



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



TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

JENNIFER EMILY ANUNCIAÇÃO SOUSA

***Alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides pteronyssinus como possíveis marcadores de
gravidade para doenças alérgicas***

Salvador, BA

2025

2025

Alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides pteromyssinus como possíveis
marcadores de gravidade para doenças alérgicas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JENNIFER EMILY ANUNCIAÇÃO SOUSA



JENNIFER EMILY ANUNCIACÃO SOUSA

**Alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e
Dermatophagoides pteronyssinus como possíveis marcadores
de gravidade para doenças alérgicas**

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 (a): Profa. Dra. Carina da Silva Pinheiro

Coorientador: Dr. Eduardo Santos da Silva

Salvador, BA

2025

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725 Sousa, Jennifer Emily Anunciação
 Alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides*
 pteronyssinus como possíveis marcadores de gravidade para doenças alérgicas/
Jennifer Emily Anunciação Sousa. – Salvador, 2025.
 70 f.: il.

 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carina da Silva Pinheiro; Coorientador: Prof.
Dr. Eduardo Santos da Silva
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2025.
 Inclui referências.

 1. Ácaros da poeira doméstica. 2. Alergia. 3. Proteínas recombinantes.
I. Pinheiro, Carina da Silva. II. Silva, Eduardo Santos da. III. Universidade
Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.97



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

TERMO DE APROVAÇÃO

A DISSERTAÇÃO:

“Alérgenos recombinantes de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus* como possível marcadores de gravidade para doenças alérgicas”

Elaborada por:

JENNIFER EMILY ANUNCIAÇÃO SOUSA

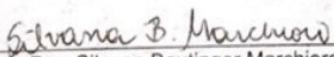
]

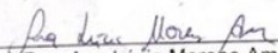
Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia como requisito parcial à obtenção do título de **MESTRE**.

Salvador, Bahia, 25 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA:


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


Profa. Dra. Silvana Beutinger Marchiori


Prof. Dra. Ana Lúcia Moreno Amor

Agradecimentos

A meus pais, **Marcia e Genivaldo**, por todo apoio em cada passo que venho tomando em minha vida, e pelo amor e carinho em todas as vezes que achei que o caminho era desafiador demais, sem vocês, nada disso seria possível. À minha irmã, **Angel**, tudo que você faz é minha alegria, obrigada por ser o meu sol e por me ensinar tanto sobre tudo. A **Daniel**, meu grande amor e melhor amigo, por ter mudado a minha vida e me ajudado a compreender que ela vale muito a pena ser vivida, principalmente ao seu lado. Obrigada por exatamente tudo, eu te amo!

Um agradecimento mais que especial à Profa. Dra. **Carina Pinheiro da Silva**. Obrigada por todo incentivo e por ter visto brilho em mim. Você sempre será uma grande referência de mulher para mim, sou muito grata por toda a sua contribuição, paciência e carinho por mim. Você é maravilhosa, só tenho a agradecer por todo esse tempo juntas.

A meu querido coorientador, Dr. **Eduardo Santos da Silva**, a luz que me guia na pesquisa, essencial em diversos momentos, por ter me ensinado a como fazer ciência, e por ter me ajudado diversas vezes quando muito precisei. Obrigada por tudo, sou muito feliz por ser sua aluna!

A **Raphael Chagas**, por ter me apoiado e me ensinado tantas coisas de maneira leve e divertida. A minha grande musa da pesquisa e melhor amiga, **Carolina Orrico**, você é minha grande alegria e indispensável na minha vida. Se hoje eu amo o que eu faço, é por sua causa. Te amo de todo meu coração e obrigada por ter sido um acontecimento icônico.

Obrigada a todos os meus amigos que fiz no LAA. Em especial **Nátale**, por ter sido meu apoio e uma grande irmã. **Vítor**, pela companhia nos experimentos que iam até tarde da noite. **João e Emílio**, por terem me feito amar ensinar e amar ser quem sou hoje. As minhas amadas e especiais alunas, **Milena e Marcela** pelo carinho, sem vocês, eu não teria crescido tanto na vida. Obrigada pelo apoio mesmo que indiretamente, aos meus amigos **Leo, Lourence, Lucas, Carol, Gabi, Felipe, Emilly, Lorena, Clara Liz, Daniel, Vitória, Andrés Jessica e Silvia** pelos momentos de descontração, alegria e ajuda em meu projeto.

À Dra **Neuza Maria Alcântara Neves**, por ter sido referência na pesquisa, criado o LAA e formado profissionais incríveis que hoje me orientam.

A **Fundação ProAR**, por terem me acolhido e ensinado que por trás de toda amostra de sangue, existe uma vida precisando de cuidado e gentileza. Obrigada por terem me proporcionado a experiência de conhecer uma equipe maravilhosa e que guardarei com carinho por toda minha jornada de pesquisa.

E por fim, a **Universidade Federal da Bahia** por ter sido a minha segunda casa e **FAPESB** pelo apoio financeiro investido nesse projeto e em mim.

*“Quanto mais estudo, mais insaciável me sinto em
relação ao meu gênio”.*

Ada Lovelace

Resumo

Introdução: As alergias aos ácaros da poeira doméstica, como *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*, representam um importante problema de saúde pública. A caracterização molecular e imunológica de alérgenos dessas duas espécies é crucial para aplicações clínicas. **Objetivos:** Expressar e purificar os alérgenos Blo t 41 e Der p 20 e comparar a reatividade IgE desses dois alérgenos em um coorte de pacientes alérgicos aos ácaros *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*. **Materiais e Métodos:** As sequências dos genes do Blo t 41 e Der p 20 foram clonadas em vetores pET21a(+) e expressas em *E. coli* BL21(DE3). Após teste de solubilidade, foi feita a purificação por cromatografia por troca iônica e exclusão por tamanho. A funcionalidade do Blo t 41 foi confirmada por ligação à quitina, rBlo t 41 e rDer p 20 passaram por um teste de estabilidade em temperatura ambiente e 4 °C com amostras periódicas coletadas e a reatividade IgE foi determinada por ELISA indireto usando 222 soros de pacientes asmáticos alérgicos. **Resultados e Conclusão:** A expressão de rBlo t 41 (13 kDa) e rDer p 20 (40 kDa) foi bem-sucedida e confirmada. No teste de estabilidade do alérgeno rDer p 20 mostrou-se termicamente estável a temperatura ambiente e a 4°C, já rBlo t 41 mostrou mais resistente a temperatura ambiente. O ensaio de ligação à quitina confirmou que rBlo t 41 é uma proteína funcional de ligação à quitina. Na análise sorológica, rBlo t 41 apresentou maior reatividade (59% em alérgicos; 18% em asmáticos alérgicos) que Der p 20 (37% e 12%, respectivamente), sendo identificado como um alérgeno majoritário de *B. tropicalis*. Der p 20 correlacionou-se fortemente com extratos de *D. pteronyssinus* em asmáticos leves. *E. coli* BL21(DE3) mostrou-se eficaz como vetor de expressão para produzir rBlo t 41 e rDer p 20 com alto rendimento. Considerando a capacidade de ligação a IgE em soros de pacientes alérgicos aos ácaros, esses alérgenos recombinantes podem ser utilizados em aplicações diagnósticas e explorados como potenciais marcadores de gravidade da doença.

Palavras-chave: ácaros da poeira doméstica, alergia, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Introduction: Allergies to house dust mites, such as *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, represent a major public health problem. Molecular and immunological characterization of allergens from these two species is crucial for clinical applications. **Objectives:** Express and purify the allergens Blo t 41 and Der p 20 and compare the IgE reactivity of these two allergens in cohorts of allergic individuals. **Materials and Methods:** The Blo t 41 and Der p 20 gene sequences were cloned into pET21a(+) vectors and expressed in *E. coli* BL21(DE3). After solubility testing, purification was performed by ion exchange and size exclusion chromatography. The functionality of Blo t 41 was confirmed by binding to chitin. rBlo t 41 and rDer p 20 underwent a stability test at room temperature and 4°C with periodic samples collected, and IgE reactivity was determined by indirect ELISA using 222 sera from allergic asthmatic patients. **Results and Conclusion:** The expression of rBlo t 41 (13 kDa) and rDer p 20 (40 kDa) was successful and confirmed. In the allergen stability test, rDer p 20 was shown to be thermally stable at room temperature and at 4°C, while rBlo t 41 was shown to be more resistant at room temperature. The chitin binding assay confirmed that rBlo t 41 is a functional chitin-binding protein. In the serological analysis, rBlo t 41 showed greater reactivity (59% in allergic subjects; 18% in allergic asthmatics) than Der p 20 (37% and 12%, respectively), identified as a major allergen of *B. tropicalis*. Der p 20 showed a strong positive correlation with the *D. pteronyssinus* extract in patients with mild allergic asthma. *E. coli* BL21 (DE3) can be used as an effective expression vector to produce rBlo t 41 and rDer p 20, with high expression yields. Considering that they showed IgE reactivity in sera from patients allergic to HDMs, these recombinant allergens could, therefore, be used in future diagnostic applications and further explored as potential markers for disease severity.

Keywords: house dust mite; allergy; recombinant protein.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AA	Asma alérgica
APD	Ácaros da poeira doméstica
Blo t	<i>Blomia tropicalis</i>
Bte	<i>Blomia tropicalis</i> extract (inglês); Extrato de <i>Blomia tropicalis</i> (português)
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CBD	<i>Chitin Binding domain</i>
cDNA	DNA complementar
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Dpe	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> extract (inglês); Extrato de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (português)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ECL	<i>Enhanced luminol</i>
FcεRI	High-affinity receptor for IgE (inglês). Receptor de IgE de alta afinidade (português).
FcεRII	Low-affinity receptor for IgE (inglês). Receptor de IgE de baixa afinidade (português).
FRAAT	<i>Risk Factors for Asthma and Allergy in the Tropics</i> (inglês); Fator de risco para asma e alergia nos trópicos (português)
FT	<i>Flow through</i>
GenBank	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i> (inglês); Iniciativa global para asma (português)
h	<i>Hours</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (inglês); Peroxidase de raiz (português).
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-13	Imunoglobulina 13
IL-4	Imunoglobulina 4

IL-5	Imunoglobulina 5
ILC2	<i>Innate lymphoid cell type 2</i> (inglês); Células linfoides inatas do tipo 2
IPTG	Isopropyl β -D-tiogalactopiranosídeo
ISAAC	<i>The International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i> (inglês); estudo internacional de asma e alergias na infância (português)
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i> (inglês); União internacional de sociedades imunológicas (português)
kDa	<i>Kilodalton</i> (inglês); Quilodalton (português)
L	Litro
LB	Luria
M	Molar
mg	Miligrama
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (inglês); Complexo principal de histocompatibilidade (português)
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MW	<i>Molecular weight</i> (inglês); peso molecular (português)
NaP	<i>Sodium phosphate</i> (inglês); fosfato de sódio (português)
nm	Nanômetros
ns	<i>No significant</i>
OD	<i>Optical density</i> (inglês); Densidade óptica (português)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (inglês); salina tamponada com fosfato (português)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Inibidor de protease
ProAR	Bahia State Program for the Control of Asthma and Allergic Rhinitis (inglês); Programa de Controle da Asma e Rinite Alérgica na Bahia (português)
RA	Rinite alérgica
Rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>

SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (inglês); Cromatografia de exclusão por tamanho (português)
sIgE	<i>Specific Immunoglobulin E</i> (inglês); Imunoglobulina E específica (português)
SPT	<i>Skin prick test</i> (inglês); Teste de punção cutânea (português)
Th2	T helper 2 (inglês); T auxiliar 2 (português)
TISIGNER	<i>Translation Initiation coding region designer</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tri a	<i>Triticum aestivum</i>
V	Volts

LISTA DE TABELAS

Table 1. Clinical characteristics of the study cohort.....	36
Table 2 - Conditions selected for standardization of the expression of recombinants Blo t 41 and Der p 20.	38

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Expression, purification and immunodetection of Blo t 41.	38
Figure 2. Expression, purification and immunodetection of Der p 20.	39
Figure 3. In vitro structural analysis of recombinants rDer p 20 and rBlo t 41.....	41
Figure 5. Sensitization frequencies to rBlo t 41 and rDer p 20 in serum samples from allergic individuals analyzed by indirect ELISA.....	45
Figure 6. Spearman's correlation between serum IgE reactivity to recombinant allergens and their corresponding mite extracts.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Ácaros da poeira doméstica (APD)	20
2.2 O ácaro dos trópicos, <i>Blomia tropicalis</i>	21
2.3 Blo t 41, o novo maior alérgeno do <i>Blomia tropicalis</i>	21
2.4 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	22
2.5 Der p 20, uma arginina quinase.....	23
2.6 Mecanismos de sensibilização e produção da IgE específica	24
2.7 Alergias respiratórias e marcha atópica	25
2.8 Diagnóstico das alergias	27
2.9 Alérgenos recombinantes	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. CAPÍTULO 1- Artigo: Serological and functional assessment of Blo t 41 and Der p 20 in allergic patients.....	30
INTRODUCTION	30
METHODOLOGY	32
Allergenic extracts	32
Synthesis and Cloning of Blo t 41 and Der p 20 Allergen Genes	32
Transformation and heterologous expression of recombinant proteins	32
Purification of recombinant proteins Blo t 41 and Der p 20.....	33
Physicochemical and immunochemical characterization of recombinant proteins.....	33
In vitro structural characterization of recombinant rDer p 20 and rBlo t 41.....	34
Study Population and Serum Samples.....	34
Indirect ELISA for detection of allergen-specific IgE	34
Evaluation of the biological activity of Blo t 41 through chitin binding assay.....	35
Statistical analysis	35
RESULTS	36
Cohort study ProAR Project.....	36

Characterization of heterologous expression and purification of rBlo t 41 and rDer p 20 proteins	37
Expression, Purification, and Immunodetection of Recombinant Allergens rBlo t 41 and rDer p 20.....	39
Chitin bead binding assay	42
Indirect ELISA for measuring sIgE in serum of mild and severe allergic asthmatic patients in a ProAR cohort.....	42
DISCUSSION	48
CONCLUSION	50
REFERENCES	50
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57
MATERIAL SUPLEMENTAR	66

1. INTRODUÇÃO

O contato com ácaros da poeira doméstica (APD) e de seus aeroalérgenos em fragmentos de poeira presentes em camas, carpetes e estofados, são um dos principais causadores da asma e rinite alérgica no mundo, onde estima-se que entre 1-2% da população mundial é sensibilizada para estes aracnídeos (Rodinkova *et al.*, 2022; Walsemann *et al.*, 2023; Yuriev *et al.*, 2023a). Essa sensibilização e as subsequentes exposições a seus alérgenos representam um significativo fator para o desencadeamento e piora dos quadros das doenças respiratórias, em particular a asma, cujos sintomas em pacientes sensibilizados correlacionam-se diretamente com os níveis de exposição domiciliar, consolidando estes ácaros como relevantes desencadeadores de alergias, e um problema de saúde global (Zuiani; Custovic, 2020; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023).

Entre as principais espécies de ácaros indutoras da resposta alérgica, podemos citar o *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), artrópode distribuído globalmente encontrado em regiões temperadas e úmidas na Europa, Ásia, Austrália e Américas (Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023). No Brasil foi observado em pacientes asmáticos níveis de sensibilização de 61,5% a este ácaro (Alcantara-Neves *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020; Zuiani; Custovic, 2020). Além do *D. pteronyssinus*, o *Blomia tropicalis* (Blo t), muito prevalente em regiões tropicais e subtropicais é considerado como o principal ácaro encontrado em domicílios de pessoas com asma e rinite alérgica (65%) na cidade de Salvador-BA (Baqueiro *et al.*, 2007; Miller, 2019; Santos Da Silva *et al.*, 2017).

O aumento prevalente das doenças alérgicas em decorrência da exposição aos diferentes tipos de alérgenos, transformou esse distúrbio não somente em uma questão socioeconômica, mas também em um problema de saúde pública mundial devido a seus impactos negativos na qualidade de vida relacionada a saúde do paciente (Hillerich *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2020). Nessa perspectiva, estima-se que aproximadamente 30% da população mundial apresente algum tipo de sintoma alérgico. Esse aumento na prevalência das doenças alérgicas está fortemente relacionado a transformações sociais que impactam os hábitos cotidianos e a qualidade de vida da população, promovendo alterações no perfil de sensibilização alérgica, tanto em países desenvolvidos quanto em nações em desenvolvimento (Alcantara-Neves *et al.*, 2017; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023). No Brasil, devido ao aumento da eficiência das políticas públicas, como o acesso à vacinação gratuita, melhorias no saneamento básico, o contato e exposição dos indivíduos com agentes infecciosos, que atuam no sistema imune através de seus mecanismos imunomoduladores nas alergias, tem reduzido (Alcantara-Neves *et al.*, 2017; Biliute *et al.*, 2024; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023; Silva *et al.*, 2020). Embora haja avanços nas condições básicas

de saúde, países em desenvolvimento ainda enfrentam altas taxas de doenças alérgicas. De acordo com dados da 1ª fase do estudo ISAAC (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), o Brasil ocupava a oitava posição mundial em incidência de asma, com destaque para a cidade de Salvador, que apresentava uma prevalência de 24,6% (Alcantara-Neves *et al.*, 2012; Mascarenhas *et al.*, 2016).

Esse cenário está diretamente relacionado a capacidade desses ácaros em causar alergias por conta da presença de alérgenos em seu corpo e até mesmo em suas fezes. Ao entrarem em contato por inalação ou diretamente com a mucosa, são reconhecidos e induzem uma resposta Th2 mediada por IgE específica, e após sucessíveis exposições, associam-se ao agravamento da asma aguda e rinite alérgica (Caraballo *et al.*, 2020a). No entanto, ainda são poucos os estudos que tenham identificado quais alérgenos estão relacionados ao surgimento dessas doenças (Caraballo *et al.*, 2020a; Dramburg *et al.*, 2023; Jacquet; Robinson, 2020; Tang, Ren-Bin, 2020; Zakzuk *et al.*, 2024). Alérgenos de *D. pteronyssinus*, como Der p 5, Der p 20 e Der p 21, têm sido associados à influência no fenótipo e na gravidade das doenças atópicas. De forma semelhante, os alérgenos Blo t 5 e Blo t 21, provenientes de *B. tropicalis*, figuram entre os principais sensibilizadores desse ácaro e estão relacionados ao desenvolvimento da asma na população estudada, evidenciando a importância da inclusão desses alérgenos em painéis moleculares voltados ao diagnóstico de doenças alérgicas (Walsemann *et al.*, 2023; Zakzuk, *et al.*, 2024).

Assim, considerando as lacunas existentes nos métodos diagnósticos para doenças alérgicas, o presente estudo visa investigar a soropositividade de IgE específica aos alérgenos recombinantes de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus*, avaliando sua prevalência da sensibilização a novos alérgenos recombinantes (rBlo t 41 e rDer p 20) e seu potencial como possíveis marcadores de fenótipos específicos da asma alérgica e de outras doenças respiratórias em uma coorte na cidade de Salvador, Bahia.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácaros da poeira doméstica (APD)

Os ácaros da poeira doméstica (0.1-0.4 mm) pertencentes ao filo Arthropoda (classe Arachnida, subclasse Acari e subordem Astigmata) são reconhecidos amplamente por serem uma grande fonte de alérgenos, destacando-se por seu potencial de desencadear reações alérgicas mundialmente (Bergmann, 2022; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023).

Os aeroalérgenos dos APD são um dos mais comuns em todo mundo, classificados em grupos com base em suas propriedades bioquímicas, função biológica e relevância clínica para diversas doenças alérgicas. Esses organismos têm alta sensibilidade a modificações do microambiente e padrões de cultivo em laboratórios (Santos da Silva *et al.*, 2019; Thomas, 2015). Mudanças globais ou regionais de temperatura, umidade, poluição do ar ou outras condições ambientais podem modificar o crescimento natural dos ácaros, sua sobrevivência e, mais importante, a produção desses aeroalérgenos (Casset *et al.*, 2012; Santos da Silva *et al.*, 2019; Thomas, 2015). Acerca do cultivo, o tipo de alimentação, condições de umidade e temperatura, e perfil de endogamia das culturas também podem impactar a produção de alguns alérgenos (Santos da Silva *et al.*, 2019).

Na família Pyroglyphidae são encontrados estes artrópodes responsáveis pela sensibilização em pacientes alérgicos, como no caso do *Dermatophagoides pteronyssinus*, um ácaro da poeira, comum em carpetes, estofados, camas e tecidos encontrado em países de clima temperado (Bergmann, 2022; Miller, 2019). Além dos ácaros da poeira doméstica, outro causador importante de alergias, é o *Blomia tropicalis*, identificado em 1970 por Bronswijk e de Cock como ácaro de armazenamento encontrado em grãos e comida, da família Glycyphagidae, muito presente no ambiente domiciliar de países de clima tropical e subtropical, e o principal agente responsável por alergias em adultos e crianças no município de Salvador, Bahia, Brasil (Alcantara-Neves *et al.*, 2017; Miller, 2019; Santos Da Silva *et al.*, 2017).

A maioria dos alérgenos de *B. tropicalis* apresenta apenas 30% a 40% de identidade de sequência com seus homólogos, demonstrando baixa reatividade cruzada de IgE e na indução de respostas imunológicas distintas em relação aos alérgenos do gênero *Dermatophagoides* (Yan Chua *et al.*, 2007). Da mesma forma, os alérgenos de *Dermatophagoides* também apresentam baixa reatividade cruzada de IgE e exibem uma imunobiologia própria (Yan Chua *et al.*, 2007). Entre as espécies desse gênero, *D. pteronyssinus* é a segunda mais relevante no município de Salvador,

sendo observadas altas taxas de co-sensibilização com *B. tropicalis* (Alcantara-Neves *et al.*, 2017).

2.2 O ácaro dos trópicos, *Blomia tropicalis*

O *B. tropicalis* é um aracnídeo de formato globular encontrado em grãos, como contaminação em alimentos processados à base de cereais (Santos Da Silva *et al.*, 2017; Zakzuk *et al.*, 2024). Além de ser originalmente associado a ambientes de armazenamento, *B. tropicalis* também foi identificado como um importante ácaro da poeira doméstica e causador de doenças alérgicas. Em países tropicais, sua presença foi detectada em mais de 90% das residências urbanas, enquanto em regiões subtropicais sua prevalência é significativamente menor, sendo encontrada em apenas cerca de 30% dos domicílios analisados (Zakzuk, 2012).

Segundo o FRAAT (*Risk Factors for Asthma and Allergy in the Tropics*) crianças podem se sensibilizar de forma precoce aos componentes moleculares desse ácaro, antes de apresentarem alguma manifestação clínica. Desde os primeiros achados sobre sua relevância alergênica, houveram muitos avanços significativos no isolamento de seus alérgenos mediante estudos genômicos e proteômicos, evidenciando a relevância da identificação tanto dos alérgenos principais quanto daqueles associados com o desenvolvimento das doenças alérgicas (Santos Da Silva *et al.*, 2017; Santos da Silva *et al.*, 2019; Zakzuk *et al.*, 2024; Zakzuk, 2012).

2.3 Blo t 41, o novo maior alérgeno do *Blomia tropicalis*

Segundo *Allergen Nomenclature*, até o momento, existem apenas dois registros de alérgenos pertencentes ao grupo 41: Tri a 4, um alérgeno do *Triticum aestivum*, e recentemente, o Blo t 41, um alérgeno de *B. tropicalis*, sendo o primeiro e único identificado, até o momento, entre os ácaros da poeira doméstica (allergen.org). Para os ácaros, o grupo 41 pode se referir aos alérgenos ligantes de quitina, segundo biopolímero mais abundante na natureza presente em importantes fontes de alérgenos (Zakzuk, 2012).

Dentre os importantes alérgenos encontrados em *B. tropicalis*, através de uma nova análise genômica, Blo t 41 foi descrito como uma possível proteína de ligação à quitina com um domínio de ligação à quitosana (domínio de ligação à quitina tipo 2) ainda não bem elucidado, com tamanho teórico de 14 kDa, apresentando elevado nível de sensibilização em indivíduos alérgicos

a ácaros e demonstrando potencial para aplicação no diagnóstico de doenças alérgicas (Luo *et al.*, 2024; Xiong *et al.*, 2024).

Na bioquímica, a proteína ligante de quitina tem o papel crucial na formação, remodelamento e manutenção da matriz de quitina, ajudando na organização, fortalecimento da matriz extracelular na estrutura e biogêneses nos tecidos formados por quitina no exoesqueleto de insetos, crustáceos, e em partes bucais de moluscos, além de função estrutural, essas proteínas tem papeis de defesa contra patógenos, ao se ligarem na parede de patógenos (Heymann *et al.*, 2021). No entanto, apesar da nova descoberta, pouco se sabe sobre a sua exata função na biologia nos ácaros, apontando a necessidade de novos estudos para compreender sua função bioquímica e seu papel na alergia.

2.4 *Dermatophagoides pteronyssinus*

A espécie *D. pteronyssinus*, ácaro da poeira doméstica encontrado globalmente em regiões de clima temperado, tropical e subtropical, é reconhecido como um dos principais agentes sensibilizadores e principal gatilho responsável pelo desenvolvimento das doenças respiratórias e dermatites. Essa capacidade está associada à presença de fontes potentes de alérgenos tanto em seu corpo quanto em seus pellets fecais (Biliute *et al.*, 2024; Forchert *et al.*, 2022; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023). Um total de 35 alérgenos para *D. pteronyssinus* foram identificados e são aceitos pela IUIS (*International Union of Immunological Societies*), sendo os alérgenos clássicos de importância clínica os do grupo 1, 2 e 23 que estão associados com asma alérgica, rinite alérgica e dermatite atópica (Muddaluru *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2020).

Entre os diversos grupo de alérgenos de ácaros já existentes, Der p 1 foi o primeiro encontrado entre os ácaros da poeira doméstica. Esse alérgeno demonstrou uma frequência maior que 80% de ligação de IgE, apresentando níveis de IgE específica significativamente altos em crianças asmáticas em comparação as não asmáticas. A presença do anticorpo IgE anti-Der p 1 em idades abaixo de 5 anos constitui um fator de risco para o desenvolvimento de asma. Outro importante alérgeno identificado foi o Der p 2, com uma frequência de IgE maior que 90%, em pacientes alérgicos, em particular asmáticos, apresentando altos níveis de IgE específicos (Caraballo *et al.*, 2020b).

2.5 Der p 20, uma arginina quinase

Identificada pela primeira vez em mariposas da espécie *Plodia interpunctella* e posteriormente isolado e expresso como proteína recombinante, a arginina quinase desempenha um papel importante como agente sensibilizador e causador das alergias. Na bioquímica, é responsável pela garantia da manutenção da energia celular nos invertebrados, catalisando a transferência do fosfato entre fosfosonagina e adenosina difosfato para o fornecimento de trifosfato de adenosina para a contração muscular (Sarzsinszky *et al.*, 2021). Nos ácaros, as argininas quinases pertencem ao grupo 20, de tamanho molecular teórico de 40 kDa, com sequência altamente conservada em alguns invertebrados com 80% de homologia nos crustáceos, 75% em insetos e 45% em enzimas de mamíferos (Bessot; Pauli, 2011). Além disso, compreende os panalérgenos, conceito que abrange a família de proteínas alergênicas que compartilham de sequências com regiões, estruturas e funções altamente conservadas, que permitem o reconhecimento cruzado da IgE entre alérgenos não relacionados, como as argininas quinases, tropomiosinas, profilinas, polcalcinas e proteínas não específicas de transferências de lipídeos (nsLTPs) (Hauser *et al.*, 2010; Sarzsinszky *et al.*, 2021).

Identificada como um alérgeno e caracterizada como uma arginina quinase, segundo Sarzsinszky e colaboradores (2021), Der p 20 é um aeroalérgeno encontrado principalmente no corpo do *D. pteronyssinus*, com reatividade de IgE de 30% em pacientes alérgicas ao ácaro e associado a sintomas asmáticos e problemas respiratórios (Hauser *et al.*, 2010; Sarzsinszky *et al.*, 2021). Apesar da baixa reatividade de IgE específica, sua sensibilização pode ser um grande problema, pois leva ao risco de desenvolvimento de múltiplas sensibilizações por ser um panalérgeno (Hauser *et al.*, 2010).

Análoga à creatina quinase em mamíferos, com função na garantia de energia muscular, o Der p 20 também demonstrou-se ser um alérgeno importante associado a pacientes com dermatite atópica, cujos pacientes com altos níveis de IgE ao Der p 20 exibiam quadros graves de eczema atópicos com mais frequência em comparação aos que reagem mais baixos, sugerindo correlação do alérgeno como um possível marcador para formas mais severas de dermatite atópica, porém apesar dos achados, pouco se sabe sobre o seu potencial alergênico na população brasileira (Thomas, 2015; Walsemann *et al.*, 2023).

2.6 Mecanismos de sensibilização e produção da IgE específica

As doenças alérgicas referem-se ao mecanismo de hipersensibilidade do tipo I ou imediata, em resposta a uma proteína ou produto químico associado a uma proteína que afetam as vias aéreas superiores e inferiores, olhos, pele e, ocasionalmente, circulação sanguínea (Dramburg *et al.*, 2023; Jutel *et al.*, 2023). Para que este tipo de resposta imune se inicie e desencadeie as doenças alérgicas, existem diversos alérgenos clássicos que podem ser citados como pólenes (árvores, ervas daninhas e gramíneas), esporos de mofo, pêlos de animais, saliva e urina por exemplo de cães, gatos, hamsters, baratas, venenos de animais, alimentos (por exemplo, amendoins, frutos do mar, leite, ovos, soja, trigo, frutas, vegetais) e ácaros da poeira doméstica (Jutel *et al.*, 2023; Santos Da Silva *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020).

Os mecanismos que precedem o processo alérgico são iniciados através da fase de sensibilização, cujos alérgenos passam as junções intercelulares do epitélio nasal ou de mucosa, que ativam o epitélio para o recrutamento de células dendríticas imaturas, quando entram em contato com o alérgeno. Quando ativadas, a migração das células dendríticas é auxiliada pela interleucina 13 (IL-13) produzida pelas células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) e pela interleucina 4 (IL-4) produzidas pelos basófilos, que se encaminham para o paracórtex dos linfonodos, apresentando peptídeos derivados do alérgeno às células T *naïves*, por via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. Dentro da zona intermediária, as células T se diferenciam e se ativam para um perfil de células Th2, produzindo citocinas como IL-4 e IL-13 que promovem a troca de classe da imunoglobulina das células B resultando a produção final da IgE específica contra o alérgeno. Quando produzidos, esses anticorpos, circulam através dos vasos linfáticos, posteriormente atingindo a corrente sanguínea, estando presentes de forma sistêmica para se ligarem aos receptores de alta afinidade (FcεRI) dos mastócitos, basófilos, e de baixa afinidade (FcεRII) de eosinófilos (Jutel *et al.*, 2023; Thomas, 2015; Zhang *et al.*, 2025).

Após um segundo contato com o alérgeno, as células efectoras, como basófilos e mastócitos, que foram sensibilizadas com as IgEs específicas ligadas a seus receptores FcεRI de alta afinidade reconhecem o mesmo alérgenos (*cross-linking*) resultando em uma cascata de sinalização, culminando na ativação e degranulação das células efectoras junto a liberação de diversos mediadores inflamatórios. O processo de degranulação libera mediadores pré-armazenados, como histamina, heparina, proteases e algumas citocinas, como prostaglandinas, leucotrienos e nucleotídeos de adenosina. Com a degranulação e liberação dos mediadores, os sintomas característicos de uma reação alérgica é desenvolvida, como vasodilatação, aumento da

permeabilidade vascular, contração do músculo liso, estimulação dos nervos sensoriais e produção de muco, e em casos onde há a exposição frequente ao mesmo alérgeno, ocorre uma inflamação pulmonar crônica, aumento acentuado na produção de muco, fibrose e o remodelamento das paredes brônquicas (Jutel *et al.*, 2023; Thomas, 2015).

2.7 Alergias respiratórias e marcha atópica

As alergias referem-se ao fenômeno de hipersensibilidade imediata ou hipersensibilidade tipo I, com sua terminologia utilizada para uma reação anormal ou exagerada inesperada a um estímulo exógeno que envolve o sistema imunológico (Jutel *et al.*, 2023). Dentre as doenças alérgicas que mais afetam as vias aéreas associadas a uma hipersensibilidade imediata, podem-se destacar a asma alérgica e a rinite alérgica. Estima-se que quase 340 e 400 milhões de pessoas mundialmente sofrem de asma e rinite alérgicas, sendo assim, as duas doenças respiratórias mais comuns, crônicas e de grande impacto na saúde e qualidade de vida (Pulido-Guillen *et al.*, 2023).

Além da crescente prevalência das doenças alérgicas, outro fenômeno crítico é a marcha atópica, um conceito que descreve a progressão natural e sequencial de diferentes alergias em uma mesma pessoa, em especial durante a infância (Mrkić Kobal *et al.*, 2023). É entendido que esse marco ocorre devido às evidências epidemiológicas que envolvem fatores como a exposição à ácaros, também como outras fontes alergênicas, assim como predisposição genética, que quando associados proporcionam o desenvolvimento da dermatite atópica durante a infância, seguida do surgimento da rinite e asma alérgica no decorrer da vida do indivíduo (Mrkić Kobal *et al.*, 2023; Tang, Xin; Li, 2024).

Das manifestações da marcha atópica, a rinite alérgica (RA) é uma doença inflamatória que afeta as vias aéreas superiores mediada por uma resposta de hipersensibilidade do tipo I (Czech; Overholser; Schultz, 2023). Clinicamente, caracteriza-se pelos sintomas clássicos de espirros constantes, rinorreia e congestão nasal, podendo ser de caráter sazonal ou perene com diferentes gravidades a depender do tipo de gatilho que favorece o surgimento da alergia (Wise *et al.*, 2023). É uma doença que afeta de 10 a 30% adultos, sendo que, em crianças, 74 a 81% dos casos diagnosticados com asma alérgica já manifestam precocemente os primeiros sintomas de rinite (Mrkić Kobal *et al.*, 2023).

A rinite apresenta uma relação estabelecida com a asma alérgica, doença esta que marca o elo final da marcha atópica em muitos pacientes (Yang; Fu; Zhou, 2020). A prevalência mundial da asma, tem atingido números preocupantes afetando quase 262 milhões de pessoas, com

estimativa de 461.000 mortes anualmente (Vos *et al.*, 2020). A asma é um distúrbio crônico inflamatório das vias aéreas inferiores, acompanhada de sintomas como tosse, opressão torácica, sibilos e falta de ar, resultantes de uma inflamação pulmonar acompanhada pela produção de muco, hiperresponsividade dos brônquios e remodelamento das paredes brônquicas (Hammad; Lambrecht, 2021; Pauli *et al.*, 2023).

As classificações de gravidade de asma usam os seguintes critérios: para asma ser considerada leve, deve estar bem controlada com tratamentos de baixa intensidade e que não interfere nas atividades diárias ou sono. Para uma asma moderada, são necessários o uso de medicações de média dose de corticoides inalados e quando as atividades diárias são afetadas ou a presença de sintomas mais frequentes, mas ainda é controlável com o tratamento adequado. Já para uma asma ser considerada grave, é quando mesmo com o uso diário de altas doses de corticoides inalados beta-2-agonistas de ação prolongada ou medicamentos para evitar o agravamento não consegue ser controlada e necessitam de terapias especializadas para o controle dos sintomas (Global Initiative for Asthma, 2025).

A asma apresenta diversos fenótipos, sendo classificada entre asmáticos alérgicos e não alérgicos. A asma alérgica (AA) frequentemente ocorre na infância, mas alguns podem desenvolvê-la tardiamente, é tipicamente diagnosticada com base em sintomas desencadeados pela exposição a alérgenos e a alergia pode ser confirmada por teste cutâneo ou medindo no soro a presença da IgE (Gerday *et al.*, 2022). Esse fenótipo é classicamente oposto à asma não alérgica, onde os desencadeantes de obstrução das vias aéreas eram mais frequentemente considerados infecciosos ou poluentes, de início tardio e geralmente mais grave e menos associada às alergias (Gerday *et al.*, 2022; Hammad; Lambrecht, 2021).

Seu diagnóstico é realizado através da histórico dos sintomas e através das evidências de limitação variável do fluxo expiratório, que deve ser documentado através de testes de responsividade brônquica ou por testes de função pulmonar, além de outras avaliações para confirmação da asma ou exclusão de outros gatilhos para sintomas respiratórios. Além do diagnóstico, é classificada com base na gravidade, controle e resposta ao tratamento, sendo incluída a categoria leve, moderada e grave (Global Initiative for Asthma, 2025).

2.8 Diagnóstico das alergias

Alinhadas com uma anamnese criteriosa realizada por um médico, o diagnóstico preciso das alergias baseiam-se na corroboração de testes *in vivo* ou *in vitro* para determinar a sensibilização por IgE (Zakzuk, Josefina, 2012).

Utilizada como ferramenta mais comum e confiável, o teste cutâneo de puntura (SPT) é um dos principais métodos de triagem para alergias que envolve a aplicação de pequenas quantidades de alérgenos específicos sob a pele, que embora segura, é um teste que apresenta limitações, como a possibilidade de falsos positivos e contraindicado para pacientes com dermatite atópica grave (Justo *et al.*, 2016; Zakzuk, Josefina, 2012).

Além do teste de puntura, outro método de diagnóstico é a medição sorológica da IgE específica, que diferente da aplicação direta do alérgeno na pele, esse teste mede a quantidade de IgE específica para um determinado alérgeno utilizando apenas uma amostra de soro do paciente alérgico, como no caso do ensaio de ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific/Phadia, Up-sala, Sweden) que utiliza uma fase sólida para fixar um alérgeno específico para detecção da IgE específica para quantificação precisa dos níveis de IgE no soro do paciente (Van Hage; Hamsten; Valenta, 2017).

2.9 Alérgenos recombinantes

Alérgeno é qualquer molécula capaz de gerar uma resposta IgE específica e celular mediadas por este anticorpo. São um grupo de moléculas que não compartilham estrutura ou mecanismo biológico em comum, sendo geralmente associado a alergenicidade, porém alguns alérgenos, devido algumas propriedade biológicas, proporcionam a sensibilização e resposta alérgica, como no caso dos aeroalérgenos (Zakzuk, Josefina, 2012). Os aeroalérgenos são compostos proteicos consideravelmente pequenos, solúveis em água, característica esta que permite a dispersão facilitada no muco e nas membranas basais do epitélio até os linfonodos regionais, que desencadeiam uma resposta imune (Fernandes, 2022; Jutel *et al.*, 2023).

A produção dos alérgenos na forma de proteínas recombinantes tem se mostrado uma técnica muito promissora para o ramo da alergologia na prática clínica, pois graças aos avanços tecnológicos de clonagem e sequenciamento de proteínas alergênicas, muitas destas moléculas agora podem ser purificadas e obtidas em quantidades significativas, algo que seria difícil de se obter por abordagens de fontes naturais (Dramburg *et al.*, 2023; Zakzuk, 2012).

Uma boa caracterização molecular para a produção dessas proteínas é algo muito importante, uma vez que, é indispensável avaliar sua semelhança com a molécula natural levando em conta os aspectos físico-químicos, biológicos, estruturais. Além da caracterização imunológica que necessita de pesquisas que vão além da avaliação sorológica de IgE, é essencial a relevância epidemiológica em uma população específica e a reatividade cruzada com outros alérgenos, pois nos dão informações cruciais para sua inclusão ou não em painéis para uso diagnóstico no caso de medicina personalizada ou até mesmo para avaliação de biomarcadores para doenças específicas (Vrtala; Huber; Thomas, 2014; Zakzuk, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a soropositividade de IgE específica aos alérgenos recombinantes de *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* como possíveis marcadores para doenças alérgicas numa coorte da cidade de Salvador, Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar a síntese dos genes codificadores dos alérgenos Blo t 41 e Der p 20 para clonagem em vetor de expressão bacteriano.
2. Padronizar a expressão recombinante e purificação dos alérgenos recombinantes utilizando diferentes linhagens de *Escherichia coli*.
3. Caracterizar molecularmente o Blo t 41.
4. Determinar a reatividade de IgE do rBlo t 41 e rDer p 20 em soro de pacientes com doenças alérgicas.
5. Associar a soropositividade aos alérgenos com sintomas e gravidade das doenças alérgicas.

4. CAPÍTULO 1- ARTIGO: SEROLOGICAL AND FUNCTIONAL ASSESSMENT OF BLO T 41 AND DER P 20 IN ALLERGIC PATIENTS

Serological and functional assessment of Blo t 41 and Der p 20 in allergic patients

Jennifer Emily Anunciação Sousa ^{1,2} ; Carolina Orrico Melo Ferreira de Jesus ^{1,2} ; João Vitor Borges Rios ¹ ; Paulo Emilio de Oliveira Cruz ¹ ; Lorena Miranda Souza ^{1,2} ; Nátae Cardoso Sena ¹ ; Vítor Lima Miranda Melo ¹ ; Jessica Cristiane Conceição de Andrade ^{1,2} ; Raphael Chagas Silva^{1,2} ;Alvaro Cruz ³ ; Eduardo Santos da Silva ^{1,2} ; Carina da Silva Pinheiro ^{1,2} .

¹Laboratório de Alergia e Acarologia – LAA, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia;

²Programa de pós-graduação em Imunologia –PPGIIm;

³ ProAR foundation Universidade Federal da Bahia

INTRODUCTION

Sensitization to house dust mite allergens is an issue that, regardless of gender, age, or ethnicity, impacts global health, driven by direct and indirect costs involving treatment and hospitalizations. It is estimated that approximately 65–130 million people are allergic to house dust mites, with associated mortality rates worldwide primarily in low-income regions with limited access to health services (Cardona-Villa *et al.*, 2022; Dey; Saha; Podder, 2019; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023; Luo *et al.*, 2024, p. 41; Santos Da Silva *et al.*, 2017; Walsemann *et al.*, 2023).

House dust mites refer to species found in household dust environments and storage mites (Luo *et al.*, 2024). In tropical and subtropical countries, *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* are the two main species that coexist and play fundamental roles in sensitizing and worsening allergic conditions, the symptoms of which are directly correlated with levels of household exposure, consolidating these arthropods as relevant triggers of allergies (Zuiani; Custovic, 2020; Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023).

According to the World Health Organization (WHO) and the International Union of Immunological Societies (IUIS), responsible for the systematic classification of allergens into groups, to date, 35 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and 26 from *Blomia tropicalis* have been officially recognized. Among these, groups 1 and 2 stand out as the main sensitizing agents in the Americas and Europe, followed by group 23 from *D. pteronyssinus* (Wong *et al.*, 2017; Yuriev *et al.*, 2023b). However, these allergens are less relevant in allergic

responses to *B. tropicalis*, where proteins such as Blo t 5 and Blo t 21 emerge as the main allergens, demonstrating greater reactivity to IgE (Da Silva; Aglas; *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2017, p. 5; Zakzuk, J *et al.*, 2024).

Notably, currently available allergen extracts have significant compositional limitations. Although standardized primarily for *D. pteronyssinus* allergens, these extracts still do not include all relevant components of this mite, with essential allergens present in suboptimal concentrations, and the complete neglect of critical allergens from *B. tropicalis* (Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023; Luo *et al.*, 2024a; Martínez *et al.*, 2018; Santos da Silva *et al.*, 2019; Yuriev *et al.*, 2023b).

Currently, there are few studies that attempt to associate the presence of allergens from these mites with the severity of allergic diseases, and there is a lack of information on the reactivity profiles of patients exposed to allergens that have not been molecularly characterized (Biliute *et al.*, 2024, p. 23; Luo *et al.*, 2024; Pinheiro *et al.*, 2021; Santos Da Silva *et al.*, 2017; Walsemann *et al.*, 2023; Zakzuk, J *et al.*, 2024).

Among the main allergens studied from *D. pteronyssinus*, Der p 20, an arginine kinase, has stood out for its potential as a possible biomarker for allergic asthma and atopic dermatitis in allergic populations in Europe (Sarzsinszky *et al.*, 2021; Walsemann *et al.*, 2023). However, its sensitization profile in the Brazilian population remains poorly explored, representing a critical gap in epidemiological studies. At the same time, the recently identified Blo t 41—a chitin-binding domain type 2 (CBM2) protein—emerges as a major allergen in Asian studies (Luo *et al.*, 2024; Xiong *et al.*, 2024). Despite its recognized clinical importance, evidenced by high rates of sensitization in allergic patients, fundamental aspects of its structure and function remain unclear, as does its potential applicability in diagnostics for tropical populations.

In this context, advances in recombinant DNA technology have provided strategic alternatives to overcome the limitations of conventional natural extracts, enabling the selection of specific allergens and more detailed investigation of their structural, molecular, and immunological characteristics. Therefore, this study aims to further explore potential markers for allergies (rBlo t 41 and rDer p 20), determine which of these allergens could be potential markers of specific phenotypes for allergic asthma and other respiratory diseases, and perform, for the first time, the biochemical characterization, via chitin binding assay, of the new major allergen of *B. tropicalis*, Blo t 41.

METHODOLOGY

Allergenic extracts

The mite biomass of *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus* used for extract preparation was produced in-house by the Laboratory of Allergy and Acarology (LAA- UFBA) and stored at -20 °C. The biomass were weighed, solubilized in 15 mM buffered saline solution (PBS 1X), pH 7.4 with protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific) and lysed by sonication (Waring Commercial, Torrington, Connecticut, USA). The samples were centrifuged at 13,000g for 40 minutes at 4 °C, after which the supernatants were collected, aliquoted, and quantified using the Bradford assay to determine protein concentrations, and ELISA was used to quantify the major allergen Blo t 5. The samples were then stored at -70°C.

Synthesis and Cloning of Blo t 41 and Der p 20 Allergen Genes

The cDNA sequences of the Blo t 41 (OQ285961.1) and Der p 20 (EU684970.1) genes approved by the International Union of Immunological Societies (www.allergen.org) were obtained through GenBank/NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and their sequences were optimized through the Translation Initiation coding region designer (TISIGNER) for better expression in *E. coli* and cloned into a plasmid expression vector pET21a(+) with ampicillin resistance through specialized company (www.fastbio.com.br).

Transformation and heterologous expression of recombinant proteins

The pET21a(+) vectors containing the *Blo t 41* and *Der p 20* genes were transformed into competent *E. coli* BL21 (DE3) cells using a calcium chloride/heat shock method. After transformation, colonies were selected and cultured in LB medium supplemented with glycerol, ammonium sulfate, magnesium sulfate, and sodium phosphate buffer (1 M, pH 7.4). Protein expression was induced with 1 mM IPTG at different OD₆₀₀ values (0.3, 0.5, and 1.0), and incubated at 37 °C, 220 rpm for 2, 4, or 16 hours.

SDS-PAGE (15% for rBlo t 41 and 12% for rDer p 20) confirmed recombinant expression, with optimal conditions determined as OD₆₀₀ = 0.5 and 4 h for rBlo t 41, and OD₆₀₀ = 1.0 and 2 h for rDer p 20. These parameters were scaled up to 1 L cultures. Cells were harvested (4,000 g, 20 min, 4 °C), lysed in denaturing buffer (6 M urea), and disrupted by sonication. Soluble protein

fractions were collected by centrifugation (13,000 g, 40 min, 4 °C), and protein expression and solubility were confirmed by the presence of bands at ~13 kDa (rBlo t 41) and ~40 kDa (rDer p 20).

Purification of recombinant proteins Blo t 41 and Der p 20

Following solubility testing, recombinant proteins were purified by anion Exchange chromatography using a 5 mL HiTrap Q HP column (Cytiva Marlborough, MA, USA) to obtain a partially purified fractions. The eluates were then dialyzed using 8 kDa cutoff membranes in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) for rBlo t 41 and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.5) for rDer p 20. After dialysis, samples were concentrated using filters with 10 kDa and 30 kDa molecular weight cutoffs (Vivaspin) for rBlo t 41 and rDer p 20, respectively. Subsequently, the concentrated proteins were further purified by size exclusion chromatography using a Superdex™ 75 Increase 10/300 GL column. This purification strategy followed previously established protocols for non-tagged recombinant proteins (Da Silva; Aglas; *et al.*, 2020; Da Silva; Huber; *et al.*, 2020).

Purity and molecular weights were evaluated by SDS-PAGE at 15% for rBlo t 41 and 12% for rDer p 20. Selected fractions containing the purified recombinant proteins were pooled, and total protein concentrations were quantified using the Qubit Protein Assay (Thermo Fisher Scientific).

Physicochemical and immunochemical characterization of recombinant proteins

Recombinant proteins rBlo t 41 and rDer p 20 were characterized by SDS-PAGE and Western blot. Electrophoresis was performed under reducing conditions using 4–15% SDS-polyacrylamide gels. Samples were denatured in 1× Laemmli buffer containing β -mercaptoethanol, heated at 100 °C for 5 minutes, and loaded onto the gels. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, briefly heated, incubated on a horizontal shaker, and destained with water to visualize protein bands.

For immunodetection, purified proteins were transferred from SDS-PAGE (15%) to nitrocellulose membranes at 20 V for 40 minutes. Membranes were stained with Ponceau Red to confirm protein transfer, then blocked overnight at 4 °C in PBS-Tween containing 5% non-fat milk. After blocking, membranes were incubated for 16 hours at 4 °C with pooled human sera (1:5 dilution) from patients allergic to *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus*. After washing, membranes were incubated with HRP-conjugated anti-human IgE antibody (1:1000) for 1 hour

at room temperature. Signal detection was performed using ECL substrate (Sigma-Aldrich), and chemiluminescence was captured with an ImageQuant LAS 500 system.

In vitro structural characterization of recombinant rDer p 20 and rBlo t 41

Stability analyses were performed using measurement parameters already standardized by the laboratory (Da Silva; Huber; *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2023). For structural stability analysis, the purified recombinant allergens rBlo t 41 and rDer p 20 were stored in their respective buffers at 4 °C for 0, 3, 7, 14, and 21 days, as well as at room temperature for 0, 3, 6, 12, 24, and 48 hours. Samples were collected at these different times for SDS-PAGE analysis, and the results were processed by densitometry using ImageJ Version 1.54p software.

Study Population and Serum Samples

This study analyzed sera from 83 individuals aged 18–25 years from Salvador, Brazil, including 53 allergic (clinical history and positive SPT and sIgE to *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus*) and 30 non-allergic donors. Samples were obtained from the serum bank of the Allergy and Acarology Laboratory (UFBA), under ethical approval CAAE 45376814.0.0000.5577. Additionally, sera from 40 individuals adults (30 allergic, 10 non-allergic; aged 25–32 years) from Villavicencio, Colombia were included, collected with approval 50.100.2.249 from the University of Llanos. A broader Brazilian cohort from the Asthma Control Program (ProAR) was also included, comprising 222 allergic asthmatic patients (139 mild, 83 severe) and 77 healthy individuals non-allergic and controls, aged 18–73 years. All participants were from Salvador, with negative stool parasitology tests to avoid IgE cross-reactivity (Fitzsimmons; Falcone; Dunne, 2014), and ethical clearance under the ProAR project 25000.013834/2010-96.

Indirect ELISA for detection of allergen-specific IgE

Indirect ELISA was performed to assess IgE reactivity to recombinant allergens, following protocols adapted from Carvalho *et al.* (2013a). High-binding 96-well half-area microplates (Corning, NY, USA) were coated with 6.25 µg/mL of each recombinant allergen (in duplicate) in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated for 16 h at 4 °C. Extracts of *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus* were included as positive controls. Plates were blocked with PBS-Tween 0.05% supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) for 12 h at 4 °C.

Serum samples were diluted 1:5 in PBS-Tween containing 2.5% FBS and incubated (25 μ L/well) for 12–18 h at 4 °C. Non-allergic individuals were used as negative controls, and the cutoff for IgE positivity was defined as the mean optical density (OD) of negative controls plus two standard deviations.

After incubation, wells received 25 μ L of HRP-conjugated anti-human IgE (1:1000) and were incubated for 1 hour. Detection was performed using 25 μ L/well of citrate phosphate buffer with TMB (0.1 mg/mL) and 30% hydrogen peroxide. Plates were incubated in the dark at room temperature, and the reaction was stopped with sulfuric acid (H₂SO₄). Absorbance was measured at 450 nm using a Multiskan Go microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Evaluation of the biological activity of Blo t 41 through chitin binding assay

The chitin binding assay was performed to evaluate the biological activity of recombinant Blo t 41 following the manufacturer's protocol. Briefly, 338 μ g of rBlo t 41 were incubated with 100 μ L of chitin beads on an orbital shaker for 1 hour at 4 °C. The unbound fraction was removed using a magnetic rack, and the beads were washed three times with buffer containing 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.05% Tween 20 (pH 8.0).

Subsequently, bound proteins were eluted with 100 μ L of elution buffer by overnight incubation at 4°C under gentle agitation. After separation of the beads, the supernatant containing the eluted protein was mixed with Laemmli buffer and analyzed by 15% SDS-PAGE.

Statistical analysis

Differences in sensitization patterns (Based on ImmunoCAP results), clinical symptoms and disease severity were compared between patients positive and negative for recombinant allergens rBlo t 41 and rDer p 20. Correlation between specific IgE levels to recombinant allergens and corresponding mite extracts (*B. tropicalis* and *D. pteronyssinus*), were assessed using non-parametric Spearman correlation test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), and results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Cohort study ProAR Project

222 asthmatic patients were recruited for research, in addition to the SPT, the allergy was confirmed through the ImmunoCAP test with the kits D201 - *Blomia tropicalis* and D1 - *Dermatophagoides pteronyssinus*, to define positivity, the cutoff point suggested by the manufacturer, 0.35, was used. For a complete epidemiological description of the cohort of individuals belonging to the project “Fatores de risco, biomarcadores e endofenotipos da asma grave (2012-2015) ("Caso-controle")”, of the Asthma and Allergic Rhinitis Control Program in Bahia (ProAR) were included in an epidemiological table (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of the study cohort

Variables	Mild Asthma (n = 139)	Severe Asthma (n = 83)	p
Male -N (%)	42 (30)	17 (20)	
Female -N (%)	97 (70)	66 (80)	
Age (years) - median (IQ range) ^c	31/0,952 (18-73)	45/1,360 (19 - 70)	< 0,0001
Total IgE - median (IQ range) ^c	395,78 / 59,14 (16,21-3000)	416 / 77,37 (32 - 3000)	1
Positive SPT ^c - N (%)	138 (99)	81 (98)	< 0,0001
Rhinitis diagnosis - N (%)	129 (93)	80 (96)	
Blood eosinophil count cells/mm ³ -median (IQ range) ^c	309 / 2301 (36 - 2467)	256 / 32,7 (49 - 1518)	1
Blood eosinophil > 260 cells/mm ³ - N (%)	84 (60)		
FEV1 percent of predicted value post-BD - median (IQ range) ^c	86% (51,15 - 120,99)	72% (33 - 106,11)	1
FVC percent of predicted value post-BD - median (IQ range) ^c	88% (52,87 - 119,47)	86% (56 - 115,97)	1
FVE1/FVC post-BD - median (IQ range) ^c	0,84%/0,008 (0,053-1)	0,65% / 0,01168 (0,43 - 0,99)	0,04
Age of asthma onset - median (IQ range) ^c	5 / 1.32 (1-81)	6 / 1,36 (19 - 40)	< 0,0001
Use of > 880 µg of inhaled Fluticasone/day – N (%)		25 (30)	
Use of inhaled Beta-2 agonists/day – N (%)		75 (90)	
Exacerbation/year (one or more times)		1 / 0,275 (0 - 12)	
Hospitalization/year (one or more times)		0 / 0,048 (0 - 1)	
Uncontrolled asthma ^D – N (%)	87 (62)	74 (89)	< 0,0001
Use of > 880 µg of Fluticasone/day – N (%)		21 (25)	
Use of > 880 µg of Beclometasona/day – N (%)		28 (33)	
Use of > 880 µg of Formoterol/day – N (%)	1 (0,7)	57 (69)	< 0,0001
Use of > 880 µg of Salmeterol/day – N (%)		22 (27)	
Use of > 880 µg of Mometasona/day – N (%)		2 (2,4)	
Use of > 880 µg of Ciclesonida/day – N (%)			

c,d – According to GINA criteria

Characterization of heterologous expression and purification of rBlo t 41 and rDer p 20 proteins

The heterologous expression of the recombinant proteins rBlo t 41 and rDer p 20 in *E. coli* BL21 (DE3) was confirmed by SDS-PAGE, with protein bands corresponding to their predicted molecular weights approximately 13 kDa for rBlo t 41 and 40 kDa for rDer p 20.

As shown in Figure 1A, the optimal expression condition for rBlo t 41 was observed at $OD_{600} = 0.5$ with 4 hours of induction, where the intensity of the corresponding band was highest. The solubility assay, confirming that rBlo t 41 was predominantly recovered in the insoluble fraction (Figure 1A well 5). The chromatogram of anion exchange chromatography (Figure 1B) and the final purified protein (Figure 1E) confirming the presence of a single band at ~13 kDa.

For rDer p 20, the best expression was obtained at $OD_{600} = 1.0$ with 2 hours of induction, (Figure 2A). Solubility analysis indicated that the recombinant protein was recoverable under denaturing conditions (Figure 2A well 5). The anion exchange chromatogram (Figure 2B) and purified protein fraction (Figure 2D well 3) confirmed the successful purification of rDer p 20, with a major band at ~40 kDa.

These optimized conditions were subsequently used for large-scale expression and purification of both recombinant allergens using the *E. coli* BL21 (DE3) system.

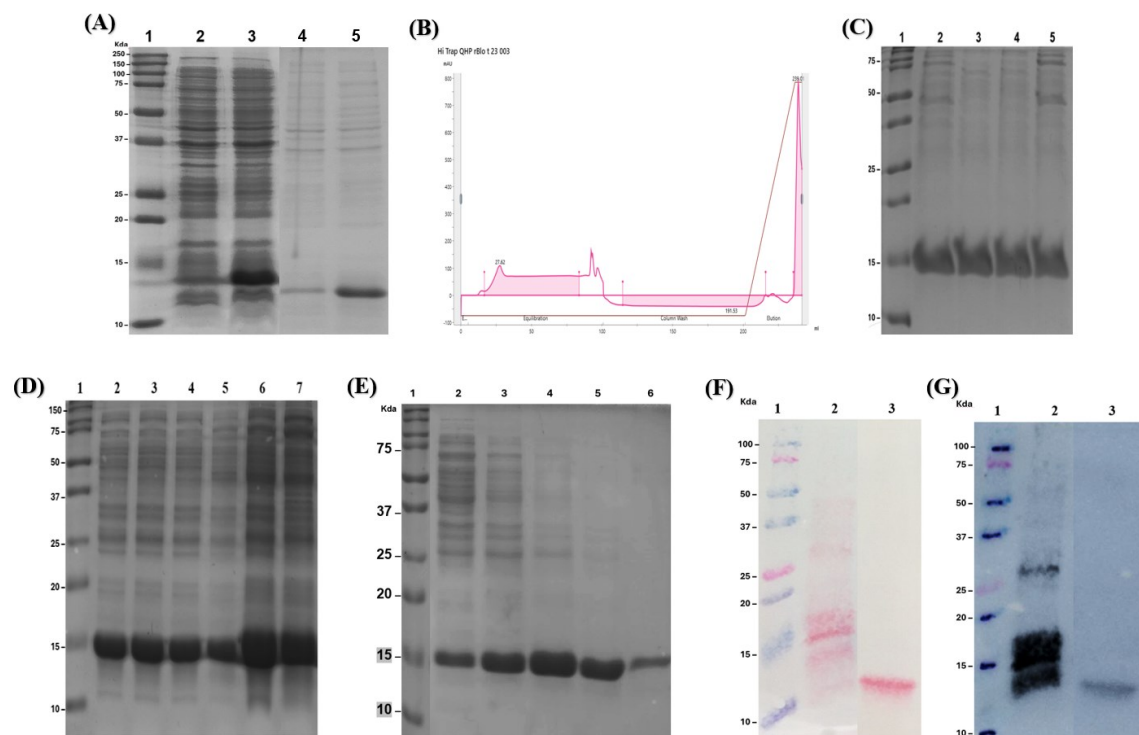


Figure 1. Expression, purification and immunodetection of Blo t 41. (A): Transformation into *E. coli* heterologous expression: 1 – MW molecular weight standard. 2 – Before IPTG induction, 3 – 4h of expression. 4 – Soluble proteins 5 - Insoluble proteins. (B) Chromatogram of anion exchange purification (C) Purification of the recombinant protein. 1 – MW molecular weight standard, 2 – Blo t 41 before purification, 3-5 – Flow through rBlo t 41. (D) Result of concentration on the Vivaspin cytiva 10,000MWCO column of Blo t 41. 1 – MW molecular weight standard. 2 – Fraction 1 of Blo t 41 concentrate. 3 – Fraction 2 of Blo t 41 concentrate. 4 – Fraction 3 of Blo t 41 concentrate. 5 – Fraction 4 of Blo t 41 concentrate. 6 – Fraction 5 of Blo t 41 concentrate. 7 – Fraction 6 of Blo t 41 concentrate. (E) Size exclusion purification of Blo t 41. 1 – MW molecular weight standard. 2 – Fraction 1. 3 – Fraction 2. 4 – Fraction 3. 5 – Fraction 4. 6 – Fraction 5. 7 – Fraction 6. (F) Ponceau red stained membrane to confirm transfer of extract (*B. tropicalis*) and recombinant allergen (Blo t 41). 1- MW. 2 – *B. tropicalis* extract 1. 3- rBlo t 41. (G): Western Blot - Nitrocellulose membrane labeled with anti-IgE antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) enzyme confirming the extract and Blo t 41.

Table 2 - Conditions selected for standardization of the expression of recombinants Blo t 41 and Der p 20.

Recombinant protein	<i>E. coli</i> expression strain	Culture medium	OD600nm	Expression time	Temperature	IPTG concentration	Antibiotic Concentration
rBlo t 41	BL21 (DE3)	*LBS	0.5	4 hours	37 °C	1 mM	Ampicillin 1mg/ml
rDer p 20	BL21 (DE3)	*LBS	1.0	2 hours	37 °C	1 mM	Ampicillin 1mg/ml

*LBS: Peptone, yeast extract, glycerol, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, NaP (pH 7.4), NaCl

Source: Prepared by the author.

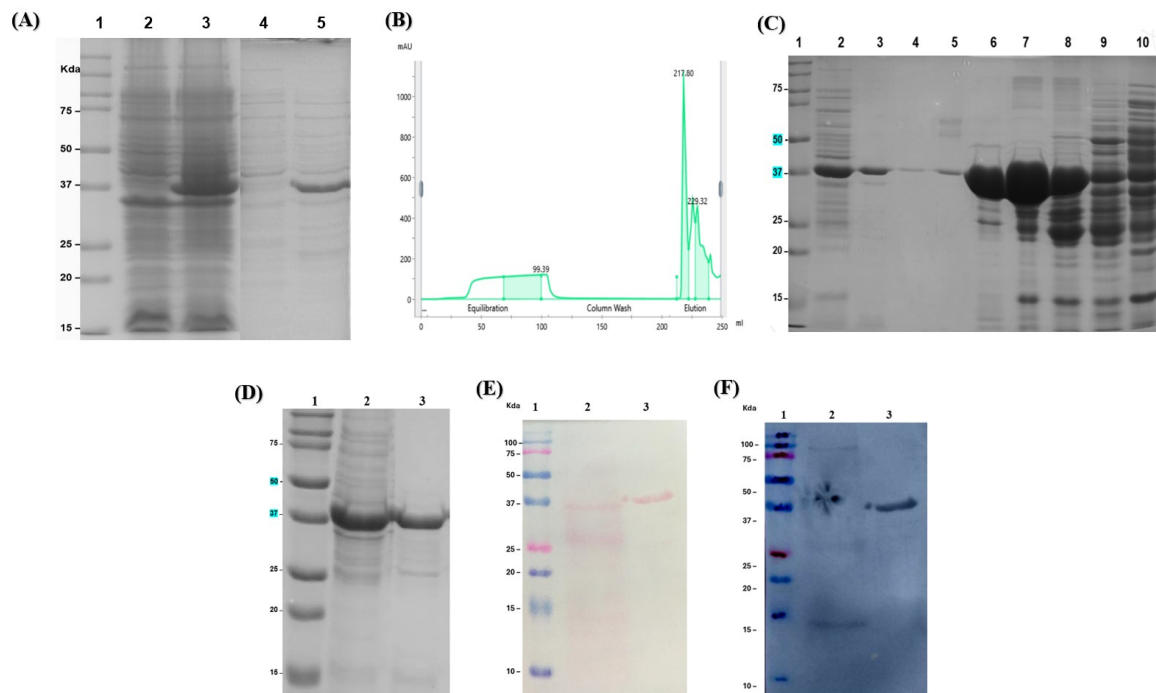


Figure 2. Expression, purification and immunodetection of Der p 20. (A): Transformation into *E. coli* heterologous expression: 1 – MW molecular weight standard. 2 – Before IPTG induction, 3 – 2h of expression. 4 - Solubility test of the protein. 5 - Insoluble fraction of the protein extract in denaturing buffer TrisHCl + Urea. (B) Chromatogram of anion exchange purification (C) Purification of the recombinant protein. 1 – MW molecular weight standard. 2 – Der p 20 before purification. 3 – Flow through (FT). 4 – Wash. 5-10 – Purified fractions. (D) Result of concentration on the Vivaspin cytiva 30,000MWCO column of Der p 20. 1 – MW molecular weight standard. 2 – Fraction of Der p 20 before dialysis. 3 – Fraction of Der p 20 after dialysis. (E) Ponceau red stained membrane to confirm transfer of extract (*D. pteronyssinus*) and recombinant allergen (Der p 20). 1- MW. 2 – *D. pteronyssinus* extract 1. 3- rDer p 20. (F): Western Blot - Nitrocellulose membrane labeled with anti-IgE antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) enzyme confirming the extract and Der p 20.

Expression, Purification, and Immunodetection of Recombinant Allergens rBlo t 41 and rDer p 20

The recombinant allergens rBlo t 41 and rDer p 20 were successfully expressed and subjected to purification and characterization processes to assess their purity, stability, and IgE reactivity.

During purification, SDS-PAGE (15%) analysis revealed that rBlo t 41 bound weakly to the ion-exchange chromatography column, with most of the protein detected in the flow-through (FT) and its peaks, along with some impurities, and not in the purified fractions (2–5) (Figure 1C). To improve purity, a second step using size exclusion chromatography (SEC) was employed. Before SEC, a concentration step was carried out using centrifugation columns, during which impurities with molecular weights above and below the expected 13 kDa were detected (Figure 1D). SEC proved effective in isolating the protein, and pure fractions of rBlo t 41 were obtained in fractions 4, 5, and 6 (Figure 1E).

For rDer p 20, strong binding to the ion-exchange column was observed, with the recombinant present in fractions 6 to 8 (Figure 2C). To remove urea from the protein, a dialysis step was required before further purification. Following overnight dialysis, the sample was analyzed on 12% SDS-PAGE, confirming that bacterial proteins had been effectively removed and yielding a purified sample of Der p 20 without the need for SEC (Figure 2D, well 3).

The final concentrations of the purified recombinant allergens were 668 µg/mL for rBlo t 41 (35 mL total volume, yield of 23.4 mg/L) and 447 µg/mL for rDer p 20 (10 mL total volume, yield of 4.5 mg/L).

To evaluate protein stability, both allergens were stored under physiological conditions at 4°C and at room temperature. rDer p 20 remained stable at 4°C with no visible degradation (Figure 3A) and retained stability for up to 48 hours at room temperature (Figure 3C). In contrast, rBlo t 41 began to degrade progressively from day 7 and was completely degraded by day 21 at 4°C (Figure 3B). At room temperature, it was stable for 24 hours, but degradation began at 48 hours (Figure 3D). Densitometric analysis confirmed these observations: at 4°C, rBlo t 41 showed precipitation starting on day 7 (Figure 3E), while at room temperature, both proteins remained stable for 24 hours, with rBlo t 41 showing loss of stability after 48 hours (Figure 3F).

To confirm the presence and IgE reactivity of the recombinants, Western blotting was performed using pooled sera from 16 asthmatic patients allergic to *Blomia tropicalis* (n = 8) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (n = 8). Ponceau red staining confirmed the transfer of both the mite extracts and recombinant proteins to the membranes (Figures 1F and 2E), with visible bands corresponding to rBlo t 41 (13 kDa) and rDer p 20 (40 kDa) in well 3 of each figure. Subsequent development of the membranes using chemiluminescence (ECL) confirmed the IgE reactivity of both recombinant allergens (Figures 1G and 2F).

These findings demonstrate that both rBlo t 41 and rDer p 20 were successfully expressed, purified, and are immunologically active, with rDer p 20 showing greater thermal stability compared to the more labile rBlo t 41.

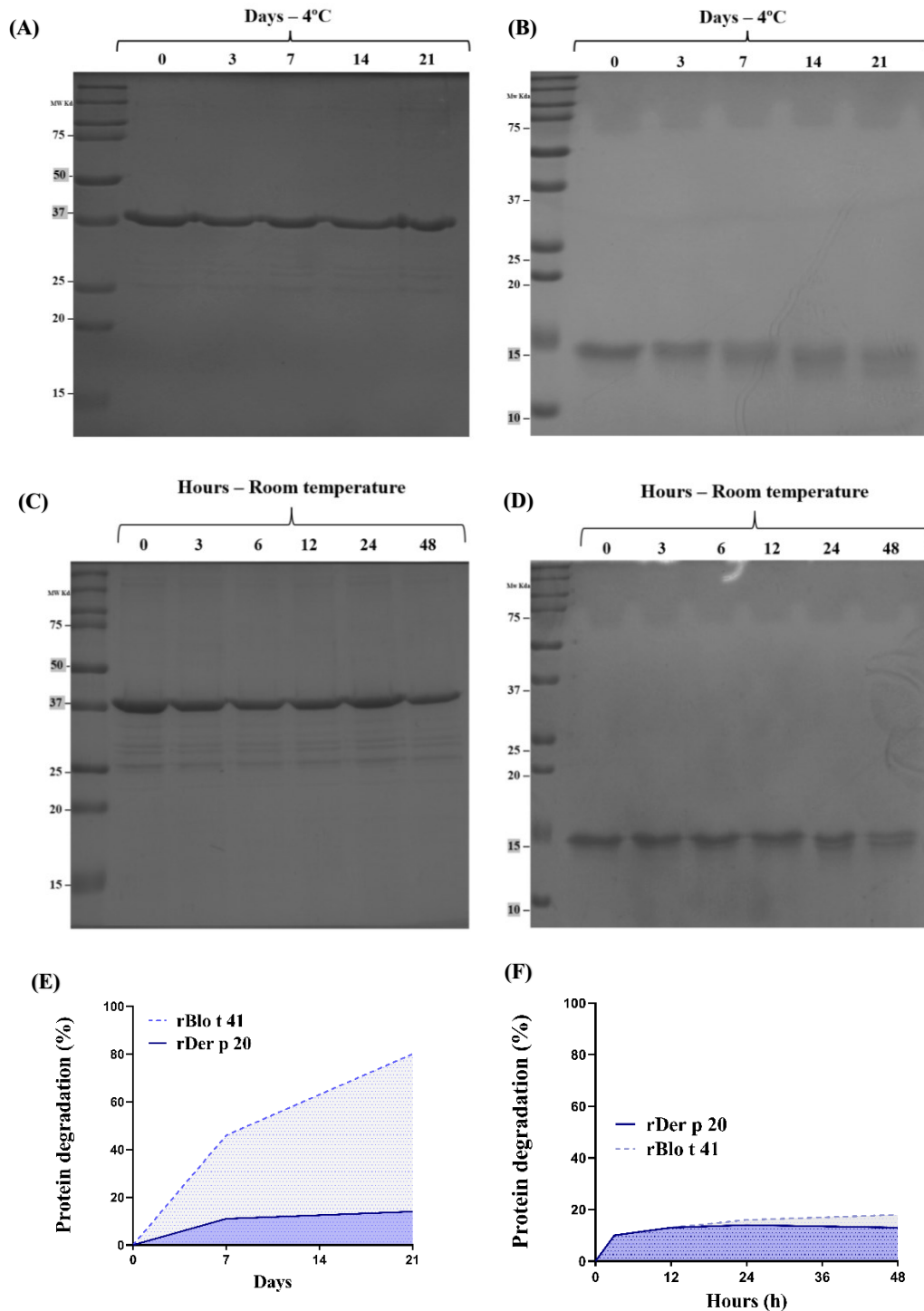


Figure 3. In vitro structural analysis of recombinants rDer p 20 and rBlo t 41. (A): 12% SDS-PAGE for stability of rDer p 20 at 4 °C, during the periods shown in the figure. (B): 15% SDS-

PAGE for stability of rBlo t 41 at 4 °C, during the periods shown in the figure. (C) 12% SDS-PAGE for stability of rDer p 20 at room temperature, during the periods shown in the figure. (D) 15% SDS-PAGE for stability of rBlo t 41 at room temperature, during the periods shown in the figure. (E) Densitometry of degradation of recombinant proteins at room temperature, during the periods shown in the figure. (F) Densitometry of degradation of recombinant proteins at 4°C, during the periods shown in the figure.

Chitin bead binding assay

A chitin affinity assay was performed with Blo t 41 to confirm the prediction of the biological activity of the allergen. An assay to analyse the chitin affinity was performed with a commercial kit where it was possible to observe that, Blo t 41 bound to chitin, confirming its possible biochemical function as a possible chitin domain protein (Figure 4).

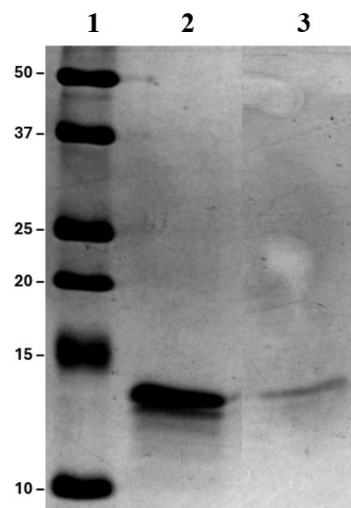


Figure 4. Chitin binding assay for molecular characterization of Blo t 41 in SDS-PAGE (15%). 1- MW. 2 – Blo t 41 not binding. 3– Blo t 41 bound to chitin.

Indirect ELISA for measuring sIgE in serum of mild and severe allergic asthmatic patients in a ProAR cohort

The study assessed the IgE reactivity to recombinant allergens rBlo t 41 and rDer p 20 in two distinct cohorts: individuals with allergic symptoms and patients with mild or severe allergic asthma. A total of 275 serum samples were analyzed 53 from individuals with allergic symptoms, sourced from the serum bank of the Allergy and Acarology Laboratory (UFBA), and 222 from

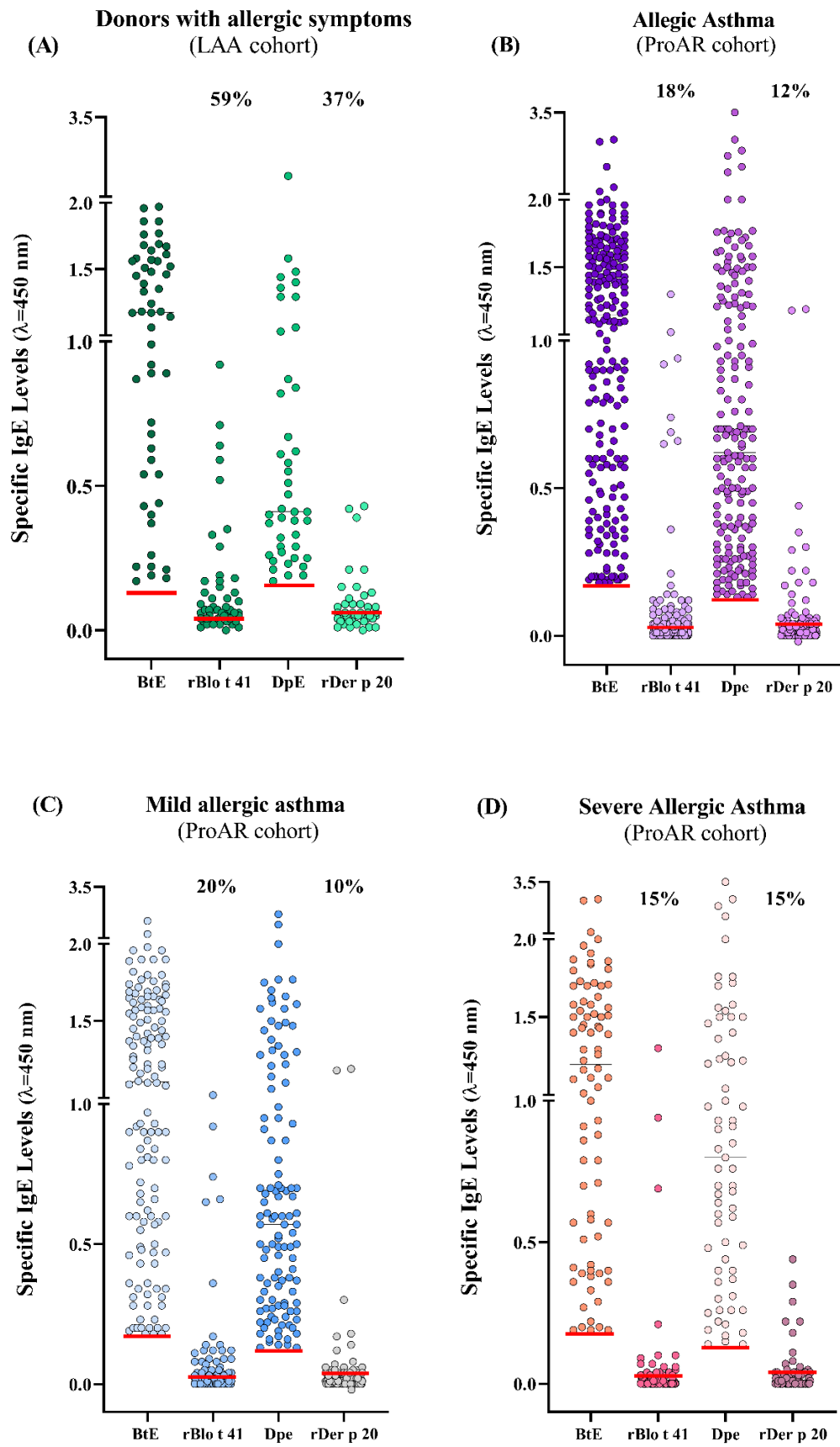
adult patients participating in the “Case-Control” cohort of the ProAR Foundation, including 139 with mild allergic asthma and 83 with severe allergic asthma.

The analysis revealed differences in sensitization patterns across groups, suggesting a potential association between allergen reactivity and specific allergic phenotypes. Among individuals with allergic symptoms, sensitization frequencies were 59% for rBlo t 41 and 37% for rDer p 20 (Figure 5A), using respective ELISA cut-offs of 0.05 and 0.07. The cut-off values for the corresponding mite extracts were 0.13 for *B. tropicalis* and 0.16 for *D. pteronyssinus*.

In the allergic asthma group, IgE reactivity was lower, with 18% of patients reacting to rBlo t 41 and 12% to rDer p 20 (Figure 5B). For this group, the ELISA cut-offs were 0.04 for rBlo t 41 and 0.05 for rDer p 20, and 0.18 and 0.13 for the *B. tropicalis* and *D. pteronyssinus* extracts, respectively.

When stratifying the asthmatic patients by severity, those with mild asthma exhibited sensitization rates of 20% for rBlo t 41 and 10% for rDer p 20 (Figure 5C). In the severe asthma group, both allergens had a sensitization frequency of 15% (Figure 5D). The same cut-off values applied to both asthma subgroups.

In a geographic comparison of sensitization profiles to recombinant allergens, Brazilian patients exhibited IgE reactivity rates of 18% for rBlo t 41 and 12% for rDer p 20, based on cut-offs of 0.04 and 0.05, respectively. In contrast, among Colombian patients with allergic symptoms to house dust mites, rBlo t 41 showed a slightly higher sensitization frequency of 19% detected in only 3 individuals while rDer p 20 presented a notably lower rate of 5%, with just one individual sensitized. For this population, the cut-off values were 0.06 for rBlo t 41 and 0.03 for rDer p 20; extract cut-offs were 0.06 for *B. tropicalis* and 0.07 for *D. pteronyssinus*. These data suggest that while sensitization to rBlo t 41 remains consistent between regions, reactivity to rDer p 20 may vary significantly across geographic contexts (Figure 5E).



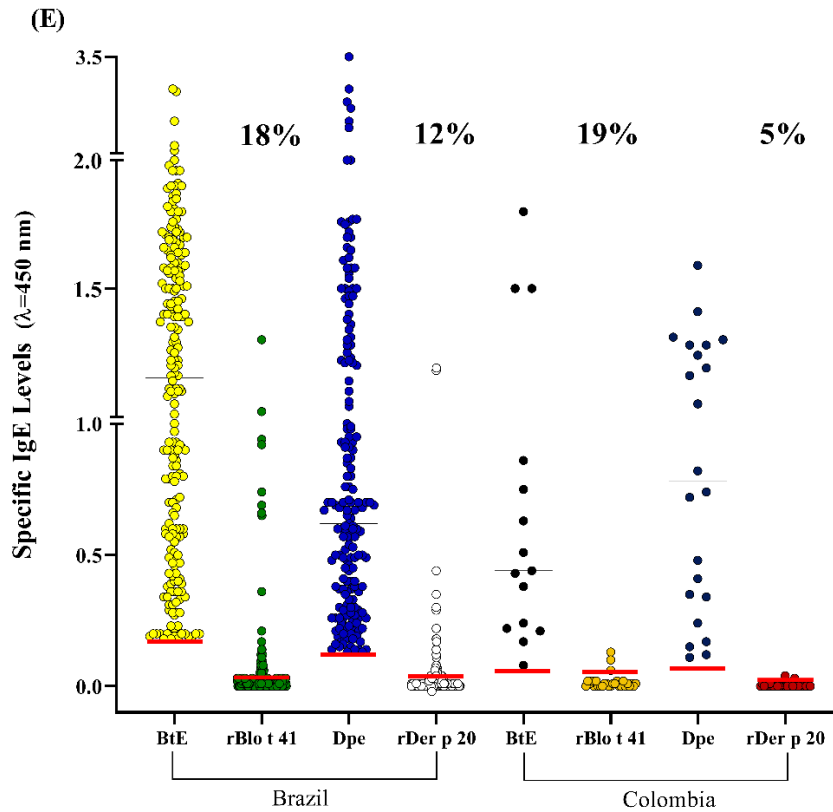


Figure 5. Sensitization frequencies to rBlo t 41 and rDer p 20 in serum samples from allergic individuals analyzed by indirect ELISA. (A) Individuals with allergic symptoms ($n = 53$): rBlo t 41 – 59%; rDer p 20 – 37%; cut-offs: 0.05 (Blo t 41), 0.07 (Der p 20); extracts: 0.13 (*B. tropicalis*), 0.16 (*D. pteronyssinus*). (B) Allergic asthmatics ($n = 222$): rBlo t 41 – 18%; rDer p 20 – 12%; cut-offs: 0.04 (Blo t 41), 0.05 (Der p 20); extracts: 0.18 (*B. tropicalis*), 0.13 (*D. pteronyssinus*). (C) Mild asthma ($n = 139$): rBlo t 41 – 20%; rDer p 20 – 10%. (D) Severe asthma ($n = 83$): rBlo t 41 – 15%; rDer p 20 – 15%; same cut-offs as in (B). (E) Country comparison: Brazil ($n = 222$): rBlo t 41 – 18%, rDer p 20 – 12%, cut-offs: 0.04 (Blo t 41), 0.05 (Der p 20); Colombia ($n = 28$): rBlo t 41 – 19%, rDer p 20 – 5%, cut-offs: 0.06 (Blo t 41), 0.03 (Der p 20); extracts: 0.06 (*B. tropicalis*), 0.07 (*D. pteronyssinus*).

In the correlation analysis between recombinant allergens and their corresponding mite extracts, different patterns were observed across clinical groups. Among donors with allergic symptoms, the correlation between specific IgE levels for rBlo t 41 and the *B. tropicalis* extract was weak and not statistically significant ($r = -0.1367$; $p > 0.05$) (Figure 6A). Similarly, rDer p 20 showed

a weak and non-significant negative correlation with the *D. pteronyssinus* extract ($r = -0.1938$; $p > 0.05$) (Figure 6B).

In the mild allergic asthma group, the correlation between rBlo t 41 and *B. tropicalis* extract was moderate but still not significant ($r = 0.3298$; $p > 0.05$) (Figure 6C), whereas rDer p 20 showed a strong and statistically significant positive correlation with *D. pteronyssinus* extract ($r = 0.7161$; $p = 0.0113$) (Figure 6D).

In patients with severe allergic asthma, both allergens exhibited weak and non-significant correlations with their respective extracts. rBlo t 41 had a correlation of $r = 0.1510$ with *B. tropicalis* extract (Figure 6E), while rDer p 20 showed a very weak correlation ($r = 0.1155$) with *D. pteronyssinus* extract (Figure 6F).

These findings suggest that the recombinant Der p 20 allergen may be more strongly associated with the extract response in mild asthmatics, while the response to rBlo t 41 appears more variable and less dependent on extract-based sensitization patterns across groups.

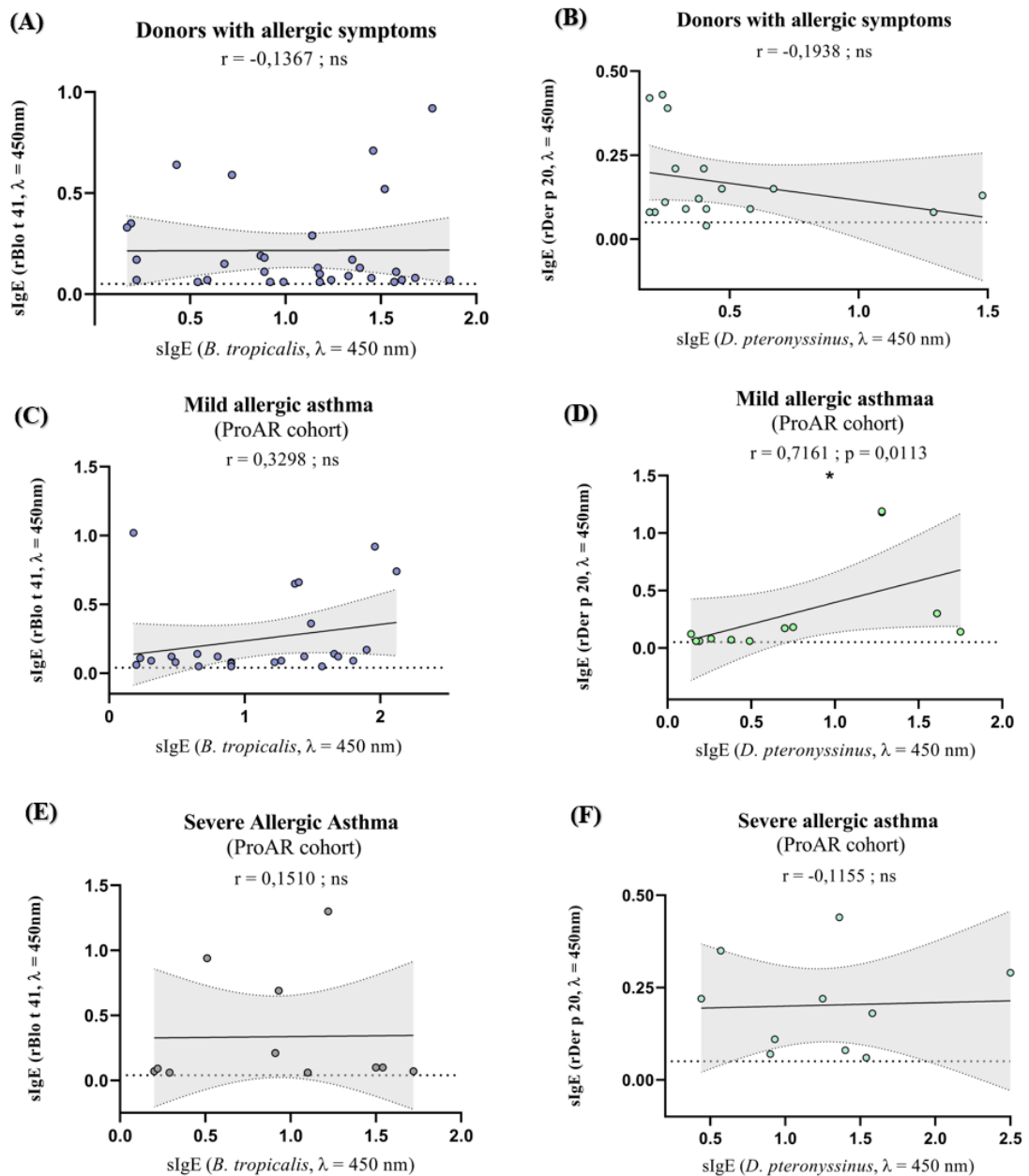


Figure 6. Spearman's correlation between serum IgE reactivity to recombinant allergens and their corresponding mite extracts. (A) Donors with allergic symptoms: correlation between rBlo t 41 and *B. tropicalis* extract ($r = -0.1367$; ns; $n = 31$). (B) Same group: correlation between rDer p 20 and *D. pteronyssinus* extract ($r = -0.1938$; ns; $n = 17$). (C) Mild allergic asthma: correlation between rBlo t 41 and *B. tropicalis* extract ($r = 0.3298$; ns; $n = 25$). (D) Mild allergic asthma: correlation between rDer p 20 and *D. pteronyssinus* extract ($r = 0.7161$; $p = 0.0113$; $n = 12$). (E) Severe allergic asthma: correlation between rBlo t 41 and *B. tropicalis* extract ($r = 0.1510$; ns; $n = 11$). (F) Severe allergic asthma: correlation between rDer p 20 and *D. pteronyssinus* extract ($r = 0.1155$; ns; $n = 10$). Dashed lines indicate ELISA cut-off values: 0.05 for rBlo t 41, 0.07 or 0.05

for rDer p 20, and 0.13 or 0.18 for *B. tropicalis* extract, 0.16 or 0.13 for *D. pteronyssinus* extract, depending on the group.

DISCUSSION

The structural and immunological characterization of allergens is essential for improving diagnostic approaches and identifying potential biomarkers of allergic disease severity. In this study, we investigated two recombinant allergens not yet included in commercial panels rBlo t 41 and rDer p 20 produced via heterologous expression in *E. coli*. These proteins were evaluated for IgE binding in sera from individuals with allergic symptoms and from patients with mild and severe allergic asthma.

Conventional purification of natural allergens is complex and limited by technical constraints such as low yield and the need for monoclonal antibodies (Dramburg *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2023; Zakzuk, 2012). Recombinant allergens offer a practical alternative, allowing consistent production, functional assessment, and IgE reactivity studies under controlled conditions (Dall'Antonia *et al.*, 2014; Dramburg *et al.*, 2023; Hubert *et al.*, 2023; Vieira *et al.*, 2023; Yi *et al.*, 2004). This approach has already proven effective for *B. tropicalis* allergens such as Blo t 5 and Blo t 21 (Carvalho *et al.*, 2013; Da Silva; Huber; *et al.*, 2020, p. 20; Santos da Silva *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2023).

Here, rDer p 20 a panallergen and the newly described rBlo t 41 were successfully expressed and purified. We confirmed the IgE reactivity of both and, for the first time, characterized the chitin-binding activity of Blo t 41 (Luo *et al.*, 2024; Sarzsinszky *et al.*, 2021). Der p 20 showed high thermal stability at 4 °C and room temperature, a desirable feature for maintaining allergenic structure and function (Cabrera *et al.*, 2020; Da Silva; Huber; *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2023). This is consistent with previous findings showing greater structural stability among *D. pteronyssinus* allergens (Foo; Mueller, 2021; Ogburn *et al.*, 2017). In contrast, rBlo t 41 was sensitive to cold but remained stable at room temperature for 48 hours an important property for diagnostic applications. This performance was superior to earlier studies with unstable recombinant Blo t 5 variants (Da Silva; Huber; *et al.*, 2020, p. 20; Luo *et al.*, 2024; Ogburn *et al.*, 2017).

Structurally, Blo t 41 shares a chitin-binding domain similar to Der p 23, another clinically relevant allergen in children (Forchert *et al.*, 2022; Xiong *et al.*, 2024). Our data confirmed Blo t 41's chitin-binding activity, supporting its classification and highlighting its likely role in

allergen-induced immune responses (Bueno-Díaz *et al.*, 2021; Caraballo *et al.*, 2020b; Zakzuk *et al.*, 2014). Proper folding is critical for allergen function, especially for preserving conformational IgE epitopes (Alvarez, 2017). The use of *E. coli* expression systems, when optimized, maintains relevant structural features essential for immune recognition.

Regarding IgE reactivity, rBlo t 41 showed high sensitization frequency in individuals with allergic symptoms (59%), consistent with findings from Luo *et al.* (2024), but was less reactive in allergic asthmatics (18%), particularly among severe cases (15%). This suggests its greater relevance in allergic rhinitis than asthma (Huang; Sarzsinszky; Vrtala, 2023; Santos da Silva *et al.*, 2019; Thomas, 2015; Walsemann *et al.*, 2023). Der p 20 also showed limited reactivity 37% in allergic individuals and only 12% in asthmatics contrary to reports supporting its use as a biomarker for asthma and dermatitis (Sarzsinszky *et al.*, 2021; Walsemann *et al.*, 2023). Differences in population characteristics, clinical profiles, and even protein folding may explain this divergence (Alvarez, 2017; Foo; Mueller, 2021).

Other *D. pteronyssinus* allergens, such as Der p 5 and Der p 21, have shown similar patterns: considered minor in Europe but highly reactive in tropical regions like Brazil (Curin *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2022). The reduced IgE response to rBlo t 41 and rDer p 20 in asthmatic patients may also be influenced by age or treatment. Sensitization typically increases until age 18, and corticosteroid therapy common among severe asthmatics can suppress IgE production by inhibiting Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13), impairing B cell class switching (Barnes, 2001; Scola *et al.*, 2009).

Correlation analysis further supports these observations. Der p 20 showed a significant correlation with *D. pteronyssinus* extract in mild asthmatics, suggesting its presence in natural exposure environments. No such pattern was observed for rBlo t 41, indicating it may not be a dominant component of *B. tropicalis* extracts or may be masked by co-sensitization (Alvarez, 2017; Foo; Mueller, 2021).

Geographic differences also emerged: Colombian patients exhibited lower reactivity to Der p 20 (5%) and similar levels for Blo t 41 (19%) compared to Brazilians. These findings reflect environmental and genetic factors influencing exposure and sensitization (Acevedo; Zakzuk; Caraballo, 2019; Bønnelykke *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2023). Altogether, these data reinforce the idea that allergen classification into “major” and “minor” is overly simplistic. Even allergens with low prevalence may be clinically significant for specific populations of individuals with

allergic symptoms and should be considered in molecular diagnostics and therapeutic strategies (Caraballo *et al.*, 2021; Dramburg *et al.*, 2023; Vieira *et al.*, 2023).

CONCLUSION

In this study, we performed for the first time in details the biochemical characterization assay of the Blo t 41 allergen, as well as the IgE binding to evaluate this allergen together with Der p 20. The results suggest a clinical relevance of sensitization to the new major allergen of *B. tropicalis*, Blo t 41 in patients with allergic symptoms and the significant correlation of IgE levels of the allergen Der p 20 with the extract of sensitized mild allergic asthma individuals, reinforcing the clinical relevance of these allergens as favorable and promising for the diagnosis of house dust mite allergies, by establishing a comprehensive profile with these new allergens.

REFERENCES

- ACEVEDO, Nathalie; ZAKZUK, Josefina; CARABALLO, Luis. House Dust Mite Allergy Under Changing Environments. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 450, 2019. <https://doi.org/10.4168/aaair.2019.11.4.450>.
- ALVAREZ, Juan Ricardo Urrego. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. [s. l.], 2017. .
- BARNES, Peter J. Corticosteroids, IgE, and atopy. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 265–266, 1 fev. 2001. <https://doi.org/10.1172/JCI12157>.
- BILIUTE, Gabija; MISKINYTE, Monika; MISKINIENE, Asta; ZINKEVICIENE, Aukse; KVEDARIENE, Violeta. Sensitization profiles to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* molecular allergens in the Lithuanian population: Understanding allergic sensitization patterns. **Clinical and Translational Allergy**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e12332, jan. 2024. <https://doi.org/10.1002/clt2.12332>.
- BØNNELYKKE, Klaus; SPARKS, Rachel; WAAGE, Johannes; MILNER, Joshua D. Genetics of allergy and allergic sensitization: common variants, rare mutations. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 36, p. 115–126, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.08.002>.
- BUENO-DÍAZ, Cristina; MARTÍN-PEDRAZA, Laura; PARRÓN, Jorge; CUESTA-HERRANZ, Javier; CABANILLAS, Beatriz; PASTOR-VARGAS, Carlos; BATANERO, Eva; VILLALBA, Mayte. Characterization of Relevant Biomarkers for the Diagnosis of Food Allergies: An Overview of the 2S Albumin Family. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1235, 29 maio 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10061235>.
- CABRERA, Aurora; RANDALL, Thomas A.; OGBURN, Ryenne N.; MEBRAHTU, Betelihem; JOHNSON, Julia H. R.; FOO, Alexander C. Y.; FITZGERALD, Michael C.; MUELLER, Geoffrey A. Are allergens more abundant and/or more stable than other proteins in pollens and dust? **Allergy**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 1267–1269, maio 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14121>.

CARABALLO, Luis; VALENTA, Rudolf; ACEVEDO, Nathalie; ZAKZUK, Josefina. Are the Terms Major and Minor Allergens Useful for Precision Allergology? **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 651500, 8 mar. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651500>.

CARABALLO, Luis; VALENTA, Rudolf; PUERTA, Leonardo; POMÉS, Anna; ZAKZUK, Josefina; FERNANDEZ-CALDAS, Enrique; ACEVEDO, Nathalie; SANCHEZ-BORGES, Mario; ANSOTEGUI, Ignacio; ZHANG, Luo; VAN HAGE, Marianne; ABEL-FERNÁNDEZ, Eva; KARLA ARRUDA, L.; VRTALA, Susanne; CURIN, Mirela; GRONLUND, Hans; KARSONOVA, Antonina; KILIMAJER, Jonathan; RIABOVA, Ksenja; TRIFONOVA, Daria; KARAULOV, Alexander. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 100118, maio 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100118>.

CARDONA-VILLA, Ricardo; URIBE-GARCIA, Susana; CALVO-BETANCUR, Víctor Daniel; CANTILLO, Jose Fernando; FERNÁNDEZ-CALDAS, Enrique. Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy with a mixture of glutaraldehyde-modified extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Blomia tropicalis*. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 100692, set. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2022.100692>.

CARVALHO, Kellyanne Dos Anjos; DE MELO-NETO, Osvaldo Pompílio; MAGALHÃES, Franklin Barbalho; PONTE, João Carlos Marques; FELIPE, Filipe Adriano Borba; DOS SANTOS, Mariese Conceição Alves; DOS SANTOS LIMA, Givaneide; CRUZ, Álvaro Augusto; PINHEIRO, Carina Silva; PONTES-DE-CARVALHO, Lain Carlos; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria. *Blomia tropicalis* Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract. **BMC Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 11, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-11>.

CURIN, M.; GARMATIUK, T.; RESCH-MARAT, Y.; CHEN, K. W.; HOFER, G.; FAULAND, K.; KELLER, W.; HEMMER, W.; VRTALA, S.; FOCKE-TEJTL, M.; VALENTA, R. Similar localization of conformational IgE epitopes on the house dust mite allergens Der p 5 and Der p 21 despite limited IgE cross-reactivity. **Allergy**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1653–1661, ago. 2018. <https://doi.org/10.1111/all.13398>.

DA SILVA, Eduardo Santos; AGLAS, Lorenz; PINHEIRO, Carina Silva; DE ANDRADE BELITARDO, Emília M. M.; SILVEIRA, Elisânia Fontes; HUBER, Sara; TORRES, Rogério Tanan; WALLNER, Michael; BRIZA, Peter; LACKNER, Peter; LAIMER, Josef; PACHECO, Luis Gustavo C.; CRUZ, Álvaro A.; ALCÂNTARA-NEVES, Neuza Maria; FERREIRA, Fatima. A hybrid of two major *Blomia tropicalis* allergens as an allergy vaccine candidate. **Clinical & Experimental Allergy**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 835–847, jul. 2020. <https://doi.org/10.1111/cea.13611>.

DA SILVA, Eduardo Santos; HUBER, Sara; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria; ASAM, Claudia; SILVEIRA, Elisânia Fontes; DE ANDRADE BELITARDO, Emília Maria Medeiros; AGLAS, Lorenz; WALLNER, Michael; GADERMAIER, Gabriele; BRIZA, Peter; KARNER, Ingrid; TORRES, Rogério Tanan; ALVAREZ, Juan Ricardo Urrego; WUENSCHMANN, Sabina; CHAPMAN, Martin; FERREIRA, Fatima; PINHEIRO, Carina Silva. N-terminal peptide deletion influences immunological and structural features of Blo t 5. **Allergy**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 1503–1507, jun. 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14176>.

DALL'ANTONIA, Fabio; PAVKOV-KELLER, Tea; ZANGGER, Klaus; KELLER, Walter. *blomia*. **Methods**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 3–21, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.024>.

DEY, Debarati; SAHA, Goutam Kumar; PODDER, Sanjoy. A review of house dust mite allergy in India. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 1–14, maio 2019. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00366-4>.

DRAMBURG, Stephanie; HILGER, Christiane; SANTOS, Alexandra F.; DE LAS VECILLAS, Leticia; AALBERSE, Rob C.; ACEVEDO, Nathalie; AGLAS, Lorenz; ALTMANN, Friedrich; ARRUDA, Karla L.; ASERO, Riccardo; BALLMER-WEBER, Barbara; BARBER, Domingo; BEYER, Kirsten; BIEDERMANN, Tilo; BILO, Maria Beatrice; BLANK, Simon; BOSSHARD, Philipp P.; BREITENEDER, Heimo; BROUGH, Helen A.; BUBLIN, Merima; *et al.* EAACI Molecular Allergology User's Guide 2.0. **Pediatric Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 34, n. S28, p. e13854, mar. 2023. <https://doi.org/10.1111/pai.13854>.

FITZSIMMONS, Colin Matthew; FALCONE, Franco Harald; DUNNE, David William. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, 2014. DOI 10.3389/fimmu.2014.00061. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00061/abstract>. Acesso em: 9 set. 2025.

FOO, Alexander C. Y.; MUELLER, Geoffrey A. Abundance and Stability as Common Properties of Allergens. **Frontiers in Allergy**, [s. l.], v. 2, p. 769728, 28 out. 2021. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.769728>.

FORCHERT, Leandra; POTAPOVA, Ekaterina; PANETTA, Valentina; DRAMBURG, Stephanie; PERNA, Serena; POSA, Daniela; RESCH-MARAT, Yvonne; LUPINEK, Christian; ROHRBACH, Alexander; GRABENHENRICH, Linus; ICKE, Katja; BAUER, Carl-Peter; HOFFMAN, Ute; FORSTER, Johannes; ZEPP, Fred; SCHUSTER, Antje; WAHN, Ulrich; KEIL, Thomas; LAU, Susanne; VRTALA, Susanne; VALENTA, Rudolf; MATRICARDI, Paolo Maria. Der p 23-specific IGE response throughout childhood and its association with allergic disease: A birth cohort study. **Pediatric Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. e13829, jul. 2022. <https://doi.org/10.1111/pai.13829>.

HUANG, Huey-Jy; SARZSINSZKY, Eszter; VRTALA, Susanne. House dust mite allergy: The importance of house dust mite allergens for diagnosis and immunotherapy. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 158, p. 54–67, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.04.008>.

HUBERT, Jan; VRTALA, Susanne; SOPKO, Bruno; DOWD, Scot E.; HE, Qixin; KLIMOV, Pavel B.; HARANT, Karel; TALACKO, Pavel; ERBAN, Tomas. Predicting *Blomia tropicalis* allergens using a multiomics approach. **Clinical and Translational Allergy**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. e12302, out. 2023. <https://doi.org/10.1002/clt2.12302>.

KIM, Ji Tae; LEE, Jongsun; YUK, Jie Eun; SONG, Hangyeol; KIM, Hyunho; KIM, Sung Hyun; KIM, Dong Jun; SHIN, Yeji; LEE, Deug-Chan; JEONG, Kyoung Yong; PARK, Jung-Won. Novel Sensitive, Two-site ELISA for the Quantification of Der f 1 Using Monoclonal Antibodies. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 665, 2021. <https://doi.org/10.4168/aaair.2021.13.4.665>.

LUO, Wenting; ZHANG, Jiale; ZHENG, Xianhui; LI, Aoli; XV, Miaoyuan; ZHOU, Dongmei; YUAN, Cunyin; CUI, Yubao; SUN, Baoqing. Identification of rBlo t 41 with a chitin-binding type-2 domain: A novel major allergen from *Blomia tropicalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 262, p. 129972, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129972>.

MARTÍNEZ, Dalgys; CANTILLO, Jose Fernando; HERAZO, Helber; WORTMANN, Judith; KELLER, Walter; CARABALLO, Luis; PUERTA, Leonardo. Characterization of a hybrid protein designed with segments of allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 196, p. 103–112, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.012>.

OGBURN, Ryenne N.; RANDALL, Thomas A.; XU, Yingrong; ROBERTS, Julia H.; MEBRAHTU, Betelihem; KARNUTA, Jaret M.; RIDER, S. Dean; KISSLING, Grace E.; LONDON, Robert E.; POMÉS, Anna; ARLIAN, Larry; FITZGERALD, Michael C.; MUELLER, Geoffrey A. Are dust mite allergens more abundant and/or more stable than other *Dermatophagoides pteronyssinus* proteins? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 139, n. 3, p. 1030-1032.e1, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.016>.

PINHEIRO, Carina S.; SILVA, Eduardo S.; DE ANDRADE BELITARDO, Emília M. M.; PACHECO, Luis G. C.; AGUIAR, Eric R. G. R.; ALCANTARA-NEVES, Neuza M.; GADERMAIER, Gabriele; FERREIRA, Fatima. *En route* to personalized medicine: uncovering distinct IgE reactivity pattern to house dust mite components in Brazilian and Austrian allergic patients. **Clinical and Translational Allergy**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e12004, mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/clt2.12004>.

SANTOS DA SILVA, Eduardo; ASAM, Claudia; LACKNER, Peter; HOFER, Heidi; WALLNER, Michael; SILVA PINHEIRO, Carina; ALCÂNTARA-NEVES, Neuza Maria; FERREIRA, Fatima. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 172, n. 4, p. 203–214, 2017. <https://doi.org/10.1159/000464325>.

SANTOS, Sara P.O.; GARCÉS, Luis Fabian S.; SILVA, Filipe S.R.; SANTIAGO, Leonardo F.; PINHEIRO, Carina S.; ALCANTARA-NEVES, Neuza M.; PACHECO, Luis G.C. Engineering an optimized expression operating unit for improved recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 199, p. 106150, nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106150>.

SANTOS DA SILVA, Eduardo; MARQUES PONTE, João Carlos; BARBOSA DA SILVA, Márcia; SILVA PINHEIRO, Carina; CARVALHO PACHECO, Luis Gustavo; FERREIRA, Fatima; BRIZA, Peter; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 180, n. 3, p. 159–172, 2019. <https://doi.org/10.1159/000501964>.

SARZSINSZKY, Eszter; LUPINEK, Christian; VRTALA, Susanne; HUANG, Huey-Jy; HOFER, Gerhard; KELLER, Walter; CHEN, Kuan-Wei; PANAITESCU, Carmen Bunu; RESCH-MARAT, Yvonne; ZIEGLMAYER, Petra; ZIEGLMAYER, René; LEMELL, Patrick; HORAK, Friedrich; DUCHÊNE, Michael; VALENTA, Rudolf. Expression in *Escherichia coli* and Purification of Folded rDer p 20, the Arginine Kinase From *Dermatophagoides*

pteronyssinus : A Possible Biomarker for Allergic Asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 154, 2021. <https://doi.org/10.4168/aaair.2021.13.1.154>.

SCOLA, Anne-Marie; LOXHAM, Matthew; CHARLTON, Steven J; PEACHELL, Peter T. The long-acting β -adrenoceptor agonist, indacaterol, inhibits IgE-dependent responses of human lung mast cells. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 267–276, set. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00178.x>.

SILVA, Eduardo Santos Da; PINHEIRO, Carina Silva; PACHECO, Luis Gustavo Carvalho; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria. *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 163–177, 3 mar. 2020. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1712360>.

THOMAS, Wayne R. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. **Allergology International**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 304–311, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.05.004>.

VIEIRA, Camilo; SILVA, Raphael; SILVEIRA, Elisânia; FERNANDES, Antônio; JARAMILLO-HERNÁNDEZ, Dumar; GARCÉS, Luis; FONSECA, Larissa; MACHADO, Bruna; FERNANDES, Jamille; PINHEIRO, Gabriela; CRUZ, Álvaro; FERREIRA, Fatima; COOPER, Philip; PACHECO, Luis; ALCANTARA-NEVES, Neuza; PINHEIRO, Carina; DA SILVA, Eduardo. Removal of N-Terminal Peptide Impacts Structural Aspects of an IgE-Reactive Recombinant Der p 5. **Allergies**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 184–201, 18 set. 2023. <https://doi.org/10.3390/allergies3030012>.

WALSEMANN, Theresa; BÖTTGER, Marisa; TRIDL, Stephan; SCHWAGER, Christian; GÜLSEN, Askin; FREIMOOSER, Sina; ROESNER, Lennart Matthias; WERFEL, Thomas; JAPPE, Uta. Specific IGE against the house dust mite allergens Der p 5, 20 and 21 influences the phenotype and severity of atopic diseases. **Allergy**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 731–742, mar. 2023. <https://doi.org/10.1111/all.15553>.

WONG, Kenneth H.; ZHOU, Qian; PRABHU, Nayana; FURUHASHI, Kazuki; CHUA, Yen Leong; GROTENBREG, Gijsbert M.; KEMENY, David M. *Blomia tropicalis* allergen 5 (*Blo t* 5) T-cell epitopes and their ability to suppress the allergic immune response. **Immunology**, [s. l.], v. 152, n. 2, p. 344–355, out. 2017. <https://doi.org/10.1111/imm.12772>.

XIONG, Qing; LIU, Xiaoyu; WAN, Angel Tsz-Yau; MALAINUAL, Nat; XIAO, Xiaojun; CAO, Hui; TANG, Man-Fung; NG, Judy Kin-Wing; SHIN, Soo-Kyung; SIO, Yang Yie; WANG, Mingqiang; SUN, Baoqing; LEUNG, Ting-Fan; CHEW, Fook Tim; TUNGTRONGCHITR, Anchalee; TSUI, Stephen Kwok-Wing. Genomic analysis reveals novel allergens of *Blomia tropicalis*. **Allergology International**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 340–344, abr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2023.11.004>.

YI, F. C.; CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; SHEK, L. P.; LEE, B. W. Immunoglobulin E reactivity of native *Blo t* 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. **Clinical & Experimental Allergy**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 1762–1767, nov. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02107.x>.

YURIEV, Serhii; RODINKOVA, Victoria; MOKIN, Vitalii; VARCHUK, Ilona; SHARIKADZE, Olena; MARUSHKO, Yuriy; HALUSHKO, Bohdan; KURCHENKO, Andrii. Molecular sensitization pattern to house dust mites is formed from the first years of life and includes group

1, 2, Der p 23, Der p 5, Der p 7 and Der p 21 allergens. **Clinical and Molecular Allergy**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1, 3 fev. 2023a. <https://doi.org/10.1186/s12948-022-00182-z>.

ZAKZUK, J; DONADO, K; MONDOL, E; MARRUGO, V; REGINO, R; LÓPEZ, Jf; HERNANDEZ, K; MERCADO, D; DENNIS, R; PUERTA, L; CARABALLO, L. IgE-Mediated Sensitization to Blo t 21 and Blo t 5 Is Associated With Asthma in the Tropics: A Case-Control Study. **Journal of Investigational Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 157–166, 18 jun. 2024. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0892>.

ZAKZUK, Josefina. Immunological and Biological Characterization of Blomia tropicalis Allergens. [s. l.], 2012. .

ZAKZUK, Josefina; BENEDETTI, Inés; FERNÁNDEZ-CALDAS, Enrique; CARABALLO, Luis. The Influence of Chitin on the Immune Response to the House Dust Mite Allergen Blo t 12. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 163, n. 2, p. 119–129, 2014. <https://doi.org/10.1159/000356482>.

ZUIANI, Chiara; CUSTOVIC, Adnan. Update on House Dust Mite Allergen Avoidance Measures for Asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 50, set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11882-020-00948-y>.

CONCLUSÃO

Neste estudo, conseguimos entender o papel de dois novos alérgenos recombinantes dos ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus* como possíveis marcadores de gravidade para doenças alérgicas e abrindo caminhos para novas perspectivas no diagnóstico de alergias. Mostrando também, pela primeira vez por nosso grupo de pesquisa, o papel do Blo t 41 como uma proteína ligante de quitina, através do ensaio de confirmação da caracterização bioquímica deste alérgeno desde sua recente identificação pela IUIS que não havia sido explorada, sendo um importante marco para a exploração de seu potencial alergênico.

Constatamos que Blo t 41 e Der p 20 foram expressos, purificados, caracterizados e suas reatividades de IgE testadas com sucesso em diferentes populações alérgicas tanto com sintomas alérgicos assim como em grupos asmáticos. O novo maior alérgeno do *B. tropicalis*, o Blo t 4 e Der p 20 apresentaram resultados interessantes sobre sua capacidade de ligação a IgE em diferentes populações. Nos ensaios de estabilidade da molécula ambos os alérgenos mostraram-se estáveis termicamente, reforçando um *refolding* bem-sucedido. Por fim, esses resultados confirmaram a importância do alérgeno Blo t 41 na sensibilização ao ácaro *Blomia tropicalis*, através alta frequência em pacientes com sintomas alérgicos, e do Der p 20, com uma forte correlação da sua presença com a positividade dos extratos envolvendo o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em pacientes asmáticos alérgicos de leve gravidade.

Além disso, mais informações sobre a metodologia e resultados mais detalhados que não entraram para o artigo estão anexados junto a dissertação na forma de Dados suplementares.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, Nathalie; ZAKZUK, Josefina; CARABALLO, Luis. House Dust Mite Allergy Under Changing Environments. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 450, 2019. <https://doi.org/10.4168/aaair.2019.11.4.450>.

ALCANTARA-NEVES, Neuza M.; VEIGA, Rafael V.; PONTE, João C. M.; DA CUNHA, Sérgio S.; SIMÕES, Silvia M.; CRUZ, Álvaro A.; YAZDANBAKHS, Maria; MATOS, Sheila M.; SILVA, Thiago Magalhães; FIGUEIREDO, Camila A.; PONTES-DE-CARVALHO, Lain C.; RODRIGUES, Laura C.; FIACCONE, Rosemeire L.; COOPER, Philip J.; BARRETO, Maurício L. Dissociation between skin test reactivity and anti-aeroallergen IgE: Determinants among urban Brazilian children. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. e0174089, 28 mar. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174089>.

ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria; VEIGA, Rafael Valente; DATTOLI, Vitor Camilo Cavalcante; FIACCONE, Rosimeire Leovigildo; ESQUIVEL, Renata; CRUZ, Álvaro Augusto; COOPER, Philip John; RODRIGUES, Laura Cunha; BARRETO, Maurício Lima. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 359-367.e3, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.015>.

ALVAREZ, Juan Ricardo Urrego. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. [s. l.], 2017. .

BAQUEIRO, Tiana; PONTES-DE-CARVALHO, Lain; CARVALHO, Fernando Martins; SANTOS, Nilza Maria; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria; MEDICAL STUDENT'S GROUP*. Asthma and rhinitis symptoms in individuals from different socioeconomic levels in a Brazilian city. **Allergy and Asthma Proceedings**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 362–367, 1 maio 2007. <https://doi.org/10.2500/aap.2007.28.2967>.

BARNES, Peter J. Corticosteroids, IgE, and atopy. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 265–266, 1 fev. 2001. <https://doi.org/10.1172/JCI12157>.

BERGMANN, Karl-Christian. Biology of house dust mites and storage mites. **Allergo Journal International**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 272–278, 15 nov. 2022. <https://doi.org/10.1007/s40629-022-00231-8>.

BESSOT, J. C.; PAULI, G. Mite allergens: an overview. **European Annals of Allergy and Clinical Immunology**, v. 43, n. 5, p. 141–156, 2011

BILIUTE, Gabija; MISKINYTE, Monika; MISKINIENE, Asta; ZINKEVICIENE, Aukse; KVEDARIENE, Violeta. Sensitization profiles to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* molecular allergens in the Lithuanian population: Understanding allergic sensitization patterns. **Clinical and Translational Allergy**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e12332, jan. 2024. <https://doi.org/10.1002/clt2.12332>.

BØNNELYKKE, Klaus; SPARKS, Rachel; WAAGE, Johannes; MILNER, Joshua D. Genetics of allergy and allergic sensitization: common variants, rare mutations. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 36, p. 115–126, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.08.002>.

BUENO-DÍAZ, Cristina; MARTÍN-PEDRAZA, Laura; PARRÓN, Jorge; CUESTA-HERRANZ, Javier; CABANILLAS, Beatriz; PASTOR-VARGAS, Carlos; BATANERO, Eva; VILLALBA, Mayte. Characterization of Relevant Biomarkers for the Diagnosis of Food

Allergies: An Overview of the 2S Albumin Family. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1235, 29 maio 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10061235>.

CABRERA, Aurora; RANDALL, Thomas A.; OGBURN, Ryenne N.; MEBRAHTU, Betelihem; JOHNSON, Julia H. R.; FOO, Alexander C. Y.; FITZGERALD, Michael C.; MUELLER, Geoffrey A. Are allergens more abundant and/or more stable than other proteins in pollens and dust? **Allergy**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 1267–1269, maio 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14121>.

CARABALLO, Luis; VALENTA, Rudolf; ACEVEDO, Nathalie; ZAKZUK, Josefina. Are the Terms Major and Minor Allergens Useful for Precision Allergology? **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 651500, 8 mar. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.651500>.

CARABALLO, Luis; VALENTA, Rudolf; PUERTA, Leonardo; POMÉS, Anna; ZAKZUK, Josefina; FERNANDEZ-CALDAS, Enrique; ACEVEDO, Nathalie; SANCHEZ-BORGES, Mario; ANSOTEGUI, Ignacio; ZHANG, Luo; VAN HAGE, Marianne; ABEL-FERNÁNDEZ, Eva; KARLA ARRUDA, L.; VRTALA, Susanne; CURIN, Mirela; GRONLUND, Hans; KARSONOVA, Antonina; KILIMAJER, Jonathan; RIABOVA, Ksenja; TRIFONOVA, Daria; KARAULOV, Alexander. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 100118, maio 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100118>.

CARABALLO, Luis; VALENTA, Rudolf; PUERTA, Leonardo; POMÉS, Anna; ZAKZUK, Josefina; FERNANDEZ-CALDAS, Enrique; ACEVEDO, Nathalie; SANCHEZ-BORGES, Mario; ANSOTEGUI, Ignacio; ZHANG, Luo; VAN HAGE, Marianne; ABEL-FERNÁNDEZ, Eva; KARLA ARRUDA, L.; VRTALA, Susanne; CURIN, Mirela; GRONLUND, Hans; KARSONOVA, Antonina; KILIMAJER, Jonathan; RIABOVA, Ksenja; TRIFONOVA, Daria; KARAULOV, Alexander. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 100118, maio 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100118>.

CARDONA-VILLA, Ricardo; URIBE-GARCIA, Susana; CALVO-BETANCUR, Víctor Daniel; CANTILLO, Jose Fernando; FERNÁNDEZ-CALDAS, Enrique. Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy with a mixture of glutaraldehyde-modified extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Blomia tropicalis*. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 100692, set. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2022.100692>.

CARVALHO, Kellyanne Dos Anjos; DE MELO-NETO, Osvaldo Pompílio; MAGALHÃES, Franklin Barbalho; PONTE, João Carlos Marques; FELIPE, Filipe Adriano Borba; DOS SANTOS, Mariese Conceição Alves; DOS SANTOS LIMA, Givaneide; CRUZ, Álvaro Augusto; PINHEIRO, Carina Silva; PONTES-DE-CARVALHO, Lain Carlos; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria. *Blomia tropicalis* Blo t 5 and Blo t 21 recombinant allergens might confer higher specificity to serodiagnostic assays than whole mite extract. **BMC Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 11, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-11>.

CASSET, Anne; MARI, Adriano; PUROHIT, Ashok; RESCH, Yvonne; WEGHOFFER, Margit; FERRARA, Rosetta; THOMAS, Wayne R.; ALESSANDRI, Claudia; CHEN, Kuan-Wei; DE BLAY, Frédéric; VALENTA, Rudolf; VRTALA, Susanne. Varying Allergen Composition and Content Affects the in vivo Allergenic Activity of Commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* Extracts. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 253–262, 2012. <https://doi.org/10.1159/000337654>.

CURIN, M.; GARMATIUK, T.; RESCH-MARAT, Y.; CHEN, K. W.; HOFER, G.; FAULAND, K.; KELLER, W.; HEMMER, W.; VRTALA, S.; FOCKE-TEJKL, M.; VALENTA, R. Similar localization of conformational IgE epitopes on the house dust mite allergens Der p 5 and Der p 21 despite limited IgE cross-reactivity. **Allergy**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 1653–1661, ago. 2018. <https://doi.org/10.1111/all.13398>.

CZECH, Eric J.; OVERHOLSER, Andrew; SCHULTZ, Paul. Allergic Rhinitis. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 159–178, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2023.01.003>.

DA SILVA, Eduardo Santos; AGLAS, Lorenz; PINHEIRO, Carina Silva; DE ANDRADE BELITARDO, Emília M. M.; SILVEIRA, Elisânia Fontes; HUBER, Sara; TORRES, Rogério Tanan; WALLNER, Michael; BRIZA, Peter; LACKNER, Peter; LAIMER, Josef; PACHECO, Luis Gustavo C.; CRUZ, Álvaro A.; ALCÂNTARA-NEVES, Neuza Maria; FERREIRA, Fatima. A hybrid of two major *Blomia tropicalis* allergens as an allergy vaccine candidate. **Clinical & Experimental Allergy**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 835–847, jul. 2020. <https://doi.org/10.1111/cea.13611>.

DA SILVA, Eduardo Santos; HUBER, Sara; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria; ASAM, Claudia; SILVEIRA, Elisânia Fontes; DE ANDRADE BELITARDO, Emília Maria Medeiros; AGLAS, Lorenz; WALLNER, Michael; GADERMAIER, Gabriele; BRIZA, Peter; KARNER, Ingrid; TORRES, Rogério Tanan; ALVAREZ, Juan Ricardo Urrego; WUENSCHMANN, Sabina; CHAPMAN, Martin; FERREIRA, Fatima; PINHEIRO, Carina Silva. N-terminal peptide deletion influences immunological and structural features of Blo t 5. **Allergy**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 1503–1507, jun. 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14176>.

DALL'ANTONIA, Fabio; PAVKOV-KELLER, Tea; ZANGGER, Klaus; KELLER, Walter. *blomia*. **Methods**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 3–21, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.024>.

DEY, Debarati; SAHA, Goutam Kumar; PODDER, Sanjoy. A review of house dust mite allergy in India. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 1–14, maio 2019. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00366-4>.

DRAMBURG, Stephanie; HILGER, Christiane; SANTOS, Alexandra F.; DE LAS VECILLAS, Leticia; AALBERSE, Rob C.; ACEVEDO, Nathalie; AGLAS, Lorenz; ALTMANN, Friedrich; ARRUDA, Karla L.; ASERO, Riccardo; BALLMER-WEBER, Barbara; BARBER, Domingo; BEYER, Kirsten; BIEDERMANN, Tilo; BILO, Maria Beatrice; BLANK, Simon; BOSSHARD, Philipp P.; BREITENEDER, Heimo; BROUGH, Helen A.; BUBLIN, Merima; CAMPBELL, Dianne; CARABALLO, Luis; CAUBET, Jean Christoph; CELI, Giorgio; CHAPMAN, Martin D.; CHRUSZCZ, Maksymilian; CUSTOVIC, Adnan; CZOLK, Rebecca; DAVIES, Janet; DOULADIRIS, Nikolaos; EBERLEIN, Bernadette; EBISAWA, Motohiro; *et al.* EAACI Molecular Allergology User's Guide 2.0. **Pediatric Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 34, n. S28, p. e13854, mar. 2023. <https://doi.org/10.1111/pai.13854>.

FERNANDES, Antônio Márcio Santana. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA. [s. l.], 2022. .

FITZSIMMONS, Colin Matthew; FALCONE, Franco Harald; DUNNE, David William. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity.

Frontiers in Immunology, [s. l.], v. 5, 2014. DOI 10.3389/fimmu.2014.00061. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00061/abstract>. Acesso em: 9 set. 2025.

FOO, Alexander C. Y.; MUELLER, Geoffrey A. Abundance and Stability as Common Properties of Allergens. **Frontiers in Allergy**, [s. l.], v. 2, p. 769728, 28 out. 2021. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.769728>.

FORCHERT, Leandra; POTAPOVA, Ekaterina; PANETTA, Valentina; DRAMBURG, Stephanie; PERNA, Serena; POSA, Daniela; RESCH-MARAT, Yvonne; LUPINEK, Christian; ROHRBACH, Alexander; GRABENHENRICH, Linus; ICKE, Katja; BAUER, Carl-Peter; HOFFMAN, Ute; FORSTER, Johannes; ZEPP, Fred; SCHUSTER, Antje; WAHN, Ulrich; KEIL, Thomas; LAU, Susanne; VRTALA, Susanne; VALENTA, Rudolf; MATRICARDI, Paolo Maria. Der p 23-specific IgE response throughout childhood and its association with allergic disease: A birth cohort study. **Pediatric Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. e13829, jul. 2022. <https://doi.org/10.1111/pai.13829>.

GERDAY, Sara; SCHLEICH, Florence; HENKET, Monique; GUISSARD, Françoise; PAULUS, Virginie; LOUIS, Renaud. Revisiting differences between atopic and non-atopic asthmatics: When age is shaping airway inflammatory profile. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 100655, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2022.100655>.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global strategy for asthma management and prevention (2025). **Geneva**: GINA, 2025.

HAMMAD, Hamida; LAMBRECHT, Bart N. The basic immunology of asthma. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 6, p. 1469–1485, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.016>.

HAUSER, Michael; ROULIAS, Anargyros; FERREIRA, Fátima; EGGER, Matthias. Panallergens and their impact on the allergic patient. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1, dez. 2010. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-1>.

HEYMANN, Dario; MOHANRAM, Harini; KUMAR, Akshita; VERMA, Chandra S.; LESCAR, Julien; MISEREZ, Ali. Structure of a consensus chitin-binding domain revealed by solution NMR. **Journal of Structural Biology**, [s. l.], v. 213, n. 2, p. 107725, jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107725>.

HILLERICH, Vivienne; VALBERT, Frederik; NEUSSER, Silke; PFAAR, Oliver; KLIMEK, Ludger; SPERL, Annette; WERFEL, Thomas; HAMELMANN, Eckard; RIEDERER, Cordula; WOBBE-RIBINSKI, Stefanie; NEUMANN, Anja; WASEM, Jürgen; BIERMANN-STALLWITZ, Janine. Quality of life and healthcare costs of patients with allergic respiratory diseases: a cross-sectional study. **The European Journal of Health Economics**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 579–600, jun. 2024. <https://doi.org/10.1007/s10198-023-01598-3>.

HUANG, Huey-Jy; SARZSINSZKY, Eszter; VRTALA, Susanne. House dust mite allergy: The importance of house dust mite allergens for diagnosis and immunotherapy. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 158, p. 54–67, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.04.008>.

HUBERT, Jan; VRTALA, Susanne; SOPKO, Bruno; DOWD, Scot E.; HE, Qixin; KLIMOV, Pavel B.; HARANT, Karel; TALACKO, Pavel; ERBAN, Tomas. Predicting *Blomia tropicalis*

allergens using a multiomics approach. **Clinical and Translational Allergy**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. e12302, out. 2023. <https://doi.org/10.1002/clt2.12302>.

JACQUET, Alain; ROBINSON, Clive. Proteolytic, lipidergic and polysaccharide molecular recognition shape innate responses to house dust mite allergens. **Allergy**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 33–53, jan. 2020. <https://doi.org/10.1111/all.13940>.

JUSTO, X.; DÍAZ, I.; GIL, J. J.; GASTAMINZA, G. Prick test: evolution towards automated reading. **Allergy**, [s. l.], v. 71, n. 8, p. 1095–1102, ago. 2016. <https://doi.org/10.1111/all.12921>.

JUTEL, Marek; AGACHE, Ioana; ZEMELKA-WIACEK, Magdalena; AKDIS, Mübeccel; CHIVATO, Tomás; DEL GIACCO, Stefano; GAJDANOWICZ, Pawel; GRACIA, Ibon Eguiluz; KLIMEK, Ludger; LAUERMA, Antti; OLLERT, Markus; O'MAHONY, Liam; SCHWARZE, Jürgen; SHAMJI, Mohamed H.; SKYPALA, Isabel; PALOMARES, Oscar; PFAAR, Oliver; TORRES, Maria Jose; BERNSTEIN, Jonathan A.; CRUZ, Alvaro A.; DURHAM, Stephen R.; GALLI, Stephen J.; GÓMEZ, R. Maximiliano; GUTTMAN-YASSKY, Emma; HAAHTELA, Tari; HOLGATE, Stephen T.; IZUHARA, Kenji; KABASHIMA, Kenji; *et al.* Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: Adapted to modern needs: An EAACI position paper. **Allergy**, [s. l.], v. 78, n. 11, p. 2851–2874, nov. 2023. <https://doi.org/10.1111/all.15889>.

KIM, Ji Tae; LEE, Jongsun; YUK, Jie Eun; SONG, Hangyeol; KIM, Hyunho; KIM, Sung Hyun; KIM, Dong Jun; SHIN, Yeji; LEE, Deug-Chan; JEONG, Kyoung Yong; PARK, Jung-Won. Novel Sensitive, Two-site ELISA for the Quantification of Der f 1 Using Monoclonal Antibodies. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 665, 2021. <https://doi.org/10.4168/aaair.2021.13.4.665>.

LUO, Wenting; ZHANG, Jiale; ZHENG, Xianhui; LI, Aoli; XV, Miaoyuan; ZHOU, Dongmei; YUAN, Cunyin; CUI, Yubao; SUN, Baoqing. Identification of rBlo t 41 with a chitin-binding type-2 domain: A novel major allergen from *Blomia tropicalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 262, p. 129972, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129972>.

MARTÍNEZ, Dalgys; CANTILLO, Jose Fernando; HERAZO, Helber; WORTMANN, Judith; KELLER, Walter; CARABALLO, Luis; PUERTA, Leonardo. Characterization of a hybrid protein designed with segments of allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 196, p. 103–112, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.012>.

MASCARENHAS, Jean Márcia Oliveira; SILVA, Rita De Cássia Ribeiro; ASSIS, Ana Marlúcia Oliveira De; PINTO, Elizabete De Jesus; CONCEIÇÃO, Jackson Santos; BARRETO, Maurício Lima. Sintomas de asma e fatores associados em adolescentes de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 181–193, mar. 2016. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201600010016>.

MILLER, Jeffrey D. The Role of Dust Mites in Allergy. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 312–329, dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8693-0>.

MRKIĆ KOBAL, Iva; PLAVEC, Davor; VLAŠIĆ LONČARIĆ, Željka; JERKOVIĆ, Ivana; TURKALJ, Mirjana. Atopic March or Atopic Multimorbidity—Overview of Current Research. **Medicina**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 21, 22 dez. 2023. <https://doi.org/10.3390/medicina60010021>.

MUDDALURU, Varun; VALENTA, Rudolf; VRTALA, Susanne; SCHLEDERER, Thomas; HINDLEY, James; HICKEY, Pascal; LARCHÉ, Mark; TONTI, Elena. Comparison of house dust mite sensitization profiles in allergic adults from Canada, Europe, South Africa and USA. *Allergy*, [s. l.], v. 76, n. 7, p. 2177–2188, jul. 2021. <https://doi.org/10.1111/all.14749>.

OGBURN, Ryenne N.; RANDALL, Thomas A.; XU, Yingrong; ROBERTS, Julia H.; MEBRAHTU, Betelihem; KARNUTA, Jaret M.; RIDER, S. Dean; KISSLING, Grace E.; LONDON, Robert E.; POMÉS, Anna; ARLIAN, Larry; FITZGERALD, Michael C.; MUELLER, Geoffrey A. Are dust mite allergens more abundant and/or more stable than other *Dermatophagoides pteronyssinus* proteins? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, [s. l.], v. 139, n. 3, p. 1030-1032.e1, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.016>.

PAULI, Gabrielle; WURMSER, Carole; ROOS, Antoine; KOKOU, Cosme; HUANG, Huey-Jy; D'SOUZA, Nishelle; LUPINEK, Christian; ZAKZUK, Josefina; REGINO, Ronald; ACEVEDO, Nathalie; CARABALLO, Luis; VRTALA, Susanne; VALENTA, Rudolf. Frequent IgE recognition of *Blomia tropicalis* allergen molecules in asthmatic children and young adults in equatorial Africa. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 14, p. 1133935, 2 jun. 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1133935>.

PINHEIRO, Carina S.; SILVA, Eduardo S.; DE ANDRADE BELITARDO, Emília M. M.; PACHECO, Luis G. C.; AGUIAR, Eric R. G. R.; ALCANTARA-NEVES, Neuza M.; GADERMAIER, Gabriele; FERREIRA, Fatima. *En route* to personalized medicine: uncovering distinct IgE reactivity pattern to house dust mite components in Brazilian and Austrian allergic patients. *Clinical and Translational Allergy*, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e12004, mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/clt2.12004>.

PULIDO-GUILLEN, Norma A; MORALES-ROMERO, Jaime; BEDOLLA-BARAJAS, Martín; BEDOLLA-PULIDO, Tonantzin I; JIMÉNEZ-CARRILLO, Claudia E; ARELLANO-ARTEAGA, Kevin J; ROBLES-FIGUEROA, Martín. Association Between Allergic Rhinitis and Asthma in Adults With Loss of Interest in Sex. *Cureus*, [s. l.], 28 mar. 2023. DOI 10.7759/cureus.36823. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/136209-association-between-allergic-rhinitis-and-asthma-in-adults-with-loss-of-interest-in-sex>. Acesso em: 17 maio 2025.

RODINKOVA, Victoria V.; YURIEV, Serhii D.; KRYVOPUSTOVA, Mariia V.; MOKIN, Vitalii B.; KRYZHANOVSKYI, Yevhenii M.; KURCHENKO, Andrii I. Molecular Profile Sensitization to House Dust Mites as an Important Aspect for Predicting the Efficiency of Allergen Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 13, p. 848616, 22 mar. 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848616>.

SANTOS DA SILVA, Eduardo; ASAM, Claudia; LACKNER, Peter; HOFER, Heidi; WALLNER, Michael; SILVA PINHEIRO, Carina; ALCÂNTARA-NEVES, Neuza Maria; FERREIRA, Fatima. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *International Archives of Allergy and Immunology*, [s. l.], v. 172, n. 4, p. 203–214, 2017. <https://doi.org/10.1159/000464325>.

SANTOS, Sara P.O.; GARCÉS, Luis Fabian S.; SILVA, Filipe S.R.; SANTIAGO, Leonardo F.; PINHEIRO, Carina S.; ALCANTARA-NEVES, Neuza M.; PACHECO, Luis G.C. Engineering an optimized expression operating unit for improved recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, [s. l.], v. 199, p. 106150, nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106150>.

SANTOS DA SILVA, Eduardo; MARQUES PONTE, João Carlos; BARBOSA DA SILVA, Márcia; SILVA PINHEIRO, Carina; CARVALHO PACHECO, Luis Gustavo; FERREIRA, Fatima; BRIZA, Peter; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 180, n. 3, p. 159–172, 2019. <https://doi.org/10.1159/000501964>.

SARZSINSZKY, Eszter; LUPINEK, Christian; VRTALA, Susanne; HUANG, Huey-Jy; HOFER, Gerhard; KELLER, Walter; CHEN, Kuan-Wei; PANAITESCU, Carmen Bunu; RESCH-MARAT, Yvonne; ZIEGLMAYER, Petra; ZIEGLMAYER, René; LEMELL, Patrick; HORAK, Friedrich; DUCHÊNE, Michael; VALENTA, Rudolf. Expression in *Escherichia coli* and Purification of Folded rDer p 20, the Arginine Kinase From *Dermatophagoides pteronyssinus*: A Possible Biomarker for Allergic Asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 154, 2021. <https://doi.org/10.4168/aair.2021.13.1.154>.

SCOLA, Anne-Marie; LOXHAM, Matthew; CHARLTON, Steven J; PEACHELL, Peter T. The long-acting β -adrenoceptor agonist, indacaterol, inhibits IgE-dependent responses of human lung mast cells. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 267–276, set. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00178.x>.

SILVA, Eduardo Santos Da; PINHEIRO, Carina Silva; PACHECO, Luis Gustavo Carvalho; ALCANTARA-NEVES, Neuza Maria. *Dermatophagoides* spp. hypoallergens design: what has been achieved so far? **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 163–177, 3 mar. 2020. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1712360>.

TANG, Ren-Bin. House dust mite-specific immunotherapy alters the natural course of atopic march. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 109–112, fev. 2020. <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000231>.

TANG, Xin; LI, Mei. The role of the skin in the atopic march. **International Immunology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 567–577, 26 out. 2024. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxae053>.

THOMAS, Wayne R. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. **Allergology International**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 304–311, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.05.004>.

VAN HAGE, Marianne; HAMSTEN, Carl; VALENTA, Rudolf. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 140, n. 4, p. 974–977, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>.

VIEIRA, Camilo; SILVA, Raphael; SILVEIRA, Elisânia; FERNANDES, Antônio; JARAMILLO-HERNÁNDEZ, Dumar; GARCÉS, Luis; FONSECA, Larissa; MACHADO, Bruna; FERNANDES, Jamille; PINHEIRO, Gabriela; CRUZ, Álvaro; FERREIRA, Fatima; COOPER, Philip; PACHECO, Luis; ALCANTARA-NEVES, Neuza; PINHEIRO, Carina; DA SILVA, Eduardo. Removal of N-Terminal Peptide Impacts Structural Aspects of an IgE-Reactive Recombinant Der p 5. **Allergies**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 184–201, 18 set. 2023. <https://doi.org/10.3390/allergies3030012>.

VOS, Theo; LIM, Stephen S; ABBAFATI, Cristiana; ABBAS, Kaja M; ABBASI, Mohammad; ABBASIFARD, Mitra; ABBASI-KANGEVARI, Mohsen; ABBASTABAR, Hedayat; ABD-ALLAH, Foad; ABDELALIM, Ahmed; ABDOLLAHI, Mohammad; ABDOLLAHPOUR,

Ibrahim; ABOLHASSANI, Hassan; ABOYANS, Victor; ABRAMS, Elissa M; ABREU, Lucas Guimarães; ABRIGO, Michael R M; ABU-RADDAD, Laith Jamal; ABUSHOUK, Abdelrahman I; ACEBEDO, Alyssa; ACKERMAN, Ilana N; ADABI, Maryam; ADAMU, Abdu A; ADEBAYO, Oladimeji M; ADEKANMBI, Victor; ADELSON, Jaimie D; ADETOKUNBOH, Olatunji O; ADHAM, Davoud; AFSHARI, Mahdi; AFSHIN, Ashkan; AGARDH, Emilie E; AGARWAL, Gina; AGESA, Kareha M; AGHAALI, Mohammad; AGHAMIR, Seyed Mohammad Kazem; AGRAWAL, Anurag; AHMAD, Tauseef; AHMADI, Alireza; *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, [s. l.], v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, out. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).

WALSEMANN, Theresa; BÖTTGER, Marisa; TRIDL, Stephan; SCHWAGER, Christian; GÜLSEN, Askin; FREIMOOSER, Sina; ROESNER, Lennart Matthias; WERFEL, Thomas; JAPPE, Uta. Specific IGE against the house dust mite allergens Der p 5, 20 and 21 influences the phenotype and severity of atopic diseases. **Allergy**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 731–742, mar. 2023. <https://doi.org/10.1111/all.15553>.

WISE, Sarah K.; DAMASK, Cecelia; ROLAND, Lauren T.; EBERT, Charles; LEVY, Joshua M.; LIN, Sandra; LUONG, Amber; RODRIGUEZ, Kenneth; SEDAGHAT, Ahmad R.; TOSKALA, Elina; VILLWOCK, Jennifer; ABDULLAH, Baharudin; AKDIS, Cezmi; ALT, Jeremiah A.; ANSOTEGUI, Ignacio J.; AZAR, Antoine; BAROODY, Fuad; BENNINGER, Michael S.; BERNSTEIN, Jonathan; BROOK, Christopher; CAMPBELL, Raewyn; CASALE, Thomas; CHAABAN, Mohamad R.; CHEW, Fook Tim; CHAMBLISS, Jeffrey; CIANFERONI, Antonella; CUSTOVIC, Adnan; DAVIS, Elizabeth Mahoney; DELGAUDIO, John M.; ELLIS, Anne K.; FLANAGAN, Carrie; FOKKENS, Wytske J.; FRANZESE, Christine; GREENHAWT, Matthew; GILL, Amarbir; HALDERMAN, Ashleigh; HOHLFELD, Jens M.; *et al.* International consensus statement on allergy and rhinology: Allergic rhinitis – 2023. **International Forum of Allergy & Rhinology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 293–859, abr. 2023. <https://doi.org/10.1002/alr.23090>.

WONG, Kenneth H.; ZHOU, Qian; PRABHU, Nayana; FURUHASHI, Kazuki; CHUA, Yen Leong; GROTENBREG, Gijsbert M.; KEMENY, David M. *Blomia tropicalis* allergen 5 (*Blo t* 5) T-cell epitopes and their ability to suppress the allergic immune response. **Immunology**, [s. l.], v. 152, n. 2, p. 344–355, out. 2017. <https://doi.org/10.1111/imm.12772>.

XIONG, Qing; LIU, Xiaoyu; WAN, Angel Tsz-Yau; MALAINUAL, Nat; XIAO, Xiaojun; CAO, Hui; TANG, Man-Fung; NG, Judy Kin-Wing; SHIN, Soo-Kyung; SIO, Yang Yie; WANG, Mingqiang; SUN, Baoqing; LEUNG, Ting-Fan; CHEW, Fook Tim; TUNGTRONGCHITR, Anchalee; TSUI, Stephen Kwok-Wing. Genomic analysis reveals novel allergens of *Blomia tropicalis*. **Allergology International**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 340–344, abr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2023.11.004>.

YAN CHUA, Kaw; CHEONG, Nge; KUO, I-Chun; WAH LEE, Bee; CHENG YI, Fong; HUANG, Chiung-Hui; NYIN LIEW, Lip. The *Blomia tropicalis* Allergens. **Protein & Peptide Letters**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 325–333, 1 abr. 2007. <https://doi.org/10.2174/092986607780363862>.

YANG, Lan; FU, Jinrong; ZHOU, Yufeng. Research Progress in Atopic March. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 1907, 27 ago. 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01907>.

YI, F. C.; CHUA, K. Y.; CHEONG, N.; SHEK, L. P.; LEE, B. W. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. **Clinical & Experimental Allergy**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 1762–1767, nov. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02107.x>.

YURIEV, Serhii; RODINKOVA, Victoria; MOKIN, Vitalii; VARCHUK, Ilona; SHARIKADZE, Olena; MARUSHKO, Yuriy; HALUSHKO, Bohdan; KURCHENKO, Andrii. Molecular sensitization pattern to house dust mites is formed from the first years of life and includes group 1, 2, Der p 23, Der p 5, Der p 7 and Der p 21 allergens. **Clinical and Molecular Allergy**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1, 3 fev. 2023a. <https://doi.org/10.1186/s12948-022-00182-z>.

YURIEV, Serhii; RODINKOVA, Victoria; MOKIN, Vitalii; VARCHUK, Ilona; SHARIKADZE, Olena; MARUSHKO, Yuriy; HALUSHKO, Bohdan; KURCHENKO, Andrii. Molecular sensitization pattern to house dust mites is formed from the first years of life and includes group 1, 2, Der p 23, Der p 5, Der p 7 and Der p 21 allergens. **Clinical and Molecular Allergy**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1, 3 fev. 2023b. <https://doi.org/10.1186/s12948-022-00182-z>.

ZAKZUK, J; DONADO, K; MONDOL, E; MARRUGO, V; REGINO, R; LÓPEZ, Jf; HERNANDEZ, K; MERCADO, D; DENNIS, R; PUERTA, L; CARABALLO, L. IgE-Mediated Sensitization to Blo t 21 and Blo t 5 Is Associated With Asthma in the Tropics: A Case-Control Study. **Journal of Investigational Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 157–166, 18 jun. 2024. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0892>.

ZAKZUK, Josefina. Immunological and Biological Characterization of *Blomia tropicalis* Allergens. [s. l.], 2012. .

ZAKZUK, Josefina; BENEDETTI, Inés; FERNÁNDEZ-CALDAS, Enrique; CARABALLO, Luis. The Influence of Chitin on the Immune Response to the House Dust Mite Allergen Blo t 12. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 163, n. 2, p. 119–129, 2014. <https://doi.org/10.1159/000356482>.

ZHANG, Jiale; LUO, Wenting; CUI, YuBao; SUN, Baoqing. B-cell epitope peptide immunotherapy alleviates chitin-binding protein-induced type 2 airway inflammation in a *Blomia tropicalis*-murine model. **Respiratory Research**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 129, 9 abr. 2025. <https://doi.org/10.1186/s12931-025-03207-8>.

ZUIANI, Chiara; CUSTOVIC, Adnan. Update on House Dust Mite Allergen Avoidance Measures for Asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 50, set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11882-020-00948-y>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Metodologia

Indivíduos e soros

No presente estudo, foi realizado um ensaio utilizando 83 soros de indivíduos residentes em Salvador, BA, Brasil, com idade entre 18-25 anos, ambos os sexos, sendo 53 de doares alérgicos, com alergia definida da seguinte forma: história clínica de doença alérgica, teste cutâneo (SPT) positivo para *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* e 30 não alérgicos e que não apresentassem nenhum sintoma alérgico ao longo dos anos. Os soros eram pertencentes ao banco de soros do Laboratório de Alergia e Acarologia para o Elisa Indireto cuja coleta foi realizada mediante diretrizes do comitê de ética, sob parecer aprovado pela Faculdade de Medicina da UFBA, parecer CAAE45376814.0.0000.5577.

Para os soros da Colômbia, foram usados 30 indivíduos adultos de 25 a 32 anos de Villavicencio, incluídos como alérgicos e 10 não alérgicos. O comitê de ética do Conselho Geral de Investigações da Universidade de Llanos, Colômbia, aprovou os procedimentos experimentais de coleta de sangue, sob a aprovação de 50.100.2.249.

Como parte do projeto, também foram incluídos um banco com 299 indivíduos pertencentes ao projeto “Fatores de risco, biomarcadores e endofenotipos da asma grave (2012-2015) (“Caso-controle”)”, em especial, um coorte brasileira pertencentes ao Programa de Controle da Asma (ProAR), com objetivo principal de prestar atendimento médico integral a esses pacientes (Fernandes *et al*, 2014). Desse banco de dados, foram incluídos 222 pacientes asmáticos alérgicos aos ácaros, sendo 139 pacientes com asma alérgica leve e 83 pacientes com asma alérgica grave, ambos alérgicos aos ácaros da poeira doméstica, com idade 18-73 anos, ambos os sexos, com exames parasitológicos negativos e residentes em Salvador, BA, Brasil, além da inclusão de 77 controles negativos, indivíduos saudáveis, sem comorbidades, exames parasitológicos negativos e não alérgicos, com SPT negativo. Os documentos foram arquivados no respectivo laboratório ou organização responsável de cada país.

Expressão heteróloga dos alérgenos do Blo t 41 e Der p 20 em *E.coli* e teste de solubilidade

Para a padronização da expressão heteróloga das proteínas recombinantes seguiu os parâmetros similares aos de trabalhos anteriormente publicados (Sarzsinszky *et al.*, 2021; Walsemann *et al.*, 2023; Xiong *et al.*, 2024). Após confirmação da transformação da linhagem bacteriana, foram

selecionadas ao menos 3 colônias para dar início a expressão proteica, com a sua inoculação das colônias em 5 mL de meio LB suplementado com glicerol, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), sulfato de magnésio(MgSO₄) e tampão fosfato (1M de fosfato de sódio, pH 7.4) (Sarzsinszky et al., 2021) e indução da expressão através da adição de 1 Mm de Isopropil-b- D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) quando a OD600nm atingiu 0,3, 0,5 e 1,0. O tempo de expressão foi delimitado entre 2, 4 e 16 horas, sob agitação de 220 rpm, a 37°C (Sarzsinszky et al., 2021).

Alíquotas foram coletadas durante os tempos de 0 horas (antes da indução por IPTG), 2, 4 e 16 horas para posterior confirmação expressão dos recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15% (Blo t 41) e 12% (Der p 20). Após expressão, foi definido que a melhor densidade ótica de OD600 nm para o rBlo t 23 foi de 0.5 com o tempo de expressão de 4 horas, já para o rDer p 20 uma expressão de 2 horas com a OD600nm de 1.0. Após confirmação da expressão em pequena escala, uma nova expressão no volume de 1L foi realizado para ambos os recombinantes.

Após expressão, o volume total do cultivo foi centrifugado a 4000 g, 20 minutos, a 4°C, para a deposição do sedimento bacteriano, que foi ressuscitado primeiramente em tampão de lise não desnaturante 50 mM NaP, 6M de Ureia, pH 8 e em seguida em tampão desnaturante 50 mM NaP, 6M de Ureia, pH 8 e 50 mM TrisHCl, pH 9.5 e 50 mM TrisHCl, 6M de Ureia, pH 9.5 para o rBlo t 41 e rDer p 20, respectivamente. Uma proporção de 50 ml de tampão para cada grama de pellet foi utilizada para esta etapa. Este ressuscitado passou, em seguida, por lise celular através de sonicação, utilizando uma frequência de 35Hz. A sonicação foi realizada em banho de gelo e 8 ciclos de 20 segundos de sonicação e 20 segundos de descanso para o rBlo t 23. Já para o rDer p 20, a sonicação foi realizada com 4 ciclos de 30 segundos de sonicação e 30 segundos de descanso no gelo. O lisado foi centrifugado a 13000 g, 40 minutos, a 4°C e o sobrenadante armazenado.

A avaliação da solubilidade dos alérgenos recombinantes também foi realizada por meio de SDS-PAGE a 15% e 12%. A presença dos alérgenos recombinantes foi corroborada pela formação de bandas nas posições equivalentes aos pesos moleculares teóricos de 13 e 40 kDa para rBlo t 41 e rDer p 20, respectivamente.

Caracterização físico-química das proteínas recombinantes Blo t 41 e Der p 20

Western blot

Amostras puras de rBlo t 41 e rDer p 20 foram previamente dosadas e analisadas por SDS-PAGE a 15%. Um segundo gel foi utilizado para a transferência das proteínas para uma membrana de

nitrocelulose por 40 min a 20V. Para confirmar transferência, a membrana foi corada em solução de Red Ponceau durante 5 minutos, e logo em seguida incubada em solução de bloqueio PBS Tween Leite overnight à 4 °C. Após bloqueio, a membrana foi lavada em 3 ciclos de 3 minutos em PBS-Tween, onde adicionou-se um pool de soros (1:5) de pacientes alérgicos aos ácaros *B. tropicalis* e *D. pteronyssinus* por 16 horas, 4 °C. Finalizado tempo de incubação dos soros, foram realizados mais 3 ciclos de lavagens e então adicionados para incubação o anticorpo secundário IgG anti-IgE humano conjugado com HRP (1:1000) por 1 hora. Ao final, foram feitos mais 3 ciclos de lavagem e a membrana de celulose foi relevada em 30 segundos com reagente ECL (Sigma-Aldrich). A reação de foi detectada em fotodocumentor (Imagequant Las 500).

Análise de bioinformática comparativa do domínio de quitina conservado em ácaros da poeira doméstica

PROSITE foi utilizado para predição dos domínios conservados de ligação à quitina nos alérgenos de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*. Após predição, as sequencias foram alinhadas utilizando o Clustal Omega e visualizadas utilizando o software Jalview v. 2.11.4.0.

Resultados

Avaliação da cadeia conservada de quitina do Blo t 41 com alérgenos homólogos do *B.tropicalis* e *D. pteronyssinus* por alinhamento das sequências de aminoácidos

A Figura 1 mostra o alinhamento das sequencias de aminoácidos do alérgeno recombinando Blo t 41 que através da predição por alinhamento, possui um domínio de quitina conservado do tipo 2 (CBD-II), presente em alérgenos homólogos do *Blomia tropicalis* (Blo t 12, Blo t 18, Blo t 37) e *D. pteronyssinus* (Der p 15, Der p 18, Der p 23 e Der p 37).

		500	510	520	530	540	550	560	570	580	
Blo_t_12	69	EKTTTEETHSDDLIVHEGGKTY	HVVC--	HEEGPIHIQEMCNKYI	ICSKSGSLWYITVMPCSIGTK	FDPISRNCVLDN	-----	-----	-----	-----	144
Blo_t_18	396	EVV-----TDI-----	PGVFKC--	HSVGFKFRDHEYCFKYYDCVMGDFGLESTVMYCERH	QAFDEKTYKCVASQIPGC	-----	-----	-----	-----	-----	461
Blo_t_37	79	-----LSDSKFDCGTGKPDGFY	ISDDRTKFHECDH	-----HCPYDFHCPPLTY	FEPKKNVCVFDKDNHEHT	IMK---	PEVTTHA	149			
Blo_t_41	15	-----MNI	SAFECPO-ENGYFRHPTDQHRFFLCID	-----GREYEHCPANLV	WNQS	IHQCDYTTGPEDII	TTTTPTIPHGDRSR	87			
Der_p_15	465	DST-----	SETPKYTTYVDGHLIKC--	YKEGDLPHPTNIHKYLVCEYVNGWVWH	IMPCPPGTI	WCQEKLTCTITE	-----	-----	-----	-----	532
Der_p_18	396	EHV-----	TDI-----	PGVFHC--	HQEGFFRDKTYCAKYIECKKGDFGLEQTVHHCPNHSQAFDEVSR	TCVDHAKIPGC	-----	-----	-----	-----	462
Der_p_23	40	-----	QPDDKFECPS	RFGYFADPKDPHKFYICSN	-----WEAVHKDCPGNTR	WNDEETCT	-----	-----	-----	-----	90
Der_p_37	105	-----	HGNSK	FNCTGKEDDFYPDEKDATKFHECVN	-----GYPYDFECPPNTV	FDAKRKACAFRSAEQSL	ENEQSQPQSQK	178			

Figura 7. Alinhamento das sequencias de aminoácidos ligantes de quitina. Sequências de aminoácidos da proteína Blo t 41 (Acesso do GenBank número OQ285961.1), Blo t 12 (Acesso

do GenBank número U27479.1), Blo t 18 (Acesso do GenBank número OQ285956.1), Blo t 37 (Acesso do GenBank número OQ285982.1), Der p 15 (Acesso do GenBank número DQ078741.1), Der p 18 (Acesso do GenBank número DQ078739.1), Der p 23 (Acesso do GenBank número EU414751.1), Der p 37 (Acesso do GenBank número MG520330.1). Os aminoácidos idênticos foram destacados com marcação lilás para indicar o domínio predito de ligação à quitina tipo 2.

Curva de concentração para os recombinantes: Blo t 41 e Der p 20

Antes da realização dos ensaios imunoenzimáticos, foi realizado um ensaio para determinar qual seria a melhor concentração de reatividade dos alérgenos, e como mostrado na Figura 14, a concentração ótima para ambos os recombinantes foi 25 µg/ml e a subótima 6,25 µg/ml.

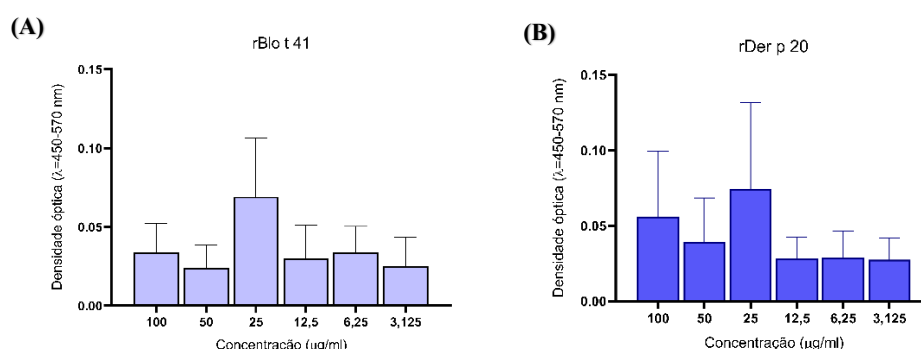


Figura 8. Curva de concentração ótima e subótima dos alérgenos recombinante Blo t 41 e Der p 20. (A) Curva de concentração do Blo t 41. (B) Curva de concentrado do Der p 20.

Referências

1. Fernandes, A. G. O., Souza-Machado, C., Coelho, R. C. P., Franco, P. A., Esquivel, R. M., Souza-Machado, A., & Cruz, Á. A.. (2014). Risk factors for death in patients with severe asthma. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, 40(4), 364–372.
2. SARZSINSZKY, Eszter; LUPINEK, Christian; VRTALA, Susanne; HUANG, Huey-Jy; HOFER, Gerhard; KELLER, Walter; CHEN, Kuan-Wei; PANAITESCU, Carmen Bunu;

RESCH-MARAT, Yvonne; ZIEGLMAYER, Petra; ZIEGLMAYER, René; LEMELL, Patrick; HORAK, Friedrich; DUCHÊNE, Michael; VALENTA, Rudolf. Expression in *Escherichia coli* and Purification of Folded rDer p 20, the Arginine Kinase From *Dermatophagoides pteronyssinus*: A Possible Biomarker for Allergic Asthma. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 154, 2021. <https://doi.org/10.4168/aair.2021.13.1.154>.

3. WALSEMANN, Theresa; BÖTTGER, Marisa; TRAUDL, Stephan; SCHWAGER, Christian; GÜLSEN, Askin; FREIMOOSER, Sina; ROESNER, Lennart Matthias; WERFEL, Thomas; JAPPE, Uta. Specific IGE against the house dust mite allergens Der p 5, 20 and 21 influences the phenotype and severity of atopic diseases. *Allergy*, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 731–742, mar. 2023. <https://doi.org/10.1111/all.15553>.

4. XIONG, Qing; LIU, Xiaoyu; WAN, Angel Tsz-Yau; MALAINUAL, Nat; XIAO, Xiaojun; CAO, Hui; TANG, Man-Fung; NG, Judy Kin-Wing; SHIN, Soo-Kyung; SIO, Yang Yie; WANG, Mingqiang; SUN, Baoqing; LEUNG, Ting-Fan; CHEW, Fook Tim; TUNGTRONGCHITR, Anchalee; TSUI, Stephen Kwok-Wing. Genomic analysis reveals novel allergens of *Blomia tropicalis*. *Allergology International*, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 340–344, abr. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2023.11.004>.