

DANIELE DANELLA FIGO

**Imunoterapia sublingual para alergia a ácaros: Composição do extrato
e dinâmica de reconhecimento de epítomos durante tratamento**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca FMUSP

SÃO PAULO

2022

DANIELE DANELLA FIGO

**Imunoterapia sublingual para alergia a ácaros: Composição do extrato
e dinâmica de reconhecimento de epítomos durante tratamento**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca FMUSP

SÃO PAULO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Figo, Daniele Danella
Imunoterapia sublingual para alergia a ácaros :
composição do extrato e dinâmica de reconhecimento de
epítomos durante tratamento / Daniele Danella Figo. -
- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Imunoglobulina E 2.Imunoglobulina
G 3.Ácaros de poeira doméstica 4.Imunoterapia
5.Epítomos 6.Proteoma

USP/FM/DBD-383/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese ao meu marido Lukas, minha mãe e meu pai, Meire e José Roberto e minha irmã Viviane, sem eles, hoje, eu não estaria aqui.

AGRADECIMENTOS

Com esses últimos anos sendo bem *atípicos*, gostaria de começar agradecendo primeiro minha família, que me sustentou até aqui. Meu marido Lukas, meu melhor amigo, parceiro de vida e maior incentivador, sem você seria muito menos divertido, emocionalmente e financeiramente impossível terminar esse doutorado. Obrigada. Minha mãe e meu pai, Meire e José Roberto, pelo amor e apoio incondicional, nunca serei capaz de agradecer por tanto. Minha irmã, Viviane, minha melhor amiga, pelos desabafos em momentos sérios e os muitos momentos de distração, muitas reprises de The office e risadas compartilhadas. Ao Ozzy, meu gato, meu companheiro, meu amorzinho, que não me deixou sozinha nunca, mesmo quando era tudo que eu queria. Vocês me mantiveram viva até aqui. Tendo atravessado a pandemia do COVID-19 durante a execução desse trabalho, uma depressão profunda e um diagnóstico tardio no Transtorno do Espectro Autista, preciso agradecer o Dr. Davi Neves, meu psiquiatra, por todo suporte em reestabelecer minha saúde mental. Agradeço à minha orientadora, Dra. Keity Souza Santos por me acolher, mais uma vez como sua aluna, pela confiança, amizade e atenção, por todas as horas de ligações e chamadas de vídeo, de assuntos aleatórios, até as ligações tardes da noite até pegar no sono, para finalização desse trabalho. Ao nosso grupo de alergia: Anne, Ariane, Everton, Jamille, Jhosie e Safiri... pelas conversas, cafés, experiências, experimentos e bancadas divididas ao longo desses anos, muito obrigada. Ao Dr. Clóvis Eduardo Santos Galvão, por me aceitar como uma parte do seu projeto, por todas as discussões e contribuições, não somente referente a esse projeto, mas todos os que trabalhamos juntos. Ao Cesar Remuzgo, pela disposição, ensinamentos e contribuições nesse projeto. Ao Washington e a Deia, pela prestatividade e disponibilidade sempre. Agradeço a todos os colegas do Incor e da FMUSP que fizeram parte da minha rotina durante esses cinco anos de trabalho. Agradeço À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

*You are young and life is long, and there is time to kill today
And then one day you find ten years have got behind you
No one told you when to run, you missed the starting gun*

Time – Pink Floyd
(The Darkside of the Moon - 1973)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. Introdução	1
1.1 Doenças alérgicas e mecanismos da alergia.....	1
1.2 Alergia como um problema crescente.....	2
1.3 Rinite alérgica	3
1.4 Principais alérgenos de ácaros.....	4
1.5 Imunoterapia	7
1.5.1 Imunoterapia sublingual.....	10
1.6 Extratos alergênicos	10
1.7 Alergologia molecular e medicina de precisão	13
1.8 Mapeamento de epítomos.....	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. PLANO DE TRABALHO	17
4. OBJETIVOS	18
5. MÉTODOS	19
5.1 Seleção dos pacientes	19
5.2 Caracterização do extrato de ácaros	20
5.2.1 Eletroforese 1D e 2D.....	20
5.2.2 Western blotting	21
5.2.3 Shotgun	22
5.2.3.1 Digestão de proteínas em solução	22
5.2.3.2 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas.....	23
5.2.3.3 Análise de dados	23
5.3 Microarray de epítomos	24
5.3.1 Análise estatística.....	25
5.3.2 Modelagem de proteínas	25
6. RESULTADOS	27
6.1 Caracterização do extrato usado na imunoterapia sublingual	27
6.2 <i>Microarray</i> de epítomos.....	39
7. DISCUSSÃO	49

8. CONCLUSÃO	57
9. REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcento
°C	grau Celsius
1D	primeira dimensão
1x	uma vez
2D	segunda Dimensão
3D	terceira Dimensão
Å	Angstrom (1nm)
aa	aminoácidos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	células apresentadoras de antígenos
ARIA	do inglês, <i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>
BAU	do inglês, <i>bioequivalent allergenic unit</i> (unidade alérgica bioequivalente)
Blo t	<i>Blomia tropicalis</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBC	do inglês, <i>commassie blue colloidal</i>
CD	células dendríticas
Der f	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DTT	ditiolreitol
ELISA	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	ácido clorídrico
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
IAE	imunoterapia alérgica específica
IEF	do inglês, <i>isoelectric focusing</i> (focalização isoeletrica)
IgE	imunoglobulina tipo E
IgG	imunoglobulina tipo G

IgG4	imunoglobulina tipo G subclasse 4
IL	interleucinas
ILC	do inglês, <i>innate lymphoid cell</i> (células linfóides inatas)
IMF	intensidade média de fluorescência
ISAAC	do inglês, <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
ITSL	imunoterapia sublingual
IUIS	do inglês, <i>International Union of Immunological Societies</i>
KdA	quilodalton
LC	células de Langerhans
M	molar
m/v	molaridade/volume
m/z	massa/carga
mA	miliampere
MAP	Monografia sobre Produtos Alérgicos
mg	miligrama
MHC	do inglês, <i>major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
min	minutos
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
N	amino-terminal
nL	nanolitros
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial de hidrogênio
pI	ponto isoelétrico
PNU	unidade de nitrogênio protéico
PPIR	produto-padrão interno de referência
ppm	partes por milhão
RA	rinite alérgica
s	segundos
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	tampão tris salino

TGF-β	do inglês, transforming growth factor (fator de transformação do crescimento beta)
Th	do inglês, <i>T helper</i> (células T auxiliaadoras)
UCSF	do inglês, <i>University of San Francisco</i>
US\$	dólares americanos
v/v	volume\volume
VEF	volume expiratório forçado
Vh	volt hora
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrometros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação das respostas imunes alérgicas como consequência da imunoterapia alérgeno específica (IAE). Células Treg induzidas por IAE que produzem IL-10, TGF- β e IL-35 e também expressam moléculas de superfície como CTLA4 e PD1, todas as quais contribuem para a supressão. As células Treg suprimem células Th2, basófilos e eosinófilos e também induzem células Breg alérgeno-específicas. O meio supressivo limita a produção de IgE e induz produção de IgG4 a partir de células B. Células Breg, células NKreg e células ILCreg contribuem para a indução e manutenção da tolerância específica ao alérgeno. (bas: basófilos, eos: eosinófilos, ILCreg: células linfóides inatas reguladoras, NKreg: células natural killer reguladoras, Treg: células T reguladoras).....	09
Figura 2. Etapas de execução deste trabalho.....	17
Figura 3. Extrato de ácaros diluído em PBS 1x (15, 20 e 25 μ g) em 1D-SDS-PAGE 12% corado com Comassie. MM = marcador molecular.....	27
Figura 4. (a) 2D-SDS-PAGE 12% (ponto isoelétrico (pI) 3–10) corado com Comassie. (b) Western blotting 2D (WB 2D) do pool de soro (n=10) dos pacientes pré-imunoterapia.....	28
Figura 5. Extrato de ácaros sonificado e diluído em tampão de extração 2 (20 μ g) em 1D-SDS-PAGE 12% corado com Comassie. MM = marcador molecular.....	29
Figura 6. Western Blotting do extrato usado na imunoterapia sublingual. (a) Western blotting individual de pacientes pré e pós 1-ano de ITSL. (b) Possíveis alérgenos presentes no extrato de acordo com a massa molecular.....	31
Figura 7. Alérgenos presentes no extrato comercial usado da imunoterapia sublingual identificados por <i>shotgun</i> agrupados por fonte alergênica identificada.....	36
Figura 8. Espécies de ácaros presentes no extrato usado na imunoterapia sublingual identificados por <i>shotgun</i>	37
Figura 9. Alérgenos do gênero <i>Dermatophagoides</i> identificados no <i>shotgun</i>	38
Figura 10. Diversidade de peptídeos IgE e IgG4 pré e pós 1 ano de tratamento. Linhas verdes indicam aumento de mais de 20%.....	40
Figura 11. Diversidade de reatividade de peptídeos pré e pós 1-ano de imunoterapia. (a) Diversidade de peptídeos IgE para alérgenos de; (b) Diversidade de peptídeos IgG4 para alérgenos de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ; (c) Diversidade de peptídeos IgE para alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i> ; (b) Diversidade de peptídeos IgG4 para alérgenos de <i>Blomia tropicalis</i> . Linhas verdes indicam aumento de mais de 20%, linhas vermelhas indicam uma diminuição de no mínimo 20%, linhas azuis foram consideradas inalteradas (<20% de alteração).....	41
Figura 12. Intensidade da reatividade de anticorpo aos peptídeos de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e <i>Blomia tropicalis</i> analisados para cada alérgeno. (a) Amplitude de IgE pré e pós-1 ano de ITSL. (b) Amplitude de IgG4 pré e pós-1 ano de ITSL. Box plot, do mínimo ao máximo, mostrando todos os	

pontos. Teste de Wilcoxon foi realizado para comparar as intensidades pré e pós para cada alérgeno. IMF= Intensidade Média de Fluorescência. *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.0001.....

43

Figura 13. Localização dos epítomos e amplitude de resposta para IgE e IgG4 pré e pós 1-ano de ITSL. A posição dos epítomos foi atribuída considerando a sequencia completa da proteína. IMF= Intensidade média de fluorescência.....

45

Figura 14. Modelagem de proteínas da estrutura terciária de alérgenos destacando peptídeos/epítomos detectados no microarray. Em amarelo epítomos de IgE pré-ITSL, em azul epítomos de IgG4 pós 1 ano ITSL e em rosa regiões com afinidade aos dois anticorpos.....

47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alérgenos descritos de <i>Blomia tropicalis</i> e <i>Dermatophagoides pteronissinus</i>	06
Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos pacientes.....	20
Tabela 3. Alérgenos selecionados para inclusão no microarray de peptídeos.....	25
Tabela 4. Proteínas identificadas no extrato usado na imunoterapia sublingual.....	32
Tabela 5. Epítomos específicos IgG4 1 ano após ITSL.....	48

RESUMO

Figo DD. Imunoterapia sublingual para alergia a ácaros: composição do extrato e dinâmica de reconhecimento de epítomos durante tratamento [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A Imunoterapia Alérgeno Específica (IAE) é um tratamento seguro e eficaz com efeitos duradouros. Ácaros de Poeira Domiciliar estão entre as principais fontes de alérgenos no mundo e são uma das IAE mais aplicadas. Dentre os ácaros, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) e *Blomia tropicalis* (Blo t) são as principais espécies clinicamente relevantes nos países tropicais. Der p 1, 2, 5, 7, 23 e 21 parecem representar os alérgenos mais importantes. Enquanto Der p 10 (tropomiosina), seja considerado um alérgeno *maior* em outras fontes, como camarão e barata, é considerado um alérgeno *menor* em ácaros, para populações que não estão normalmente expostas a baratas, diferentemente do que acontece no Brasil. *Blomia tropicalis* é uma espécie menos estudada, sendo Blo t 5 seu alérgeno principal. A dinâmica de reconhecimento de epítomos ao longo da IAE ainda não foi bem estudada, além disso, regiões antigênicas capazes de induzir IgG, mas não anticorpos IgE são especialmente interessantes como alvos promissores para formulação de vacinas. Por outro lado, a despeito dos grandes avanços feitos na área de alergologia molecular para o diagnóstico das alergias, há um grande descompasso em relação ao tratamento, já que falta padronização dos extratos em relação à qualidade e à quantificação de alérgenos, cuja composição permanece pouco estudada. Portanto, nosso objetivo foi caracterizar o extrato de ácaros utilizado nessa imunoterapia e avaliar a dinâmica de reconhecimento de epítomos de IgE e IgG4 durante imunoterapia sublingual (ITSL) bem como identificar epítomos capazes de induzir IgG4, mas não IgE em indivíduos alérgicos. Para isso, as sequências dos alérgenos mais relevantes, além do Der p 10 foram incluídas em um *microarray* de peptídeos 15-aa e testadas contra um *pool* de soros de 10 pacientes pré e pós 1-ano de imunoterapia ITSL. Foi também realizada análise proteômica por *shotgun* do extrato comercial de ácaros utilizado nesses pacientes. Os dados da espectrometria de massas foram submetidos a análises para identificação em dois bancos de dados distintos, Astigmata e Swiss-Prot. As proteínas identificadas foram então submetidas à análise utilizando a ferramenta de predição de potencial alergênico AllerCatPro 2.0. Todos os alérgenos foram reconhecidos por pelo menos um isotipo de anticorpo e a diversidade de peptídeos reconhecidos foi maior após 1 ano para ambos os anticorpos. O perfil dinâmico de reconhecimento de epítomos seguiu o mesmo padrão de ligação molecular, com aumento da diversidade após 1 ano de ITSL tanto para IgE quanto para IgG4. Para melhor compreender se a IgG4 que foi produzida durante a imunoterapia tem especificidade similar ao perfil de sensibilização original foram comparados, em uma estrutura secundária e terciária, os padrões de ligação da IgG4 pós imunoterapia aos padrões de ligação IgE basal. Epítomos de IgG4 induzidos pela SLIT foram direcionados contra várias, mas não todas as regiões de ligação de IgE dos alérgenos e reagem também a áreas que não são relevantes para a ligação de IgE, mas podem estar envolvidas no bloqueio alostérico. Quinze epítomos de todas as moléculas, exceto Der p 10, reagiram apenas contra IgG4 e podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas

hipoalergênicas. Na análise por *shotgun* realizada com o mesmo extrato alergênico usado durante a ITSL, foram identificadas setenta e nove proteínas, dentre elas, dezoito alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e três de *Blomia tropicalis*. Identificamos também trinta e um alérgenos de outras dez espécies de ácaros. As outras vinte e sete moléculas identificadas dividem-se em alérgenos de outros artrópodes; insetos, como duas espécies de baratas; fungos; animais; parasitas e plantas. O extrato mostrou-se bastante rico e heterogêneo em número de alérgenos de ácaros, que apesar da diversidade identificada não estão quantificados. Verificamos que o extrato usado para imunoterapia contém muito mais alérgenos do que apenas Der p 1 e Der p 2, os únicos que precisam ser comprovados na mistura. Além disso, chama atenção a presença de alérgenos de outras fontes. Se por um lado a presença de outros alérgenos importantes pode ser útil para dessensibilização de outras moléculas, por outro, a detecção de outros alérgenos que podem ser contaminantes, podem interferir na segurança do tratamento ou até mesmo causar novas sensibilizações. A padronização de extratos alergênicos para imunoterapia é fundamental para garantir um tratamento eficaz e seguro e acompanhar os avanços alcançados no diagnóstico molecular, ademais, alguns epítopos IgG4 identificados podem fornecer ferramentas adicionais para tratamento futuro.

Descritores: Imunoglobulina E. Imunoglobulina G. Ácaros de poeira doméstica. Imunoterapia. Epítopos. Proteoma.

ABSTRACT

Figo DD. Sublingual immunotherapy for house dust mites: extract composition and dynamics of epitope recognition during treatment [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Allergen-specific Immunotherapy (AIT) is a safe and effective treatment with long-lasting effects. House dust mites (HDM) are midst the main source allergens worldwide and is one of the most applied AIT. Among HDM, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) and *Blomia tropicalis* (Blo t) are the main clinically relevant species in tropical countries. Der p 1, 2, 5, 7, 23 and 21 seem to represent the most important allergens. While Der p 10, (tropomyosin) although considered a major allergen in other sources such as shrimp and cockroach, is considered a minor allergen in populations that are not usually exposed to cockroach, differently of what happens in Brazil, where we do not have this epidemiological data. *Blomia tropicalis* is less extensively studied with Blo t 5 being its major allergen. Epitope dynamic profile along AIT is not well defined. Furthermore, antigenic regions that can elicit IgG but not IgE antibodies are especially interesting as promising targets for vaccine formulations. On the other hand, despite advances made in the field of molecular allergology for allergy diagnosis, there is a great discrepancy in relative to the treatment, since there is a lack of standardization of the extracts regarding quality and quantification of allergens, whose composition remains unknown. Therefore, our objective was to characterize the HDM extract used in sublingual immunotherapy (SLIT) and to evaluate the dynamics of recognition of IgE and IgG4 epitopes as well as to identify epitopes capable of inducing IgG4, but not IgE in allergic individuals. For this, sequences of most relevant allergens and also Der p 10 were included in a 15-mer peptide microarray and tested against pooled sera from 10 patients pre and post 1-year SLIT. A shotgun proteomic analysis of the commercial extract HDM used in these patients was also performed. Mass spectrometry data were analyzed for identification in two different databases, Astigmata and Swiss-Prot. The identified proteins were then subjected to analysis using the AllerCatPro 2.0 allergen potential prediction tool. All allergens were recognized by at least one antibody isotype and the diversity of recognized peptides was higher after 1 year for both antibodies. The dynamic profile of epitope recognition followed the same pattern of molecular binding, with increased diversity after 1 year of SLIT for both IgE and IgG4. To better understand if the IgG4 that was produced during immunotherapy had similar specificity to the original sensitization profile, in a secondary and tertiary structure, the IgG4 binding patterns after immunotherapy were compared to the basal IgE binding patterns. SLIT-induced IgG4 epitopes were directed against several, but not all IgE binding regions of the allergens, and also reacted to areas that are not relevant for IgE binding but may be involved in allosteric blocking. Fifteen epitopes of all molecules, except Der p 10, reacted only against IgG4 and could be potential targets for the development of hypoallergenic vaccines. In the shotgun analysis performed with the same allergen extract used during SLIT, seventy-nine proteins were identified, including eighteen allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and three from *Blomia tropicalis*. We also identified thirty-one allergens from ten other mite species. The

other twenty-seven molecules identified divide into allergens from other arthropods; insects, such as two species of cockroaches; fungi; animals; parasites and plants. The extract proved to be rich and heterogeneous in terms of number of mite allergens, which, despite the diversity identified, are not quantified. We found that the extract used for immunotherapy contains many more allergens than just Der p 1 and Der p 2, the only ones that need to be proven to be present in the mix. In addition, the presence of allergens from other sources is noteworthy. If, on the one hand, the presence of other important allergens can be useful for the desensitization of other molecules, on the other hand, the detection of other allergens that may be contaminants can interfere with the safety of the treatment or even cause unwanted new sensitization. The standardization of allergen extracts for immunotherapy is essential to ensure an effective and safe treatment and to follow the advances achieved in molecular diagnosis, in addition, some identified IgG4 epitopes may provide additional tools for future treatment.

Descriptors: Immunoglobulin E. Immunoglobulin G. House dust mites. Immunotherapy. Epitopes. Proteome.

1. Introdução

1.1 Doenças alérgicas e mecanismos da alergia

As alergias representam um conjunto de distúrbios mediados por respostas imunes inatas e adaptativas, juntamente com células epiteliais causando hipersensibilidade imunológica à moléculas ambientais não próprias e inicialmente inofensivas (alérgenos) (1, 2). As principais doenças alérgicas incluem rinite alérgica, asma alérgica, alergia alimentar, dermatite atópica, conjuntivite e rinosinusite crônica (1, 3).

Os exemplos mais comuns de fontes de alérgenos envolvidos nas reações com participação de IgE são ácaros, epitélio de animais, alimentos, fungos, polens, venenos de insetos e medicamentos (4).

Os mecanismos imunológicos envolvidos das doenças alérgicas podem ser divididos em duas fases principais: fase de sensibilização e fase efetora.

Durante a fase de sensibilização, os alérgenos são capturados nas vias aéreas, intestino ou pele por tipos específicos de células dendríticas (CDs) residentes da mucosa. Essas CDs internalizam o alérgeno e o transportam para o linfonodo mais próximo, onde esse alérgeno será processado e apresentado como peptídeos associados com moléculas de MHC de classe II para células T CD4+ *naive*, levando à produção de células CD4+ alérgeno específicas do perfil Th2. Essas células Th2 produzem altos níveis de IL-4 e IL-13 favorecendo o *switch* de classe para IgE das células B. Essas células B se diferenciam em plasmócitos e produzem grandes quantidades de IgE alérgeno-específicas, as quais se ligam aos receptores de alta afinidade à IgE (FcεRI) na superfície de mastócitos e basófilos, tornando o paciente sensibilizado. Nessa fase, o paciente não apresenta sintomas clínicos, mas ele está pronto para reagir em novos encontros com o alérgeno. Nesta fase, além das IgE-específicas, um *pool* de células de memória Th2 e B alérgeno-específicas são gerados após a expansão clonal, e também estão prontas para interagir em novos encontros com alérgenos (1).

Já na fase efetora da inflamação alérgica, temos uma reação de hipersensibilidade quando um novo encontro com o alérgeno causa uma ligação cruzada entre esse alérgeno e duas IgEs ligadas a FcεRI em basófilos ou mastócitos previamente sensibilizados. Essa ligação cruzada desencadeia a ativação e liberação de mediadores anafilactogênicos pré-

formados como, histamina, heparina ou proteases, *de novo* síntese de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, que são responsáveis pelos sintomas da fase imediata e inflamação aguda. A acumulação desses mediadores e a ativação de células Th2 alérgeno-específicas, juntamente com a ILC2, ativada por citocinas derivadas de células epiteliais que produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, desempenham um papel fundamental na manutenção dos níveis de IgE específicos, na eosinofilia e no recrutamento de células inflamatórias para tecidos inflamados, produção de muco e inflamação e dano tecidual, levando à inflamação crônica e caracterizando a fase tardia da alergia (1).

Dependendo dos tecidos afetados, essas reações se manifestam de maneiras diferentes. Os mais comumente acometidos são pele (urticária, angioedema), gastrointestinal (dor abdominal, vômitos, diarreia), cardiopulmonar (aumento de batimentos cardíacos, hipotensão, tosse). A forma mais grave da reação alérgica é a anafilaxia, que é uma reação de hipersensibilidade sistêmica caracterizada pelo acometimento de pelo menos dois desses sistemas, geralmente pele e mais um, onde normalmente há queda na pressão arterial, secundária à vasodilatação (4, 5).

1.2 Alergia como um problema crescente

As doenças alérgicas afetam a vida de mais de um bilhão de pessoas no mundo. Com uma epidemia crescente durante os últimos 60 anos, é esperado que sua prevalência possa atingir até 4 bilhões de pessoas em 2050 (6).

Embora as razões desse acontecimento ainda não sejam totalmente compreendidas, as interações do estilo de vida moderno e do exposoma têm sido citadas como um fator importante que contribui para o surto de doenças alérgicas em indivíduos geneticamente predispostos e epigeneticamente regulados (1, 7).

A diminuição da diversidade de micro-organismos é proposta como uma das principais causas do aumento da alergia. Essa hipótese da biodiversidade tem sido sustentada por alguns fatores como: uma baixa diversidade na microbiota intestinal na primeira semana de vida está associada com dermatite atópica (8); a probabilidade do desenvolvimento de asma em crianças criadas no meio rural é inversamente relacionada com a extensão de exposição a bactérias e fungos ambientais (9). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem

que uma “alta carga” antigênica nos estágios iniciais da vida, originada geralmente por infecções ou pela dieta podem “educar” o sistema imune e prevenir doenças alérgicas na infância (6).

O crescimento da rinite alérgica, asma e dermatite atópica tem sido definido como a “epidemia da alergia”. Durante os dois últimos séculos as alergias respiratórias têm se espalhado pelo mundo em todas as classes sociais. Mais recentemente, as alergias alimentares estão se tornando mais prevalentes. Essa “segunda onda” da alergia já gera um grande impacto nos despreparados sistemas de saúde (6).

1.3 Rinite alérgica

A rinite alérgica (RA) é caracterizada por espirros, congestão nasal, prurido nasal e coriza. É causada por reações imunes mediadas por IgE a alérgenos inalados (4, 10). Esses alérgenos incluem ácaros, pólenes, mofo e alérgenos de animais (11). Essas reações imunes envolvem inflamação da mucosa que são conduzidas por células do tipo 2 (12, 13). A rinite alérgica parece ser a consequência de exposições ambientais agindo sobre um *background* genético predisposto. Geralmente pode estar associada a asma e/ou conjuntivite (11).

Pode ser considerada a doença de maior prevalência entre as doenças respiratórias crônicas, afeta 400 milhões de pessoas no mundo (12). Pode acometer até 40% da população em alguns países da Europa (14). Nos Estados Unidos, os maiores estudos de prevalência sugerem que a rinite alérgica afete de 10% a 20% da população (15).

No Brasil, os estudos de prevalência foram realizados empregando o protocolo do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) e são limitados a jovens em idade escolar e adolescentes. Em 1996, a prevalência de rinite foi de 26,6% entre crianças de 6-7 anos e 34,2% entre os adolescentes (13-14 anos) e a de rinoconjuntivite 12,8% e 18,0%, respectivamente (16). Em novas avaliações em 2003 e 2012, foram observadas variações nos resultados com tendência geral de elevação para os dois sintomas avaliados (17, 18). Em adultos, existem dados da cidade de Curitiba, onde a prevalência foi 47% (19, 20).

Ainda que historicamente a RA tenha sido classificada como sazonal ou perene, essa distinção não foi bem reproduzida em estudos epidemiológicos que avaliaram alérgenos de

forma molecular, já que muitos pacientes são polissensibilizados. Assim, após a publicação do ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) passou-se então a classificar a rinite alérgica em intermitente ou persistente, bem como sua classificação em leve ou moderada/grave, segundo sintomas e impacto no dia a dia (11, 12).

O diagnóstico é realizado baseado na história clínica do paciente, *skin prick* testes com extratos alergênicos e pesquisa de IgE específica no sangue. O tratamento consiste em orientação e educação do paciente com relação ao controle ambiental, farmacoterapia e imunoterapia alérgeno específica (11).

Estima-se que o custo da rinite alérgica varie de US\$ 1,6 a US\$ 4,9 bilhões nos Estados Unidos (21) estando entre as dez razões mais frequentes de atendimento primário à saúde (22). A qualidade de vida é prejudicada em vários aspectos, com distúrbios do sono relatados em 88% das crianças e 57% dos adultos (23, 24). Outro estudo concluiu que os sintomas da RA têm impacto na qualidade de vida, qualidade do sono e também está relacionado com sintomas de depressão e ansiedade em todos os pacientes avaliados, mas os indivíduos com rinite perene e sintomas graves parecem sofrer mais intensamente seus efeitos (25). Uma revisão sistemática também verificou que a RA impacta substancialmente a produtividade no ambiente de trabalho (26).

Ainda que os sintomas da rinite não sejam graves o suficiente para oferecer risco de morte, o efeito sobre a qualidade de vida já está bem documentado, assim como o impacto econômico nos sistemas de saúde.

1.4 Principais alérgenos de ácaros

Os ácaros da poeira domiciliar estão entre as mais importantes fontes de alérgenos contendo diversas moléculas alergênicas que são identificadas como agentes etiológicos da rinite alérgica na população brasileira (27). As espécies sensibilizantes mais comuns são *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* (28, 29).

Neste trabalho vamos focar nos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* que serão os objetos desse estudo.

Para *Dermatophagoides pteronyssinus* Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, Der p 21 e Der p 23 parecem representar os alérgenos clinicamente mais relevantes. Os alérgenos Der p

1 e Der p 2 são alérgenos maiores, significa que são reconhecidos por mais de 50% dos pacientes alérgicos a ácaros, Der p 1 tem frequência de reatividade entre pacientes de de 70-100% e Der p 2 de 80-100% (30). Ambas as moléculas são provenientes principalmente de partículas fecais do ácaro e são as principais moléculas clinicamente relevantes (30). Recentemente descrito, o Der p 23, está presente no revestimento intestinal, sendo também liberado nas partículas fecais. É considerado um alérgenos maior, sendo reconhecido por 74% dos pacientes alérgicos ao *D. pteronyssinus* em níveis comparáveis aos dos principais alérgenos Der p 1 e Der p 2. Apresenta grande potencial de sensibilização alérgica em indivíduos predispostos (31).

Der p 5, Der p 7 e Der p 21 são considerados alérgenos intermediários, podendo induzir resposta em aproximadamente 40% dos pacientes (32). A porcentagem de sensibilização para esses alérgenos chega a ser maior em caso de pacientes asmáticos alérgicos a ácaros (33, 34).

Por outro lado, Der p 10, tropomiosina, embora seja considerado um alérgeno importante em outras fontes, como camarão e barata (35, 36), é considerado um alérgeno menor em populações sem exposição a baratas, o que é diferente no Brasil, mas os dados epidemiológicos são muito escassos.

Blomia tropicalis é um ácaro que foi descrito inicialmente como ácaro de armazenamento e hoje é considerado ácaro da poeira domiciliar em áreas tropicais e subtropicais, sendo este o caso do Brasil. É menos estudado e o Blo t 5 é seu principal alérgeno (37). É um alérgeno maior, reconhecido por até 98% dos pacientes em regiões tropicais, como Brasil. Apesar de possuir sequencias de aminoácidos similar com Der p 5, as duas moléculas possuem baixa reatividade cruzada (38). A base molecular para essa baixa reatividade cruzada ainda permanece desconhecida. Blo t 6 pertence a classe de quimiotripsina das proteases, ainda que vários estudos o tenham categorizado como um alérgeno menor, um recente estudo mostrou que essa molécula, produzida de forma recombinante, foi reconhecida por 63,3 e 76,7% de crianças com asma e eczema, respectivamente (29). Blo t 12, alérgeno maior, reconhecido por aproximadamente 50% dos pacientes, é uma proteína de ligação à quitina (29). Blo t 13, proteína de ligação de ácidos graxos, alérgeno menor, reconhecido por aproximadamente 11% dos pacientes (39).

Na tabela 1, encontra-se uma relação de todos os alérgenos de *Der p* e *Blomia* já descritos e registrados no WHO/IUIS *Allergen Nomenclature Sub-Committee* (Subcomite de nomenclatura de alérgenos).

Tabela 1. Alérgenos descritos de *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronissinus*.

Alérgenos	Relevância Clínica	Nome Bioquímico	Massa Molecular (SDS-PAGE)
Blo t 1	Maior	Cysteine protease	39 kDa
Blo t 2	Menor	ML-domain protein	14.5 kDa
Blo t 3	Maior	Trypsin	23.8 kDa
Blo t 4	Menor	Alpha-amylase	56 kDa
Blo t 5	Maior	-	14 kDa
Blo t 6	Menor	Chymotrypsin	25 kDa
Blo t 7	Menor	Bactericidal permeability-increasing like protein	25 kDa
Blo t 8	Menor	Glutathione S-transferase	27 kDa
Blo t 10	Menor	Tropomyosin	33 kDa
Blo t 11	Maior	Paramyosin	110 kDa
Blo t 12	Maior	-	14 kDa
Blo t 13	Menor	Fatty acid-binding protein	14.8 kDa
Blo t 19	Menor	Anti-microbial peptide homologue	7 kDa
Blo t 21	Maior	-	13 kDa
Der p 1	Maior	Cysteine protease	24 kDa
Der p 2	Maior	NPC2 family	15 kDa
Der p 3	Maior	Trypsin	31 kDa
Der p 4	Menor	Alpha-amylase	60 kDa
Der p 5	Menor	-	14 kDa
Der p 6	Menor	Chymotrypsin	25 kDa
Der p 7	Maior	Bactericidal permeability-increasing like protein	26, 30 and 31 kDa
Der p 8	Menor	Glutathione S-transferase	27 kDa
Der p 9	Maior	Collagenolytic serine protease	29 kDa
Der p 10	Menor	Tropomyosin	36 kDa

Der p 11	Maior	Paramyosin	103 kDa
Der p 13	Menor	Cytosolic Fatty Acid Binding Protein	15 kDa
Der p 14	Menor	Apolipophorin	177 kDa
Der p 15	Maior	Chitinase-like protein	58.8 and 61.4 kDa
Der p 18	Menor	Chitin-binding protein	49.2 kDa
Der p 20	Menor	Arginine kinase	40 kDa
Der p 21	Menor	-	14.726 kDa
Der p 23	Maior	Peritrophin-like protein domain (PF01607)	14 kDa, of recombinant also dimerizes
Der p 24	Maior	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein; Cytochrome b-c1 complex subunit 7	13 kDa
Der p 25	Menor	Triosphosphate isomerase	27 kDa
Der p 26	Maior	Myosin light-chain	14.1 kDa
Der p 28	Maior	Heat Shock Protein 70	72 kDa
Der p 29	Menor	Cyclophilin	27.7 kDa
Der p 30	Menor	Ferritin	12.1 kDa
Der p 31	Menor	Cofilin	16.8 kDa
Der p 32	Menor	inorganic pyrophosphatase	45 kDa
Der p 33	Maior	alpha-tubulin	44.2 kDa
Der p 36	Menor	-	23 kDa
Der p 37	Menor	Peritrophin-A domain containing protein	30 kDa
Der p 38	Maior	Bacteriolytic enzyme	15 kDa
Der p 39	Menor	Troponin C	18 kDa
Der p 40	Menor	Thioredoxin like protein	12 kDa

1.5 Imunoterapia

A imunoterapia alérgeno específica (IAE) tem sido utilizada para tratar doenças alérgicas por mais de 100 anos (40, 41, 42). Atualmente, a IAE é o único tratamento capaz de modificar o curso da doença e alterar a sua história natural (43).

É baseada na administração de doses gradualmente crescentes de extratos do alérgeno sensibilizante, levando ao desenvolvimento de tolerância clínica, assim, o paciente deixa de ter uma reação alérgica aquele alérgeno em condições que anteriormente provocariam sintomas (44). Tem por objetivo reduzir o grau de sensibilização e por consequência os sintomas característicos da alergia (43).

Os mecanismos da imunoterapia ainda não são totalmente elucidados, mas essa tolerância é acompanhada pela diminuição da infiltração local de basófilos e mastócitos. Além disso, existe a indução do fenótipo de células dendríticas tolerogênicas, que promovem o aumento de células T reguladoras, as quais desviam a resposta imune de Th2 para Th1 e induzem o aumento de células B reguladoras (45). Consequentemente, células Treg produzem citocinas como IL-10 e TGF- β e também utilizam moléculas inibitórias de superfície como CTLA4 e PD1 (46, 47). As Breg produzem IL10, TGF- β e IL-35 e seu papel na IAE já foi relacionado com a diminuição de IgE e aumento da produção de IgG4 (45, 47, 48). As células NKreg e células ILCreg contribuem para a indução e manutenção da tolerância específica ao alérgeno (47). A IAE modula eficientemente a ativação IgE-mediada e a liberação de histamina por mastócitos e basófilos devido a mecanismos dependentes de células Treg. A IL-10 também regula negativamente a função e a atividade dos eosinófilos, diretamente ou por diminuição na produção de IL-5 e reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos mastócitos. A IAE também resulta na diminuição do número de eosinófilos e seus mediadores nos tecidos (6). Além disso, já foi demonstrado que a imunoterapia é marcada inicialmente pelo aumento de IgE específica, seguido por aumento de IgG4 e posterior redução do IgE com aumento contínuo de IgG4 específica (49).

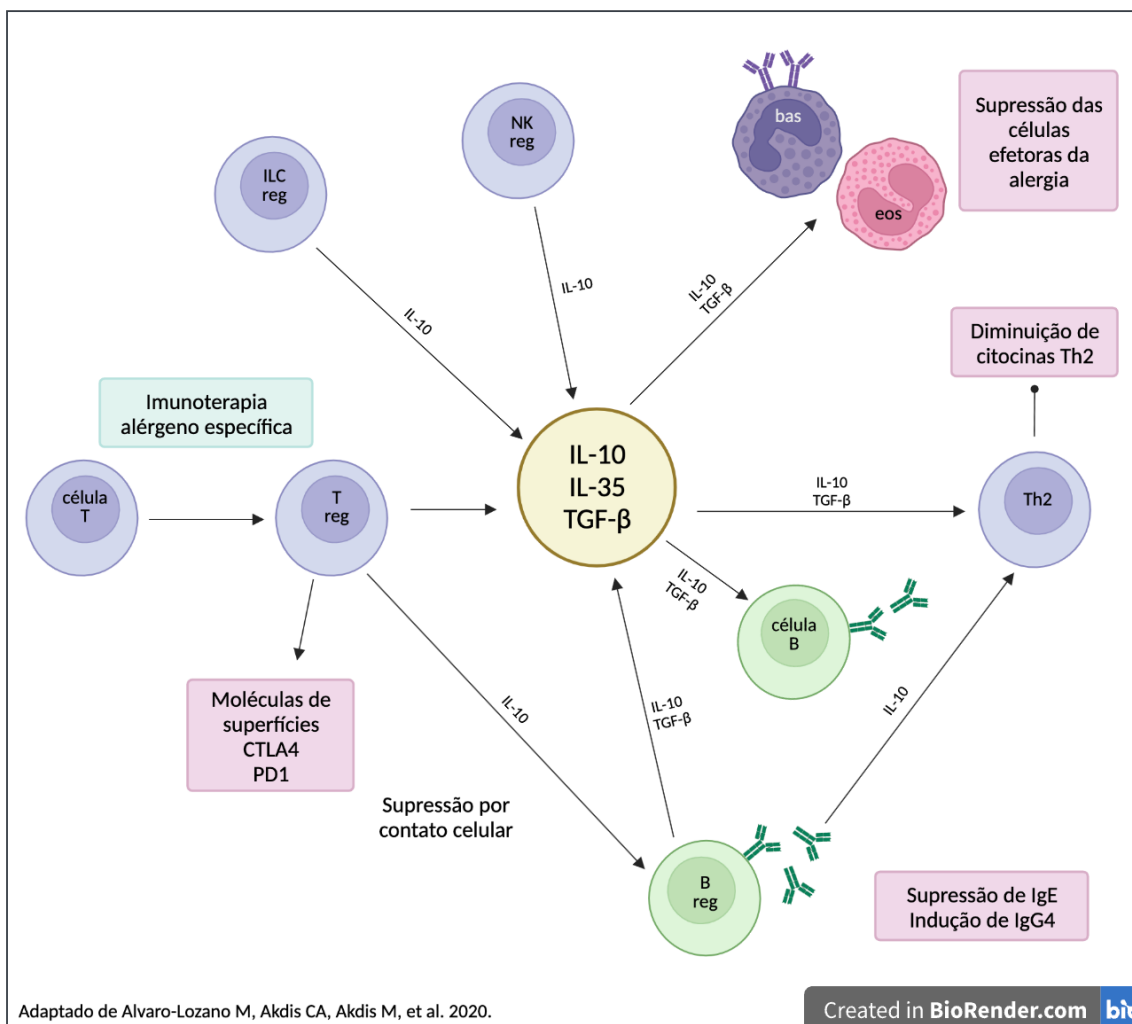


Figura 1. Regulação das respostas imunes alérgicas como consequência da imunoterapia alérgeno específica (IAE). Células Treg induzidas por IAE que produzem IL-10, TGF- β e IL-35 e também expressam moléculas de superfície como CTLA4 e PD1, todas as quais contribuem para a supressão. As células Treg suprimem células Th2, basófilos e eosinófilos e também induzem células Breg alérgeno-específicas. O meio supressivo limita a produção de IgE e induz produção de IgG4 a partir de células B. Células Breg, células NKreg e células ILCreg contribuem para a indução e manutenção da tolerância específica ao alérgeno. (bas: basófilos, eos: eosinófilos, ILCreg: células linfóides inatas reguladoras, NKreg: células natural *killer* reguladoras, Treg: células T reguladoras) (47).

A IAE, além de prevenir a progressão para doenças mais graves, como da rinite alérgica para asma (50), possui efeito curativo a longo prazo (51, 52, 53).

É realizada principalmente pela via subcutânea ou sublingual para crianças e adultos. (54). A imunoterapia sublingual (ITSL) tem mostrado ser uma alternativa segura e eficaz, com efeito duradouro após a sua interrupção (55).

1.5.1 Imunoterapia sublingual

A imunoterapia sublingual (ITSL) tem sido considerada uma alternativa conveniente e não invasiva a via subcutânea, que requer injeções frequentes e visitas a centros médicos, pois envolve a autoadministração do alérgeno sob a língua (56). Também é considerada uma abordagem mais segura, pois está associada a um menor risco de reações sistêmicas graves (56). As reações adversas mais associadas à ITSL são reações locais como coceira e inchaço na boca, que ocasionalmente podem persistir por algumas semanas (47).

A ITSL se beneficia das propriedades tolerogênicas da mucosa oral (57). Quando os alérgenos são administrados por essa via, as células de Langerhans (LC) são as primeiras a encontrarem os alérgenos. Elas estão localizadas dentro da mucosa e atuam como células apresentadoras de antígenos locais (APCs), captando alérgenos (58). Essas células migram para os linfonodos onde os alérgenos são apresentados para células CD4+ e CD8+ naïve para induzir sua diferenciação em células efectoras T *helper* (Th) e linfócitos T citotóxicos (CTL), que assim, desencadeiam as respostas imunes (58). A ITSL motiva a resposta imune no indivíduo alérgico a polarizar do fenótipo Th2 para o Th1 e células T reguladoras (células secretoras de TGF- β e IL-10) (59). Também acontece a mudança de isotipo de anticorpo de IgE para IgG, especialmente IgG4, e IgA em pacientes recebendo ITSL. Ainda foi sugerido que a ITSL exerce atividades inibitórias em células imunes inatas como eosinófilos, basófilos e ILCs 2 (57).

Vários ensaios clínicos mostraram reduções de 30% a 40% nos sintomas e no uso de medicação de resgate em pacientes com rinite alérgica após a imunoterapia sublingual (55, 60, 61, 62, 63). Uma revisão recente sobre o tema aponta que os mecanismos imunorregulatórios desencadeados pela ITSL ainda requerem mais atenção na literatura para investigar sua possível divergência daqueles desencadeados por outras vias de aplicação contra doenças alérgicas respiratórias (57).

1.6 Extratos alergênicos

Tanto o diagnóstico de alergia quanto a imunoterapia ainda dependem fortemente de extratos de fontes alergênicas, porém, a despeito dos grandes avanços feitos na área de alergologia molecular para o diagnóstico, há um grande descompasso em relação ao

tratamento, já que falta padronização dos extratos em relação à qualidade e a quantificação de alérgenos, cuja composição permanece pouco estudada.

A padronização dos extratos alergênicos, seja pela determinação das proteínas alergênicas totais, pela quantificação dessas proteínas e determinação de suas atividades biológicas é extremamente importante para melhorar a eficácia clínica da IAE.

Entre 1987 e 1998, a FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos padronizou 19 extratos alergênicos, entre eles, extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* (64). Para a padronização, dentre os diferentes métodos utilizados pela FDA, para os extratos de ácaros foi realizada uma avaliação da potência alergênica geral. A FDA desenvolveu uma forma de teste cutâneo titulado denominado ID₅₀EAL, que consiste na aplicação de quatro diluições crescentes em triplicata por via intradérmica, em indivíduos altamente alérgicos até a formação de um eritema. A soma dos diâmetros ortogonais mais longo e do ponto médio do eritema é determinada em cada diluição, e a dose logarítmica que produz uma resposta de 50mm (D50) é calculada. A média dos indivíduos (de 15 a 20) altamente alérgicos é usada para determinar o D50 para o extrato. Os extratos com um D50 médio de 14 receberam arbitrariamente o valor de 100.000 BAU/mL. Extratos que produzem respostas D50 equivalentes ao de referência podem ser considerados bioequivalentes e recebem a unidade (BAU = *bioequivalent allergenic unit*). Subseqüentes liberações de lotes podem ser realizadas *in vitro*, no caso de ácaros, por ensaios de inibição de ligação da IgE com *pool* de soro de pacientes alérgicos. O Centro de Avaliação e Pesquisa Biológica (*Center for Biologics Evaluation and Research* - CBER) providencia os extratos e *pool* de soros para os testes (64).

Os extratos não padronizados são rotulados com base nos valores de PNU (unidade de nitrogênio protéico) ou no peso do material de origem extraído com um determinado volume de fluido de extração (peso por volume) (65).

Já na Europa, o Comitê de Produtos Medicinais para Uso em Humanos (*Committee for Medicinal Products for Human Use* - CHMP) emitiu um *guideline* sobre a qualidade e produção de produtos alergênicos em 2008. Assim, os fabricantes devem garantir a padronização lote a lote, usando um produto-padrão interno de referência (PPIR), que é caracterizada por uma série ensaios físico-químicos e imunológicos. A comprovação da presença de alérgenos principais é normalmente utilizada para garantir a qualidade do

produto. A potência do extrato (ligação à IgE) deve ser determinada por algum método *in vitro* já validado, como ELISA (66). A Monografia sobre Produtos Alérgicos (MAP), um regulamento europeu, permite uma variação de 50% a 200%, desde que verificada por testes de inibição de IgE, do conteúdo de moléculas alergênicas individuais em um extrato. Isso significa, por exemplo, que para um extrato simples, contendo apenas três alérgenos maiores, podem existir lotes com conteúdos alergênicos muito altos ou muito baixos, incluindo todas as possibilidades intermediárias (67).

De acordo com as resoluções número 233, de 17 de agosto de 2005 e número 194, de 12 de dezembro de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, que falam sobre produção, comercialização, distribuição e registros de extratos alergênicos no país, o Brasil também adota o uso do PPIR. O PPIR é caracterizado pela determinação do perfil de proteínas, por métodos como, focalização isoeletrica, eletroforese em gel de poliacrilamida, entre outros ensaios. Para extratos alergênicos padronizados, a potência estimada obtida do teste de atividade alergênica total não deve ser menor do que 50% ou maior do que 200% da potência nominal, a mesma variação do regulamento europeu. O PPIR deve ser calibrado em relação ao alérgeno de referência internacional, quando este existir.

Ainda que existam normas para garantir qualidade dos extratos usados para o diagnóstico e tratamento das alergias e diversos ensaio clínicos corroborando a eficácia desses produtos usados para imunoterapia (55, 60, 61, 62), não existe a padronização das moléculas presentes nesses extratos.

Uma diferença importante entre diagnóstico e tratamento estão nas exigências regulatórias: enquanto é relativamente mais fácil com a biotecnologia moderna produzir uma molécula recombinante e utilizá-la em um diagnóstico *in vitro*, por outro, as demandas para testes pré-clínicos, estudos de toxicidade, e, finalmente, a fase 1-3 em estudos clínicos randomizados necessários para aprovação de um tratamento podem durar facilmente uma década e custar muito dinheiro. A força da alergia molecular no diagnóstico, onde o ideal da medicina de precisão é praticamente alcançado, com a possibilidade de ser possível se traçar um perfil molecular individualizado de sensibilização a IgE, torna-se um obstáculo no tratamento: pacientes com alergia e perfis de sensibilização diferentes, sendo tratados com extratos alergênicos em comum para todos (30).

1.7 Alergologia molecular e medicina de precisão

As variações observadas na resposta ao tratamento em pacientes com características clínicas semelhantes (denominadas fenótipo) reforçam o conceito de que, "um único tratamento não se adequa a todos" e encorajam a comunidade científica a determinar mecanismos fisiopatológicos específicos. Para este fim, a classificação de fenótipos de doença em subclasses denominadas endótipos, isto é, a identificação de características definidas por mecanismos específicos, leva em consideração as variações associadas nas vias genéticas, farmacológicas, fisiológicas, biológicas e imunológicas com cada fenótipo. O tratamento dirigido a um indivíduo com base no perfil endotípico, em vez de no perfil fenotípico, passou a ser denominado por consenso como medicina de precisão ou personalizada (68, 69). Assim, a medicina de precisão é o resultado de uma busca por melhores diagnósticos, tratamentos e prevenções de doenças (70).

A ideia de que os tratamentos individualizados para os pacientes devem ser adaptados às características específicas da doença desse paciente não é um novo conceito na prática da alergologia e alergia clínica. Esta noção teve sua fundamentação científica com a descrição de um protocolo de Noon e Freeman para imunizar pacientes afetados com rinite alérgica induzida por pólen de gramíneas com um extrato pólen destas gramíneas para reduzir a sua reatividade clínica a um alérgeno específico (40, 41, 42).

A necessidade de aperfeiçoamento das ferramentas diagnósticas trouxe para o campo da pesquisa em alergia a era da alergologia molecular, o princípio de diagnóstico por componentes, na qual componentes alergênicos podem ser identificados, caracterizados e produzidos na forma de proteína recombinante com a finalidade de incorporação em sistemas de diagnóstico molecular (70).

A imunoterapia alérgeno específica tem uma justificativa imunológica única, uma vez que sua abordagem é adaptada ao espectro de IgE específico de um indivíduo e modifica o curso natural da doença, podendo atualmente ser considerada um protótipo da Medicina de Precisão (71). Como a imunoterapia só modifica a resposta imune contra o alérgeno para qual está sendo administrada, se faz necessário que o diagnóstico seja preciso, para que então

aconteça a seleção do extrato a ser utilizado na imunoterapia, tornando-a dessa forma, uma abordagem de precisão (71).

1.8 Mapeamento de epítomos

O interesse por estudar os epítomos dos alérgenos surge devido ao seu potencial uso como peptídeos imunoterapêuticos, seja na indução de anticorpos bloqueadores, anergia ou tolerância: uma vez que sua administração, ao invés do alérgeno em sua forma “nativa”, pode solucionar problemas associados ao desencadeamento da desgranulação de mastócitos (72).

Existe uma vasta literatura que avalia perfis moleculares de reconhecimento de IgE e IgG4 durante a IAE (73, 74) e o mapeamento de epítomos data de aproximadamente 30 anos atrás (75). Alguns trabalhos anteriores identificaram epítomos em alérgenos de ácaros, como Der p 5 (76), Der p 7 (77), Der p 2 (78, 79), Der p 39 (80) e Blo t 11 (81) para caracterizar sítios de ligação de IgE ou de IgE e IgG por diversos métodos diferentes. Outros estudos utilizaram o mapeamento de epítomos com o objetivo de investigar a reatividade cruzada de anticorpos entre diferentes moléculas (38, 39, 82), Yi et al. avaliaram semelhanças entre Blo t 10 e Der p 10 (83). Já em 1996, Kobayashi et al (84) compararam epítomos reconhecidos por anticorpos IgE específicos para Der p 2 com aqueles reconhecidos por anticorpos IgG4 demonstrando suas diferenças e apontaram que estudos semelhantes, mapeando epítomos após imunoterapia, seriam cruciais para entender melhor essas diferenças. No entanto, ainda faltam estudos que revelem mudanças na ligação do epítomo durante o curso da IAE.

Devido aos avanços da alergologia molecular, novas vacinas para alergia estão sendo desenvolvidas, entre elas as vacinas de peptídeos. A imunoterapia com vacina hipoalergênica baseada em epítomos recombinantes de células B para alergia ao pólen de gramíneas demonstrou ser segura e eficaz (85, 86) e, em um estudo duplo-cego controlado por placebo, provou diminuir os sintomas alérgicos dos pacientes (85). Dado que a produção de anticorpos bloqueadores de IgE é pré-requisito crucial para eficácia clínica a longo prazo, estudos futuros são necessários para determinar se isso requer maturação contínua de afinidade de respostas IgG de células B por exposição contínua ou aumento da avididade de anticorpos bloqueadores devido à policlonalidade aumentada (87). Alguns benefícios possíveis para as vacinas peptídicas são que elas podem não induzir efeitos colaterais mediados por IgE ou

células T, têm alta especificidade, baixa capacidade de promover respostas de IgE específicas para alérgenos e a tecnologia pode ser aplicável para muitos alérgenos (88).

2. JUSTIFICATIVA

A imunoterapia sublingual (ITSL) para ácaros é focada nos alérgenos dos grupos 1 e 2, não havendo padronização dos extratos e estudos que avaliem a resposta aos demais alérgenos. Apesar dos grandes avanços feitos na área de alergologia molecular para o diagnóstico das alergias, há um grande descompasso em relação ao tratamento, já que falta padronização dos extratos em relação à qualidade e a quantificação de alérgenos, cuja composição permanece pouco estudada. A eficácia do tratamento está demonstrada e sabe-se que o tratamento é marcado inicialmente pelo aumento de IgE, seguido por aumento de IgG4 e posterior redução do IgE com aumento contínuo de IgG4 específica. Uma das hipóteses de mecanismos sobre como a IAE funciona é que a IgE e a IgG4 podem competir pelo mesmo sítio de ligação dos alérgenos. Sendo assim, caracterizar o extrato utilizado na imunoterapia e avaliar o repertório de ligação de epítomos de IgE e IgG4 é fundamental para aprimorar o diagnóstico e elucidar os mecanismos do tratamento.

3. PLANO DE TRABALHO

As etapas de execução do projeto encontram-se resumidas na figura abaixo:

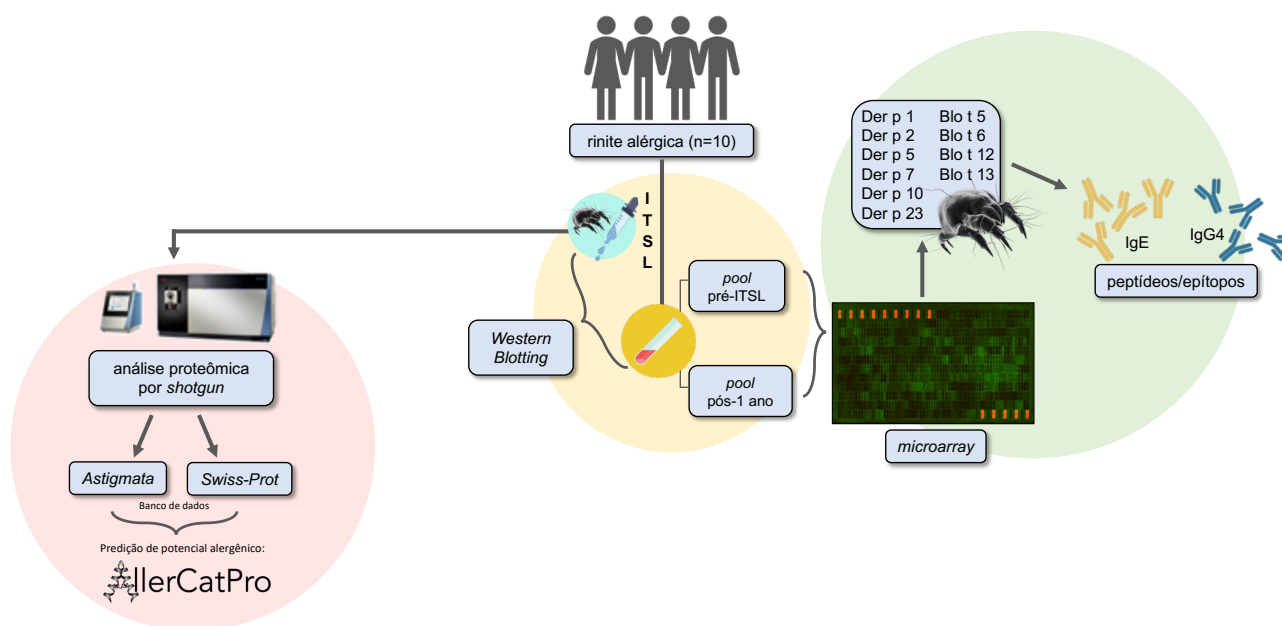


Figura 2. Etapas de execução deste trabalho.

4. OBJETIVOS

Caracterizar o extrato utilizado na imunoterapia sublingual para alérgenos de ácaros e avaliar a dinâmica de reconhecimento de epítomos IgE e IgG4 pré e após 1 ano dessa imunoterapia.

Específicos:

- Identificar peptídeos capazes de induzir apenas IgG4 mas não IgE nos indivíduos alérgicos.

5. MÉTODOS

5.1 Seleção dos pacientes

Com base na história clínica e nas amostras disponíveis, dez pacientes com rinite alérgica persistente (> 4 dias por semana e > 4 semanas) e sintomas moderados-graves (com comprometimento das atividades diárias) que estavam sendo submetidos a um protocolo de estudo ITSL (Imunoterapia Sublingual) com extrato de ácaros de corpo total IPI-ASAC misto de Der p e Blo t foram selecionados no Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do HCFMUSP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) (Tabela 2). Critério de inclusão foi baseado na sensibilização para *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* (confirmado por prick teste com pápula ≥ 3 mm ou IgE sérica específica e espirometria normal - VEF1 $\geq 70\%$ do previsto).

Soro desses pacientes, antes do tratamento (pré-ITSL) e após um ano de imunoterapia (pós-1 ano), foram usados neste estudo. Esta pesquisa foi aprovada pela “Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo” (CAAE: 64005516.1.0000.0068).

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos pacientes.

Paciente	Sexo	Idade (a)	Sintomas	Pré-ITSL				Pós 1-ano	
				IgE Der p 1 (kUA/L)	IgE <i>Blomia</i> (kUA/L)	Prick DPT (mm)	Prick <i>Blomia</i> (mm)	IgE Der p 1 (kUA/L)	IgE <i>Blomia</i> (kUA/L)
4	F	48	RA, conjuntivite	1,61	0,27	5	6	0,2	1,23
10	F	23	RA, conjuntivite, asma	>100	>100	4	5	93,5	NR
16	F	23	RA, conjuntivite	11,9	67	6	5	52,2	5,89
40	F	25	RA, asma	0,26	11,2	5	6	0,06	8,11
44	F	43	RA, conjuntivite	20,9	0,02	5	4	0,02	14
48	M	15	RA, conjuntivite, dermatite	29,9	16,9	9	5	13,9	23,6
51	M	15	RA, conjuntivite, asma, dermatite	16,5	0,04	5	3	0,03	11,3
58	F	20	RA	90	>100	4	6	0,04	5,88
61	M	13	RA, conjuntivite	1,43	19,6	5	4	20,6	0,89
77	M	15	RA, conjuntivite	1,52	1,45	7	4	9,77	11,4

Abreviações: a, ano; F, feminino; M, masculino; RA, rinite alérgica; NR, não realizado.

5.2 Caracterização do extrato de ácaros

5.2.1 Eletroforese 1D e 2D

Para os ensaios de eletroforese 1D e 2D, foi utilizado o mesmo extrato da imunoterapia sublingual cedido, liofilizado, pela empresa IPI-ASAC.

A separação inicial das proteínas dos extratos brutos foi realizada por gel de SDS-PAGE em concentrações de 12% e 15%. As amostras foram previamente aquecidas a 95°C na presença do SDS e de um reagente thiol (2-mercaptoetanol), para desnaturação e quebra das pontes dissulfeto. A corrente aplicada foi de 10mA/gel durante 20 minutos ou até a entrada da amostra no gel de resolução e de 30mA/gel até o fim da corrida.

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (89) para que cerca de 20µg de proteínas totais sejam aplicadas em cada poço do gel.

Os géis foram corados com *Commassie Blue Coloidal* (CBC), como descrito por Candiano e colaboradores (2004) (90). As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

Primeira dimensão – Focalização isoeétrica (IEF): Para realização da IEF as proteínas foram solubilizadas em uma solução de reidratação (DeStreak acrescido de 0,5% de tampão IPG (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) e azul de bromofenol. Fitas para imobilização de proteínas (Immobiline Dry Strips - IPG), foram reidratadas nesta solução de proteínas por 15 horas e submetidas ao IEF em um sistema IPGphor (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia) a 500Vh, 1000Vh e 8000Vh.

Segunda dimensão – SDS-PAGE: Após a primeira dimensão as fitas de IPG foram incubadas em tampão de equilíbrio 1 (75mM Tris-HCl, pH 8.8; uréia 6M; 30% de glicerol; 10mg/mL DTT; 2% SDS; iodoacetamida e azul de bromofenol), durante 15 minutos para a redução das pontes dissulfeto e por mais 15 minutos em tampão de equilíbrio 2 (mesma solução, entretanto substituindo-se DTT por 25mg/mL de iodoacetamida) para alquilação destas pontes. As fitas foram então transferidas para os géis de 12% de poliacrilamida contendo SDS que foram corados com *Commassie Blue Coloidal* (90). As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

5.2.2 Western blotting

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose em um sistema de eletrotransferência Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Califórnia, USA).

Nos ensaios de Western Blotting para detecção de IgE específicas ao extrato de ácaros, foram utilizados soro de dez pacientes antes e depois de um ano de tratamento com imunoterapia sublingual para ácaros. O anticorpo utilizado foi Anti-IgE humana produzida em camundongos (ϵ -específica) conjugada à *Horseradish Peroxidase* (HRP). (Invitrogen-Califórnia, EUA).

A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com TBS-Tween 20 a 0,1% (v/v) + leite em pó desnatado 5% (m/v) por 2 horas, em temperatura ambiente. Os soros dos pacientes foram

solubilizados (1:10) em TBS-Tween 20 a 0,1% (v/v) + leite em pó desnatado 5% (m/v). A membrana foi incubada com o soro dos pacientes a 4° C durante a noite sob leve agitação. Após essa etapa, a membrana foi lavada com TBS-Tween 20 0,1% (v/v) por 3 vezes, durante 10 minutos cada lavagem à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgE) diluído em TBS-Tween 20 a 0,1% (v/v) na proporção 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente. Para a detecção por quimioluminescência a membrana foi lavada com TBS-Tween 20 a 0,1% (v/v), por 3 vezes durante 10 minutos cada lavagem a temperatura ambiente. Para detecção por quimioluminescência foi utilizado o Kit de Imunofluorescência Aumentada “*Enhanced Chemiluminescence -ECL™ Prime Western Blotting System*” (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suécia), segundo recomendações do fabricante. Foram misturados volumes iguais da solução de detecção 1 e 2 do kit, permitindo volume total suficiente para cobrir as membranas. As membranas foram reveladas utilizando o fotodocumentador LAS 4000 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suécia).

5.2.3 Shotgun

5.2.3.1 Digestão de proteínas em solução

Foram utilizados 50 ug de extrato proteico que foi solubilizado em 60 µl de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8. Em seguida, foi adicionado 25 µl do surfactante RapiGest à 0,2% (m/v) e incubado à 37°C por 1 hora. Nas etapas posteriores, as proteínas foram reduzidas na presença de 2.5 µl de Ditiotreitól 100 mM (Calbiochem), incubadas à 37°C por 40 min e alquiladas com 2.5 µL de Iodoacetamida 375 mM por 30 minutos, em temperatura ambiente livre de luz (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha). Em seguida, foi adicionado uma solução de tripsina (Promega, Mannheim, Alemanha) na razão 1:50 seguindo de incubação por 16 horas à 37°C. Por fim, o processo de digestão enzimática é encerrado com a adição de 10 µl ácido trifluoroacético 5% (v/v) (Roth, Mannheim, Alemanha). Para obtenção dos digestos tripticos, foi centrifugado a 16000 g por 30 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e dessalinizados usando *Peptide Cleanup C18 Spin Tubes* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante para melhorar o desempenho da espectrometria de massas. Os

peptídeos dessalinizados foram concentrados sob vácuo e armazenados a -20°C para posterior análise.

5.2.3.2 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas

As frações peptídicas liofilizadas foram reconstituídas individualmente em ácido fórmico 0,1% (v/v) e submetidas a cromatografia líquida de nano-ultra-desempenho Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) utilizando ácido fórmico 0,1% [v/v] como tampão A e ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v] como tampão B. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30 μm x 5 mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific) sob um gradiente isocrático de 4% de tampão B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min e eluídos por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3 μm , 120 Å , 105 mm (Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP), utilizando um gradiente linear de 4-55% B por 30 min, 55% a 90% B por 1 minuto, mantido a 90% B por 5 minutos e reequilibrado a 4% B por 20 minutos a um fluxo de 200 nL/min. A eluição dos peptídios foi acoplada diretamente à ionização por um espectrômetro de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP) com modo de operação positiva pelo método DDA e os espectros MS adquiridos de m/z 200 a m/z 2000, numa resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão de 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10 s. Os dados foram adquiridos por meio do software *Thermo Xcalibur* (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

5.2.3.3 Análise de dados

Os dados brutos foram submetidos ao *software* PatternLab versão 4.0.0.84 (91) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados: Astigmata e SwissProt; enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de

tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (Falso Discovery) máxima foi considerada de $\leq 1\%$.

As proteínas identificadas foram então submetidas à análise com o AllerCatPro 2.0, uma ferramenta de predição de potencial de alergênico para proteínas (92).

5.3 Microarray de epítomos

O mapeamento de epítomos IgE e IgG4 específicos foi feito por *microarray* usando PEPperMAP® Linear Epitope Mapping de PEPperPRINT (Heidelberg, Alemanha), que é o formato padrão de mapeamento de epítomos baseado em um único comprimento de peptídeo e sobreposição máxima de peptídeos para dados de epítopo de alta resolução. Os critérios utilizados para selecionar os alérgenos presentes no chip foram: prevalência, relevância clínica e tamanho dos alérgenos. Portanto, dez alérgenos foram incluídos (Tabela 2), com peptídeos de 15 resíduos de aminoácidos usando um *offset* de 3 resíduos. No total, 544 peptídeos foram incluídos. Os experimentos de *microarray* foram executados na instalação PEPperPRINT (Heidelberg, Alemanha) usando amostras de *pool* soro em diluições de 1:100 e 1:5 para detecção de IgG4 e IgE, respectivamente. A quantificação das intensidades dos *spots* e a anotação de peptídeos foram baseadas nos arquivos *tiff* em escala de cinza de 16 bits que exibem uma faixa dinâmica mais alta do que os arquivos *tiff* coloridos de 24 bits. A análise da imagem do *microarray* foi feita com PepSlide® Analyzer. Um algoritmo de software divide as intensidades de fluorescência de cada spot em sinal bruto, de primeiro plano e de plano de fundo, e calcula as medianas de intensidade e desvios de cada duplicata de spot. Um desvio máximo ponto a ponto de 40% foi tolerado, caso contrário, o valor de intensidade correspondente foi zerado. Para aumentar a especificidade valores acima de 100 foram considerados positivos para análise categórica.

Tabela 3. Alérgenos selecionados para inclusão no *microarray* de peptídeos e código de acesso para as sequências utilizadas.

Alérgeno	ID Uniprot/GenBank
Der p 1	P08176.2
Der p 2	CAK22338.1
Der p 5	P14004.2
Der p 7	P49273.1
Der p 10	O18416.1
Der p 23	L7N6F8.1
Blo t 5	O96870.1
Blo t 6	AAQ24544.1
Blo t 12	Q17282.1
Blo t 13	Q17284.1

5.3.1 Análise estatística

A comparação da intensidade dos peptídeos foi realizada por meio do teste de Wilcoxon de amostras pareadas não paramétricas. Todas as análises estatísticas foram bicaudais e a significância foi estabelecida em $p < 0,05$. As análises foram realizadas usando o GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.3.2 Modelagem de proteínas

Estruturas tridimensionais dos alérgenos Der p 1 (5VPG), Der p 2 (1A9V), Der p 5 (3MQ1), Der p 7 (3H4Z) e Der p 23 (4ZCE) de *Dermatophagoides pteronyssinus* e Blo t 5 (2JMH) de *Blomia tropicalis* foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>).

A estrutura 3D de Blo t 12 (2MFK) do RCSB Protein Data Bank mostrava apenas o domínio de ligação à quitina correspondente aos resíduos 59-124. Para completar a estrutura de Blo t 12, a região N-terminal (1-58) foi modelada usando o servidor de previsão de estrutura trRosetta de novo (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) (93).

As estruturas dos demais alérgenos, Der p 10, Blo t 6 e Blo t 13, foram obtidas por modelagem por homologia usando o software MODELLER 10.3 e 7KO4, 2F91, 2A0A como moldes, respectivamente. Saves 6.0 (saves.mbi.ucla.edu) foi usado para validar nossos modelos. Todos os 5 modelos foram executados no *Procheck* para verificar a qualidade estereoquímica da estrutura, analisando a geometria resíduo por resíduo e a geometria geral da estrutura. O melhor modelo foi escolhido pelos resultados do gráfico de Ramachandran. A sobreposição da estrutura de consulta e modelo e a visualização dos modelos gerados foram realizadas usando o pacote de software UCSF Chimera 1.16 (94).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização do extrato usado na imunoterapia sublingual

Para a caracterização do extrato utilizado na imunoterapia sublingual foi usada uma alíquota cedida pela empresa IPI-ASAC, produtora do extrato comercial. Com 1mg da amostra diluído em 100 μ l de PBS 1X foi realizado um Bradford e o resultado foi 1,66 μ g/ μ l. Essa amostra foi separada por eletroforese 1D em um gel 12% (Figura 3) em diferentes concentrações: 15, 20 e 25 μ g de proteínas.

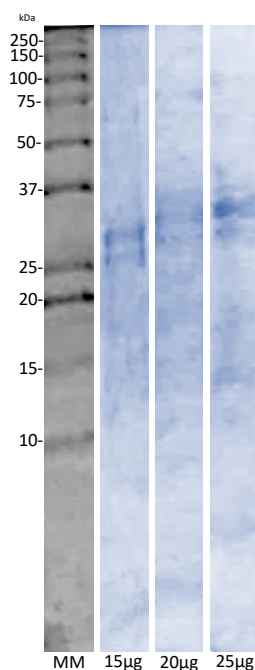


Figura 3. Extrato de ácaros diluído em PBS 1x (15, 20 e 25 μ g) em 1D-SDS-PAGE 12% corado com Comassie. MM = marcador molecular.

Nessa primeira separação, foi possível observar um extrato escasso em proteínas, com poucas bandas aparentes entre as regiões de 37 e 15 kDa e uma baixa resolução da imagem após coloração e captura da imagem do gel.

Para tentar uma melhor visualização e separação das proteínas presentes no extrato, decidimos por realizar uma eletroforese 2D, seguida de um *western blotting*. Assim, 3mg de extrato foram diluídas em 130 μ l de PBS 1X, resultando em 5,16 μ g/ μ l, totalizando 670 μ g de

proteínas. Foram aplicadas 300µg de proteína na fita de ponto isoelétrico (pI) 3-7 destinada ao gel que seria corado com *Comassie* e 370 µg na fita que seria usada para transferência das proteínas. Depois da focalização, não aconteceu o acúmulo de volt hora (Vh) esperado. Assim, o extrato foi novamente diluído, nas mesmas proporções, mas dessa vez em água MilliQ. Um novo Bradford foi realizado, e o resultado foi 4,1 µg/µl. Assim, novas fitas de pI 3-7, na mesma concentração de proteínas citada acima foram reidratadas e focalizadas e o WD 2D (*Western Blotting* 2D) pode ser realizado com um *pool* do soro dos 10 pacientes pré-imunoterapia.

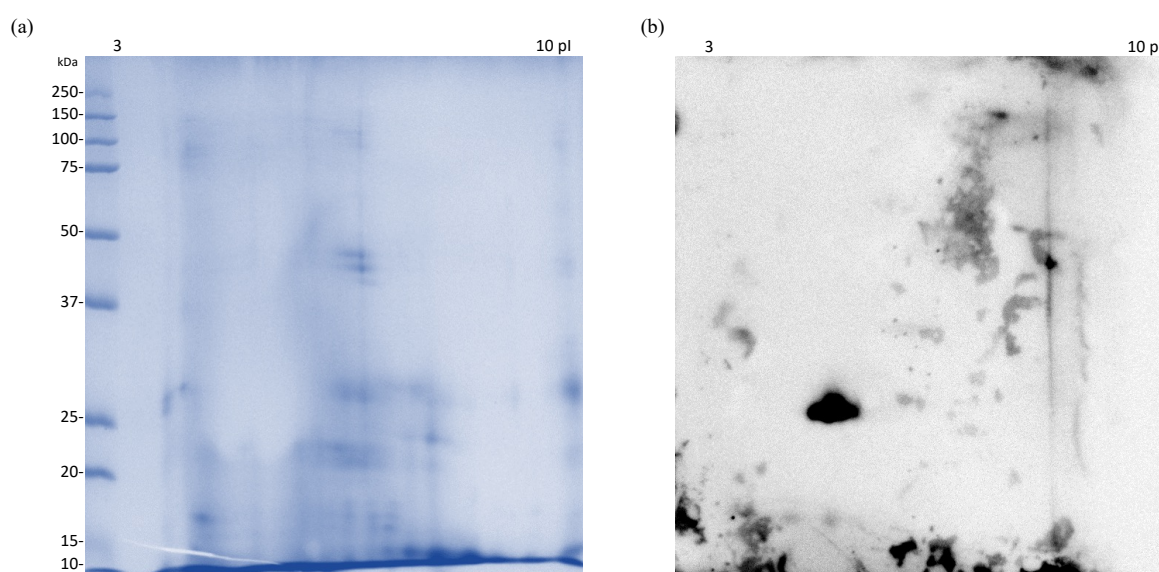


Figura 4. (a) 2D-SDS-PAGE 12% (ponto isoelétrico (pI) 3–10) corado com *Comassie*. (b) *Western blotting* 2D (WB 2D) do *pool* de soro (n=10) dos pacientes pré-imunoterapia.

O gel apresentou uma baixa resolução (Figura 4a), mostrando que a diluição do extrato em água ao invés de PBS foi suficiente para permitir que a focalização acontecesse, mas ainda não de forma satisfatória para uma melhor visualização das proteínas. Já o resultado do WB 2D (Figura 4b) não pode ser considerado devido a inúmeros artefatos na imagem de revelação final do experimento, não sendo possível onde estão de fato os *spots* IgE-reativos.

Havia a intenção de repetir o experimento, com uma concentração maior de proteínas, mas ao separar uma nova alíquota do extrato liofilizado para a dosagem de proteínas, notou-

se que a quantidade proporcional de proteínas vinha diminuindo a cada novo Bradford, assim como na alíquota de extrato que mantínhamos congelada, como um experimento 2D requer uma maior quantidade de proteínas e tínhamos um estoque limitado de material, resolvemos testar qual melhor método para evitar a degradação das proteínas do extrato.

Para otimizar a quantidade de proteínas e a resolução do extrato no gel, a amostra foi sonicada por ultrassom, 2 vezes por 30 segundos e o pellet formado foi diluído com tampão de extração com a seguinte composição: 7M de uréia + 2M tiouréia + 4% CHAPS + 1% DTT.

O resultado do Bradford realizado com a amostra diluída em tampão de extração foi $2,7\mu\text{g}/\mu\text{l}$, que em seguida foi submetida a uma eletroforese 1D, em um gel 12% (Figura 5). Essa estratégia para otimizar a concentração e a resolução de proteínas, apesar da concentração não ter aumentado, mostrou-se bem-sucedida, já que comparando os resultados anteriores, a última abordagem proporcionou um resultado muito mais nítido, onde foi possível observar diversas bandas de proteínas, desde 150 kDa até 15 kDa.

Para evitar a degradação, foi decidido que o extrato liofilizado seria diluído imediatamente antes de cada experimento, e somente na quantidade a ser utilizada.

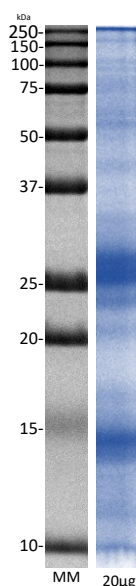
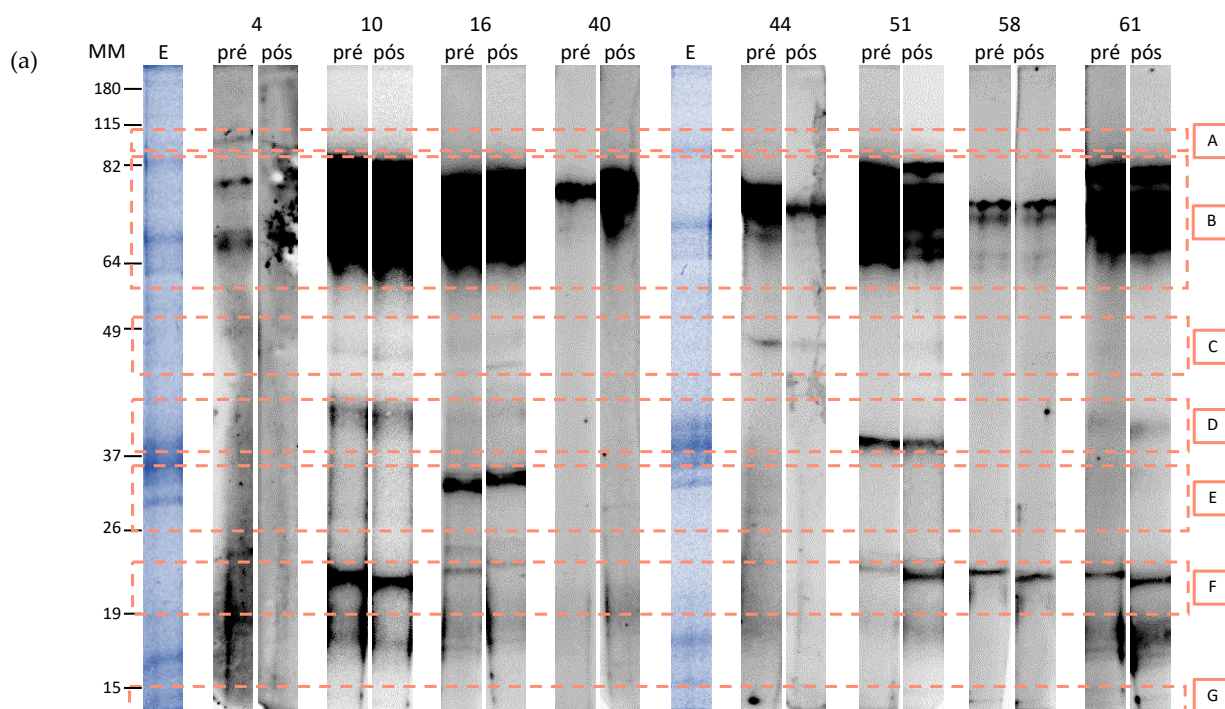


Figura 5. Extrato de ácaros sonicado e diluído em tampão de extração 2 ($20\mu\text{g}$) em 1D-SDS-PAGE 12% corado com Comassie. MM = marcador molecular.

Assim, foi possível seguir a investigação das proteínas IgEs reativas por Western Blotting 1D (WB 1D) usando soro individual dos pacientes ($n=8$, 2 pacientes não puderam

ser realizados por falta de amostras), que nos revelou diferentes perfis de sensibilização com várias bandas sendo reconhecidas principalmente de 10 a 80 kDa. Não houve diferenças significativas no reconhecimento de bandas entre pré e pós 1 ano imunoterapia sublingual (Figura 6a). Pela massa molecular é possível estimar quais alérgenos estariam presentes no WB 1D como mostrado na Figura 6b. Na região A, apenas o paciente 4 reconhece a proteína de maior massa molecular detectada nesse experimento, que poderiam ser as paramiosinas Der p 11 ou Blo t 11. Na região B, houve reconhecimento IgE de todos os pacientes, alguns com alta reatividade. O único alérgeno descrito dentro dessa faixa de massa molecular (aproximadamente entre 60 e 85kDa) é o Der p 28, uma *heat shock protein 70*. Na região C, temos um fraco reconhecimento dos pacientes 4, 10, 16, 44 e 51 por uma proteína de aproximadamente 45 kDa, podendo ser Der p 33, descrito como alérgeno maior, porém com baixa relevância clínica. Na região D, na faixa de aproximadamente 39 kDa, temos os pacientes 10, 51 e 61, reconhecendo uma banda que poderia ser o alérgeno Blo t 1. Na região E, os pacientes 16 e 40, reconheceram proteínas na faixa de aproximadamente 26-34 kDa, onde poderiam estar localizadas as moléculas Der p 3, Der p 7 e Der p 9. Na região F, os pacientes 10, 16, 51, 58 e 61 reconhecem bandas que podem ser Der p 1 ou Blo t 3. Na região G, os pacientes 58 e 61 reconhecem bandas de aproximadamente 15 kDa, que podem ser Der p 2, Der p 23, Der p 26, Der p 38, Blo t 5 ou Blo t 12.



(b)

Região	Possível alérgeno
A	Blo t 11 – 110 kDa Der p 11 – 103 kDa
B	Der p 28 – 72 kDa
C	Der p 33 – 44.2 kDa
D	Blo t 1 – 39 kDa
E	Der p 3 – 31 kDa Der p 7 – 26, 30, 31 kDa Der p 9 – 29 kDa
F	Der p 1 – 24 kDa Blo t 3 – 23 kDa
G	Der p 2 – 15 kDa Der p 23 – 14 kDa Der p 26 – 14,1 kDa Der p 38 – 15 kDa Blo t 5 – 14 kDa Blo t 12 – 14 kDa

Figura 6. Western Blotting do extrato usado na imunoterapia sublingual. **(a)** Western blotting individual de pacientes pré e pós 1-ano de ITSL. **(b)** Possíveis alérgenos maiores presentes no extrato de acordo com a massa molecular.

Devido à heterogeneidade e falta de padronização dos extratos utilizados para imunoterapia, o extrato alergênico foi submetido a uma análise *shotgun* para investigar quais moléculas estavam presentes na mistura.

A digestão tripsínica do extrato total nos permitiu a identificação de 634 proteínas no banco de dados SwissProt e 387 no banco de dados Astigmata. Essas 1.021 proteínas foram analisadas no banco de dados AllerCatPro 2.0, que é um banco de predição de alérgenos. Dentre os muitos parâmetros que o banco de dados fornece nos resultados, focamos no grau de evidência de alergenicidade, onde sua classificação é baseada no peso da evidência proveniente dos diferentes níveis de semelhança com alérgenos conhecidos, quando “forte” significa que há semelhança clara com alérgenos previamente descritos e quando “fraca” indica que existe alguma divergência entre as sequências das proteínas e características estruturais necessárias para desencadear uma forte reatividade cruzada. Uma lista de 79 proteínas, todas com forte evidência de alergenicidade, foi obtida após análise pela ferramenta (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da análise do banco de alérgenos AllerCatPro 2.0 agrupados por espécie.

#	Proteína	ID UniProt/NCBI	Alérgenos descrito em outra fonte	Nome Comum	Espécie
1	Tropomyosin	O01673	Aca v 3	Verme parasita	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
2	Allergen Aca s 10	B0KZJ4	Aca s 10	Ácaro	<i>Acarus siro</i>
3	Heat shock protein	Q1HR69	Aed a 8	Inseto (mosquito-da-dengue)	<i>Aedes aegypti</i>
4	Allergen Ale o 10	A1KYZ1	Ale o 10	Ácaro	<i>Aleuroglyphus ovatus</i>
5	60S acidic ribosomal protein P1-like protein	P49148	Alt a 12	Fungo	<i>Alternaria alternata</i>
6	Myosin tail 1 domain-containing protein	AGC60020	Ani s 2	Verme parasita	<i>Anisakis pegreffii</i>
7	Paramyosin-like protein 2 (Fragment)	L7V1I9	Ani s 2	Verme parasita	<i>Anisakis simplex</i>
8	Tropomyosin	Q9NAS5	Ani s 3	Verme parasita	<i>Anisakis simplex</i>
9	Tropomyosin	Q9NG56	Bla g 7	Inseto (barata)	<i>Blattella germanica</i>
10	Phosphopyruvate hydratase	Q2HXW9	Bla g Enolase	Inseto (barata)	<i>Blattella germanica</i>
11	Blo t 13 allergen	A1KXG8	Blo t 13	Ácaro	<i>Blomia tropicalis</i>
12	Group 10 allergen Blo t 10	A7XZI4	Blo t 10	Ácaro	<i>Blomia tropicalis</i>
13	Paramyosin-like protein	Q8MUF6	Blo t 11	Ácaro	<i>Blomia tropicalis</i>

14	Tropomyosin	O97162	Boo m 7	Carrapato-de-boi	<i>Boophilus microplus</i>
15	Alpha-enolase	Q9XSJ4	Bos d Enolase	Animal (gado)	<i>Bos taurus</i>
16	Tropomyosin isoforms a/b/d/f	B0K0A8	Cae b 3	Verme parasita	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
17	Tropomyosin	H2DFL1	Cho a 10	Ácaro	<i>Chortoglyphus arcuatus</i>
18	Heat shock 70 kDa protein Arginine kinase	P40918	Cla h HSP70	Fungo	<i>Cladosporium herbarum</i>
19	OS=Dermatophagoides farinae Der f 2	A1KXC3	Der f 20	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
20	OS=Dermatophagoides farinae Der f 34-like allergen (Fragment)	Q5TIW1	Der f 2	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
21	GST N-terminal domain- containing protein (Fragment)	A0A1J1DL12	Der f 34	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
22	Inorganic diphosphatase	AIO08867	Der f 8	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
23	Mag3 (Fragment)	A0A088SCP3	Der f 32	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
24	Sar s 10 allergen (Tropomyosin-like protein 2) (Fragment)	BBD 75204,00	Der f 14	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
25	Sar s 28 (Heat shock protein 70-like protein 5)	Q23939	Der f 10	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
26	Der f 13 allergen	A0A088SAS1	Der f 28	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
27	Der f 16-like allergen (Fragment)	Q1M2P5	Der f 13	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
28	Elongation factor 2	Q8MVU3	Der f 16	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
29	Group 11 mite allergen- like protein (Paramyosin) (Fragment)	L7UW58	Der f EF	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
30	Triosephosphate isomerase	AIO08864	Der f 11	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
31	Uncharacterized protein (Fragment)	A0A088SAX2	Der f 25	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
32	Alpha-amylase (Fragment)	Q9U6R7	Der f 15	Ácaro	<i>Dermatophagoides farinae</i>
33	Arginine kinase	Q9Y197	Der p 4	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
34	Der f 26-like allergen (Fragment)	B2ZSY4	Der p 20	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
35	Der f 35-like allergen (Fragment)	A0A291KYZ8	Der p 26	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
36	Der p 1 allergen (Fragment)	A0A291KZ92	Der f 35	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
37	Der p 13 allergen	Q58HT9	Der p 1	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
38	Der p 3 allergen	E0A8N8	Der p 13	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
39	Group 14 allergen protein (Fragment)	A7UNT7	Der p 3	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
40		Q8N0N0	Der p 14	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>

41	HDM allergen	Q6Y2F9	Der p 11	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
42	Mite allergen Der p 7	P49273	Der p 7	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
43	Serine protease	Q8MWR5	Der p 9	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
44	Chitinase-like mite allergen Der p 18.0101	Q4JK71	Der p 18	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
45	Der p 2 variant 4 (Fragment)	I2CMD7	Der p 2	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
46	Ferritin (Fragment)	Q962I7	Der p 30	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
47	Group 15 allergen protein	Q4JK70	Der p 15	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
48	Group 28 mite allergen-like protein (Heat shock protein 70) (Fragment)	A0A481MR44	Der p 28	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
49	Inorganic diphosphatase	A0A481MR39	Der p 32	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
50	Triosephosphate isomerase (Fragment)	A0A291KYZ7	Der p 25	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
51	Tropomyosin (Fragment)	Q304Y3	Der p 10	Ácaro	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
52	Der s 2 a allergen	Q27V36	Der s 2	Ácaro	<i>Dermatophagoides siboney</i>
53	Superoxide dismutase	Q00637	Dro m MnSOD	Inseto (mosca-das-frutas)	<i>Drosophila melanogaster</i>
54	Group 14 mite allergen-like protein (Apolipophorin-like)	Q9U785	Eur m 14	Ácaro	<i>Euroglyphus maynei</i>
55	Group 2 mite allergen-like protein (Lipid binding protein)	Q9TZZ2	Eur m 2	Ácaro	<i>Euroglyphus maynei</i>
56	Group 4 mite allergen-like protein (Alpha amylase) (Fragment)	Q9Y196	Eur m 4	Ácaro	<i>Euroglyphus maynei</i>
57	Beta-enolase	P07322	Gal d 9	Animal (galo)	<i>Gallus gallus</i>
58	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 2	R4GM10	Gal d 10	Animal (galo)	<i>Gallus gallus</i>
59	Gly d 10	Q1M2L8	Gly d 10	Ácaro	<i>Glycyphagus domesticus</i>
60	Tropomyosin	Q8IT89	Hae l 7	Carrapato	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
61	Gly d 13	Q9U5P1	Lep d 13	Ácaro	<i>Lepidoglyphus destructor</i>
62	Tropomyosin	Q9NFZ4	Lep d 10	Ácaro	<i>Lepidoglyphus destructor</i>
63	Heat shock 70 kDa protein (Fragment)	Q92260	Pen c 19	Fungo	<i>Penicillium citrinum</i>
64	ATP synthase subunit beta	P85446	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Fungo	<i>Penicillium glabrum</i>
65	Tropomyosin Per a 7.0103	C5J049	Per a 7	Inseto (barata)	<i>Periplaneta americana</i>
66	Tropomyosin	Q8T6L5	Per f 7	Inseto (barata)	<i>Periplaneta fuliginosa</i>
67	Uncharacterized protein (Fragment)	Q3BJY7	Pso o 10	Ácaro	<i>Psoroptes ovis</i>

68	Sar s 10 allergen (Tropomyosin-like protein 1) (Fragment)	K7P6E6	Sar s 10	Ácaro parasita (escabiose)	<i>Sarcoptes scabiei</i>
69	RNA dependent RNA polymerase	A0A1M4PIW9	RNA dependent RNA polymerase	Ácaro parasita (escabiose)	<i>Sarcoptes scabiei</i>
70	Myosin_tail_1 domain-containing protein	B1PS35	Sch j PM	Verme parasita (esquistossomose)	<i>Schistosoma japonicum</i>
71	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	K4AX22	Sola l SOD	Planta (tomate)	<i>Solanum lycopersicum</i>
72	Tropomyosin	Q95VA8	Tri sp 3	Verme parasita	<i>Trichinella spiralis</i>
73	Tropomyosin, muscle	P15846	Tri co 3	Verme parasita	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
74	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	Q6S5B1	Tri tu 30	Planta (farro, tipo de trigo)	<i>Triticum turgidum</i>
75	ALDH-like protein	A0A1B2YLJ7	Tyr p 35	Ácaro	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
76	Arginine kinase	MT900252	Tyr p 20	Ácaro	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
77	Mite allergen Tyr p 13	B0KZL2	Tyr p 13	Ácaro	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
78	Sar s 28 (Heat shock protein 70-like protein 8)	A0A1B2YLJ2	Tyr p 28	Ácaro	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
79	Tropomyosin (Fragment)	Q6IUP9	Tyr p 10	Ácaro	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>

Dessas proteínas, 38% foram identificadas em outras espécies de ácaros, que não *Der p* e *Blomia*. Vinte e sete moléculas identificadas, correspondente a 34% do extrato, dividem-se em alérgenos de outros artrópodes; insetos, como duas espécies de baratas; fungos; animais; parasitas e espécies de plantas. De todas as moléculas identificadas, 24% e 4%, respectivamente, representam alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, no extrato (Figura 7).

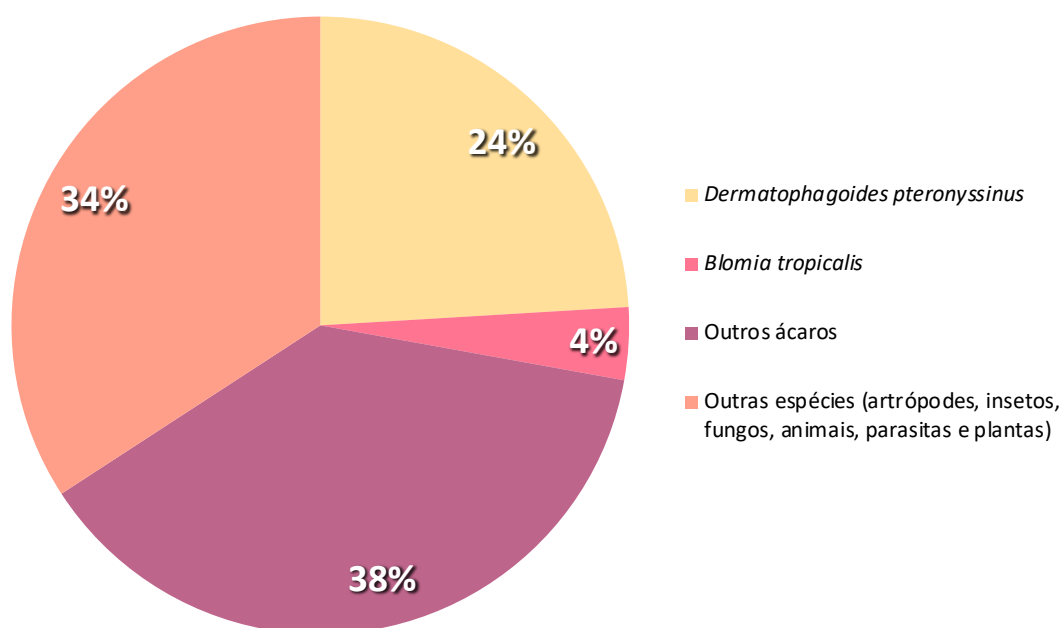


Figura 7. Alérgenos presentes no extrato usado na imunoterapia sublingual identificados por *shotgun*.

Analisando apenas os ácaros (Figura 8), foram identificados 52 alérgenos pertencentes a 12 espécies diferentes. Desses, 36% são alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, seguido de *Dermatophagoides farinae* que representam 27% dos alérgenos de ácaros no extrato. Interessantemente, *Blomia tropicalis* aparece em quarto lugar de representatividade, tendo apenas 3 alérgenos reconhecidos, o que representa 6% dos alérgenos de ácaros e apenas 4% no extrato total. O ácaro da espécie *Tyrophagus putrescentiae* representa 9% do extrato, aparecendo logo em seguida do gênero *Dermatophagoides* e antes de *Blomia*.

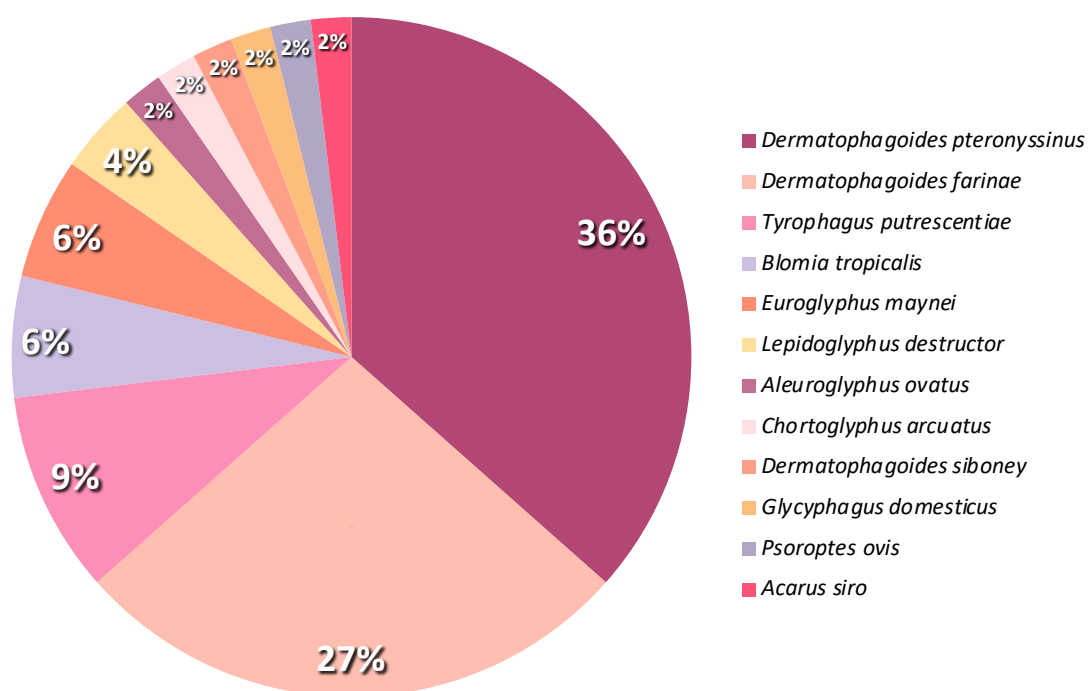


Figura 8. Espécies de ácaros presentes no extrato usado na imunoterapia sublingual identificados por *shotgun*.

Analisando o gênero *Dermatophagoides*, o mais abundante encontrado no extrato, foram identificados dez alérgenos em comum entre as espécies *pteronyssinus* e *farinae* como mostrado na figura 9. Foram identificados alérgenos maiores do grupo 2, que são proteínas com a função biológica de ligação lipídica tipo MD-2. E alérgenos dos grupos 10 (tropomiosinas), 11 (paramiosinas), 13 (proteínas de ligação de ácidos graxos), 14, 15 (quitinases), 20 (arginina quinases), 25 (triosefosfato isomerasas), 28 (*heat shock protein 70*) e 32 (pirofosfatases).

Der p 1		
Der p 2	GRUPO 2	Der f 2
Der p 3		
Der p 4		
Der p 7		Der f 8
Der p 9		
Der p 10	GRUPO 10	Der f 10
Der p 11	GRUPO 11	Der f 11
Der p 13	GRUPO 13	Der f 13
Der p 14	GRUPO 14	Der f 14
Der p 15	GRUPO 15	Der f 15
Der p 18		Der f 16
Der p 20	GRUPO 20	Der f 20
Der p 25	GRUPO 25	Der f 25
Der p 26		
Der p 28	GRUPO 28	Der f 28
Der p 30		
Der p 32	GRUPO 32	Der f 32
Der p 35		Der f 34 Der f EF

Figura 9. Alérgenos do gênero *Dermatophagoides* identificados no *shotgun*.

Analisando as proteínas individualmente, 52 do total de proteínas identificadas são de ácaros, sendo 4 tropomiosinas. Das 27 que são de outras fontes, 10 são tropomiosinas. As 4 tropomiosinas de ácaros foram alinhadas e apresentaram de 92,8% até 95,7% de identidade entre si. A sequência consenso resultante desse alinhamento foi alinhada com as demais

tropomiosinas provenientes de outras fontes alergênicas, onde a identidade variou de 73.2% a 86.6%. Das outras 17 proteínas identificadas de outras fontes, a maioria já foi identificada em ácaros, mostrando que esse resultado pode ter se dado por similaridade entre proteínas em diferentes espécies presentes no banco de dados analisados.

O extrato mostrou-se bastante rico e heterogêneo em número de alérgenos de ácaros, que apesar da diversidade identificada, não estão quantificados. Porém, em relação às principais moléculas clinicamente relevantes para Der p, apenas Der p 1, 2, 7 e 10 foram identificadas no extrato utilizado na imunoterapia sublingual. Já para *Blomia*, apenas os alérgenos Blo t 10, 11 e 13 foram identificados, sendo Blo t 10 e 13 alérgenos menores. Chama atenção a falta de representação de Der p 23 e Blo t 5, alérgenos maiores e de grande relevância clínica.

6.2 *Microarray* de epítomos

Para analisar o reconhecimento de peptídeos IgE e IgG4, nós selecionamos dez alérgenos relevantes de ácaros: Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 23, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 12 e Blo t 13 para o mapeamento de epítomos. O *pool* dos soros de 10 pacientes em tratamento com imunoterapia sublingual para ácaros pré e pós 1 ano de tratamento foi utilizado para os testes. Todos os alérgenos presentes no *microarray* tiveram ao menos um peptídeo que foi reconhecido por pelo menos um isotipo de anticorpo presente no *pool* de soros. Os peptídeos com Intensidade Média de Fluorescência (IMF) maior do que 100 foram considerados positivos. A diversidade na reatividade de peptídeos foi maior após 1 ano para ambos os anticorpos, passando de 46 peptídeos IgE-reativos para 60 e de 19 para 66 peptídeos IgG4-reativos (Figura 10).

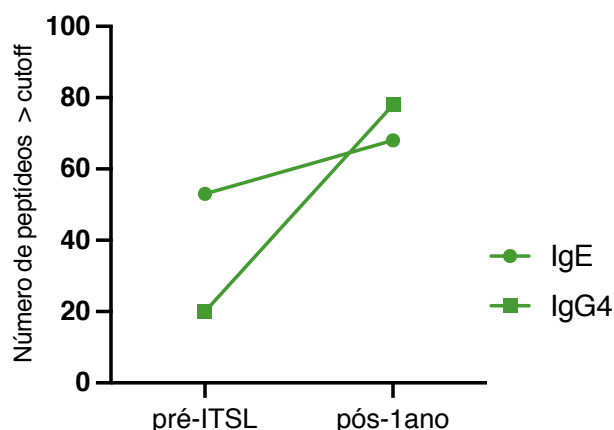


Figura 10. Diversidade de peptídeos IgE e IgG4 pré e pós 1 ano de tratamento. Linhas verdes indicam aumento de mais de 20%.

Considerando as moléculas individualmente, Der p 10 apresentou maior diversidade de peptídeos IgE pré-ITSL, com 16 peptídeos sendo reconhecidos, seguido por Der p 1, que apresentou 8 (Figura 11a) juntos, eles correspondem a mais de 50% dos peptídeos identificados. Para *Blomia tropicalis*, a molécula com a maior diversidade de peptídeos foi Blo t 12, com 7 peptídeos detectados pré-tratamento (Figura 11c). Todos os alérgenos, exceto Der p 5 e Der p 23, apresentaram ligação de peptídeos a IgG4 pré-ITSL. Novamente, Der p 10 foi a molécula com maior número de peptídeos reconhecidos e dentre os alérgenos de *Blomia* o reconhecimento foi baixo, com no máximo 2 peptídeos reativos (Figura 11b e d).

Durante a imunoterapia, foi considerado um aumento ou diminuição na reatividade de peptídeos caso houvesse uma diferença de no mínimo 20%. Após 1 ano de tratamento, Der p 1, Der p 5 e Der p 23 (Figura 11a) apresentaram mais peptídeos IgE-reativos do que antes. Por outro lado, Der p 2, Der p 7 e Der p 10 (Figura 11a) apresentaram menor diversidade após 1 ano. Der p 5, assim como Blo t 13, não apresentou peptídeos de IgE pré-imunoterapia, porém uma nova sensibilização a dois peptídeos desses alérgenos após 1 ano de ITSL foi demonstrada no nosso *pool* (Figura 11a e c).

A diversidade de peptídeos reconhecidos pela IgG4 foi maior para todas as moléculas de Der p testadas após 1 ano, com exceção de Der p 1, o qual apresentou um peptídeo a menos após ITSL (Figura 11b).

Para *Blomia tropicalis*, a molécula com a maior diversidade de peptídeos IgE-reativos foi Blo t 12, nos dois tempos. Blo t 5 e Blo t 6 mantiveram o mesmo número de peptídeos pré e pós-tratamento (Figura 11c). A diversidade de peptídeos IgG4 foi maior para todas as moléculas testadas após 1 ano de imunoterapia (Figura 11d).

Analisando as alterações na diversidade de peptídeos, os perfis de peptídeos IgE-reativos foram heterogêneos, algumas sensibilizações aos alérgenos testados permaneceram similares, ao mesmo tempo que também foram identificadas reatividades novas e mais altas após a ITSL. Dos 544 peptídeos analisados no *microarray* 46 e 60 peptídeos IgE, bem como 19 e 66 peptídeos IgG4 foram identificados antes e após 1 ano de ITSL, respectivamente. No geral, 7/10 dos alérgenos apresentou número reduzido ou semelhante de peptídeos IgE após 1 ano. Em relação aos perfis de IgG4, os pacientes em tratamento demonstraram claramente uma maior e crescente diversidade na reatividade para a maioria dos alérgenos, exceto Der p 1.

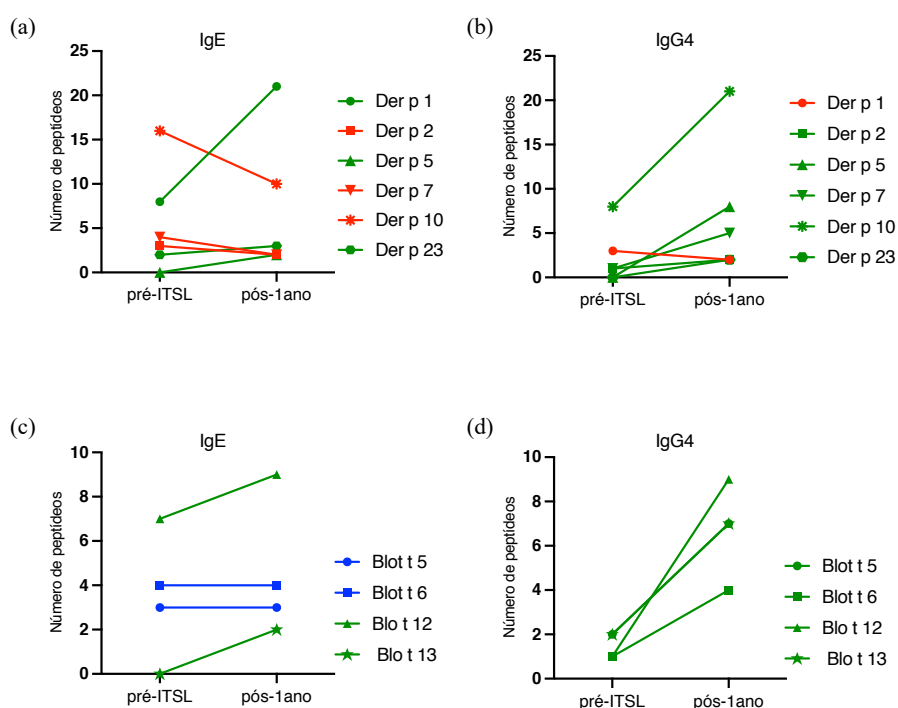
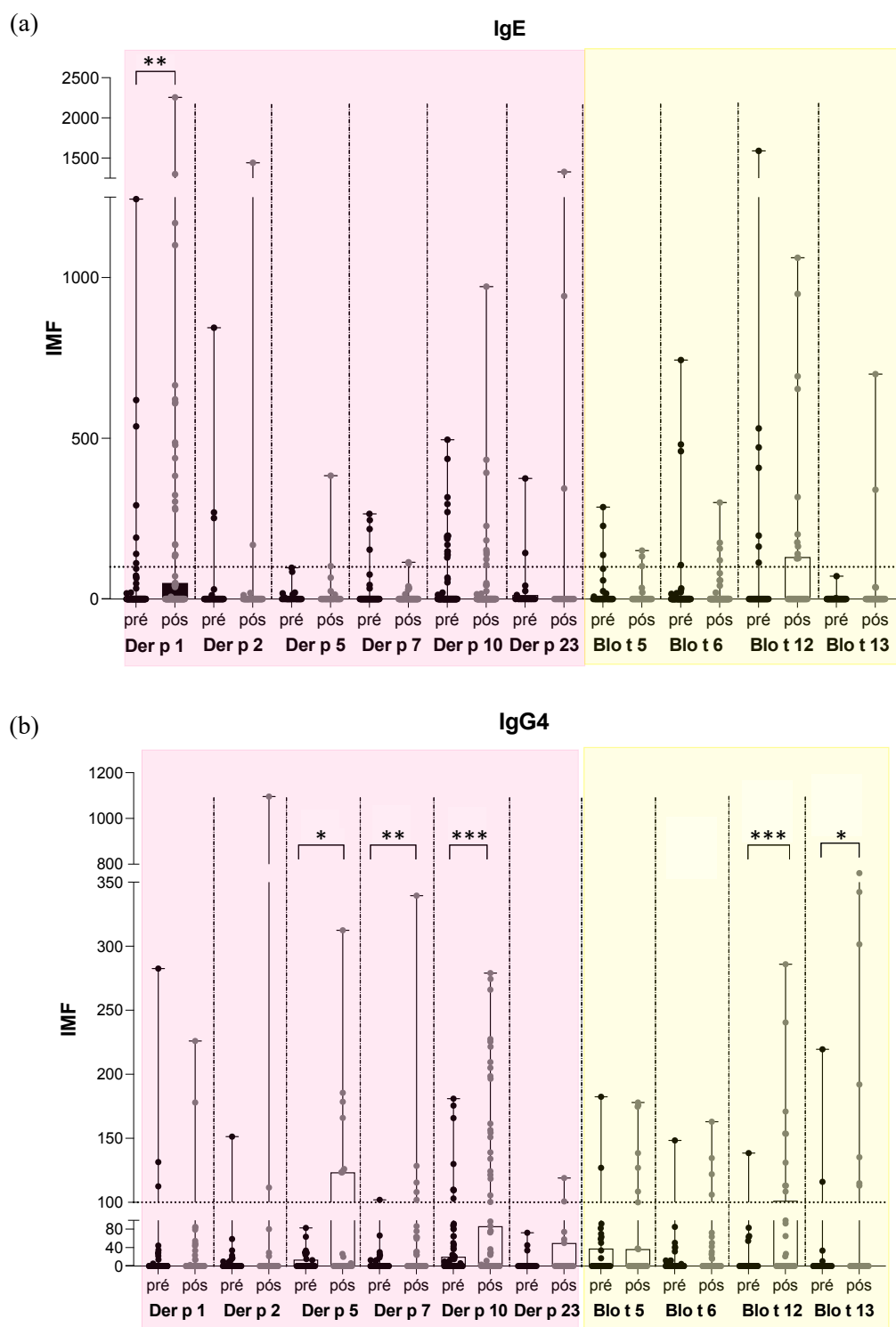


Figura 11. Diversidade de reatividade de peptídeos pré e pós 1-ano de imunoterapia. **(a)** Diversidade de peptídeos IgE para alérgenos de; **(b)** Diversidade de peptídeos IgG4 para alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*; **(c)** Diversidade de peptídeos IgE para alérgenos de *Blomia tropicalis*; **(d)** Diversidade de peptídeos IgG4 para alérgenos de *Blomia tropicalis*. Linhas verdes indicam aumento de mais de 20%, linhas vermelhas indicam uma diminuição de no mínimo 20%, linhas azuis foram consideradas inalteradas (<20% de alteração).

Considerando as Intensidades Médias de Fluorescência (IMF) para os peptídeos de cada alérgeno, a reatividade de IgE aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* principalmente aumentou, enquanto para alérgenos de *Blomia tropicalis*, principalmente diminuiu após o tratamento. Entretanto, essa observação foi estatisticamente significativa apenas para Der p 1 (Figura 12a). Quanto a IgG4, um aumento na amplitude de resposta após o tratamento foi observado nas moléculas Der p 5, Der p 7 e Der p 10 de *Dermatophagoides pteronyssinus* e Blo t 12 e Blo t 13 para *Blomia tropicalis* (Figure 12b). Acompanhando o aumento da diversidade de epítomos de IgG4, a ITSL também induziu uma maior capacidade de ligação dos anticorpos aos peptídeos de alérgenos.



Para entender melhor a dinâmica do perfil de reconhecimento de epítomos por IgE e IgG4, os padrões de ligações antes e após 1 ano de ITSL foram comparados (Figura 13). Alguns epítomos foram reativos à IgE no momento basal e não foram detectáveis após 1 ano de tratamento, como ocorre para Der p 1, 2, 7, 10 e 23 e também para Blo t 6. Outros epítomos foram reconhecidos de forma semelhante ou com maior intensidade, como para Der p 2 e Der p 23. Vários novos epítomos IgE-reativos foram detectados para Der p 1, 2 e 23 e Blo t 5, 6 e 12 durante o tratamento. Der p 5 e Blo t 13 não apresentavam epítomos IgE-reativos antes da imunoterapia enquanto após 1 ano de ITSL dois novos epítomos foram detectáveis. Em geral, os epítomos IgE-reativos não seguiram um evidente padrão de reconhecimento, enquanto a nova sensibilização aos epítomos Der p 5 e Blo t 13 foi observada durante o curso do tratamento. Em relação à indução de IgG4, a reatividade de epítomos mostrou um notável aumento para todos os alérgenos e inclusive incluiu novos epítomos reativos de IgG4 no caso de Der p 5 e Der p 23. Essa observação destaca a relevância da indução de epítomos de IgG4 durante a imunoterapia com alérgenos. A maioria das regiões de ligação de IgG4 identificadas se sobrepõem pelo menos parcialmente com epítomos de IgE. No entanto, vários peptídeos IgG4 derivados de, por exemplo, Der p 5, Blo t 5 e Blo t 13 parecem ser únicos, principalmente sem sobreposição com peptídeos de IgE.

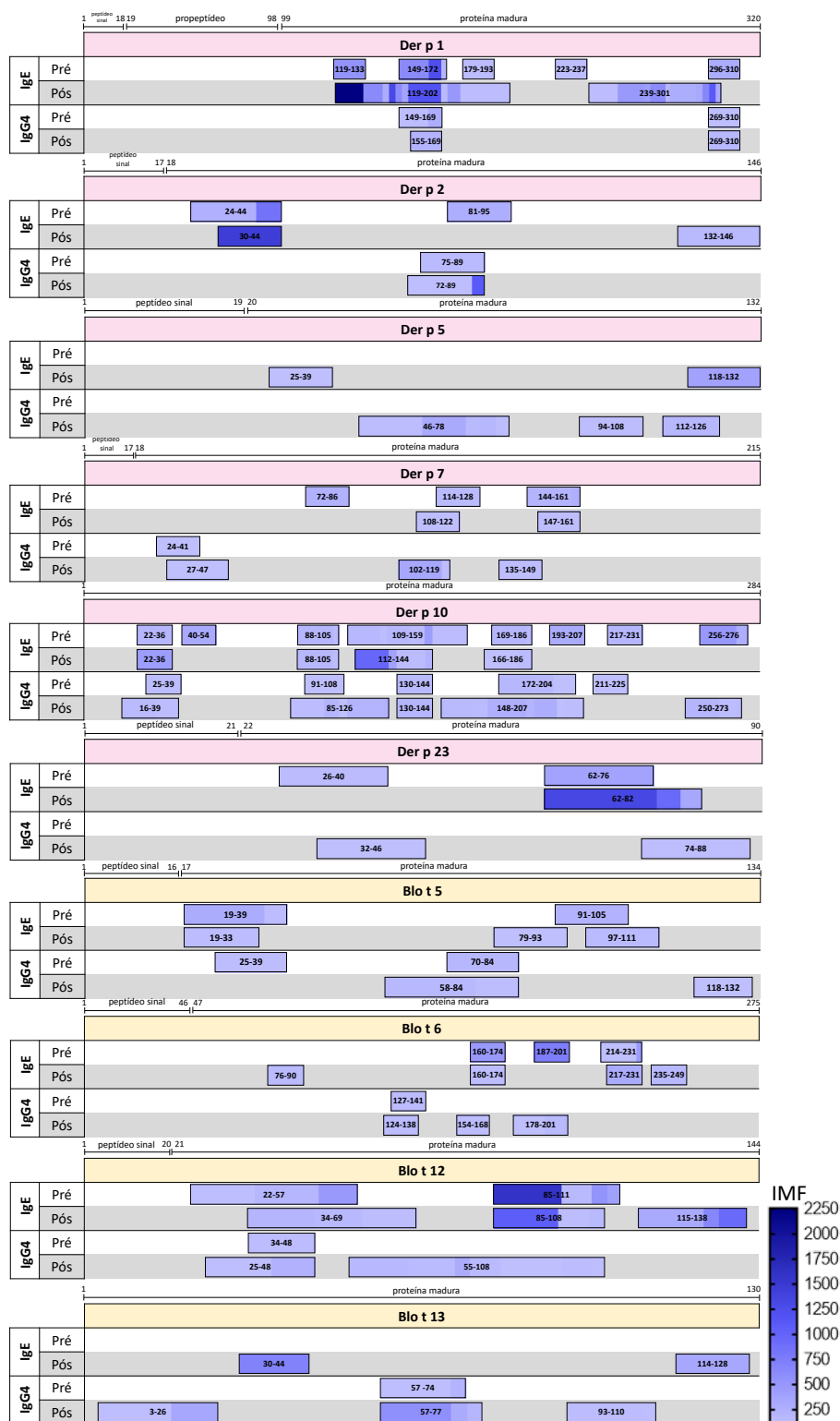


Figura 13. Localização dos epítomos e amplitude de resposta para IgE e IgG4 pré e pós 1-ano de ITSL. A posição dos epítomos foi atribuída considerando a sequência completa da proteína. IMF= Intensidade média de fluorescência.

A fim de visualizar os epítomos IgE pré-existentes em comparação com os epítomos IgG4 induzidos durante a imunoterapia, usamos modelos tridimensionais dos alérgenos individuais (Figura 14). Os epítomos identificados estavam geralmente localizados em regiões expostas das proteínas. Maiores regiões de epítomos IgE únicos, mostrados em amarelo, foram principalmente detectáveis em Der p 1, Der p 2 e Der p 7. Todos os alérgenos, exceto Der p 5 e Blo t 13, apresentaram sobreposição de regiões IgE pré-existentes e IgG4 pós-ITSL destacadas em rosa. As regiões proteicas que são reconhecidas exclusivamente por IgG4, mas não por IgE, são mostradas em azul e podem ser encontradas em todas as moléculas em graus variados (Figura 14). Com base em nossos dados de peptídeos, a ITSL induziu vários anticorpos IgG4 que reconheceram regiões únicas ou se sobrepuseram a regiões de ligação de IgE para todos os alérgenos. A indução de anticorpos IgG4 foi muito forte para todos os alérgenos exceto para Der p 1 e 2 onde apenas um número limitado de peptídeos foi reconhecido por IgG4.

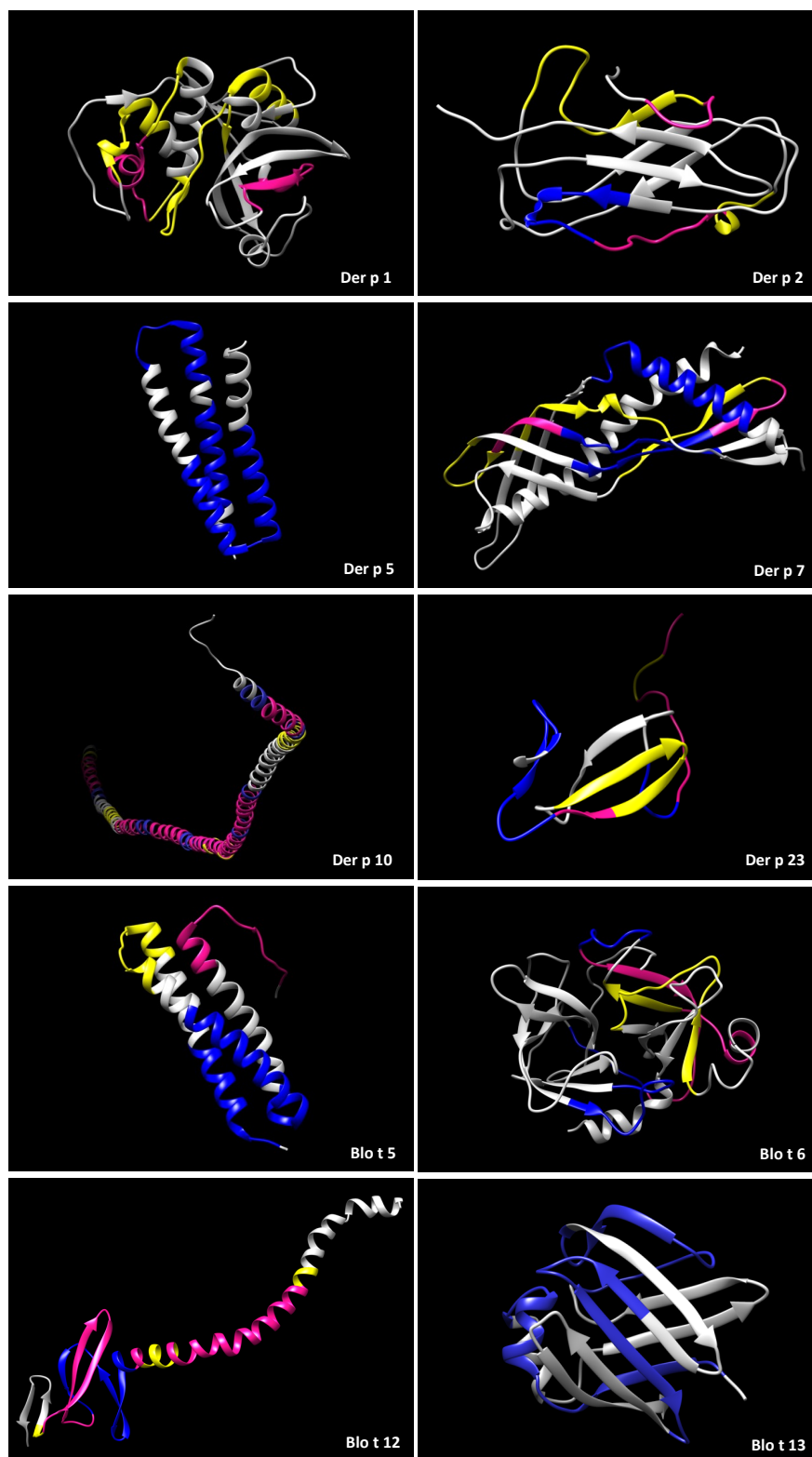


Figura 14. Modelagem de proteínas da estrutura terciária de alérgenos destacando peptídeos/epítomos detectados no microarray. Em amarelo epítomos de IgE pré-ITSL, em azul epítomos de IgG4 pós 1 ano-ITSL e em rosa regiões com afinidade aos dois anticorpos.

Além da dinâmica de reconhecimento de epítomos durante a imunoterapia, focamos em regiões que induziram exclusivamente IgG4 durante o tratamento sem co-localização para reatividade de IgE pré ou pós-tratamento (Tabela 5). Consideramos todas as regiões com pelo menos 12 resíduos, de um a três peptídeos, com comprimento de até 33 resíduos, puderam ser identificados para Der p 5 e 7 e todos os alérgenos de Blo t, que induziram exclusivamente uma resposta IgG4 e, portanto, são potenciais candidatos à imunoterapia com peptídeos.

Tabela 5. Epítomos de IgG4 únicos selecionados induzidos após ITSL que não se ligam à IgE em nenhum tempo testado.

Alérgeno	Posição correspondente ao aminoácido	Epítopo
Der p 5	62 – 94	ELALFYLQEQINHFEEKPTKEMKDKIVAEMDTI
	110 – 124	QRKDLDFEQYNLEM
Der p 7	27 – 47	EEINKAVDEAVAAIEKSETFD
	58 – 78	DELNENKSKELQEKIIRELDV
Blo t 5	118 – 132	LKDLKETEQKVKDIQ
	124 – 138	VQHEQYDPNTIENDI
Blo t 12	70 – 84	KTTTEETHHSDDLIV
	3 – 26	IEGKYKLEKSDNFDKFLDELGVGF
Blo t 13	57 – 77	KNTEIKFKLGEEFEEDRADGK
	93 – 110	QTQYGDKEVKIVRDFQGD

7. DISCUSSÃO

Na imunoterapia respostas imunes adquiridas são impulsionadas pelo contato de moléculas imunológicas com epítomos alergênicos contidos em extratos não padronizados devido à complexidade de sua composição. Sendo assim, nosso trabalho se propôs a caracterizar o extrato utilizado na imunoterapia sublingual para ácaros em pacientes com rinite e analisar a ligação de epítomos de IgE e IgG4 pré e pós 1 ano de tratamento frente a alérgenos de ácaros, detectados ou não nesse extrato, por meio de um *microarray*.

Atualmente não existe uma padronização requerida para os extratos usados no diagnóstico e na imunoterapia (95), isso acaba sendo um problema relevante para os extratos de ácaros, que além de serem fontes de alérgenos com muitas moléculas já identificadas, são ricos em proteases (27), tornando difícil a obtenção de extratos de alta qualidade, justificando assim um melhor controle de qualidade desse material.

Encontramos dificuldade para manter a estabilidade durante o armazenamento do extrato, após solubilização com qualquer um dos diluentes. Isto já foi descrito na literatura em outros trabalhos, pois devido a sua composição, extratos de ácaros podem degradar e perder seu potencial alergênico ao longo de seu armazenamento. Inibidores de protease já mostraram não contribuir para estabilidade de extrato de ácaros (96) e ainda que estudos mostrem que é possível usar um extrato reconstituído por até um mês (97) em nossa experiência, a única forma de solucionar esse problema foi reconstituindo o extrato imediatamente antes de cada uso para os experimentos, seguido de uma dosagem de proteínas pelo método Bradford (89), garantindo assim que a concentração de proteínas obtida no resultado seria de fato a concentração usada no experimento, evitando o desperdício do extrato liofilizado. Já em relação à focalização ruim no SDS-PAGE 2D foi observado que o PBS poderia prejudicar a focalização das fitas para o WB 2D por ultrapassar a concentração ótima (0,05M) de sal na amostra (98).

A abordagem por *shotgun*, seguida da análise no AllerCatPro nos mostrou que o extrato usado na ITSL contém muito mais alérgenos do que apenas Der p e *Blomia*. A maioria dos extratos preparados a partir de fontes naturais de *Dermatophagoides pteronyssinus* contém principalmente Der p 1 e Der p 2, e são apenas padronizados para essas moléculas de acordo com *guidelines* das Agencias de Medicamentos Européia, enquanto outros alérgenos ou estão

presentes em pequenas quantidades ou não estão presentes (27). Em nossos resultados, foram identificadas 19 moléculas de Der p, sendo 4 delas de relevância clínica já bem documentada.

Apesar de teoricamente o extrato ser composto por uma mistura dos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, o ácaro *Dermatophagoides fariana* foi o segundo ácaro com alérgenos mais identificados no extrato. Foram identificados alérgenos de 10 grupos do gênero *Dermatophagoides*. É muito improvável que esse resultado seja proveniente de uma contaminação, já que há um cuidado para obtenção de cultura puras de *Dermatophagoides* com relação a contaminação entre espécies, pois, por serem do mesmo gênero, as duas espécies são muito parecidas morfológicamente, existindo poucas características físicas que diferenciem as duas (30, 99). É possível que o resultado tenha se dado pela alta similaridade entre as sequências das proteínas das duas espécies. A ligação de IgE aos alérgenos de Der f não foi tão estudada quanto aos alérgenos de Der p, mas uma semelhança seria esperado dado sua identidade de 80-90% de similaridade em suas sequências (100).

Em 2021, um estudo avaliou o perfil proteico de extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* de fabricantes indianos, dos 5 extratos testados, nenhum continha proteínas de Der p. Em um extrato foram encontradas proteínas de *Dermatophagoides fariana* e proteínas humanas; e nos outros quatro proteínas de leveduras, ácaros de estocagem e de leguminosas (101). Outro estudo verificou a potência *in vivo* e *in vitro* de oito extratos comerciais de Der p utilizados para imunoterapia e verificou que os níveis de Der p 1 ou Der p 2 eram muito baixo e até indetectáveis na maioria dos extratos, exceto em um, sendo os níveis de alérgenos insuficientes para alcançar as doses efetivas preconizadas internacionalmente para imunoterapia (102). Um estudo realizado em 2012 mostrou que a variação de moléculas presentes nos extratos de Der p afetou resultados de *skin prick* testes e produziu resultados falso negativos (103).

A abordagem por WB 1D nos mostrou diferentes padrões sendo reconhecidos pelos pacientes, incluindo a presença de bandas fortemente reativas em ambos os tempos analisados. Interessantemente, ao observarmos as bandas detectadas no WB 1D podemos estabelecer semelhanças entre estas e as algumas proteínas identificadas no *shotgun*. Além de Der p 1 e 2, que estão na região de 24 e 15 kDa, respectivamente e ambos foram especulados estar presentes no WB 1D e confirmados no *shotgun*, vemos que existe uma

banda ao redor da massa molecular do Blo t 11 e/ou Der p 11, e ambas moléculas foram identificadas no *shotgun*. É possível observar, para todos os pacientes, bandas IgE reativas na região entre 64 e 82 kDa. O alérgeno Der p 28 (*heat shock protein* 70 kDa), foi identificado no extrato utilizado por esses pacientes, e possui massa de 70 kDa, que seria compatível com bandas identificadas nessa região. De forma similar temos bandas detectadas na região correspondente aos alérgenos Der p 3, Der p 7 e Der p 9, todas identificadas no *shotgun*. Ainda com massa molecular de aproximadamente 70 kDa, tropomiosinas são basicamente formadas por α -hélice e se dimerizam em *coils* paralelas (104). Der p 10, tropomiosina com massa de 36 kDa, poderia estar presente de forma dimérica no extrato, mas é sabido que sua estrutura se desfaz em resposta ao aumento de temperatura, o que ocorre durante o preparo das amostras para aplicação no gel SDS-PAGE. A abordagem ideal seria identificar especificamente as bandas IgE-reativas nessas regiões por espectrometria de massas.

No caso da *Blomia tropicalis*, apenas 3 moléculas foram identificadas no *shotgun* e seu principal alérgeno clinicamente relevante, Blo t 5, não foi detectado, podendo não estar no extrato ou estar pouco representado. Um estudo publicado em 2019 avaliou 11 extratos obtidos de diferentes culturas de *Blomia tropicalis* e um extrato comercial, qualitativamente e quantitativamente. Blo t 2 foi o alérgeno mais abundante encontrado nos extratos analisados, seguido de Blo t 10, Blo t 5 e Blo t 13. Blo t 10 e 13 foram também encontrados no nosso extrato e apesar de Blo t 5 estar na terceira posição como alérgeno mais abundante em geral, em alguns extratos, representou apenas de 2,1 a 6,2% de representatividade, mostrando que dependendo a cultura utilizada o alérgeno pode não estar bem representado (105).

Em resumo, se por um lado a presença de outros alérgenos importantes pode ser útil para dessensibilização de outras moléculas, por outro, a detecção de outros alérgenos com baixa relevância clínica pode interferir na segurança do tratamento ou até mesmo causar novas sensibilizações (106). Nossos resultados acerca da caracterização do extrato usado na ITSL mostram que a padronização de alérgenos em extratos é fundamental para garantir a qualidade do produto e, portanto, segurança e eficácia no tratamento, acompanhando assim, avanços alcançados no diagnóstico molecular.

Embora vários estudos tenham mapeado epítomos de IgE e/ou IgG para alérgenos de ácaros, estudos que avaliam a dinâmica de ligação de epítomos ao longo da imunoterapia com

alérgenos ainda são muito limitados (38, 39, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83). Diferenças nas especificidades de anticorpos IgE ou IgG4 e também foram relatadas em outros alérgenos, Der p 1 (107) e Der p 2 (84). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a ligação de epítomos para alérgenos de ácaros antes e após um ano de imunoterapia.

Um estudo analisou epítomos de IgE em alérgenos de *Dermatophagoides farianae*, utilizando metodologia semelhante ao de nosso trabalho, identificando 4 peptídeos para Der f 1, três para Der f 2, dois para Der f 5 e três para Der f 7. Similarmente ao nosso estudo, todos esses epítomos estavam localizados em áreas expostas à superfície das moléculas, o que permitiria que os epítomos reconhecessem o anticorpo IgE (108).

Estávamos particularmente interessados na identificação de epítomos de IgG4 induzidos durante a IAE. O aumento observado na ligação de IgG4 a peptídeos/epítomos de ácaros, bem como na amplitude de IgG4 durante ITSL em nosso estudo, está de acordo com observações anteriores de aumento dos níveis de IgG4 específicos de alérgenos durante a imunoterapia para ácaros da poeira domiciliar, bem como outras fontes de alérgenos (73, 74, 109). Considera-se que os anticorpos IgG4 competem com IgE específica pela ligação ao alérgeno. Isso pode inibir a formação de complexos mediados por IgE em células que expressam o receptor de sIgE, como mastócitos e basófilos (110).

A imunoterapia mostrou alterar os padrões de ligação aos epítomos, causando um aumento policlonal nos níveis de IgG4, com uma redução simultânea na diversidade e intensidade dos epítomos de IgE (111). Em nosso estudo, maior diversidade de peptídeo IgG4 foi observada após 1 ano de ITSL para todos os alérgenos, incluindo apenas pequenas alterações para Der p 1, mas também indução de novo da reatividade de IgG4. A reatividade de epítomos à IgE foi maior para alguns alérgenos, permaneceu a mesma ou foi menor 1 ano após ITSL. Dado o curto período de tempo de SLIT, um aumento na reatividade de IgE pode ser antecipado pelo menos para alguns alérgenos. Da mesma forma, um aumento na diversidade de epítomos de IgE durante quatro anos de imunoterapia oral contra amendoim foi observado por Vickery et al (111).

Curiosamente, Der p 10, uma tropomiosina, foi o alérgeno com a maioria dos peptídeos IgE e IgG4 sendo reconhecidos. Esta proteína é tipicamente descrita como um alérgeno menor nas áreas de clima temperado, mas é considerada um alérgeno importante em outras fontes, como camarões, helmintos e baratas (35, 36, 112). Dados epidemiológicos sobre

sensibilização ao Der p 10 são muito escassos no Brasil. Dada a alta reatividade observada aos peptídeos Der p 10, mais estudos são necessários para esclarecer seu papel na alergia a ácaros, uma vez que há uma exposição concomitante à tropomiosina de baratas e helmintos em nosso país (113, 114). Em um estudo realizado no Zimbábue, que também está localizado em uma região tropical com população altamente exposta a baratas e crustáceos, 55% dos pacientes apresentaram IgE específica para Der p 10 (115), mostrando a importância de realizar estudos de alérgenos em diferentes populações. Além disso, para *Blomia*, Blo t 12 representou o alérgeno com maior quantidade de epítomos lineares sendo reconhecidos por IgE antes e após o tratamento, e não Blo t 5 como seria de esperar, uma vez que é considerado o alérgeno clinicamente mais relevante desse ácaro (116), o que também justifica novas investigações de Blo t 12 na população brasileira.

Chen et al. (2018) demonstraram que a seleção de pacientes alérgicos a ácaros por diagnóstico molecular poderia aumentar o sucesso da IAE. Seus resultados mostraram que a imunoterapia realizada com extrato total de ácaros induz anticorpos IgG principalmente para Der p 1 e Der p 2 e foi mais eficaz para os pacientes sensibilizados exclusivamente para Der p 1 e/ou Der p 2 (117), mas não para pacientes com sensibilização a outros alérgenos de ácaros. Provavelmente o motivo desse resultado segundo os autores seria o fato dos extratos normalmente serem padronizados apenas para essas duas moléculas, o que pode acarretar na baixa ou pouca representação de outras moléculas no extrato (27).

Outros estudos ainda mostram que nem sempre o alérgeno mais prevalente vai ser eficaz na imunoterapia para todos os pacientes. Na Alemanha, o perfil de sensibilização para ácaros de 119 pacientes foi heterogêneo, com 27 pacientes reconhecendo apenas 1 molécula (monossensibilizados), 50 pacientes de 2 a 4 moléculas e 32 pacientes apresentaram IgE-reativas a 5 ou mais moléculas das 12 que foram testadas (118). Em um estudo multicêntrico incluindo, Áustria, França, Itália e Suécia, 97% dos pacientes eram positivos para Der p 1 e 2, e mais de 50% dos pacientes reconheceram mais de uma molécula (119). Outro estudo também na Áustria, mostrou que 16% dos pacientes não apresentavam sensibilização a Der p 1, Der p 2 nem Der p 10 e 5 dos pacientes estudados eram monossensibilizados a Der p 23 (120). Ainda, pode acontecer de alguns pacientes serem sensibilizados a moléculas alergênicas que não estão presentes ou estão mal representadas no extrato utilizado na imunoterapia. Nesse caso, a eficácia da imunização pode ser insuficiente (106).

Esses estudos corroboram a importância de se conhecer o extrato que está sendo utilizado na IAE para garantia de uma melhor resultados para os pacientes, bem como mostram a importância de se conduzir estudos de prevalência de sensibilização de alérgenos em diferentes populações.

Alguns dos principais alérgenos maiores, como Der p 2 e Der p 23, apresentaram apenas alguns epítomos lineares de IgE. Der p 2, um dos alérgenos clinicamente mais importantes, foi uma das moléculas com poucos epítomos de IgE e IgG4 detectados. Isso pode ser explicado pelo fato de que muitos epítomos de Der p 2 são principalmente definidos por características estruturais formadas a partir de regiões descontínuas do alérgeno, em vez de uma sequência peptídica contínua (121). A sua ligação de IgE é conhecida por ser vulnerável à redução e alquilação, mostrando a presença de muitos epítomos conformacionais para Der p 2 (121). Um dos epítomos IgE pré-tratamento reconhecidos, o Der p 2₈₁₋₉₅ compreende uma região de um peptídeo previamente descrito como epítomo de IgE, Der p₈₁₋₁₂₉, onde 7 de 11 pacientes asmáticos reconheceram essa região da molécula (84).

Como em nosso estudo estávamos altamente interessados nos anticorpos IgG4 induzidos pela imunoterapia, escolhemos o período de 1 ano para identificar os primeiros epítomos de IgG4 nos alérgenos de ácaros investigados. De fato, mesmo após esse período, a diversidade e o nível de reatividade de IgG4 já eram maiores na maioria dos alérgenos, estando de acordo com observações anteriores (122). A maioria dos epítomos de IgG4 se sobrepõe, pelo menos parcialmente, aos epítomos lineares de IgE de nosso estudo, provavelmente bloqueando a IgE por inibição alostérica e competindo pelo mesmo sítio de ligação do alérgeno. Embora isso represente uma das marcas do sucesso da IAE, também indica um sucesso na terapia quando, após um ano de tratamento, houve a autopercepção de um melhor controle clínico dos sintomas da rinoconjuntivite.

Para investigar regiões que poderiam potencialmente ser usadas para imunoterapia de peptídeos, focamos em peptídeos de IgG4 que não se sobrepõem com epítomos de IgE. As regiões que induziram exclusivamente IgG4 durante o tratamento mostraram epítomos de 12 até 33 resíduos. Esse comprimento está na média dos dados existentes para vacinas de peptídeos, onde os peptídeos mediados por IgE são mais longos, sendo 20-40 aminoácidos e tipicamente dependentes de uma estrutura terciária (123, 124). Peptídeos mais curtos, 10-17aa, são principalmente epítomos de células T que são projetados para serem reconhecidos

por moléculas de MHC de classe II. Além disso, esses peptídeos mais curtos devem ser incapazes de se ligar a IgE-FcεRI em células efectoras devido ao seu pequeno tamanho (124).

Todos os dez peptídeos exclusivos de IgG4 identificados em nosso estudo foram testados contra epítomos de células T e B preditos usando o *Immune Epitope Database* (<https://iedb.org/>) (125) e nenhum deles foi compatível. Embora a maioria dos epítomos de células B sejam mais longos e conformacionais, dez por cento são lineares, e esses também podem estar envolvidos em epítomos conformacionais (126). Um dos epítomos exclusivos de IgG4 identificados, Der p 5₆₂₋₉₄, compreende uma região que foi previamente predita como um epítomo de célula B conformacional e potencial alvo para um vacina de peptídeos para Der p 5: ⁷⁷EKPTKEMKD⁸⁵ (127).

Os resultados aqui apresentados mostraram que os pacientes alérgicos a ácaros que recebem ITSL podem induzir diferentes IgG4 para vários epítomos de dez alérgenos de ácaros com especificidade de epítomo parcialmente sobreposta com IgE. Além disso, destacamos também que o repertório para epítomos lineares de IgE e IgG4 não é completamente idêntico e os peptídeos exclusivos de IgG4 podem ser selecionados como potenciais candidatos a vacinas que contornariam os efeitos colaterais relacionados à IgE.

Analisando as moléculas escolhidas para o *microarray* e as moléculas de Der p e *Blomia* identificadas no *shotgun*, Der p 1, 2, 7 e 10 estavam presentes nos dois experimentos. Blo t 13, presente no *shotgun* e no *microarray* foi considerada como uma nova sensibilização para os nossos pacientes, pelo fato de nenhum deles apresentar IgE pré-tratamento para essa molécula. O fato de os pacientes serem tratados com um extrato, com essa molécula presente na composição pode ter contribuído para que esse resultado acontecesse. Diferente de Der p 5, onde também verificamos uma nova sensibilização, porém a molécula não foi detectada no *shotgun*, podendo não estar presente ou estar mal representada no extrato. Der p 5 já foi demonstrada estar pouco representada em extratos comerciais (103, 128).

Foi postulado que o uso de extrato total para imunoterapia com alérgenos poderia induzir novas sensibilizações durante o tratamento (106), de forma semelhante à nossa observação para Der p 5 e Blo t 13. Notavelmente, isso também foi observado para imunoterapia com alérgenos de pólen após 1 ano (129). Também foi demonstrado que os níveis de IgE começam a diminuir seis meses após a imunoterapia com alérgenos (49). Enquanto para a maioria dos alérgenos, a reatividade de IgE após 1 ano foi semelhante aos níveis basais, vários alérgenos

relevantes como Der p 1, Der p 2 e Der p 23 mostraram reatividade aumentada. No entanto, o protocolo de ITSL para ácaros apresentado é realizado por um total de três anos e, portanto, antecipamos uma diminuição nos níveis de IgE em momentos posteriores.

No caso dos alérgenos Blo t 5, 6, 12 e Der p 23, os quais não foram identificados no extrato, porém foram considerados para análise de *microarray*, foi possível verificar a presença de anticorpos pré-tratamento no *pool* de soros estudado, o que nos indicaria uma sensibilização prévia a essas moléculas, não dependendo de sua presença no extrato utilizado na ITSL.

Os resultados apresentados nesse trabalho abrem margem para a discussão sobre a nomenclatura atual usada para classificar os alérgenos como maiores (*major*) e menores (*minor*). Em nosso *microarray* foram incluídos alérgenos menores como Der p 5, Der p 10, Blo t 6 e Blo t 12 os quais, além de serem reconhecidos pelo *pool* de soro dos pacientes, também foram as duas moléculas, Der p 10 e Blo t 12, com maior reconhecimento de peptídeos IgE pré-tratamento. Do ponto de vista comercial, é importante saber quais são os alérgenos mais sensibilizantes para a população, para investimento em produtos, por exemplo, mas, atualmente, não faz muito sentido tratar um paciente específico baseado na frequência de ligação de IgE de uma população. Se esse paciente em específico for sensibilizado a um alérgeno menor, para a medicina de precisão importa que *este* paciente é sensibilizado e que o alérgeno tenha demonstrado importância clínica na história daquele paciente. Ademais, alérgenos maiores e menores podem variar de acordo com regiões geográficas, além disso, um alérgeno pode ser considerado maior e não ter importância clínica comprovada (70). Thomas (2015), classificou alérgenos de ácaros como sorodominantes, intermediários, menores, e alérgenos de importância desconhecida. Essa não é considerada uma classificação oficial, mas pode ser o início de uma mudança que tem nos limitado a avançar na medicina de precisão (30, 32).

8. CONCLUSÃO

O extrato utilizado na imunoterapia sublingual para alérgenos de ácaros foi caracterizado quanto a sua composição molecular e verificamos que nele estão presentes diversos alérgenos além de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, os únicos que precisam ser comprovados na mistura.

Na dinâmica de reconhecimento de epítomos, a diversidade de peptídeos, se mostrou heterogênea para os perfis IgE-reativos onde, algumas sensibilizações aos alérgenos testados permaneceram similares, ao mesmo tempo que também foram identificadas reatividades novas e mais altas após a ITSL. Em relação aos perfis de IgG4, os pacientes em tratamento demonstraram claramente uma maior e crescente diversidade na reatividade para a maioria dos alérgenos testados.

Foram identificados dez peptídeos capazes de induzir apenas IgG4 mas não IgE nos indivíduos alérgicos, que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de novas vacinas hipoalergênicas futuramente.

9. REFERÊNCIAS

1. Palomares O, Akdis M, Martin-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev.* 2017;278(1):219-36.
2. S Becker FF, R Muñoz-Cano, L Klimek, C Vidal, M D Heath, T M Kündig, C Vogelberg, C Toran, E Jensen-Jarolim, E Heffler, P V Tomazic, M Feindor, S Hewings, T Carreno, M Morales, R Mösges M A Skinner, A Graessel, D Hernandez, M F Kramer. Major Allergen Content in Allergen Immunotherapy Products: The Limited Value of Numbers. *Journal of investigational allergology & clinical immunology.* 2022;32(5).
3. Nakayama T. Introduction to "allergic inflammation". *Immunol Rev.* 2017.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular - 7ª edição.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 433 p.
5. Simons FER. Anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2010;125(2 Suppl 2):S161.
6. EAACI. European Academy of Allergy and Clinical Immunology - Global Atlas of Allergy. 2014:406.
7. Smits HH, Hiemstra PS, Prazeres da Costa C, Ege M, Edwards M, Garn H, et al. Microbes and asthma: Opportunities for intervention. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(3):690-7.
8. Wang M, Department of Food Technology EaN, Lund University, Lund, Sweden, Karlsson C, Department of Food Technology EaN, Lund University, Lund, Sweden, Olsson C, Department of Food Technology EaN, Lund University, Lund, Sweden, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2008;121(1):129-34.
9. Ege MJ, Strachan DP, Cookson WO, Moffatt MF, Gut I, Lathrop M, et al. Gene-environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in Central Europe. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(1):138-44, 44.e1-4.
10. Galvão CES, Castro FFMC. Respiratory allergies. *Rev Med (São Paulo) [Internet].* 2005; 84(1):[18-24 pp.].
11. Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Baiardini I, Bosnic-Anticevich S, Walter Canonica G, et al. Allergic rhinitis. *Nature Reviews Disease Primers.* 2020;6(1):1-17.

12. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008.
13. Greiner AN, Asthma and Allergy Centre SD, CA, USA, Hellings PW, Department of Otorhinolaryngology UHL, Leuven, Belgium, Rotiroti G, Royal National Throat N, and Ear Hospital, London WC1X 8DA, UK, et al. Allergic rhinitis. *The Lancet*. 2011;378(9809):2112-22.
14. Bousquet P, Leynaert B, Neukirch F, Sunyer J, Janson C, Anto J, et al. Geographical distribution of atopic rhinitis in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy*. 2008;63(10).
15. Mims JW. Epidemiology of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014;4 Suppl 2:S18-20.
16. Sole D, Camelo-Nunes IC, Vana AT, Yamada E, Werneck F, de Freitas LS, et al. Prevalence of rhinitis and related-symptoms in schoolchildren from different cities in Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2004;32(1):7-12.
17. Sole D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Rosario Filho NA, Naspitz CK. Prevalence of rhinitis among Brazilian schoolchildren: ISAAC phase 3 results. *Rhinology*. 2007;45(2):122-8.
18. Sole D, Rosario Filho NA, Sarinho ES, Camelo-Nunes IC, Barreto BA, Medeiros ML, et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(1):30-5.
19. Chong Neto HJ, Rosario NA, Sole D. Asthma and Rhinitis in South America: How Different They are From Other Parts of the World. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(2):62-7.
20. Araujo LM, Rosario NA, Mari A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016;44(1):18-22.
21. Reed SD, Lee TA, McCrory DC. The economic burden of allergic rhinitis: a critical evaluation of the literature. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(6):345-61.
22. OPAS/OMS Brasil - Doenças Respiratórias Crônicas | OPAS/OMS. 2016.
23. Meltzer EO, Blaiss MS, Derebery MJ, Mahr TA, Gordon BR, Sheth KK, et al. Burden of allergic rhinitis: results from the Pediatric Allergies in America survey. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3 Suppl):S43-70.

24. Meltzer EO, Nathan R, Derebery J, Stang PE, Campbell UB, Yeh WS, et al. Sleep, quality of life, and productivity impact of nasal symptoms in the United States: findings from the Burden of Rhinitis in America survey. *Allergy Asthma Proc.* 2009;30(3):244-54.
25. R M-C, P R, G A, E G, J S-L, A V. Severity of allergic rhinitis impacts sleep and anxiety: results from a large Spanish cohort. *Clinical and translational allergy.* 2018.
26. O V, D V, PD B, I A, C B, M B, et al. Impact of Rhinitis on Work Productivity: A Systematic Review. *The journal of allergy and clinical immunology In practice.* 2018.
27. Azahara Rodríguez-Domínguez MB, Alexander Rohrbach, Huey-Jy Huang, Mirela Curin, Philippe Gevaert, Paolo M Matricardi, Rudolf Valenta, Susanne Vrtala. Molecular profiling of allergen-specific antibody responses may enhance success of specific immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2020;146(5).
28. Jerónimo Carnés VI, Seong H Cho, Robert E Esch. Mite allergen extracts and clinical practice. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology.* 2017;118(3).
29. E SdS, C A, P L, H H, M W, C SP, et al. Allergens of *Blomia tropicalis*: An Overview of Recombinant Molecules. *International archives of allergy and immunology.* 2017;172(4).
30. Hoffmann K HC, Santos A, las de Vecillas L, Dramburg S. *Molecular Allergology User's Guide 2.0.* *Pediatric Allergy and Immunology.* 2022:1-574.
31. Weghofer M, Grote M, Resch Y, Casset A, Kneidinger M, Kopec J, et al. Identification of Der p 23, a Peritrophin-like Protein, as a New Major Dermatophagoides pteronyssinus Allergen Associated with the Peritrophic Matrix of Mite Fecal Pellets. 2013.
32. Thomas WR. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology.* 2015;64(4).
33. Yvonne Resch SM, Michael Kabesch, Christian Lupinek, Rudolf Valenta, Susanne Vrtala. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2015;136(4).
34. Varun Muddaluru RV, Susanne Vrtala, Thomas Schlederer, James Hindley, Pascal Hickey, Mark Larché, Elena Tonti. Comparison of house dust mite sensitization profiles in allergic adults from Canada, Europe, South Africa and USA. *Allergy.* 2021;76(7).
35. A B Santos MDC, R C Aalberse, L D Vailes, V P Ferriani, C Oliver, M C Rizzo, C K Naspitz, L K Arruda. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 1999;104(2 Pt 1).

36. C B Daul MS, G Reese, S B Lehrer. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *International archives of allergy and immunology*. 1994;105(1).
37. L Guilleminault CV-G. [*Blomia tropicalis*: A house dust mite in the tropics]. *Revue des maladies respiratoires*. 2017;34(8).
38. Lahiani S, Dumez M-E, Khemili S, Bitam I, Gilis D, Galleni M. Cross-Reactivity between Major IgE Epitopes of Family 5 Allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2022.
39. Marlon Múnera DM, Alexis Labrada, Luis Caraballo, Leonardo Puerta. Identification of B Cell Epitopes of Blo t 13 Allergen and Cross-Reactivity with Human Adipocytes and Heart Fatty Acid Binding Proteins. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(24).
40. Freeman J. Further Observations On The Treatment Of Hay Fever By Hypodermic Inoculations Of Pollen Vaccine. *The Lancet*. 1911;178(4594):814-7.
41. Freeman J. Vaccination Against Hay Fever: Report Of Results During The Last Three Years. - ScienceDirect: *The Lancet*; 1914 [Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601569007>].
42. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. Historical document. *Ann Allergy*. 1960;18:287-91.
43. Marek Jutel IA, Sergio Bonini, A Wesley Burks, Moises Calderon, Walter Canonica, Linda Cox, Pascal Demoly, Antony J Frew, Robin O'Hehir, Jörg Kleine-Tebbe, Antonella Muraro, Gideon Lack, Désirée Larenas, Michael Levin, Harald Nelson, Ruby Pawankar, Oliver Pfaar, Ronald van Ree, Hugh Sampson, Alexandra F Santos, George Du Toit, Thomas Werfel, Roy Gerth van Wijk, Luo Zhang, Cezmi A Akdis. International consensus on allergy immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(3).
44. ROBYN E. O'HEHIR AS, ANTHONY J. FREW. Sublingual Immunotherapy for Inhalant Allergens. 2014. In: *Middleton's Allergy: Principles and Practice* [Internet]. Mosby, Philadelphia. 8th. [1438-45].
45. Pattaporn Satitsuksanoa AA, Oscar Palomares, Mübeccel Akdis. Mechanisms in AIT: Insights 2021. *Allergologie select*. 2022;6.
46. O U Soyer MA, J Ring, H Behrendt, R Cramer, R Lauener, C A Akdis. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*. 2013;68(2).
47. Alvaro-Lozano M, Akdis CA, Akdis M, Alviani C, Angier E, Arasi S, et al. EAACI Allergen Immunotherapy User's Guide. *Pediatric allergy and immunology*. 2020;31(Suppl 25):1-101.

48. Willem van de Veen BS, Görkem Yaman, Marcin Wawrzyniak, Stefan Söllner, Deniz G Akdis, Beate Rückert, Cezmi A Akdis, Mübeccel Akdis. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4).
49. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):17.
50. Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S. Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(9):1392-7.
51. Soyka MB, van de Veen W, Holzmann D, Akdis M, Akdis CA. Scientific foundations of allergen-specific immunotherapy for allergic disease. *Chest*. 2014;146(5):1347-57.
52. Jutel M, Akdis CA. Novel immunotherapy vaccine development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(6):557-63.
53. Cavkaytar O, Akdis CA, Akdis M. Modulation of immune responses by immunotherapy in allergic diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;17:30-7.
54. Elenburg S, Blaiss MS. Current status of sublingual immunotherapy in the United States. *World Allergy Organ J*. 2014;7(1):24.
55. Maurizio Marogna IS, Alessandro Massolo, Giorgio Walter Canonica, Giovanni Passalacqua. Long-lasting effects of sublingual immunotherapy according to its duration: a 15-year prospective study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(5).
56. Giudice MMD, Licari A, Brambilla I, Tosca MA, Ciprandi G. Allergen Immunotherapy in Pediatric Asthma: A Pragmatic Point of View. *Children*. 2020;7(6):58.
57. Umut Gazi NNB. Immune mechanisms induced by sublingual immunotherapy in allergic respiratory diseases. *Clinical and experimental immunology*. 2022;209(3).
58. Heleen Kraan HV, Cecil Czerkinsky, Wim Jiskoot, Gideon Kersten, Jean-Pierre Amorij. Buccal and sublingual vaccine delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;190.
59. C A Akdis IBB, N Bahceciler, M Akdis. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2006;61 Suppl 81.
60. Stephen R Durham WE, Alexander Kapp, Giselda Colombo, Jan G R de Monchy, Sabina Rak, Glenis K Scadding, Jens S Andersen, Bente Riis, Ronald Dahl. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(1).

61. Ronald Dahl 1 AK, Giselda Colombo, Jan G R de Monchy, Sabina Rak, Waltraud Emminger, Montserrat Fernández Rivas, Mette Ribel, Stephen R Durham. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(2).
62. S Radulovic DW, M Calderon, Stephen Durham. Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy*. 2011;66(6).
63. Stephen R Durham WE, Alexander Kapp, Jan G R de Monchy, Sabina Rak, Glenis K Scadding, Peter A Wurtzen, Jens S Andersen, Bente Tholstrup, Bente Riis, Ronald Dahl. SQ-standardized sublingual grass immunotherapy: confirmation of disease modification 2 years after 3 years of treatment in a randomized trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(3).
64. Nelson HS. Standardized allergen extracts for allergen immunotherapy. *Allergy and asthma proceedings*. 2022;43(4).
65. José Seba NM, Nelson A. Rosário Filho, Alfeu França. Guia prático de utilização de extratos alergênicos para fins diagnóstico e terapêutico nas doenças alérgicas. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2001;24(3).
66. J.E. Slater REE. Preparation and standardization of allergen extracts. 2014. In: *Middleton's Allergy: Principles and Practice* [Internet]. Mosby, Philadelphia: Elsevier Inc. 8th. [470-81].
67. Paolo Maria Matricardi SD, Chrysanthi Skevaki, Harald Renz. "Molecular extracts" for allergy diagnostics and therapy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2019;30(1).
68. Galli SJ. Toward precision medicine and health: Opportunities and challenges in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1289-300.
69. Collins FS, Varmus H. A New Initiative on Precision Medicine. <http://dxdoiorg/101056/NEJMp1500523>. 2015.
70. Luis Caraballo RV, Nathalie Acevedo, Josefina Zakzuk. Are the Terms Major and Minor Allergens Useful for Precision Allergology? *Frontiers in immunology*. 2021;12.
71. Canonica G, Bachert C, Hellings P, Ryan D, Valovirta E, Wickman M, et al. Allergen Immunotherapy (AIT): a prototype of Precision Medicine. *World Allergy Organ J*. 82015.
72. G.A. Stewart JPR, J. Zhang , C. Robinson. The structure and function of allergens. 2014. In: *Middleton's Allergy: Principles and Practice* [Internet]. 8th.

73. Lin Yang YY, Qingxiu Xu, Wei Zhang, Qing Jiang, Wenjing Li, Yin Wang, Dongxia Ma, Xiaomin Lin, Baoqing Sun, Rongfei Zhu. Specific IgE and IgG4 Profiles of House Dust Mite Components in Allergen-Specific Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2022;12.
74. Jianjun Chen YY, Yue Zhou, Yanjun Wang, Weijia Kong. House Dust Mite Major Allergens Contributes Significantly to Specific IgG4 Response during Allergen Immunotherapy - *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016.
75. Anna Pomés GAM, Maksymilian Chruszcz. Structural Aspects of the Allergen-Antibody Interaction. *Frontiers in immunology*. 2020;11.
76. Lahiani S, Dumez M-E, Bouaziz A, Djenouhat K, Khemili S, Bitam I, et al. Immunodominant IgE Epitopes of Der p 5 Allergen. *Protein and peptide letters*. 2018;25(11):1024-34.
77. Mirela Curin H-JH, Tetiana Garmatiuk, Sandra Gutfreund, Yvonne Resch-Marat, Kuan-Wei Chen, Kerstin Fauland, Walter Keller, Petra Zieglmayer, René Zieglmayer, Patrick Lemell, Friedrich Horak, Wolfgang Hemmer, Margarete Focke-Tejkl, Sabine Flicker, Susanne Vrtala, Rudolf Valenta. IgE Epitopes of the House Dust Mite Allergen Der p 7 Are Mainly Discontinuous and Conformational. *Frontiers in immunology*. 2021;12.
78. Geoffrey A Mueller JG, Jacob L Daniel, Jian Zhang, Noah Hyduke, Crystal M Richardson, Eugene F DeRose, Martin D Chapman, R Stokes Peebles Jr, Scott A Smith, Anna Pomés. Mapping Human Monoclonal IgE Epitopes on the Major Dust Mite Allergen Der p 2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2020;205(8).
79. W van 't Hof PCD, M van den Berg, A G Beck-Sickinger, G Jung, R C Aalberse. Epitope mapping of the *Dermatophagoides pteronyssinus* house dust mite major allergen Der p II using overlapping synthetic peptides. *Molecular immunology*. 1991;28(11).
80. Wei-Yong Li Z-LC, Bo-Ping Zhang, Jia-Jie Chen, Kunmei Ji. Identification of an immunodominant IgE epitope of Der p 39, a novel allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *The World Allergy Organization journal*. 2022;15(5).
81. J D A Ramos NC, B W Lee, K Y Chua. Peptide mapping of immunoglobulin E and immunoglobulin G immunodominant epitopes of an allergenic *Blomia tropicalis* paramyosin, Blo t 11. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(4).
82. M Curin TG, Y Resch-Marat, K W Chen, G Hofer, K Fauland, W Keller, W Hemmer, S Vrtala, M Focke-Tejkl, R Valenta. 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*. 2018;73(8).
83. F C Yi NC, L P Shek, D Y Wang, K Y Chua, B W Lee. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia*

tropicalis and Dermatophagoides pteronyssinus. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2002;32(8).

84. Kobayashi I, Sakiyama Y, Tame A, Kobayashi K, Matsumoto S. IgE and IgG4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of Dermatophagoides pteronyssinus group II antigen (Der p 2). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1996;97(2):638-45.

85. Verena Niederberger AN, Philippe Gevaert, Mihaela Zidarn, Margitta Worm, Werner Aberer, Hans Jørgen Malling, Oliver Pfaar, Ludger Klimek, Wolfgang Pfützner, Johannes Ring, Ulf Darsow, Natalija Novak, Roy Gerth van Wijk, Julia Eckl-Dorna, Margarete Focke-Tejkl, Milena Weber, Hans-Helge Müller, Joachim Klinger, Frank Stolz, Nora Breit, Rainer Henning, Rudolf Valenta. Safety and efficacy of immunotherapy with the recombinant B-cell epitope-based grass pollen vaccine BM32. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;142(2).

86. Michèle Myriam Rauber CM, Raffaella Campana, Rainer Henning, Manuel Schulze-Dasbeck, Brandon Greene, Margarete Focke-Tejkl, Milena Weber, Rudolf Valenta, Wolfgang Pfützner. Allergen immunotherapy with the hypoallergenic B-cell epitope-based vaccine BM32 modifies IL-10- and IL-5-secreting T cells. *Allergy*. 2020;75(2).

87. Jens Holm NW, Peter A Würtzen, Lars H Christensen, Kaare Lund. Facilitated antigen presentation and its inhibition by blocking IgG antibodies depends on IgE repertoire complexity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(4).

88. M Focke IS, K Marth, R Valenta. Developments in allergen-specific immunotherapy: from allergen extracts to allergy vaccines bypassing allergen-specific immunoglobulin E and T cell reactivity. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(3).

89. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:9-15.

90. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327-33.

91. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nature Protocols*. 2016;11(1):102-17.

92. Minh N Nguyen NLK, Vachirane Limviphuvadh, Andreas L Lopata, G Frank Gerberick, Sebastian Maurer-Stroh. AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(W1).

93. Zongyang Du HS, Wenkai Wang, Lisha Ye, Hong Wei, Zhenling Peng, Ivan Anishchenko, David Baker, Jianyi Yang. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nature protocols*. 2021;16(12).
94. Eric F Pettersen 1 TDG, Conrad C Huang, Gregory S Couch, Daniel M Greenblatt, Elaine C Meng, Thomas E Ferrin. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13).
95. Matricardi PM, Dramburg S, Potapova E, Skevaki C, Renz H. Molecular diagnosis for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(3):831-43.
96. L N Soldatova EJP, S H Burk, R W Pastor, J E Slater. The stability of house dust mite allergens in glycerinated extracts. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105(3).
97. J Bousquet FD, B Hewitt, B Guerin, F B Michel. Comparison of the stability of a mite and a pollen extract stored in normal conditions of use. *Clinical allergy*. 1985;15(1).
98. Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L, Bjellqvist B, Gorg A. Effect of salt on the performance of immobilized pH gradient isoelectric focusing gels. *Electrophoresis*. 1988;9(2):74-80.
99. H. A. Denmark HLC. House Dust Mites. Division of Plant Industry, Entomology - University of Florida. 1998;Circular 314(EENY-59).
100. Thomas WR. House Dust Mite Allergens: New Discoveries and Relevance to the Allergic Patient. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2016;16(9):1-10.
101. Sara Huber GG, Barbara Bohle, Fatima Ferreira, Peter Briza. Proteomic profiling of commercial dust mite skin prick test solutions and allergy vaccines from India. *The World Allergy Organization journal*. 2021;14(3).
102. Aleksandro F. Zavadniak NARF, L. Karla Arruda,, Fabio F. Morato Castro DS, Wilson T. Aun, Alfeu T. França, Dirceu B. Greco. Verificação da potência de extratos alergênicos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia. *Rev bras alerg imunopatol*. 2004;27(2):46-54.
103. Anne Casset AM, Ashok Purohit, Yvonne Resch, Margit Weghofer, Rosetta Ferrara, Wayne R Thomas, Claudia Alessandri, Kuan-Wei Chen, Frédéric de Blay, Rudolf Valenta, Susanne Vrtala. Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. *International archives of allergy and immunology*. 2012;159(3).
104. Gimona M. Dimerization of Tropomyosins. In: Springer, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: SpringerLink; 2008.

105. Eduardo Santos da Silva JCMP, Márcia Barbosa da Silva, Carina Silva Pinheiro, Luis Gustavo Carvalho Pacheco, Fatima Ferreira, Peter Briza, Neuza Maria Alcantara-Neves. Proteomic Analysis Reveals Allergen Variability among Breeds of the Dust Mite *Blomia tropicalis*. *International archives of allergy and immunology*. 2019;180(3).
106. Tripodi S, Frediani T, Lucarelli S, Macri F, Pingitore G, Di Rienzo Businco A, et al. Molecular profiles of IgE to *Phleum pratense* in children with grass pollen allergy: implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):834-9.e8.
107. W K Greene JGC, K Y Chua, R M O'Brien, W R Thomas. IgE and IgG binding of peptides expressed from fragments of cDNA encoding the major house dust mite allergen Der p I. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1991;147(11).
108. Yubao Cui FT, LiLi Yu, Ying Zhou, Nan Wang, Chengbo Zhang, Li Yang. Sequential epitopes of *Dermatophagoides farinae* allergens identified using peptide microarray-based immunoassay. *IUBMB life*. 2016;68(10).
109. Sara Huber RL, Markus Steiner, Lorenz Aglas, Fatima Ferreira, Michael Wallner, Thomas Hawranek, Gabriele Gadermaier. Does clinical outcome of birch pollen immunotherapy relate to induction of blocking antibodies preventing IgE from allergen binding? A pilot study monitoring responses during first year of AIT. *Clinical and Translational Allergy*. 2018;8(1):1-15.
110. Mulin Feng XZ, Qiujuan Su, Xu Shi, Mo Xian, Rundong Qin, Jing Li. Allergen Immunotherapy-Induced Immunoglobulin G4 Reduces Basophil Activation in House Dust Mite-Allergic Asthma Patients. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8.
111. Vickery BP, Lin J, Kulis M, Fu Z, Steele PH, Jones SM, et al. Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):128-34.e1-3.
112. Resch Y, Weghofer M, Seiberler S, Horak F, Scheiblhofer S, Linhart B, et al. Molecular characterization of Der p 10: a diagnostic marker for broad sensitization in house dust mite allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(10):1468-77.
113. Ana Beatriz R. Santos GMR, Constance Oliver, Virgínia P.L. Ferriani, Rodrigo C. Lima, Mário S. Palma, Valéria S.F. Sales, Rob C. Aalberse, Martin D. Chapman, L. Karla Arruda. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(4):1040-6.e1.
114. Ana Carolina A F Sousa-Santos 1 ASM, Ana Beatriz R Santos, Michelle C R Barbosa, Davi C Aragon, Valeria S F Sales, L Karla Arruda. Parasite Infections, Allergy and Asthma: A Role for Tropomyosin in Promoting Type 2 Immune Responses. *International archives of allergy and immunology*. 2020;181(3).

115. K Westritschnig ES, W Thomas, H Auer, H Aspöck, G Pittner, S Vrtala, S Spitzauer, D Kraft, R Valenta. Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2003;33(1).
116. F C Yi 1 KYC, N Cheong, L P Shek, B W Lee. Immunoglobulin E reactivity of native Blo t 5, a major allergen of *Blomia tropicalis*. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2004;34(11).
117. Kuan-Wei Chen PZ, René Ziegelmayer, Carmen Panaitescu Bunu, Rudolf Valenta, Susanne Vrtala. Selection of house dust mite-allergic patients by molecular diagnosis may enhance success of specific immunotherapy - *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018.
118. Posa D, Hofmaier S, Arasi S, Matricardi PM. Natural Evolution of IgE Responses to Mite Allergens and Relationship to Progression of Allergic Disease: a Review. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(5):28.
119. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, Mari A, Purohit A, Pauli G, et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(12):959-65.
120. Becker S, Schleder T, Kramer MF, Haack M, Vrtala S, Resch Y, et al. Real-Life Study for the Diagnosis of House Dust Mite Allergy - The Value of Recombinant Allergen-Based IgE Serology. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;170(2):132-7.
121. M Lombardero PWH, T A Platts-Mills, J W Fox, M D Chapman. Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1990;144(4).
122. Maria Mikus AZ, Ronald Sjöberg, Carl Hamsten, Björn Forsström, Morgan Andersson, Lennart Greiff, Mathias Uhlén, Mattias Levin, Peter Nilsson, Marianne van Hage, Mats Ohlin. Allergome-wide peptide microarrays enable epitope deconvolution in allergen-specific immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2021;147(3).
123. Rudolf Valenta RC, Margit Focke-Tejkl, Verena Niederberger. Vaccine development for allergen-specific immunotherapy based on recombinant allergens and synthetic allergen peptides: Lessons from the past and novel mechanisms of action for the future. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;137(2).
124. David Calzada LC-J, María López-Ramos, Blanca Cárdbaba. Peptide Allergen Immunotherapy: A New Perspective in Olive-Pollen Allergy. *Pharmaceutics*. 2021;13(7).

125. Randi Vita SM, James A Overton, Sandeep Kumar Dhandra, Sheridan Martini, Jason R Cantrell, Daniel K Wheeler, Alessandro Sette, Bjoern Peters. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1).
126. Mukonyora M. A Review of Important Discontinuous B-Cell Epitope Prediction Tools. *Journal of clinical & cellular immunology*. 2015.
127. Narjes Ebrahimi NN, Hossein Esmailzadeh, Younes Ghasemi, Seyed Hesamodin Nabavizadeh, Soheila Alyasin. In silico prediction of B-cell epitopes for twenty-five mite allergens: The therapeutic potentials for immunotherapy. *Molecular and cellular probes*. 2019;46.
128. T Batard VB-B, A Martelet, M Le Mignon, P Lemoine, K Jain, S Mariano, S Horiot, H Chabre, C Harwanegg, C A Marquette, B P Corgier, W T Soh, P Satitsuksanoa, A Jacquet, F T Chew, E Nony, P Moingeon. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. *Allergy*. 2016;71(2).
129. Moverare R, Elfman L, Vesterinen E, Metso T, Haahtela T. Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System. *Allergy*. 2002;57(5):423-30.