

Heterogeneidade da resposta de anticorpos IgE aos alérgenos principais de *Dermatophagoides pteronyssinus* entre pacientes com alergia respiratória: Implicações para a imunoterapia específica com alérgenos

Heterogeneity of the IgE antibody response to major allergens from Dermatophagoides pteronyssinus among patients with respiratory allergy: Implications for allergen-specific immunotherapy

Ernesto A. Taketomi¹, Deise A. O. Silva¹, Meimei G. J. Queirós^{1,2},
Hamilton F. Chiba², Ronaldo Alves¹, Karine C. Almeida¹,
Leandro H. Ynoue¹, Mônica C. Soplete¹, Sun-Sang J. Sung³

Resumo

Objetivo: Analisar os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em pacientes com alergia respiratória e comparar com as sensibilizações *in vivo* (teste cutâneo de puntura - TCP) e *in vitro* (ELISA- IgE) ao extrato total de Dpt.

Métodos: Um total de 73 pacientes atópicos apresentando rinite alérgica com ou sem asma moderada e TCP positivo ao extrato total de Dpt foram estudados. Trinta indivíduos saudáveis com TCP negativo a ácaros da poeira domiciliar foram incluídos como controles. Níveis de IgE total e IgE específica a Dpt, Der p 1 e Der p 2 foram determinados por ELISA em pacientes atópicos (TCP+) e indivíduos controles não atópicos (TCP-).

Resultados: Dos 73 pacientes atópicos, 38 (52%) foram IgE duplo positivos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 (Der p 1⁺/Der p 2⁺), 11 (15%) foram IgE positivos somente para Der p 1 (Der p 1⁺/Der p 2⁻), 7 (10%) foram IgE positivos somente para Der p 2 (Der p 1⁻/Der p 2⁺) e 17 (23%) foram IgE duplo negativos para ambos alérgenos (Der p 1⁻/Der p 2⁻). Correlações significativas foram encontradas entre os níveis de IgE anti-Dpt e seus alérgenos (Der p1 ou Der p 2) bem como entre IgE anti-Der p 1 e anti-Der p 2 ($P < 0,0001$), mas não entre IgE específica a Dpt, Der p 1 ou Der p 2 e resultados do TCP. Pacientes com IgE duplo negativos apresentaram níveis de IgE anti-Dpt ($IE = 1,4 \pm 0,9$) significativamente menores que os outros grupos, embora com altos níveis médios de IgE sérica total e valores de TCP.

Conclusões: Os pacientes com alergia respiratória que apresentaram TCP+ ao extrato Dpt mostraram grande heterogeneidade da resposta de anticorpos IgE aos alérgenos principais de *D. pteronyssinus*, particularmente Der p 1 e Der p 2 e portanto, a determinação desses anticorpos específicos pode ser de grande valia para indicação e/ou seguimento de pacientes sensibilizados a ácaros sob imunoterapia específica com alérgenos.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(6):298-303 Sensibilização alérgênica, *D. pteronyssinus*, Der p 1, Der p 2, IgE, ELISA.

Abstract

Objective: To analyze the levels of specific serum IgE to Der p 1 and Der p 2 allergens in mite-sensitized atopic patients and to compare to both *in vivo* (SPT) and *in vitro* (IgE-ELISA) sensitizations to Dpt total extract.

Methods: Seventy-three atopic patients with allergic rhinitis with or without moderate asthma and positive skin prick test (SPT) to Dpt extract were studied. Thirty age-matched healthy subjects with negative SPT to HDM were included as controls. Levels of total serum IgE and Dpt-, Der p 1- and Der p 2-specific serum IgE were measured by ELISA in SPT+ atopic patients and SPT- control subjects.

Results: Among 73 atopic patients, 38 (52%) were double positive IgE to Der p 1 and Der p 2 allergens (Der p 1⁺/Der p 2⁺), 11 (15%) were single positive IgE to Der p 1 (Der p 1⁺/Der p 2⁻), 7 (10%) were single positive IgE to Der p 2 (Der p 1⁻/Der p 2⁺), and 17 (23%) were double negative IgE for both allergens (Der p 1⁻/Der p 2⁻). Significant correlations were found between levels of IgE to Dpt and its allergens (Der p 1 or Der p 2) as well as between Der p 1- and Der p 2-specific IgE levels ($P < 0.0001$), but not between Dpt-, Der p 1- or Der p 2-specific IgE levels and SPT results. The double negative IgE patients had significantly lower levels of IgE to Dpt ($EI = 1.4 \pm 0.9$) than other groups, although with high mean levels of total serum IgE and SPT results.

Conclusions: Patients with respiratory allergy presenting positive SPT to total Dpt extract showed a great heterogeneity of the IgE antibody response to major allergens from *D. pteronyssinus*, particularly Der p 1 and Der p 2, and therefore, the measurement of specific antibodies might be valuable for indication and/or follow-up of mite-sensitized patients under specific allergen immunotherapy.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(6):298-303 Allergen sensitization, *D. pteronyssinus*, Der p 1, Der p 2, IgE, ELISA.

1. Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil;

2. Programa de Controle de Asma e Rinite do Sistema Único de Saúde de Itumbiara, GO e

3. Divisão de Reumatologia e Imunologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Virgínia, Charlottesville, VA, EUA

Introdução

Doenças alérgicas respiratórias são caracterizadas pela presença de anticorpos IgE específicos dirigidos contra alérgenos inaláveis, particularmente aqueles derivados dos ácaros da poeira domiciliar como os alérgenos do grupo 1 (Der p 1) e grupo 2 (Der p 2) de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt)^{1,2}.

Imunoterapia específica com alérgenos tem mostrado ser altamente eficaz em um grupo de pacientes selecionados apresentando doença alérgica mediada por anticorpos IgE, particularmente alergia respiratória, quando adequadamente implementada³⁻⁶. O objetivo da imunoterapia específica com alérgenos é induzir alterações imunológicas que levam à tolerância contra os alérgenos administrados e, portanto, é indicada para pacientes com anticorpos IgE contra alérgenos clinicamente relevantes⁷⁻⁹.

Extratos alergênicos de ácaros são correntemente utilizados por todo o mundo tanto para procedimentos diagnósticos como para imunoterapia específica. Assim, testes cutâneos de puntura (TCP) positivos a um determinado extrato total de ácaros indicarão que o paciente está sensibilizado aos alérgenos do ácaro, mas sem identificar os componentes alergênicos¹⁰. Extratos de ácaro contêm pelo menos 15 alérgenos bem caracterizados e pacientes sensibilizados a ácaros podem ter variabilidade da reatividade de anticorpos IgE aos alérgenos principais Der p 1 e Der p 2. Neste contexto, um estudo prévio demonstrou um diferente perfil de contribuição dos alérgenos principais de *D. pteronyssinus* em induzir anticorpos IgE¹¹ como também variações na resposta de IgE aos alérgenos principais Der p 1 e Der p 2 durante imunoterapia específica com alérgenos¹².

Recentemente, o desenvolvimento de sensibilização a outros alérgenos tem sido relatado durante imunoterapia específica para alergia a pólen^{13,14}, embora esta questão permaneça ainda controversa, particularmente para a imunoterapia específica a ácaros.

O objetivo deste estudo foi analisar os níveis de IgE sérica específica a Dpt e seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em pacientes com alergia respiratória e comparar com as sensibilizações *in vivo* (TCP) e *in vitro* (ELISA-IgE) ao extrato total de Dpt.

Material e métodos

Preparação do extrato de alérgeno de ácaro

Extrato total de *D. pteronyssinus* (Dpt) foi obtido de corpos e fezes de ácaros (gentilmente cedidos pelo Dr. Federico Montealegre, Escola Médica de Ponce, Porto Rico, Estados Unidos) como descrito anteriormente¹⁵. Resumidamente, pó de ácaro foi triturado em nitrogênio líquido e alérgenos foram extraídos em salina tamponada com borato 5 mM (pH 8,0) contendo inibidores de protease (50 µg/mL leupeptina, 1,6 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF], 1 mM benzamidina e 10 µg/mL aprotinina) e a concentração total de proteína foi determinada pelo método de Lowry¹⁶ e o conteúdo de alérgenos Der p1 e Der p 2 foram determinados pelo método de ELISA de duplo anticorpo¹⁷.

Para o TCP, o extrato Dpt foi preparado na concentração protéica de 2 mg/mL em PBS contendo 0,4% fenol mais 50% glicerol e armazenado a 4°C até o uso. Para o ensaio ELISA, o extrato Dpt foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 2 mg/mL de proteína total, 170 µg de Der p 1/mL e 76 µg de Der p 2/mL em PBS e alíquotas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

Pacientes

Foram selecionados aleatoriamente 73 pacientes de ambos os sexos (41 M, 32 F), idade entre 5 e 50 anos (média ± desvio padrão: 21,1 ± 13,6 anos) atendidos pelo Programa de Controle de Asma e Rinite do Sistema Único de Saúde de Itumbiara, GO, durante o período de novembro de 2003 a abril de 2004, obedecendo aos seguintes critérios

de inclusão a) diagnóstico clínico de rinite alérgica com ou sem asma moderada, intermitente ou persistente; b) TCP positivo ao extrato total de *D. pteronyssinus*; e c) sem história prévia de imunoterapia com alérgenos. O diagnóstico de rinite alérgica e asma foi realizado de acordo com a história clínica, exame físico e sensibilização cutânea a ácaros da poeira domiciliar. A reatividade cutânea foi avaliada com base no diâmetro médio da pápula formada após 15 minutos da aplicação do extrato, considerando valores > 3 mm como um TCP positivo. Trinta indivíduos saudáveis com TCP negativo a ácaros da poeira domiciliar foram incluídos como controles para estabelecer os critérios de positividade para IgE sérica específica.

Todos indivíduos eram negativos para parasitas intestinais em três amostras de fezes independentes e colhidas em dias alternados. Em paralelo, amostras de sangue foram coletadas de todos os indivíduos e as amostras de soros foram encaminhadas ao Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia para análise e determinação dos anticorpos IgE. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos voluntários ou dos responsáveis pelas crianças, após serem informados sobre os objetivos e natureza do estudo, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU).

ELISA para IgE sérica específica a ácaros

Todas as amostras de soros foram analisadas por ELISA para determinar os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Dpt, Der p 1 e Der p 2 como anteriormente descrito¹⁸. Para o alérgeno Dpt, um ELISA convencional (ELISAc) foi usado. Em resumo, placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas com 1,0 µg/poço do extrato total de Dpt em tampão carbonato a 0,06 M (pH 9,6). As placas foram incubadas com amostras de soros (1:2) durante 2 h a 37 °C e, subsequentemente, o anticorpo secundário biotinilado anti-IgE humana (1:1000; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) foi adicionado e incubado durante 1 h a 37 °C. Em seguida, o conjugado estreptavidina-peroxidase (1:500; Sigma) foi adicionado e incubado durante 30 min à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático (ABTS a 0,01M e H₂O₂ a 0,03%). Valores de densidade óptica (DO) foram determinados em um leitor de placas (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) a 405 nm. Níveis de anticorpos foram expressos como índice ELISA (IE) como descrito anteriormente¹⁹, segundo a fórmula: IE = DO amostra / cut off, onde o cut off foi estabelecido como a média da DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

Para os alérgenos Der p 1 e Der p 2, um ELISA reverso (rELISA) foi usado. Em resumo, placas de microtitulação de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de camundongos contra Der p 1 (clone 5H8) ou Der p 2 (clone 1D8) a 1,0 µg/poço em tampão carbonato a 0,06M (pH 9,6). As placas foram então incubadas com o extrato total de Dpt (40 µg/mL) durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas com as amostras de soros, anticorpo secundário biotinilado, conjugado estreptavidina-peroxidase, e substrato enzimático como acima descrito para cELISA. Resultados foram expressos como índice ELISA (IE) como estabelecido in cELISA para Dpt.

IgE sérica total

Níveis de IgE sérica total foram mensurados por um ELISA baseado em anticorpo monoclonal como anteriormente descrito¹⁸. Em resumo, placas de microtitulação foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgE humana (1:5000; Sigma) em tampão car-

bonato a 0,06 M (pH 9,6) durante 18 h a 4 °C. As placas foram incubadas com amostras de soros (1:5, 1:25, 1:125) durante 1 h à temperatura ambiente e então com o anticorpo biotilado de cabra anti-IgE humana (1:4000; Kirkegaard & Perry) durante 1 h à temperatura ambiente. As etapas subsequentes foram semelhantes àsquelas descritas para cELISA. Os níveis de anticorpos foram expressos como unidades internacionais por mililitro (UI/mL) e foram calculados com base em uma curva controle (300 a 0,3 UI/mL) obtida por diluições duplas seriadas de um soro que foi designado como contendo 3.000 UI/mL de IgE total.

Análise estatística

Testes *t* não pareados foram usados para comparar valores de IgE específica aos alérgenos entre os grupos de

pacientes. As porcentagens de positividade em cada grupo foram comparadas usando a diferença entre duas proporções pela estatística *Z*. Níveis de IgE anti-Dpt e seus alérgenos (Der p 1 e Der p 2) foram analisados pelo teste de correlação de Pearson. Valores de *P* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Dos 73 pacientes atópicos, 38 (52%) foram IgE duplo positivos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 (Der p 1⁺/Der p 2⁺), 11 (15%) foram IgE positivos somente para Der p 1 (Der p 1⁺/Der p 2⁻), 7 (10%) foram IgE positivos somente para Der p 2 (Der p 1⁻/Der p 2⁺) e 17 (23%) foram IgE duplo negativos para ambos alérgenos (Der p 1⁻/Der p 2⁻) (Tabela 1).

Tabela 1 – Reatividade cutânea ao extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), IgE sérica total e IgE sérica específica a Dpt e seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) em 73 pacientes com rinite alérgica.

Grupos de pacientes	TCP ^a (mm)	IgE total (UI/mL)	IgE específica (IE) ^b		
			Dpt	Der p 1	Der p 2
Der p 1 ⁺ /Der p 2 ⁺ (n = 38; 52%)					
Média ± DP	9,5 ± 4,1	963,5 ± 739,2	7,5 ± 5,2	9,9 ± 5,1	14,0 ± 5,9
Mínimo-máximo	(3,0 – 24,0)	(18 – 2891)	(0,8 – 20,6)	(1,2 – 18,0)	(1,1 – 22,8)
Positividade			97%	100%	100%
Der p 1 ⁺ /Der p 2 ⁻ (n = 11; 15%)					
Média ± DP	8,7 ± 3,4	897,1 ± 965,2	3,1 ± 4,1	6,6 ± 5,3	0,8 ± 0,1
Mínimo-máximo	(4,5 – 16,0)	(6 – 3197)	(0,8 – 12,5)	(1,1 – 15,8)	(0,7 – 0,9)
Positividade			64%	100%	0%
Der p 1 ⁻ /Der p 2 ⁺ (n = 7; 10%)					
Média ± DP	7,8 ± 2,9	444,0 ± 526,8	2,4 ± 1,3	0,9 ± 0,1	8,0 ± 8,3
Mínimo-máximo	(4,0 – 12,5)	(11 – 1459)	(0,8 – 4,6)	(0,7 – 1,0)	(1,3 – 22,1)
Positividade			71%	0%	100%
Der p 1 ⁻ /Der p 2 ⁻ (n = 17; 23%)					
Média ± DP	7,9 ± 3,1	910,0 ± 811,6	1,4 ± 0,9	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Mínimo-máximo	(3,5 – 14,5)	(23 – 2725)	(0,8 – 3,8)	(0,6 – 0,9)	(0,6 – 1,0)
Positividade			41%	0%	0%

^a Reatividade cutânea determinada pelo teste cutâneo de puntura (TCP) e expressa pelo tamanho da pápula em milímetros. Valores > 3 mm foram considerados positivos.

^b Níveis de IgE sérica específica foram determinados por ELISA e expressos em índice ELISA (IE). Valores de IE > 1,0 foram considerados positivos.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada com respeito aos níveis de IgE sérica total e valores de TCP entre os grupos de pacientes. Em relação à IgE específica, pacientes com IgE duplo negativos apresentaram níveis de IgE anti-Dpt (IE = 1,4 ± 0,9) e soropositividade (41%) significativamente menores que o grupo de pacientes com IgE duplo positivos (*P* < 0,0001), embora apresentando altos níveis médios de IgE sérica total (910 ± 812 UI/mL) e de valores de TCP (7,9 ± 3,1 mm).

A comparação múltipla entre os níveis de IgE a Dpt, Der p 1 e Der p 2 em soros de pacientes com alergia respiratória está demonstrada na Figura 1. Embora os níveis médios de IgE anti-Der p 2 (IE = 8,3) fossem maiores que aqueles obtidos para IgE anti-Der p 1 (IE = 6,4), esta diferença não atingiu o limiar de significância estatística (*P* = 0,0944).

Para verificar a reatividade de anticorpos IgE anti-Dpt em relação aos seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2), as correlações entre os níveis de IgE específica a Dpt, Der p 1 e Der p 2 foram analisadas (Figura 2). Foram encontradas correlações positivas elevadas e significativas entre os níveis de anticorpos IgE anti-Dpt e anti-Der p 1 (*r* = 0,7255; *P* < 0,0001; Fig. 1A) ou anti-Der p 2 (*r* = 0,6660; *P* < 0,0001; Fig. 1B) bem como entre IgE anti-Der p 1 e anti-Der p 2 (*r* = 0,7005; *P* < 0,0001; Fig. 1C). Não houve qualquer correlação significativa entre os níveis de IgE sérica total e IgE específica a Dpt, Der p 1 ou Der p 2

bem como entre níveis de IgE total ou específica e resultados do TCP em todos os grupos de pacientes (*P* > 0,05) (dados não mostrados). Além disso, foi encontrada uma proporção considerável de pacientes com anticorpos IgE específicos duplo negativos (16% a 23%) aos alérgenos Dpt, Der p 1 ou Der p 2 ou com reatividade de IgE somente para um dos alérgenos testados.

Indivíduos controles apresentaram baixos níveis médios de IgE sérica total (29 UI/mL) e níveis de IgE sérica específica a Dpt (IE = 0,8), Der p 1 (IE = 0,9) e Der p 2 (IE = 0,7) abaixo do valor estabelecido como critério de positividade.

Discussão

Nossos resultados indicam que somente cerca de 50% dos pacientes atópicos foram IgE duplo positivos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, enquanto uma proporção considerável de pacientes apresentou reatividade de IgE única a Der p 1 (15%) ou Der p 2 (10%) e, mais interessantemente, a nenhum dos dois principais alérgenos de Dpt (23%). Estes resultados contrastam com outros relatos²⁰ demonstrando que mais de 95% dos pacientes alérgicos a ácaros na Europa Central estavam especialmente sensibilizados aos alérgenos principais de Dpt (Der p 1 e Der p 2) enquanto os pacientes restantes mostraram um vasto perfil de sensibilização, incluindo alérgenos com alta reatividade

cruzada como Der p 10 (tropomiosina) e ácaros de estocagem (*Blomia tropicalis*). Portanto, pacientes desta casuística possivelmente apresentam um perfil diferente daquele anteriormente descrito em outras regiões do mundo ou pode estar ocorrendo uma possível sensibilização cruzada com outros alérgenos presentes em invertebrados como baratas ou parasitas.

De acordo com nossos achados, nós podemos especular que a imunoterapia específica com alérgenos de ácaros pode não ser apropriada para pacientes com anticorpos IgE duplo negativos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2. Além disso, testes diagnósticos baseados na determinação dos principais alérgenos (Der p 1 e Der p 2) de Dpt poderiam ser empregados para aperfeiçoar a seleção dos pacientes com indicação de imunoterapia específica a ácaros. Neste contexto, pacientes com anticorpos IgE duplo negativos ou com reatividade de IgE a somente um dos alérgenos principais de Dpt, poderiam apresentar um risco para desenvolver novas reatividades de IgE a Der p 1 e/ou Der p 2 sob imunoterapia específica com extrato total de ácaros, já que as preparações comerciais de alérgenos são baseadas em unidades alérgênicas contendo concentrações efetivas tanto de Der p 1 como de Der p 2²¹. Vale ressaltar que os extratos alérgênicos são misturas heterogêneas de componentes alérgênicos e não-alérgênicos, os quais podem induzir, em alguns pacientes, novas sensibilizações a constituintes para os quais eles não estavam originalmente sensibilizados. Recentemente, pesquisadores têm enfatizado o desenvolvimento de novas especificidades de IgE a componentes alérgênicos em extratos de pólen durante imunoterapia específica prolongada, embora a relevância clínica destas novas reatividades de IgE permanece a ser elucidada¹⁴. Portanto, a utilização de reagentes contendo proteínas alérgênicas purificadas e bem caracterizadas que são relevantes para as doenças alérgicas seria de grande benefício para uma maior eficácia da imunoterapia¹⁰.

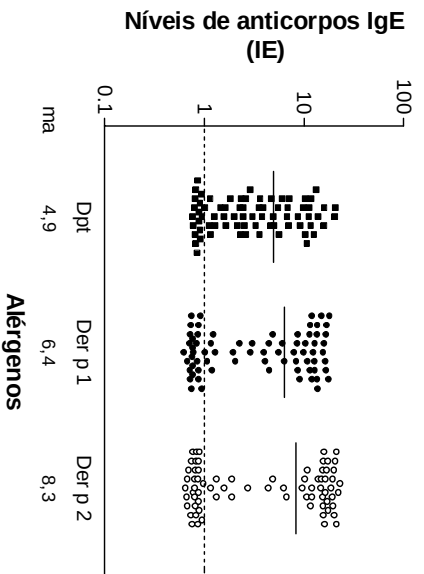


Figura 1 - Níveis de anticorpos IgE específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e aos seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) determinados por ELISA (Índice ELISA - IE) em amostras de soros de 73 pacientes atópicos. As barras horizontais representam a média aritmética (ma) dos índices ELISA e a linha pontilhada indica o valor estabelecido como critério de positividade (IE > 1,0).

No presente estudo, foi interessante notar que os pacientes com IgE duplo negativos apresentaram os menores níveis de IgE específica a Dpt, embora eles tivessem altos níveis médios de IgE sérica total e reatividade cutânea. Estes achados podem ser provavelmente atribuídos ao fato que TCP positivo e IgE sérica total aumentada podem refletir sensibilização a estruturas altamente conservadas entre os invertebrados, tais como tropomiosina de baratas, camarões, lagostas, caranguejos, lulas, moluscos^{22,23} ou pa-

ramiosina de *Schistosoma mansoni* e *Onchocerca volvulus*²⁴. Neste contexto, van Ree et al.²⁵ observaram ocasionalmente a indução de IgE contra alimentos de origem animal de invertebrados (camarão, escargot), incluindo anticorpos IgE reativos à tropomiosina durante imunoterapia específica a ácaros da poeira domiciliar. Além disso, testes de inibição mostraram que a maioria dos anticorpos IgE contra o caracol (scaragot) apresentaram reatividade cruzada com ácaros da poeira domiciliar enquanto que o ácaro não era significativamente inibido pelo caracol, sugerindo que o ácaro da poeira domiciliar foi o agente sensibilizante²⁶.

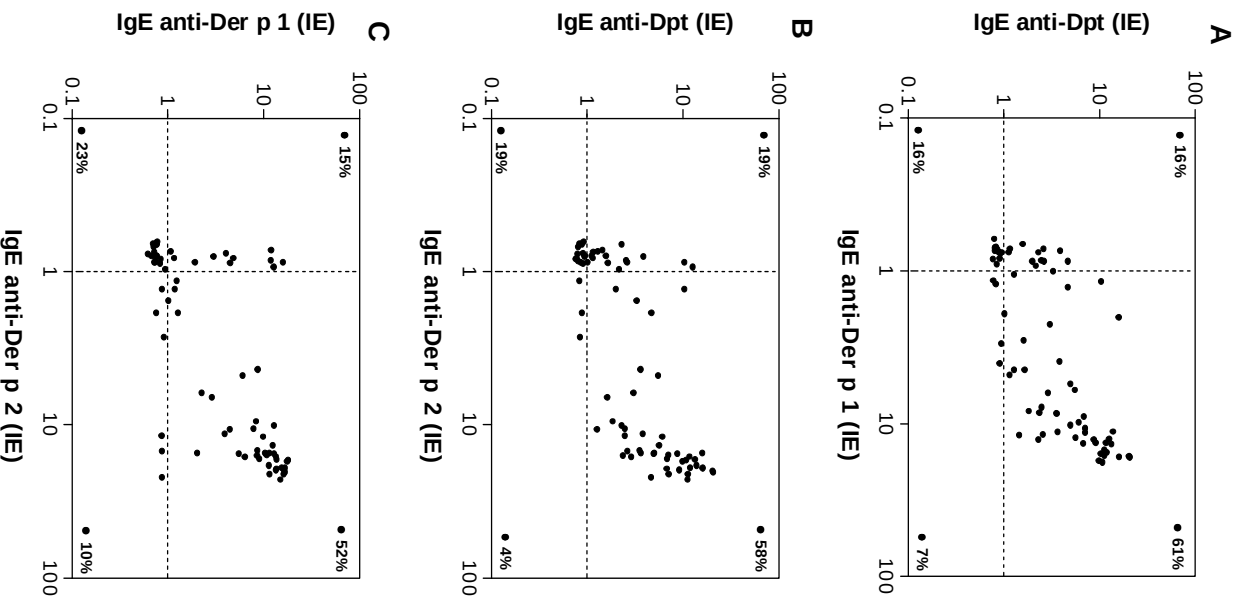


Figura 2 - Correlação entre os níveis de IgE específica a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e aos seus alérgenos principais (Der p 1 e Der p 2) determinados por ELISA (Índice ELISA - IE) em amostras de soros de 73 pacientes atópicos. (A) IgE anti-Dpt versus IgE anti-Der p 1; (B) IgE anti-Dpt versus IgE anti-Der p 2; (C) IgE anti-Der p 1 x IgE anti-Der p 2. As linhas pontilhadas indicam o limite de positividade (IE > 1,0) e as porcentagens de amostras com resultados duplo positivos, duplo negativos ou com positividade única para cada alérgeno estão indicadas nos quadrantes inter-nos correspondentes.

Entre os pacientes com TCP positivos ao extrato Dpt, uma boa concordância com os resultados de ELISA-IgE específica a Dpt foi observada no subgrupo de pacientes Der p 1⁺/Der p 2⁺, mas progressiva discordância foi notada em outros subgrupos, particularmente no subgrupo Der p 1⁺/Der p 2⁻. Estas discordâncias entre positividade ao TCP e ELISA podem refletir na probabilidade de que os pacientes possam estar sensibilizados a outros alérgenos menos relevantes do ácaro. Neste contexto, discrepâncias entre TCP e análises de anticorpos IgE têm sido já relatadas²⁷, mostrando que mais de 80% de resultados discordantes consistiram de TCP positivo sem anticorpos IgE específicos ao alérgeno detectáveis no soro. Dessa forma, nós enfatizamos a importância de uma história clínica detalhada e um diagnóstico laboratorial preciso, particularmente para investigar a presença de anticorpos IgE contra alérgenos principais clinicamente relevantes, com o intuito de aprimorar a seleção diagnóstica dos pacientes para a imunoterapia específica a ácaros. Neste contexto, o uso de análises imunoenzimáticas sensíveis como a técnica ELISA reverso (rELISA) que nós temos recentemente desenvolvido¹⁸, na qual o alérgeno é capturado por anticorpos monoclonais específicos adsorvidos em placas de microtitulação é altamente desejável. Este método tem mostrado ser muito mais sensível que o ELISA convencional (cELISA) que utiliza o alérgeno adsorvido diretamente às placas de microtitulação.

Embora estes dados sejam importantes e consistentes, uma questão clinicamente crucial permanece ainda não respondida, ou seja, se seria melhor incluir um vasto (extrato total) ou restrito (alérgenos recombinantes, possivelmente omitindo alguns alérgenos relevantes) repertório alérgênico para imunoterapia específica, como já questionado por Abramson et al.²⁸. Além disso, não há evidências ainda disponíveis para indicar se imunoterapia com extrato alérgênico total usado em pacientes que não apresentam IgE a alérgenos principais (por exemplo, injeção de Der p 1 em pacientes sem IgE específica a Der p 1) é considerada clinicamente prejudicial. Neste contexto, nós estamos desenvolvendo estudos clínicos complementares sobre imunoterapia específica alérgênica de longa duração que incluam pacientes atópicos com TCP positivo sem IgE específica a Der p 1 e/ou Der p 2 para investigar se ocorre sensibilização adicional e qual é sua relevância clínica.

Os dados deste estudo apontam para uma análise crítica sobre a imunoterapia específica com alérgenos que pode ser apropriadamente indicada para aqueles pacientes com anticorpos IgE a componentes alérgênicos relevantes presentes nos extratos alérgênicos totais se medidas de prevenção alérgica não são possíveis ou resultam em insucesso. Por outro lado, pacientes que não apresentam anticorpos IgE a alérgenos principais deveriam ser criteriosamente acompanhados, clínica e laboratorialmente, após o início da imunoterapia alérgênica com extratos totais de ácaros. Falhas do tratamento imunoterápico com estes extratos convencionais de ácaros poderiam ser melhor avaliadas através de mensurações de IgE sérica específica aos alérgenos principais. Atualmente, há várias tentativas para o desenvolvimento de peptídeos sintéticos relevantes e de alérgenos recombinantes individuais com propriedades hipoalérgicas, isto é, com reduzida atividade alérgênica para a formulação de vacinas^{29,30}.

Em conclusão, os pacientes com alergia respiratória apresentando TCP positivo ao extrato Dpt mostraram grande heterogeneidade da resposta de anticorpos IgE aos alérgenos principais de *D. pteronyssinus*, particularmente Der p 1 e Der p 2 e portanto, a determinação desses anticorpos específicos pode ser de grande valia para indicação e/ou seguimento de pacientes sensibilizados a ácaros sob imunoterapia específica com alérgenos.

Referências

- Platts-Mills TA, de Weck AL. Dust mite allergens and asthma – a worldwide problem: report of an international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:416-27.
- Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TAE et al. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy* 1991;21:433-9.
- Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:969-74.
- Bousquet J. Immunotherapy is clinically indicated in the management of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2139-42.
- Des Roches A, Paradis L, Menardo JL. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:450-3.
- Malling HJ. Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy* 1998;53:461-72.
- Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:157-64.
- Kowalski ML, Jutel M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. *Allergy* 1998;53:485-92.
- Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558-62.
- Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999;29:896-904.
- van der Zee JS, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:884-96.
- Mastrandrea F, Serio G, Minardi A, Coradduzza G, Rossi N, Scarcia G et al. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. *Allergy* 1997;52:1115-9.
- van Hage-Hamsten M, Valenta R. Specific immunotherapy – the induction of new IgE-specificities? [Editorial]. *Allergy* 2002;57:375-8.
- Movérare 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;57:423-30.
- Pereira EA, Silva DA, Cunha-Junior JP, Almeida KC, Alves R, Sung SJ et al. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. *Allergy* 2005;60:401-6.
- Lowry H, Rosenborough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. *J Immunol Methods* 1989;118:227-35.
- Silva DAO, Gervásio AM, Sopelete MC, Arruda-Chaves E, Arruda LK, Chapman MD et al. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:545-50.
- Rodrigues R, Sopelete MC, Silva DAO, Cunha-Junior JP, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. *Strongyloides ratti* antigenic components recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:89-93.
- Pittner G, Vrtala S, Thomas WR, Weghofer M, Kundi M, Horak F et al. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. *Clin Exp Allergy* 2004;34:597-603.
- Nelson HS. The use of standardized extracts in allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:41-5.
- Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:329-37.

23. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119:247-58.
24. Steel C, Limberger RJ, McReynolds LA, Ottesen EA, Nutman TB. B cell responses to paramyosin. Isotypic analysis and epitope mapping of filarial paramyosin in patients with onchocerciasis. *J Immunol* 1990;145:3917-23.
25. van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996;51:108-13.
26. van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Pajno GB, Barberio G, Corbetta L, et al. Asthma after consumption of snails in house-dust-mite-allergic patients: a case of IgE cross-reactivity. *Allergy* 1996;51:387-93.
27. van der Zee JS, de Groot H, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Discrepancies between the skin test and IgE antibody assays: study of histamine release, complement activation *in vitro*, and occurrence of allergen-specific IgG. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:270-81.
28. Abramson M, Puy R, Weiner J. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* 1999;54:1022-41.
29. Vrtala S, Focke-Tejkl M, Swoboda I, Kraf D, Valenta R. Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods* 2004;32:313-20.
30. Niederberger V, Valenta R. Genetically modified allergens. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24:727-38.

Agradecimentos

Trabalho realizado com apoio financeiro das seguintes agências brasileiras de fomento: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, DF), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, Brasília, DF), e FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG). Estes resultados fizeram parte de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia de um dos autores (MGJQ).

Correspondência:

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica
Disciplina de Imunologia, UFU
Av. Pará, 1720, Bloco 4C, Campus Umuarama
38400-902 - Uberlândia - MG - Brasil
Fone: +55-34-3218.2195
Fone/Fax: +55-34-3218.2333
E-mail: taketomi@ufu.br