



## Alergia a barata: papel na asma

### *Cockroach allergy: role in asthma*

L. Karla Arruda<sup>1</sup>, Ana Beatriz Rossetti Santos<sup>2</sup>,  
Virginia P. L. Ferriani<sup>3</sup>, Valéria S. Sales<sup>4</sup>

#### Resumo

Alergia a barata é um importante fator de risco para asma em todo o mundo, inclusive no Brasil. Evidências indicam que a combinação de sensibilização a barata e exposição a alérgenos de barata no domicílio está associada a asma mais grave. Essas observações sugerem que alérgenos de barata são particularmente potentes em induzir resposta IgE. Estratégias para diminuir a exposição ambiental a alérgenos de barata requerem limpeza extensa, educação e extermínio profissional de insetos, que podem ser difíceis de manter. Um dos principais alérgenos de barata, tropomiosina, é compartilhado com ácaros, camarão e outros crustáceos e moluscos, e com o parasita intestinal *Ascaris lumbricoides*. Análise da identidade de seqüências e da estrutura tridimensional obtida por modelagem dessas moléculas permite-nos formular a hipótese de que reatividade cruzada IgE para tropomiosina poderia ter relevância clínica e ter um papel na imunomodulação de parasitas sobre o desenvolvimento de alergia e asma. Estudo futuros investigando novas estratégias para diagnóstico e tratamento de alergia a barata podem incluir o uso de alérgenos recombinantes para testes *in vivo* e *in vitro*, e imunoterapia alérgeno-específica, que poderá beneficiar pacientes com asma e/ou rinite alérgicas a esse inseto.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(4):172-180 barata, alergia, asma, tropomiosina, parasitoses intestinais, *Ascaris lumbricoides*, *Periplaneta americana*

#### Abstract

Cockroach allergy is an important risk factor for asthma worldwide, including Brazil. Evidence indicates that the combination of sensitization and environmental exposure to cockroach is associated with more severe asthma. These observations suggest that cockroach allergens are particularly potent in inducing IgE responses. Strategies to decrease environmental exposure to cockroach allergens require extensive cleaning, education and professional extermination of the insect, and these measures are difficult to maintain. One of the major cockroach allergens, tropomyosin, is shared with mites, shrimp and other Crustacea and Mollusks, and with the intestinal parasite *Ascaris lumbricoides*. Analysis of sequence identity and tri-dimensional structure obtained by molecular modeling of these molecules allows us to formulate the hypothesis that the IgE cross-reactivity to tropomyosin could have clinical relevance and have a role in the immunomodulation by parasites on the development of allergy and asthma. Future studies investigating novel strategies for diagnosis and treatment of cockroach allergy may include the use of recombinant allergens for *in vivo* and *in vitro* testing, and allergen-specific immunotherapy, which might benefit patients with asthma and/or rhinitis allergic to this insect.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(4):172-180 cockroach, allergy, asthma, tropomyosin, parasite infections, *Ascaris lumbricoides*, *Periplaneta americana*

1. Professora Associada, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e Instituto de Investigação em Imunologia iii - CNPq;
2. Pós-Doutoranda, Departamento de Clínica Médica FMRP-USP e Instituto de Investigação em Imunologia iii - CNPq;
3. Professora Associada do Departamento de Puericultura e Pediatria FMRP-USP;
4. Professora Adjunta da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Artigo submetido em 23.06.2005, aceito em 26.07.2005.

#### Introdução

##### **Baratas: características biológicas**

Mais de 5000 espécies de barata já foram identificadas e nomeadas nos últimos dois séculos, e cientistas acreditam que um mesmo número permanece por ser encontrado. Por serem animais que preferem calor e umidade, a maioria das baratas têm as florestas tropicais por seu habitat favorito. Apenas 1% busca convívio com o homem, à procura de alimento, abrigo e água. Essas espécies são chamadas baratas domiciliares, e vivem dentro de residências ou no peridomicílio. Estudos de fósseis de baratas demons-

tram que esses insetos mudaram pouco nos 350 milhões de anos que existem na face da terra. As baratas datam do período Carbonífero, precederam os dinossauros por mais de 150 milhões de anos, e os humanos por mais de 300 milhões de anos. Considera-se que a barata é uma das espécies de maior capacidade de adaptação e resistência do reino animal. Embora numerosos animais sejam classificados como onívoros - que comem qualquer coisa - poucos desempenham essa característica tão bem como a barata<sup>1</sup>.

As espécies domiciliares de baratas mais comuns são *Blattella germanica* (barata germânica), e *Periplaneta americana* (barata americana). *B. germanica* é uma barata pequena, de aproximadamente 2cm de comprimento, que comumente infesta residências nos Estados Unidos: cozinhas e banheiros são locais preferenciais de infestação. *P. americana* é uma barata maior, de cerca de 4cm de comprimento, que infesta casas, escolas, hospitais e outros prédios grandes. *P. americana* tem menos fecundidade que *B. germanica*, e requer temperatura e umidade mais elevadas para ótimo crescimento, sendo a espécie predominante em países tropicais incluindo Taiwan e o Brasil. Acredita-se que a *Blattella germanica* veio com os Fenícios através do Mediterrâneo, a partir da África, e se espalhou pela Rússia, Europa e para as Américas. A *Periplaneta americana* não é

originária das Américas, mas veio da África em navios negreiros. Outras espécies que podem ser encontradas no domicílio incluem *Blatta orientalis*, *Suppela longipalpa* e *Periplaneta fuliginosa*. Todas as baratas pertencem à ordem Blattaria, com origem na palavra grega *blattae*, com a qual os Gregos antigos designavam essas pestes domésticas.

Embora não sejam animais sociais, como as abelhas, formigas e cupins, as baratas são gregárias, sendo comum ocorrer a presença em grupos. Feromônios de agregação contribuem para essa característica. Possuem hábitos noturnos, sendo mais ativas à noite, quando saem do abrigo para alimentação, cópula, oviposição, dispersão, vôo. Quando baratas são vistas à luz do dia, é um mau sinal, de infestação séria: significa em geral excesso de população, ou falta de alimento ou água (estresse). As características físicas da barata propiciam uma vida em um mundo para-

lelo ao nosso: atrás de papel de parede, escondida em armários de cozinha, sob o refrigerador, dentro do banheiro próximo a água, e várias gerações podem nascer, viver e morrer sem serem vistas pelo olho humano, embora seus mundos ocupem o mesmo espaço. Baratas não são transmissoras de doenças, embora possam ocasionalmente transportar agentes patogênicos, como vetor mecânico. Patógenos encontrados em baratas incluem *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Toxoplasma* e vírus da hepatite B. Entretanto, nenhuma epidemia ou doença foi associada a infestação por baratas<sup>1</sup>. Por outro lado, a asma é a única doença consistentemente associada à presença de barata no ambiente. Algumas das características biológicas das espécies *B. germanica* e *P. americana* são relatadas na tabela 1.

**Tabela 1** - Características biológicas de *P. americana* e *B. germanica*

Características Biológicas	Espécie	
	<i>Periplaneta americana</i>	<i>Blattella germanica</i>
Tamanho	30 - 45 mm	15 - 20 mm
Coloração	castanho escuro	caramelo
Ootecas por fêmea	10 a 15	4 a 8
Incubação da ooteca	30 - 40 dias	17 dias
Ovos por ooteca	14 a 28	37
Longevidade do macho	2 a 3 anos	128 dias
Longevidade da fêmea	2 a 3 anos	150 dias
Habitat	Caixas de esgoto e gordura, caixas d'água, cisternas, áreas de serviço, sanitários e vestiários, porões, sótãos, forros, jardins, áreas externas	Cozinhas, depósitos de alimentos e embalagens, sob geladeiras e freezers, sob pias e bancadas, frestas na alvenaria, armários embutidos, sanitários e vestiários

### Importância da alergia a barata na asma

Baratas foram inicialmente reconhecidas como causa de resposta IgE e asma por Bernton e Brown, em 1964. Esses autores demonstraram, através de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata que aproximadamente 40% dos pacientes com asma em Nova Iorque eram sensibilizados a alérgenos de barata<sup>2</sup>. Kang et al<sup>3</sup> confirmaram a relação existente entre alergia a barata e asma através de testes de broncoprovocação, descrevendo respostas imediatas e de fase tardia após a inalação de extrato de barata por indivíduos asmáticos sensibilizados. Além disso, também verificaram aumento significativo no número de eosinófilos no sangue periférico 24 a 48 horas após o desafio. Um trabalho mais recente relatou aumento do número de eosinófilos e neutrófilos no escarro de pacientes asmáticos alérgicos a barata 24 horas após inalação de extrato de barata<sup>4</sup>. Estes estudos confirmam o papel de alérgenos de barata na indução de inflamação brônquica em pacientes sensibilizados.

Alergia a barata está fortemente ligada a fatores socioeconômicos e ocorre mais freqüentemente quando as condições de vida favorecem a infestação pelo inseto. Alergia a barata é causa importante de visita a serviços de emergência por crises agudas de asma, tanto entre paciente adultos como entre crianças<sup>5, 6</sup>. Infestação de ambientes domiciliares por barata está associada a sensibilização e desenvolvimento de alergia e asma, e existe uma relação dose-resposta entre níveis de alérgenos de baratas no domicílio e a freqüência de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata positivos para barata<sup>7</sup>.

Resultados do *National Cooperative Inner City Asthma Study (NCICAS)* revelaram que a combinação de sensibi-

lização e exposição a alérgenos de barata é um dos fatores de risco mais importantes para gravidade da asma entre crianças vivendo em grandes cidades dos Estados Unidos<sup>8</sup>. Mais recentemente, a avaliação mais ampla de um grupo de aproximadamente 1000 crianças vivendo em cidades distribuídas por diferentes regiões nos Estados Unidos confirmou que exposição a alérgenos de barata juntamente com sensibilização a barata foi associada a morbidade aumentada por asma, sugerindo que alérgenos de barata têm um efeito maior sobre morbidade por asma quando comparados a alérgenos de ácaros ou de animais de estimação, entre crianças asmáticas vivendo em grandes cidades nos Estados Unidos<sup>9</sup>. Embora a infestação por baratas e a exposição a alérgenos de barata tenham sido mais freqüentemente ligadas a condições que incluem viver em grandes cidades, ter baixo poder aquisitivo e ter menos educação, foi demonstrado que uma significativa proporção de crianças de classe média nos Estados Unidos, vivendo fora do ambiente urbano, está exposta a níveis de alérgenos de barata suficientes para causar sensibilização<sup>10</sup>. A explicação mais provável dada para esses achados seria a distribuição passiva de alérgenos de barata, veiculados até o domicílio por sapatos ou produtos de papel.

Um estudo prospectivo demonstrou uma associação significativa entre exposição a alérgenos de barata nos primeiros três meses de vida e desenvolvimento de chiado recorrente, entre crianças com risco elevado para alergia vivendo na região metropolitana de Boston<sup>11</sup>. Estudo dos irmãos dessas crianças-índice que participaram na coorte de Boston, mostrou que a exposição a alérgenos de barata cedo na vida, foi também associada a asma diagnosticada por médico e a crises repetidas de chiado em um período

de seguimento de 22 meses<sup>12</sup>. Crianças expostas a níveis maiores que 2 U/g Bla g 1 ou Bla g 2 no domicílio tiveram um risco relativo de asma incidente de 35%, mostraram risco mais elevado para crises repetidas de chiado, e apresentaram respostas proliferativas de linfócitos T a alérgeno de barata Bla g 2<sup>11-13</sup>. Exposição precoce a alérgenos de barata foi também descrita como fator de risco para sintomas mais graves de asma em um grupo multi-étnico de crianças de baixo nível sócio-econômico, com idade abaixo de dois anos, em Denver<sup>14</sup>. Além disso, a sensibilização a barata germânica foi identificada como fator crítico para função pulmonar diminuída em crianças asmáticas de escola elementar, vivendo em Taiwan<sup>15</sup>. Em nosso meio, Solé et al<sup>16</sup> demonstraram que a presença de alergia a barata foi associada a maior gravidade da asma e maior hiperreatividade brônquica entre adolescentes vivendo em São Paulo, sugerindo que sensibilização a barata é um marcador de gravidade da asma. Exposição a barata em domicílio entre crianças vivendo em Recife foi associada a maior frequência de asma, sugerindo que a exposição a barata poderia ser fator de risco para o desenvolvimento da doença<sup>17</sup>. Esses estudos em conjunto apontam para o papel importante de alérgenos de barata não só no desenvolvimento de asma como na apresentação da doença, com maior morbidade e gravidade dos sintomas.

Estudos realizados por nosso grupo revelaram que 55% de crianças e jovens com asma e/ou rinite alérgica, atendidos em clínicas especializadas em Ribeirão Preto e São Paulo, apresentam testes cutâneos de hipersensibilidade imediata positivos para baratas<sup>18</sup>. Estudamos também um grupo de crianças de 0 a 12 anos que procuraram cuidados em pronto-socorro por crise aguda de chiado. Os resultados desse estudo caso-controle revelaram que sensibilização a barata determinada pela presença de anticorpos IgE específicos no soro, foi um fator de risco significativo para chiado entre crianças de 2 a 12 anos<sup>19</sup>. Além disso, infecções respiratórias virais, particularmente aquelas causadas pelo Vírus Respiratório Sincicial (VRS), foram fatores de risco principais para chiado agudo entre o sub-grupo de crianças de 0 a 2 anos. O seguimento prospectivo dessas crianças de 0 a 2 anos por dois anos revelou que 52% continuaram a ter episódios repetidos de chiado entre 2 e 4 anos de idade, e que esse *outcome* foi altamente associado ao desenvolvimento de sensibilização a alérgenos do interior do domicílio. Sensibilização alérgica, particularmente a ácaros e barata, e exposição a alérgenos de barata foram fortemente associados, de forma independente, a persistência de chiado entre essas crianças de baixa idade<sup>20</sup>. Nossos resultados sugerem que a alta taxa de sensibilização a esses alérgenos pode ser devida à exposição a níveis elevados no domicílio. Em nosso estudo prospectivo<sup>20</sup>, 74% e 37,5% das crianças estavam expostas a níveis elevados de alérgenos de ácaros e baratas, respectivamente, de forma semelhante a outros estudos realizados no Brasil<sup>21, 22</sup>. Além do ambiente domiciliar, exposição a níveis significantes de alérgenos de barata foi demonstrada em escolas e creches na cidade de São Paulo, podendo ser um fator de risco adicional para sensibilização e desenvolvimento de asma<sup>23</sup>. Em nossa área, a exposição a alérgenos de gato e cachorro tem sido consistentemente baixa, tanto em casas como em escolas<sup>21, 22</sup>. Sensibilização a animais de estimação, que geralmente são mantidos fora da casa, tem sido encontrada em baixa frequência e não tem sido associada a crise aguda de chiado nos nossos pacientes.

#### **Alérgenos de barata: clonagem molecular, estrutura e função**

Alérgenos de baratas são derivados de várias fontes, incluindo saliva, material fecal, secreções, ovos, fragmentos e baratas mortas. Quantidades significantes de alérgenos de barata podem ser recuperadas de lavados de barata e

de material acumulado em recipientes onde as baratas são mantidas no laboratório. Alguns alérgenos são encontrados em células epiteliais do trato digestivo e em túbulos de Malpighi, sugerindo que poderiam ser enzimas digestivas<sup>24</sup>. Os alérgenos de barata têm propriedades semelhantes às daquelas de alérgenos de ácaros: são partículas relativamente grandes (>10 mm de diâmetro), detectáveis após movimentação no ambiente em que se encontram<sup>25, 26</sup>. A diminuição da exposição ambiental a alérgenos de barata é difícil de ser realizada. Apesar de ocorrer uma diminuição significativa no número de baratas após aplicação de inseticidas, níveis elevados de alérgenos, considerados clinicamente relevantes, ainda permanecem no ambiente por vários meses<sup>27-30</sup>. Um estudo recente avaliou a eliminação de baratas e redução na concentração de alérgenos em 16 domicílios de pessoas de baixo nível sócio-econômico<sup>31, 32</sup>. Os autores verificaram que, para atingir redução significativa nos níveis de alérgenos e infestação por baratas, foi necessária intervenção que incluía aplicação profissional de inseticida, educação, e limpeza profissional.

Vários alérgenos de barata foram identificados por técnicas de imunológica e clonagem molecular, incluindo alérgenos de *B. germanica*, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6 e Bla g 7, e de *P. americana*, Per a 1, Per a 3 e Per a 7<sup>18, 33-43</sup>. Essas proteínas são potentes indutoras de resposta IgE em indivíduos geneticamente predispostos, vivendo em ambiente infestado por baratas, e anticorpos IgE específicos anti Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5 e Bla g 6 podem ser detectados em 30 a 70% dos pacientes alérgicos<sup>44</sup>. A maior parte desses alérgenos é espécie-específica. Entretanto, homólogos de alérgenos do grupo 1 (Bla g 1 e Per a 1) e grupo 7 (Bla g 7 e Per a 7) foram identificados nas duas espécies.

Os primeiros alérgenos de barata identificados, usando imunológica, foram Bla g 1 e Bla g 2<sup>33, 34</sup>. Bla g 1 tem um homólogo estrutural em *P. americana*, Per a 1. Análise de cDNAs que codificam Bla g 1 revelou 70 a 72% de identidade de seqüência com Per a 1. Ambas as moléculas têm uma estrutura pouco usual, consistindo em uma série de até sete seqüências internas repetidas, cada uma de tamanho aproximado de 100 resíduos de aminoácidos, não apresentam resíduos de cisteína e nenhum sítio de N-glicosilação<sup>42, 45</sup>. Esses alérgenos de barata do Grupo 1 apresentam 30% de homologia com um precursor de proteína do mosquito *Anopheles gambiae*, ANG12, que é secretado somente pela fêmea deste inseto após ela alimentar-se de sangue, sugerindo que essas proteínas poderiam ter função digestiva<sup>42, 46</sup>. Wu et al<sup>47</sup> identificaram regiões de ligação a IgE na molécula de Per a 1.

Bla g 2 parece ser um alérgeno especialmente potente, que induz resposta IgE em aproximadamente 60% dos pacientes alérgicos a *B. germanica*, a níveis de exposição que são 10 a 100 vezes mais baixos que outros alérgenos inalantes comuns como ácaros e gato<sup>48</sup>. Além de ser secretado pela barata, é encontrado em concentrações elevadas nos órgãos digestivos do inseto, principalmente esôfago e pró ventrículo, levantando a possibilidade de ser uma enzima digestiva. Utilizando técnicas de clonagem molecular para determinar a seqüência de aminoácidos de Bla g 2, estabelecemos que esse alérgeno é uma proteína de 36 kD que apresenta homologia com as proteases aspárticas, incluindo enzimas digestivas pepsina, catépsina e quimosina<sup>35, 49</sup>. Modelos moleculares e ensaios funcionais revelaram que Bla g 2 é uma protease aspártica inativa, por conter substituições críticas localizadas ao redor do sítio catalítico da molécula. Portanto, a atividade enzimática não parece contribuir para promover a atividade alérgica de Bla g 2, como tem sido sugerido para vários dos alérgenos de ácaros (Der p 1, Der p 3, Derp 6 and Der p 9), que funcionam como enzimas digestivas. A estrutura primária de Bla g 2 está relacionada a um grupo de proteases aspárticas

inativas de mamíferos, conhecidas como glicoproteínas associadas à gravidez (*pregnancy-associated glycoproteins*, PAG), que são expressadas no córion de fêmeas grávidas de mamíferos como porco, cavalo, vaca e ovelha<sup>49</sup>. Recentemente, a estrutura tridimensional de Bla g 2 foi determinada por cristalografia, trazendo informações sobre as bases estruturais para as propriedades alergênicas da molécula<sup>48</sup>. Substituições de aminoácidos e aspectos pouco usuais do sítio ativo, incluindo maior distância entre os resíduos catalíticos, podem explicar a ausência de atividade enzimática de Bla g 2. Além disso, a presença de cinco pontes dissulfeto e um sítio de ligação a Zinco aumentam a estabilidade da estrutura do alérgeno, podendo contribuir para sensibilização a níveis de exposição mais baixos que para outros alérgenos.

Previamente, nós relatamos a clonagem e expressão de Bla g 4, e identificamos que esse alérgeno pertence à super família das *ligand-binding proteins* (lipocalinas ou calicinas)<sup>36</sup>. Posteriormente ficou evidente que essa família inclui vários outros alérgenos de animais, como cachorro, vaca e cavalo, além da  $\beta$ -lactoglobulina do leite de vaca. As lipocalinas ou calicinas são proteínas extracelulares que se ligam a moléculas hidrofóbicas com alta afinidade e seletividade. De forma interessante, membros dessa família apresentam baixa identidade de seqüência de aminoácidos (18% a 23%), entretanto sua estrutura tri-dimensional é muito semelhante. Modelos tri-dimensionais da estrutura terciária de Bla g 4 foram obtidos e mostraram uma estrutura semelhante à de outros membros da família das calicinas<sup>36</sup>. Bla g 4 recombinante expressada em sistemas de bactéria e de levedura apresenta excelente atividade alérgica<sup>36, 41, 50</sup>. Um estudo recente revelou que Bla g 4 é expressada apenas no sistema reprodutivo do macho e que a produção de alérgeno é estimulada pelo hormônio juvenil<sup>51</sup>.

Bla g 5 é um membro da família das enzimas glutathione-S-transferases (GST). Essas enzimas são envolvidas na detoxificação de compostos tóxicos endógenos ou xenobióticos, e em insetos a produção de GST está associada à resistência a inseticidas<sup>39</sup>. Bla g 6 apresenta 70% de homologia com tropomiosina-C.

Embora existam dados detalhados sobre alérgenos de *B. germanica*, há informações limitadas relativas aos alérgenos de *P. americana*, a espécie de barata mais prevalente em domicílios em Ribeirão Preto. Em Taiwan, Wu et al descreveram a identificação de Per a 3, uma proteína de armazenamento em insetos relacionada a arilforina, de 72 kDa, capaz de induzir proliferação de células T em pacientes alérgicos a barata<sup>37, 38</sup>. Este mesmo grupo identificou epitopos de ligação a IgE na molécula de Per a 3<sup>52</sup>. Apesar deste alérgeno ser importante em Taiwan, em nosso meio não temos informações importantes a respeito da reatividade IgE.

Através de rastreamento de biblioteca de cDNA utilizando *pool* de soros de pacientes com asma, alérgicos a barata, identificamos em nosso laboratório um alérgeno principal de *P. americana*, Per a 7, que mostrou reatividade IgE em 50% dos pacientes alérgicos a barata. A seqüência de aminoácidos de Per a 7 mostrou alto grau de identidade com tropomiosinas de invertebrados, particularmente de ácaros (80%) e camarão (82%)<sup>16</sup>. Mais recentemente, tropomiosinas de *B. germanica* (Bla g 7), e de *P. fuliginosa* foram identificadas, e a análise das seqüências revelou que essas proteínas apresentaram 97% a 98,9% de identidade com tropomiosina de *P. americana*<sup>43, 53</sup>. Utilizando soros de pacientes alérgicos a *B. germanica*, Jeong et al.<sup>43</sup>, verificaram que apenas 19,4% dos pacientes alérgicos vivendo na Coreia mostraram reatividade para Bla g 7 recombinante. Tropomiosinas foram identificadas como alérgenos importantes em ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis* Der p 10, Der f 10 e Blo t 10,

respectivamente) e camarão. De forma interessante, um anticorpo monoclonal desenvolvido contra tropomiosina de *D. pteronyssinus* (mAb 1A6) mostrou reatividade a tropomiosina de camarão e reconheceu tropomiosina de barata em imunofluorescência. Em nosso laboratório, realizamos a produção de tropomiosina recombinante de *P. americana* (rPer a 7) em sistema *Pichia pastoris*, com excelente atividade biológica *in vivo* e *in vitro*. A produção de rPer a 7 com elevado grau de pureza inclui purificação por cromatografia de afinidade utilizando o anticorpo monoclonal 1A6.

Nossos resultados levantam a possibilidade de que tropomiosina possa ser a base para reatividade cruzada entre ácaros, barata, camarão e outros invertebrados, e que o alto grau de identidade de seqüências tenha significado clínico.

### **Tropomiosina e reatividade cruzada entre invertebrados**

Tropomiosinas têm sido identificadas como moléculas indutoras de resposta IgE e associadas a reatividade cruzada IgE entre invertebrados, incluindo barata, ácaros, camarão e outros crustáceos e moluscos, *A. lumbricoides* e outros parasitas<sup>54</sup>. Tropomiosina pertence a uma família de proteínas altamente conservadas com múltiplas isoformas. É encontrada em células musculares e não musculares de todas as espécies de vertebrados e invertebrados. Atua como a principal molécula regulatória do sistema contrátil em células musculares e constitui importante componente do citoesqueleto em células não musculares<sup>54</sup>. No músculo, duas moléculas paralelas de tropomiosina, constituídas por alfa-hélices, se enrolam ao redor de si mesmas para formar uma estrutura *coiled-coil*. Tropomiosinas alergênicas são encontradas em invertebrados, entretanto tropomiosinas de vertebrados não são alergênicas.

Estudos detalhados sobre epitopos IgE forneceram fortes evidências moleculares para reatividade cruzada entre tropomiosinas de invertebrados. Um trabalho utilizando peptídeos sintéticos derivados da seqüência de tropomiosina de camarão descreveu cinco principais sítios de ligação a IgE na molécula (Pen a 1) e uma alta identidade de seqüência foi observada entre essas regiões e regiões homólogas de tropomiosinas de outros invertebrados<sup>55</sup>. Entretanto, até o momento não está claro se a reatividade cruzada alérgica entre ácaros, barata e alimentos é clinicamente relevante. Sintomas de alergia alimentar após a ingestão de camarão e moluscos foram relatados em pacientes Europeus alérgicos a ácaros recebendo imunoterapia, e acredita-se que a tropomiosina seja uma das moléculas envolvidas<sup>56, 57</sup>. A resposta IgE a camarão, ácaro e barata foi analisada entre judeus ortodoxos, os quais obedecem estritamente as leis da dieta Kosher, que proíbe a ingestão de crustáceos. Nove pacientes selecionados apresentaram testes cutâneos positivos para camarão e, dentre eles, três demonstraram reatividade IgE para tropomiosina de camarão por RAST e immunoblotting. Uma significativa inibição da ligação de IgE a tropomiosina de camarão foi verificada quando os soros dos indivíduos envolvidos no estudo foram pré-incubados com extratos de *D. pteronyssinus*, *B. germanica* e *P. americana*. Estes resultados indicam que a reatividade de IgE para camarão neste grupo de judeus, não expostos a camarão, ocorreu como resultado de sensibilização indireta, por reatividade cruzada de IgE para tropomiosinas de ácaro e barata<sup>58</sup>.

Estudos prévios de inibição identificaram reatividade cruzada IgE entre insetos e parasitas, e foi sugerido que essa reatividade cruzada pode ser devida a tropomiosina. Seqüência de tropomiosina de *Anisakis simplex* revelou que tropomiosinas em nematódeos são altamente conservadas<sup>59</sup>. A ingestão de alimento contaminado com *Anisakis simplex*, um nematódeo que parasita peixes, crustáceos e

cefalópodes, no seu terceiro estágio larval (L<sub>3</sub>), pode induzir no homem uma resposta IgE específica com sintomas alérgicos, geralmente urticária. Asturias et al<sup>59</sup> clonaram, seqüenciaram e produziram tropomiosina recombinante de *A. simplex*, e verificaram que tropomiosina de *A. simplex* apresenta alta homologia com tropomiosinas de outros nematódeos tais como *Trichostrongylus colubriformis*, *Caenorhabditis elegans* e *Onchocerca volvulus* e menor homologia com tropomiosinas de outros invertebrados, incluindo crustáceos, insetos e moluscos. Um estudo que avaliou a reatividade de anticorpos IgE para artrópodes e nematódeos, incluindo *A. simplex* e *Ascaris suis*, relatou que o componente ao qual anticorpos IgE reagiam era tropomiosina, sugerindo a ocorrência de reatividade cruzada de IgE para tropomiosinas de insetos, ácaros, crustáceos, moluscos e parasitas<sup>60</sup>.

#### Relação entre parasitoses, alergia e desenvolvimento de asma: tropomiosina como modelo

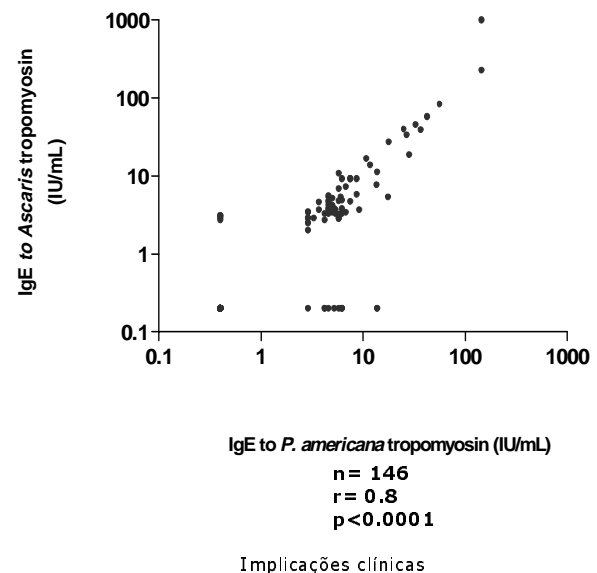
Nós recentemente determinamos a seqüência completa da tropomiosina de *A. lumbricoidea*, e demonstramos que essa proteína liga-se a IgE. Análise da seqüência mostrou um alto grau de identidade de tropomiosina de *A. lumbricoidea* com tropomiosinas de ácaros, barata, camarão e outros parasitas como *A. simplex* e *Onchocerca volvulus* (69% a 98% identidade). Além disso, demonstramos uma intensa reatividade de tecido de *A. lumbricoidea* com anticorpo monoclonal 1A6, contra tropomiosina de ácaro e que reconhece tropomiosinas de barata e camarão.

Nossos resultados demonstram alto grau de identidade de seqüência primária entre tropomiosinas de *Ascaris lumbricoidea* e tropomiosinas de alérgenos inalantes como ácaros e baratas, incluindo em áreas da molécula identificadas como epitopos IgE. A estrutura tridimensional dessas moléculas também parece ser bastante conservada. As evidências permitem prever que esse grau de identidade estrutural seja suficiente para induzir uma resposta IgE cruzada a essas moléculas. Resultados de nosso estudo epidemiológico em Natal, e de estudos realizados em outros lugares do mundo, indicam que infecção por *A. lumbricoidea* parece não ter efeito protetor sobre o desenvolvimento de alergia e asma, como tem sido demonstrado para infecções com *Schistosoma*. É conhecido que respostas IgE bem estabelecidas para inalantes se desenvolvem mais frequentemente após os dois anos de idade, e que a sensibilização a alérgenos do interior do domicílio é fortemente associada com asma. Entretanto, crianças de áreas endêmicas são infectadas por *Ascaris* muito cedo, frequentemente no primeiro ano de vida. Baseados nessas evidências, nós formulamos a hipótese de que exposição a alérgenos que apresentam reação cruzada, tais como tropomiosina, cedo na vida, no momento das infecções iniciais por *Ascaris*, poderia facilitar o desenvolvimento subsequente de respostas IgE cruzadas após exposição a ácaros ou baratas, que poderiam levar a inflamação de vias aéreas e asma. Portanto, infecção por *Ascaris* poderia ter um efeito adjuvante no desenvolvimento de asma, no subgrupo de crianças infectadas por *Ascaris* que desenvolvem respostas a tropomiosina. De forma interessante, comparação das seqüências de tropomiosinas de *Ascaris* e *Schistosoma* revelaram um grau de identidade mais baixo, da ordem de 57%, quando comparado a tropomiosinas de ácaros, barata e outros parasitas (70% a 98%). A identidade de seqüências de tropomiosinas de invertebrados com tropomiosinas de vertebrados, que não são alérgicas, varia de 50% a 60%, sugerindo que tropomiosinas de *Ascaris* e *Schistosoma* podem não compartilhar extensa reatividade cruzada.

Nós investigamos a resposta IgE a tropomiosinas de *A. lumbricoidea* e *P. americana* em um grupo de crianças vivendo na cidade de Natal, em área endêmica para parasitoses intestinais. Em estudo prévio<sup>61</sup>, avaliamos um grupo

de 150 crianças de três a seis anos de idade, que freqüentemente creche na cidade de Natal. Evidência de infecção com *A. lumbricoidea* foi encontrada em 133/150 (88,6%) crianças: 106/150 crianças (70,6%) tinham ovos de *A. lumbricoidea* detectáveis em amostras de fezes, e 123/150 (82%) crianças apresentavam anticorpos IgE para *A. lumbricoidea* no soro. A contagem de ovos variou de 48 a 31.200 ovos/g de fezes, indicando que em algumas crianças a carga de larvas de *Ascaris* nos pulmões poderia ser significativa. Nesse grupo de crianças, a presença de *A. lumbricoidea* nas fezes e a presença de testes cutâneos positivos para alérgenos inalantes foram fatores de risco significantes e independentes para presença de chiado<sup>61</sup>. Entretanto, nenhuma das crianças desse grupo apresentou teste cutâneo de hipersensibilidade imediata positivo para extrato de barata (*B. germanica*).

Analisando um painel de soros de um grupo de 146 crianças da mesma creche em Natal, dos quais 45 soros pertenciam a crianças que participaram do estudo inicial<sup>61</sup>, houve uma correlação excelente entre níveis de anticorpos IgE específicos para tropomiosinas de *A. lumbricoidea* e *P. americana*, determinados por ELISA quimérico<sup>62</sup>. Esses resultados sugerem forte reatividade cruzada IgE entre tropomiosinas de *Ascaris* e baratas. (figura 1)



**Figura 1** – Reatividade a tropomiosina do *A. lumbricoidea* e de *P. americana*

O sucesso no diagnóstico de alergia, *in vivo* através dos testes cutâneos de leitura imediata e *in vitro* pela dosagem de anticorpos IgE específicos no soro, está fortemente vinculado à qualidade dos extratos alérgicos empregados. Extratos de barata comercializados atualmente são definidos pela relação entre o peso do material bruto (corpo de baratas) e o volume de líquido utilizado para preparar o extrato. Extratos para "prick test" são definidos como 1:10 ou 1:20 peso/volume, significando que um grama de material bruto foi extraído em 10 ml (1:10) ou em 20 ml (1:20) de líquido, em geral solução salina tamponada. Esse sistema de unidades peso/volume não mede o conteúdo de alérgenos e extratos preparados dessa maneira contêm tanto componentes alérgicos como não-alérgicos.

Nos Estados Unidos, o licenciamento de produtos alérgicos para uso clínico é regulado pelo FDA ("Food and Drug Administration"), através de CBER ("Center for Biological Evaluation and Research"). Evidências consistentes têm apontado para o importante papel da alergia a barata como causa de asma e de maior morbidade associada

à doença, particularmente entre crianças vivendo em grandes cidades nos Estados Unidos. Em 2000, o FDA decidiu que extratos de barata seriam o próximo alvo para padronização. A potência de 18 extratos comerciais de barata foi comparada, através de inibição de ELISA, à potência de padrões de referência de *B. germanica* (4400 BAU/ml) e *P. americana* (1700 BAU/ml), estabelecida por testes cutâneos. Os resultados revelaram que a potência biológica de extratos comerciais (10 – 782 BAU/ml para *B. germanica* e 10-250 BAU/ml para *P. americana*) foi inferior à dos extratos de referência, e que foi inferior aos valores considerados limite para induzir testes cutâneos positivos de forma consistente (100-1000 BAU/ml) em 7/18 extratos analisados. Além disso, houve uma variabilidade grande no conteúdo de alérgenos principais em 8 extratos de *B. germanica* que foram analisados para conteúdo de Bla g 1 e Bla g 2<sup>63</sup>. Portanto, o diagnóstico de alergia a barata poderia ser melhorado com a utilização de extratos padronizados, ou alternativamente com o uso de alérgenos recombinantes. Embora a qualidade dos extratos alergênicos naturais tenha melhorado nos últimos 20 anos, estes extratos continuam sendo misturas heterogêneas, contendo muitas proteínas não alergênicas e outras macromoléculas que são administradas juntamente com os componentes ativos, os alérgenos protéicos. Mesmo com o uso de técnicas modernas, a padronização de extratos contendo múltiplos alérgenos “major” e “minor” é difícil de ser realizada.

Alérgenos recombinantes apresentam várias vantagens sobre extratos naturais<sup>64</sup>. Entretanto, é necessário estabelecer a frequência de reatividade a cada alérgeno individualmente e comparar a reatividade a alérgenos recombinantes com aquela do extrato natural. Estudos em um número pequeno de pacientes alérgicos a barata utilizando proteínas recombinantes Bla g 2 e Bla g 4, produzidas em bactéria (*Escherichia coli*), mostraram que os alérgenos recombinantes induziram teste cutâneo positivo em concentrações de até 10<sup>-5</sup>mg/ml em pacientes alérgicos, e nenhuma reação foi observada em não-alérgicos a concentrações de 1mg/ml<sup>35, 36</sup>. Outros alérgenos recombinantes de barata têm sido produzidos em *E. coli* (Bla g 5, Per a 1 e Per a 3) e em *Pichia pastoris* (Per a 1, Bla g 2, Bla g 4 e Per a 7). Estudos sorológicos nos Estados Unidos revelaram a prevalência de 60% e 70% de anticorpos IgE para rBla g 4 e rBla g 5, respectivamente, e que o uso de um coquetel de Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4 e Bla g 5 diagnosticou 95% dos casos de alergia analisados<sup>50</sup>. Esses resultados sugerem que é possível usar um coquetel de 3-4 alérgenos, ao invés de um extrato bruto de barata, não purificado, tanto para diagnóstico como para tratamento, entretanto, estudo clínico com um número maior de pacientes será necessário. Em nosso meio, temos dados limitados sobre a reatividade *in vivo* e *in vitro* a alérgenos recombinantes de barata. Estudos preliminares revelam que a frequência de reatividade a alérgenos recombinantes de *B. germanica* em testes de puntura ou “prick test” entre nossos pacientes alérgicos a barata é muito baixa (dados não mostrados).

Em um estudo recente foi avaliado o uso de alérgenos recombinantes de barata para investigar respostas IgE and IgG em pacientes alérgicos a barata, e para estabelecer perfil de reatividade IgE nesses pacientes. Usando ensaio CAP-streptavidina e ensaio multiplex de citometria de fluxo, a prevalência de anticorpos IgE a alérgenos recombinantes rBla g 1, rBla g 2, rBla g 4, rBla g 5 and rPer a 7 foi de 26.1%, 54.4%, 17.4%, 37.4% e 12.7%, respectivamente, entre pacientes alérgicos a barata<sup>65</sup>. Nesse grupo, 64% dos soros apresentaram anticorpos IgE a pelo menos um alérgeno, e anticorpos IgE específicos foram associados a níveis aumentados de anticorpos IgG. Esses resultados indicam que o uso potencial de alérgenos recombinantes para fins diagnósticos pode melhorar nossa capacidade de

definir padrões distintos de reatividade IgE e IgG entre pacientes alérgicos a barata. Entretanto, utilizando esse painel de alérgenos, mais de 30% dos pacientes não seriam diagnosticados. Os dados atuais sugerem que há um perfil complexo de reatividade IgE a alérgenos de barata, não havendo alérgenos dominantes ou principais, como os descritos para ácaros e gato. Embora os alérgenos disponíveis mostrem boa atividade biológica, é necessário que maior número de alérgenos de barata seja identificado, particularmente da espécie *P. americana*. Dessa forma, um painel mais amplo de alérgenos recombinantes poderia substituir extratos naturais para diagnóstico e tratamento. Estudos estão em andamento em laboratório para realizar rastreamento de biblioteca de expressão de cDNA de *P. americana*, utilizando pool de soros de pacientes alérgicos a barata, mas sem anticorpos IgE para Per a 1 ou Per a 7.

Um aspecto interessante é que a frequência relatada de reatividade IgE para tropomiosinas de ácaro ou barata tem sido bem mais baixa entre pacientes alérgicos vivendo na Europa ou nos Estados Unidos (10% a 13%) quando comparada àquela entre pacientes vivendo na África ou Brasil (50-55%)<sup>18, 65, 66</sup>. Essas observações podem refletir sensibilização a outros invertebrados contendo tropomiosina como alérgeno com reação cruzada, tais como parasitas. Mais estudos para estabelecer a relevância clínica da reatividade cruzada entre tropomiosinas de invertebrados serão necessários.

Embora a imunoterapia para barata seja realizada por alguns alergistas de forma anedótica, há apenas um estudo não controlado na literatura, relatando sucesso dessa forma de tratamento em pacientes com asma e alérgicos a barata<sup>67</sup>. O uso de imunoterapia alérgeno-específica teve início em 1911 na Inglaterra, com os primeiros estudos de Noon e Freeman, avaliando os efeitos da administração de injeções subcutâneas de doses crescentes de extrato de pólen de grama a pacientes alérgicos a pólen de grama que apresentavam rinoconjuntivite ou *hay fever*. Desde então essa forma de tratamento tem sido amplamente utilizada no manejo de pacientes com asma alérgica, rinite alérgica persistente ou intermitente, conjuntivite alérgica e reações de hipersensibilidade a venenos de insetos himenópteros. Imunoterapia é eficaz em pacientes cuidadosamente selecionados que apresentam doença mediada por IgE. Tem sido demonstrada eficácia da IT em anafilaxia por veneno de insetos himenópteros, e rinoconjuntivite e asma causadas por alérgenos inalantes. O benefício da IT é prolongado e documentado até pelo menos três anos após o término do tratamento. Em pacientes com alergia a venenos de insetos himenópteros, a proteção se mantém até 20 a 30 anos após o término do tratamento<sup>68, 69</sup>. Em crianças, foi demonstrado que a IT preveniu o surgimento de novas sensibilizações e reduziu a progressão de rinite para asma diagnosticada por médico<sup>70, 71</sup>. Estudos de metanálise confirmaram o efeito benéfico da IT no tratamento da asma e rinite alérgica causadas por ácaros, gato, pólenes e alguns fungos (*Alternaria* e *Cladosporium*). Acredita-se que o mecanismo do efeito imunomodulatório da imunoterapia sobre reações alérgicas envolva a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  por células T regulatórias, e produção de níveis elevados de anticorpos IgG alérgeno-específicos de alta afinidade, particularmente IgG4, induzidos no curso do tratamento<sup>72-74</sup>.

A qualidade dos extratos alergênicos e a utilização de altas doses de alérgeno são fatores críticos não só para o sucesso do diagnóstico de alergia, mas também da imunoterapia alérgeno-específica. Recentemente, o conteúdo de endotoxina de vacinas alergênicas padronizadas, comercializadas nos Estados Unidos foi avaliado. A análise de 58 vacinas mostrou níveis variando de indetectáveis a 34.000 EU/mL, sendo os níveis mais altos encontrados em vacinas de gato e ácaro *D. farinae*<sup>75</sup>. Nesse estudo, extratos de barata não foram analisados porque não são licenciados para

imunoterapia pelo FDA nos Estados Unidos. A presença de níveis elevados de endotoxina, um potente composto pró-inflamatório presente na parede de bactérias Gram-negativas, em alguns dos extratos utilizados para imunoterapia, levanta questões quanto à influência do conteúdo de endotoxina na eficácia e no desenvolvimento de reações adversas a essa forma de tratamento. Esse estudo ilustra limitações do uso dos extratos atualmente disponíveis para o diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas. Essas limitações poderiam ser minimizadas com a utilização de alérgenos recombinantes.

Em resumo, nos últimos dez anos tem havido um grande progresso na identificação de alérgenos de barata das espécies *B. germanica* e *P. americana*. Esses alérgenos são produzidos como proteínas recombinantes, com atividade biológica comparável à de seus homólogos naturais, e podem potencialmente ser úteis para melhorar a especificidade do diagnóstico de alergia a barata e para investigar a eficácia da imunoterapia em pacientes alérgicos a este inseto. Alérgenos de barata são difíceis de ser removidos do ambiente, mesmo após extermínio eficiente de baratas; podem ser carregados de forma passiva para o domicílio, e podem estar presentes em quantidades significantes em locais públicos como escolas. Portanto, a imunoterapia com alérgenos de barata poderia ser um tratamento adjuvante eficaz para pacientes com asma e/ou rinite alérgica a barata, considerando-se que baixos níveis de alérgenos de barata são difíceis de manter no ambiente, e que a combinação de exposição a níveis elevados de alérgenos de barata e sensibilização a barata está associada a maior morbidade por asma. O perfil de reatividade a alérgenos individuais, complexo e variável entre pacientes com asma e/ou rinite alérgica a barata, precisa ser mais bem estabelecido, particularmente em nosso meio. Estudos com pacientes vivendo nos Estados Unidos revelaram que o painel de alérgenos recombinantes disponíveis no momento pode identificar aproximadamente 70% dos pacientes alérgicos a barata, definidos pela presença de teste cutâneo de hipersensibilidade imediata e/ou presença de anticorpos IgE específicos para barata no soro, utilizando extratos brutos, comerciais. Esses resultados sugerem que um painel mais amplo precisa ser utilizado, e estudos para identificação de novos alérgenos de barata estão em andamento.

A relação entre asma e alergia, e infecções por helmintos permanece controversa<sup>76</sup>. Mais provavelmente, ao invés de um efeito causal direto, a exposição precoce a helmintos poderia modular mecanismos imuno-inflamatórios envolvidos na intrincada patogênese da asma. A identificação de moléculas de parasitas intestinais, particularmente de *Schistosoma mansoni* e *Ascaris lumbricoides*, associadas com proteção ou com promoção de alergia e asma, poderá fornecer a base para novas formas de tratamento ou prevenção de doenças alérgicas. Estudos prospectivos serão necessários para esclarecer o papel da tropomiosina e de outros antígenos de parasitas compartilhados com alérgenos inalantes ou alimentares no desenvolvimento de doenças alérgicas. Além disso, é importante considerar que vários fatores, tais como exposição precoce a endotoxina ou animais de estimação, infecções bacterianas e virais na infância, uso de antibióticos, condições de habitação, estilo de vida, atividade física, e dieta, poderiam coletivamente resultar no desenvolvimento de hiperreatividade de vias aéreas em partes diferentes deste mundo culturalmente diverso.

## Conclusões

Alergia a barata é um importante fator de risco para asma em todo o mundo, inclusive no Brasil. Evidências consistentes indicam que a combinação de sensibilização a ba-

rata e exposição a alérgenos de barata no domicílio está associada a asma mais grave, particularmente entre crianças vivendo em grandes cidades. Essas observações sugerem que alérgenos de barata são particularmente potentes em induzir resposta IgE. Estratégias para diminuir a exposição ambiental a alérgenos de barata requerem limpeza extensa, educação e extermínio profissional de insetos, que podem ser difíceis de manter. Um dos principais alérgenos de barata, tropomiosina, é compartilhado com ácaros, camarão e outros crustáceos e moluscos, e com parasita intestinal *Ascaris lumbricoides*. Análise da identidade de seqüências e da estrutura tridimensional obtida por modelagem dessas moléculas permite-nos formular a hipótese de que reatividade cruzada IgE para tropomiosina poderia ter relevância clínica e ter um papel na imunomodulação de parasitas sobre desenvolvimento de alergia e asma. Estudos futuros investigando novas estratégias para diagnóstico e tratamento de alergia a barata podem incluir o uso de alérgenos recombinantes para testes *in vivo* e *in vitro*, e imunoterapia alérgeno-específica, que poderá beneficiar pacientes com asma e/ou rinite alérgica a esse inseto.

## Referências

- Schweid R. The Cockroach Papers. A Compendium of History and Lore. First Edition. New York/London. Four Walls Eight Windows, 1999
- Bernton HS, Brown H. Insect allergy—Preliminary studies of the cockroach. *J Allergy* 1964; 35:506-13.
- Kang B, Vellody D, Homburger H, Yunginger JW. Cockroach as a cause of allergic asthma. Its specificity and immunologic profile. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63:80-6
- Luch M, Sastre J, Fernandez-Nieto M, Fernandez-Caldas E, Quiroz S. Eosinophilic and neutrophilic sputum response to bronchial challenge with cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:802-3.
- Pollart SM, Chapman MD, Fiocco GP, Rose G, Platts-Mills TAE. Epidemiology of acute asthma: IgE antibodies to common inhalant allergens as a risk factor for emergency room visits. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:875-81.
- Gelber LE, Seltzer L, Bouzoukis JK, Pollart SM, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Sensitization and exposure to indoor allergens (dust mite, cat, and cockroach) as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:573-578.
- Eggleston PA, Rosenstreich D, Lynn H, Gergen P, Baker D, Kattan M, et al. Relationship of indoor allergen exposure to skin test sensitivity in inner-city children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:563-70.
- Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin RG, Gergen P, et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. *N Engl J Med* 1997; 336:1356-1363.
- Gruchalla RS, Pongracic J, Plaut M, Evans III R, Visness CM, Walter M, et al. Inner City Asthma Study: Relationships among sensitivity, allergen exposure, and asthma morbidity. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:478-85.
- Matsui EC, Wood RA, Rand C, Kanchararaksa S, Swartz L, Curtin-Brosnan J, et al. Cockroach allergen exposure and sensitization in suburban middle-class children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:87-92.
- Gold DR, Burge HA, Carey V, Milton DK, Platts-Mills T, Weiss ST. Predictors of repeated wheeze in the first year of life: the relative roles of cockroach, birth weight, acute lower respiratory illness, and maternal smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:227-36.
- Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Exposure to cockroach allergen in the home is associated with incident doctor-diagnosed asthma and recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:41-7.
- Finn PW, Boudreau JO, He H, Wang Y, Chapman MD, Vincent C, et al. Children at risk for asthma: home allergen levels, lymphocyte proliferation, and wheeze. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:933-42.
- Klennert MD, Price MR, Liu AH, Robinson JAL. Morbidity patterns among low-income wheezing infants. *Pediatrics* 2003; 112:49-57.

15. Lin Y-C, Su H-J, Hsiue T-R, Lee C-H, Chen C-W, Guo YL. Levels of house dust mite-specific IgE and cockroach -specific IgE and their association with lower pulmonary function in Taiwanese children. *Chest* 2002; 121:347-53.
16. Solé D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Chacon K, Naspitz C. Sensitization to cockroach as a marker of asthma severity among probable asthmatic (PA) adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC) protocol. *J Allergy Clin Immunol* 1001; 109:S37 [Abstract].
17. Sarinho E, Schor D, Veloso MA, Rizzo JA. There are more asthmatics in homes with high cockroach infestation. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:503-10.
18. Santos ABR, Aalberse RC, Ferriani VPL, Oliver C, Rizzo MC, Naspitz CK, 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.
19. Camara AA, Silva JM, Ferriani VP, Tobias KR, Macedo IS, Padovani MA, et al. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:551-557.
20. Silva JM, Camara AA, Tobias KRC, Macedo IS, Cardoso MRA, Arruda E, et al. A prospective study of wheezing in young children: the independent effects of cockroach exposure, breast-feeding and allergic sensitization. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16:393-401.
21. Sopenete MC, Silva DA, Arruda LK, Chapman MD, Taketomi EA. Dermatophagoides farinae (Der f 1) and Dermatophagoides pteronyssinus (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlandia, Brazil. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122:257-63.
22. Tobias KR, Ferriani VP, Chapman MD, Arruda LK. Exposure to indoor allergens in homes of patients with asthma and/or rhinitis in southeast Brazil: effect of mattress and pillow covers on mite allergen levels. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:365-70.
23. Rullo VE, Rizzo MC, Arruda LK, Sole D, Naspitz CK. Daycare centers and schools as sources of exposure to mites, cockroach, and endotoxin in the city of São Paulo, Brazil. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:582-8.
24. Eggleston PA, Arruda LK. Ecology and elimination of cockroaches and allergens in the home. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:S422-9.
25. De Blay F, Sánchez J, Hedelin G, Perez-Infante A, Vérot A, Chapman MD. Dust and airborne exposure to allerges derived from cockroach (*Blattella germanica*) in low-cost public housing in Strasbourg (France). *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:107-12.
26. De Lucca SD, Taylor DJM, O'meara TJ, Jones AS, Tovey ER. Measurement and characterization of cockroach allergens detected during normal domestic activity. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:672-80.
27. Williams LW, Reinfried P, Brenner RJ. Cockroach extermination does not rapidly reduce allergen in settled dust. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:702-703.
28. Eggleston PA, Wood RA, Rand C, Nixon WJ, Chen PH, Lukk P. Removal of cockroach allergen from inner city homes. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:842-6.
29. Gergen PJ, Mortimer KM, Eggleston PA. Results of the National Cooperative Inner-city Asthma Study (NCICAS) environmental intervention to reduce cockroach allergen exposure in inner-city homes. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:501-506.
30. Wood RA, Eggleston PA, Rand C, Nixon WJ, Kanchanaraks S. Cockroach allergen abatement with extermination to reduce cockroach allergen exposure in inner-city homes. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 87:60-64.
31. Arbes Jr SJ, Sever M, Archer J, Long EH, Gore JC, Schal C, et al. Abatement of cockroach allergen (Bla g 1) in low-income, urban housing: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:339-45.
32. Arbes Jr SJ, Sever M, Mehta J, Gore JC, Schal C, Vaughn B, et al. Abatement of cockroach allergens (Bla g 1 and Bla g 2) in low-income, urban housing: Month 12 continuation results. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:109-14.
33. Schou C, Lind P, Caldas EF, Lockey RF, Lowenstein H. Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86:935-46.
34. Pollart SM, Mullins DE, Vailes LD, Hayden ML, Platts-Mills TA, Sutherland WM, et al. Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:511-21.
35. Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS, et al. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2: sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 1995; 270:19563-8.
36. Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamin DC, Chapman MD. Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycons) as a cause of IgE antibody responses. *J Biol Chem* 1995; 270:31196-201.
37. Wu CH, Lee MF, Liao SC. Isolation and preliminary characterization of cDNA encoding American cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96:352-9.
38. Wu CH, Lee MF, Liao SC, Luo SF. Sequence analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. *J Biol Chem* 1996; 271:17937-43.
39. Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TA, Hayden ML, Chapman MD. Induction of IgE antibody responses by glutathione S-transferase from the German cockroach (*Blattella germanica*). *J Biol Chem* 1997; 272:20907-12.
40. Helm RM, Bandele EO, Swanson MC, Campbell AR, Wynn SR. Identification of a German cockroach-specific allergen by human IgE and rabbit IgG. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1998; 87:230-8.
41. Vailes LD, Kinter MT, Arruda LK, Chapman MD. High level expression of cockroach allergen, Bla g 4, in *Pichia pastoris*. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:274-80.
42. Pomés A, Melén E, Vailes LD, Retief JD, Arruda LK, Chapman MD. Novel allergen structures with tandem amino acid repeats derived from the German and American cockroach. *J Biol Chem*, 1998; 273:30801-7.
43. Jeong KY, Lee J, Lee I-Y, Ree H-I, Hong C-S, Yong T-S. Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. *Allergy* 2003; 58:1059-63.
44. Arruda LK, Chapman MD. The role of cockroach allergens in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 14-9.
45. Melén E, Vailes LD, Pomés A, Arruda LK, Chapman MD. Molecular cloning of Per a 1 and definition of the cross-reactive Group 1 cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:859-64.
46. Wu CH, Wang NM, Lee MF, Kao CYY, Luo SF. Cloning of the American cockroach Cr-PII allergens: evidences for the existence of cross-reactive allergens between species. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:832-840.
47. Wu CH, Lee MF, Yang JS, Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per a 1 allergen. *Mol Immunol* 2002; 39:459-64.
48. Gustchina A, Li M, Wunschmann S, Chapman MD, Pomés A, Wlodawer A. Crystal structure of cockroach allergen Bla g 2, an unusual Zinc binding aspartic protease with a novel mode of self inhibition. *J Mol Biol* 2005; 348:433-44.
49. Pomes A, Chapman MD, Vailes LD, Blundell TL, Dhanaraj V. Cockroach allergen Bla g 2: structure, function, and implications for allergic sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:391-7.
50. Arruda LK, Vailes LD, Ferriani VPL, Santos ABR, Pomés A, Chapman MD. Cockroach allergens and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:419-28.
51. Fan Y, Gore JC, Redding KO, Vailes LD, Chapman MD, Schal C. Tissue localization and regulation by juvenile hormone of human allergen Bla g 4 from the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Mol Biol* 2005; 14:45-53.
52. Wu CH, Lee MF, Tseng CY. IgE-binding epitopes of the American cockroach Per 3 allergen. *Allergy* 2003; 58:986-92.
53. Jeong KY, Lee J, Lee I-Y, Hong C-S, Ree H-I, Yong T-S. Expression of tropomyosin from *Blattella germanica* as a recombinant non-fusion protein in *Pichia pastoris* and comparison of its reactivity with its native counterpart. *Prot Expression Purification* 2004; 37:273-8.
54. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:247-58.
55. Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:38-48.
56. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi, F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996; 51:108-113.



57. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Pajno GB, Barberio G, Corbetta L. Asthma after consumption of snails in house-dust-mite allergic patients: a case of IgE cross-reactivity. *Allergy* 1996; 51:387-93.
58. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:956-61.
59. Asturias JA, Eraso E, Martinez A. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108:263-7.
60. Martinez A, Martinez J, Palacios R, Panzani R. Importance of tropomyosin in the allergy to household arthropods. Cross-reactivity with other invertebrate extracts. *Allergol et Immunopathol* 1997; 25:118-26.
61. Sales VS, Rodrigues CE, Trombone APF, Lima RC, Santos ABR, Oliver C, et al. Infection with *Ascaris lumbricoides* in pre-school children: role in wheezing and IgE responses to inhaled allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:S27 [abstract].
62. Trombone AP, Tobias KRC, Ferriani VPL, Schuurman J, Aalberse RC, Smith AM, et al. Use of chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1-6.
63. Patterson ML, Slater JE. Characterization and comparison of commercially available German and American cockroach allergen extracts. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:721-7.
64. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:409-18.
65. Satinover SM, Reefer AJ, Pomes A, Chapman MD, Platts-Mills TAE, Woodfolk JA. Specific IgE and IgG antibody-binding patterns to recombinant cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:803-9.
66. Westritschnig K, Sibanda E, Thomas W, Auer H, Aspöck H, Pittner G, et al. Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:22-7.
67. Kang B, Johnson J, Morgan C, Chang JL. The role of immunotherapy in cockroach asthma. *J Asthma* 1988; 25:205-18.
68. Freeman TM. Clinical practice. Hypersensitivity to hymenoptera stings. *N Engl J Med* 2004; 351:1978-84.
69. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Hamilton RG, Lichtenstein LM. Outcomes of allergy to insect stings in children, with and without venom immunotherapy. *N Engl J Med* 2004; 351:668-74.
70. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81:401-5.
71. Casale T. Status of immunotherapy: Current and future. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1036-39.
72. Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:157-164.
73. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-34.
74. Norman PS. Immunotherapy: 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1013-23.
75. Trivedi B, Valerio C, Slater JE. Endotoxin content of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:777-83.
76. Arruda LK. Asthma and parasites: New insights. *Curr Allergy and Asthma Rep* 2003; 3:273-4.

*Suporte financeiro:* FAPESP e Instituto de Investigação em Imunologia iii – CNPq.

*Correspondência:*  
 Prof. Dra. L. Karla Arruda  
 Departamento de Clínica Médica  
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP  
 Av. Bandeirantes 3900  
 14049-900 - Ribeirão Preto - SP  
 Fone: 0XX-16-3602.2902  
 Fax: 0XX-16-3633.6695  
 E-mail: karla@fmrp.usp.br