



Diagnóstico molecular de alergia: pronto para a prática clínica?

Molecular diagnosis of allergy: ready for clinical practice?

L. Karla Arruda, MD, PhD¹; Adriana S. Moreno, PhD¹; Fátima Ferreira, PhD²

O diagnóstico molecular de alergia vem se tornando cada vez mais bem estabelecido na prática de Alergia. Entretanto, muitos dos alergistas em sua prática clínica ainda têm dificuldades em definir a utilidade desta nova ferramenta no diagnóstico de alergia e em determinar as indicações deste método ao invés de, ou como complemento de métodos diagnósticos tradicionais como o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata e a dosagem sérica de anticorpos IgE contra extratos naturais. Além disso, a interpretação dos resultados pode ser um desafio para alguns. O diagnóstico molecular se baseia na utilização de alérgenos purificados, que podem ser *naturais*, quando são purificados por métodos bioquímicos e/ou imunoquímicos a partir de sua fonte alergênica natural (ex. ácaros, fungos, animais, venenos de insetos, etc.) ou *recombinantes*, quando são produzidos no laboratório por tecnologia de clonagem molecular, utilizando-se vários sistemas de expressão recombinante como bactéria (ex. *Escherichia coli*) ou levedura (ex. *Pichia pastoris*).

A possibilidade de produção de alérgenos recombinantes em larga escala e em alto grau de pureza tem facilitado de forma marcante o desenvolvimento de novos métodos para diagnóstico de alergia. Para muitos alérgenos, a purificação a partir da fonte natural requer grande quantidade de matéria prima, e resulta em pequenas quantidades do produto final após as várias etapas de purificação. Atualmente, a maior parte dos alérgenos principais, e mesmo muitos dos alérgenos menores das mais variadas fontes podem ser purificados de suas fontes naturais ou, mais frequentemente, produzidos como proteínas recombinantes, de acordo com métodos bem consolidados, de forma a possibilitar a utilização desses alérgenos comercialmente em testes diagnósticos. Portanto, estamos atualmente dando passos importantes na direção da incorporação da Alergia Molecular em nossa prática clínica¹.

Apenas 2% das proteínas identificadas na natureza que foram sequenciadas tem propriedade de atuar como alérgenos, ou seja, induzem a produção de anticorpos IgE e causam ativação de células, particularmente mastócitos e basófilos. De forma interessante, esses alérgenos pertencem a um número pequeno de famílias e possuem uma quantidade limitada de funções biológicas². Esse conhecimento é importante para a avaliação de reatividade cruzada, para o estudo das propriedades bioquímicas, particularmente estabilidade à temperatura e à digestão em meio ácido, que são importantes na alergia alimentar, e para definir o potencial de certas famílias de proteínas em causar reações alérgicas graves, particularmente anafilaxia.

¹ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

² University of Salzburg, Austria.

Correspondência para:
Luisa Karla Arruda
E-mail: karla@fmrp.usp.br

A nomenclatura de alérgenos é bem estabelecida, e se baseia na utilização das três primeiras letras do gênero, a primeira letra da espécie, e um número expressado em algarismo arábico, que em geral reflete a ordem em que o alérgeno foi identificado. Por exemplo, alérgenos do leite de vaca são designados a partir do nome científico da vaca em latim, *Bos domesticus*, e incluem Bos d 4 (α -lactalbumina), Bos d 5 (β -lactoglobulina), Bos d 6 (albumina sérica) e Bos d 8 (caseína); alérgenos de amendoim são nomeados a partir de *Arachis hypogea*, e o painel atual compõe-se de: Ara h 1 (7S globulina, vicilina); Ara h 2 (2S albumina); Ara h 3 (11S globulina, legumina); Ara h 4 (11S globulina, legumina); Ara h 5 (profilina); Ara h 6 (2S albumina); Ara h 7 (2S albumina); Ara h 8 (PR10, homólogo de Bet v 1); Ara h 9 (nsLTP); e Ara h 10 (18 KDa Oleosina). Originalmente, alérgenos eram designados por números consecutivos. Nas últimas décadas, o aumento no número de sequências disponíveis e os avanços na bioinformática tornaram possível a classificação em famílias de alérgenos, cujos membros são relacionados evolutivamente, com sequências e estruturas semelhantes, e em alguns casos, apresentando reatividade cruzada. Além disso, há uma nomenclatura para moléculas semelhantes e muito próximas de um mesmo alérgeno, com designação de 4 números adicionais após um ponto colocado ao final da designação básica do alérgeno (p. ex., Bet v 1.0101). Os dois primeiros números correspondem a isoalérgenos, definidos como alérgenos de uma única espécie, com massa molecular semelhante, função bioquímica semelhante, e identidade de sequência > 67%. O terceiro e o quarto dígitos distinguem variantes diferentes de um mesmo isoalérgeno, que são definidas como proteínas com identidade de sequência maior que 90%. Os valores de 67% e 90% são limites arbitrários, que servem como guia. A designação apropriada de cada alérgeno é feita considerando-se uma avaliação caso a caso. O Subcomitê de Nomenclatura de Alérgenos da *International Union of Immunological Societies* (IUIS), sob os auspícios da *World Health Organization* (WHO) e da própria IUIS, mantém a nomenclatura sistemática das proteínas alergênicas. Todos os novos alérgenos identificados são submetidos a este Comitê, e após cuidadosa avaliação e aprovação, novos alérgenos são então incorporados à base de dados da IUIS, disponível em www.allergen.org³.

Em recente Consenso, grupo de experts da *World Allergy Organization* (WAO) revisou estudos com base em evidência sobre a utilização do diagnóstico molecular de alergia, e destaca três aspectos principais para auxiliar na decisão de usar esta tecnologia para diagnóstico: (1) possibilidade de distinguir entre sensibilização primária, genuína, e sensibilização por reatividade cruzada (o que não pode ser feito com extratos naturais), ajudando

o clínico a decidir se um alérgeno, poucos alérgenos relacionados ou múltiplos alérgenos extensamente diferentes devem ser considerados; (2) determinar se as reações alérgicas são causadas por alérgenos associados a risco de anafilaxia grave ou a reações mais leves, particularmente na área de alergia alimentar, podendo diminuir a necessidade de testes de provocação oral e melhorar as recomendações para os pacientes; (3) auxiliar na escolha dos pacientes e dos alérgenos mais apropriados para imunoterapia bem sucedida. O Consenso indica que a quantidade de informações obtidas com o diagnóstico molecular de alergia pode ser complexa, especialmente pela progressão rápida de evidência nesta área, e enfatiza a importância de programas educativos de treinamento de alergistas no uso e interpretação desta nova tecnologia, devendo ser os resultados interpretados sempre à luz da história clínica do paciente¹.

O diagnóstico molecular de alergia pode ser realizado pela medida de anticorpos IgE a alérgenos individuais, tecnologia denominada de *singleplex*, ou através de plataforma desenvolvida para medida simultânea de IgE para painel de alérgenos purificados, naturais ou recombinantes, de variadas fontes alergênicas, em um único ensaio, tecnologia designada como *multiplex*¹. No Brasil, dispomos comercialmente dos sistemas ImmunoCAP e ImmunoCAP-ISAC (*Immuno-Solid Phase Allergen Chip*) (Thermo Fisher), que são plataformas *singleplex* e *multiplex*, respectivamente. O ImmunoCAP é um método totalmente automatizado, que baseia-se no uso de fase sólida com alta capacidade de ligação ao alérgeno, na qual é colocada quantidade de alérgeno em excesso, tornando-se um método de alta sensibilidade, reprodutível, cujo uso permite que quantidades bem pequenas de IgE possam ser detectadas, com mínima ou nenhuma interferência de anticorpos específicos de outros isotipos, particularmente IgG. Como é um método quantitativo, pode ser utilizado para monitorização da resposta IgE ao longo do tempo. O sistema ImmunoCAP atualmente disponibiliza 101 alérgenos individuais (36 alimentares), incluindo CCDs (*Cross-reactive Carbohydrate Determinants*, determinantes carboidratos com reatividades cruzadas), para medida de IgE específica. Entretanto, apresenta a desvantagem de serem necessários 40 microlitros de soro para cada teste individual, o que pode limitar a seleção de alérgenos a serem testados, particularmente em crianças pequenas. O ISAC é uma plataforma de imunoensaio miniaturizada, onde alérgenos são imobilizados em um *chip* de *microarray*. O ensaio consiste em uma lâmina de vidro coberta com polímero, que contém 4 *microarrays*, sendo portanto adequada para testar simultaneamente amostras de 4 pacientes. São feitos *spots* em triplicata de cada alérgeno, e estes são imobilizados por ligação covalente ao

chip. A plataforma atual do ISAC possibilita detecção simultânea de anticorpos IgE a 112 alérgenos diferentes, das mais variadas fontes, utilizando apenas 30 a 40 microlitros de soro ou plasma, que podem ser obtidos de sangue venoso ou capilar. O teste é realizado num total de tempo de menos de 4 horas; os resultados são obtidos a partir de uma curva de calibração e expressos numa faixa de 0,3 a 100 *ISAC Standardized Units* (ISU-E), dando uma indicação semiquantitativa dos níveis de anticorpos IgE. A plataforma ISAC utiliza uma quantidade pelo menos 100.000 vezes menor de alérgeno, quando comparada ao sistema ImmunoCAP, o que diminui sua sensibilidade quando a quantidade de IgE específica é muito baixa, podendo também haver interferência de outros isotipos, particularmente quando há níveis muito elevados de IgG específica, como acontece durante a imunoterapia. Por outro lado, uma vantagem é que o método não sofre interferência de níveis muito elevados de IgE total. Foi notada maior variabilidade inter-ensaio quando as quantidades de IgE são baixas, entre 0,3 e 1 ISU-E, portanto o ISAC não é geralmente recomendado para monitorização quantitativa de níveis de anticorpos IgE ao longo do tempo¹. Mais recentemente, Lupinek e cols.⁴ relataram a expansão do método de *microarray* para conter mais de 170 moléculas das mais variadas fontes. Esta tecnologia, que tem sido utilizada para avaliar o perfil de reatividade IgE ao longo do tempo em estudos de coorte desenvolvidos na Europa, é designada como *chip* MeDALL de alérgenos⁴.

O potencial do diagnóstico molecular de alergia tem especial valor na avaliação de pacientes com alergia alimentar, em particular alergia a frutas e legumes, incluindo avaliação das síndromes pólen-alimento e látex-alimento. Algumas famílias de alérgenos de plantas foram identificadas como tendo alto potencial de induzir anafilaxia⁵. São elas: a superfamília das prolaminas, que inclui as proteínas de transferência de lipídeos não-específicas (nsLTPs), alfa-amilase e inibidores de proteases; as proteínas de estocagem, como a 2S albumina; e a família cupins de proteínas, que inclui proteínas de estocagem de sementes como as vicilinas e leguminas. Em contraste, proteínas PR-10, que são homólogas ao alérgeno principal de pólen de Bétula Bet v 1 e importantes componentes associados a reatividade cruzada a extratos alergênicos, em geral causam reações alérgicas locais à ingestão, como a síndrome da alergia oral. De forma semelhante, profilinas (por exemplo, Bet v 2), e CCDs estão presentes em muitas plantas, e interferem com a especificidade da determinação de anticorpos IgE contra extratos alergênicos. Proteínas PR-10 e profilinas são em geral lábeis e facilmente degradáveis por calor ou acidez, e acredita-se que pelo menos em parte esta seja a razão da associação com sintomas alérgicos mais leves. A

sensibilização a CCDs na maioria dos casos não tem relevância clínica. Para proteínas PR-10, profilinas e CCDs, a sensibilização primária é em geral derivada de polens ou venenos de insetos, e raramente de alimentos. Por outro lado, LTPs e proteínas de estocagem são proteínas estáveis ao calor e à digestão, e portanto têm elevado potencial para causar reações anafiláticas graves. Acredita-se que essas proteínas são indutoras da sensibilização primária através do alimento, responsável pelas reações graves. Desta forma, a análise do perfil de reatividade IgE para as diferentes famílias de alérgenos de plantas pode auxiliar na definição de riscos, o que os métodos tradicionais não permitem realizar⁵.

Um exemplo excelente da utilidade do diagnóstico molecular de alergia é o uso da ômega-5-gliadina, que pertence à família das prolaminas, para o diagnóstico de Anafilaxia Induzida por Exercício Dependente de Trigo⁵. Em extrato natural de trigo, a quantidade de ômega-5-gliadina é muito pequena, e desta forma, os testes convencionais para medir anticorpos IgE para trigo podem ser negativos ou resultar em valores muito baixos nesta condição. A medida de IgE para ômega-5-gliadina (alérgeno Tri a 19) é essencial para o diagnóstico, pois a presença de IgE específica para esta proteína tem alto valor preditivo para o desenvolvimento de Anafilaxia Induzida por Exercício Dependente de Trigo. Estudos recentes de Santos e cols.^{6,7}, do grupo do Prof. Fabio Castro, em colaboração com o grupo da Prof^a. Fatima Ferreira em Salzburg, Áustria, relataram a identificação do primeiro alérgeno de mandioca (*Manihot esculenta*), designado como Man e 5. Este alérgeno causa resposta IgE em mais de 70% de pacientes brasileiros com reações alérgicas à ingestão de mandioca, e tem reatividade cruzada com o alérgeno de látex Hev b 5. De forma interessante, os dados com Man e 5 recombinante, produzida em *E. coli*, sugerem que esta proteína tem papel na síndrome látex-alimento, sendo o látex provavelmente o sensibilizante primário⁷. Este conhecimento tem implicações importantes, pois pacientes alérgicos a látex que apresentam exposição à mandioca (por exemplo, viajantes que vão a locais onde mandioca é extensamente usada) podem ter risco aumentado de desenvolver reações alérgicas a este alimento. Portanto, conhecer se o paciente é alérgico a Hev b 5 pode melhorar as recomendações de evitar mandioca, que pode também ser ingrediente frequente em alimentos industrializados⁷. Nos casos de alergia a amendoim, a presença de sensibilização IgE a proteínas de estocagem como Ara h 1 (vicilina), Ara h 2 (2S albumina), Ara h 3 (legumina), Ara h 6 (2S albumina) e Ara h 9 (nsLTP) pode identificar pacientes com risco de reações alérgicas graves, enquanto que sensibilização a Ara h 8 (proteína PR-10, homóloga à Bet v 1), na maioria dos casos adquirida por reatividade

cruzada, está associada a reações leves como síndrome da alergia oral. Quando nenhuma IgE é detectável para os alérgenos recombinantes de amendoim, mas o paciente apresenta IgE para o extrato de amendoim total, a possibilidade de reatividade IgE para CCDs deve ser considerada. IgE anti-CCD pode ser medida usando *horseradish peroxidase* ou bromelaina (Ana c 2 ou MUXF3), que são ricos em CCDs, e disponíveis tanto no sistema ImmunoCAP (MUXF3 CCD, bromelaina, código o214) como na plataforma ISAC (nMUXF3 CCD, bromelaina). A conclusão dessas observações é que para muitos pacientes sensibilizados a componentes de plantas o diagnóstico molecular de alergia possibilita a identificação de perfis de sensibilização individuais, que poderão auxiliar em prever o risco de anafilaxia⁵.

Na área de alergia a ácaros, importante fonte de alérgenos em nosso meio, avanços recentes utilizando-se métodos quantitativos de diagnóstico molecular de alergia têm consolidado observações de que as respostas a *D. pteronyssinus* na maioria dos indivíduos alérgicos seguem uma hierarquia. A ligação IgE aos alérgenos principais de *D. pteronyssinus* Der p 1 e Der p 2 constitui 50-60% da ligação IgE a todos os alérgenos deste ácaro da poeira domiciliar, para essencialmente todos os pacientes alérgicos a ácaros⁸. Além disso, em nosso meio e em muitos outros locais do mundo, mais de 80% dos pacientes alérgicos a ácaros têm anticorpos IgE para Der p 1 e Der p 2. Os alérgenos de reatividade intermediária Der p 4, 5, 7 e 21, induzindo cada um deles resposta IgE em aproximadamente 50% dos pacientes, ligam-se a IgE constituindo 30% do título total de ligação em relação a todos os alérgenos em conjunto. Apenas uma pequena frequência e proporção de ligação IgE permanece para os alérgenos remanescentes⁸. Este padrão proporcional consistente de reatividade IgE provê excelente plataforma para seleção de alérgenos recombinantes para imunoterapia. É possível que uma formulação contendo apenas Der p 1 e Der p 2 seja eficaz para a grande maioria dos pacientes. De forma interessante, o padrão de ligação a IgE dos alérgenos de ácaro foi o mesmo em crianças com asma atendidas em Pronto-Socorro com crise aguda, quando comparado ao perfil de crianças e adultos com asma controlada, e em indivíduos com doença persistente quando comparados a pacientes com asma intermitente. Foi também demonstrado que a probabilidade de crianças com alergia a ácaros da poeira domiciliar desenvolverem asma é proporcional aos títulos de IgE antiácaro, e que um prognóstico pobre está associado ao desenvolvimento precoce de anticorpos IgE e sensibilização precoce⁸.

O estudo da reatividade cruzada IgE é uma área em que tem havido grandes avanços. Entende-se por reatividade cruzada o fenômeno de um anticorpo IgE reconhecer, ligar-se e induzir um resposta imune

a moléculas alergênicas semelhantes (homólogas) presentes em espécies diferentes. Por exemplo, a ligação de um anticorpo IgE tanto ao alérgeno Bet v 1 de pólen de bétula, como aos alérgenos Mal d 1 de maçã, e Cor a 1 de avelã ocorre devido à semelhança estrutural entre essas proteínas, tanto em termos de sequência primária de aminoácidos (55% a 67% de identidade com Bet v 1, respectivamente) como de estrutura tridimensional. Estudo recente de Roulias e cols.⁹, do grupo da Prof^a. Fátima Ferreira, demonstrou que moléculas derivadas de Mal d 1 e Cor a 1, desenvolvidas por *site-directed mutagenesis* com o objetivo de alterar a estrutura tridimensional destas moléculas, apresentaram ligação a IgE marcadamente reduzida, podendo ser consideradas como moléculas candidatas para imunoterapia tanto em pacientes com alergia a pólen de bétula como em pacientes com alergia alimentar¹⁰. É importante destacar que, no caso da síndrome pólen-alimento, essa resposta IgE adquirida por reatividade cruzada se manifesta clinicamente por reações locais leves, como prurido e edema de mucosa oral, e apenas em raras ocasiões como urticária ou mesmo anafilaxia⁹.

Muitas outras proteínas alergênicas apresentam homólogos em espécies diversas. Nesse grupo, podem ser incluídas a tropomiosina e a parvalbumina. A tropomiosina é alérgeno principal do camarão, podendo causar reações alérgicas graves à ingestão deste alimento, que apresenta homólogos com alto grau de identidade de sequência (80 a 82%) em ácaros (alérgeno Der p 10) e baratas (alérgenos Bla g 7 e Per a 7)¹¹⁻¹³. De forma semelhante, a parvalbumina é um alérgeno conservado em várias espécies de peixes, associado à presença de reatividade cruzada IgE e sintomas clínicos com ingestão de vários peixes, dependentes da quantidade de parvalbumina presente. É importante destacar que a tropomiosina e a parvalbumina são proteínas muito estáveis, sendo resistentes à temperatura e à digestão em meio ácido. Alérgenos de animais, incluindo cachorro, gato, cavalo, boi, rato, camundongo e outros são frequentemente pertencentes à família das lipocaínas, que apresenta homólogo em barata (Bla g 4 e Per a 4) (Tabela 1). Questão importante e ainda não completamente resolvida é a relevância clínica da reatividade cruzada IgE. Por exemplo, não é incomum na prática clínica que pacientes com asma e/ou rinite, com testes cutâneos positivos para extratos de ácaros e baratas, apresentem teste positivo também para camarão; curiosamente, alguns desses pacientes relatam que nunca comeram camarão ou outros crustáceos ou moluscos. Pode-se interpretar que o teste positivo para camarão seria causado por reatividade cruzada a ácaros e baratas, possivelmente a alérgenos compartilhados, como a tropomiosina. Entretanto, não se sabe se estes pacientes com sensibilização primária a ácaros e baratas teriam

Tabela 1 - Reatividade cruzada entre as famílias de componentes alergênicos mais comuns*

<p>Proteínas de armazenamento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alérgenos encontrados em nozes e sementes (p. ex.: Ara h 2, de amendoim) • Estáveis ao calor e à digestão, com frequência causam reações à ingestão do alimento cru ou cozido • Muitas vezes associadas a reações sistêmicas e quadros clínicos mais graves, além da síndrome da alergia oral • Em geral há baixo grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família
<p>nsLTPs (Non-specific Lipid Transfer Proteins) - Proteínas de Transferência Lipídica não específicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alérgenos encontrados em frutas, legumes, nozes e pólen (p. ex.: Pru p 3, de pêssego) • Estáveis ao calor e à digestão, com frequência causam reações à ingestão do alimento cru ou cozido • Muitas vezes associada a reações sistêmicas e quadros clínicos mais graves, além da síndrome da alergia oral • O grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família varia
<p>Proteína PR-10 (Pathogenesis Related Protein 10), homóloga de Bet v 1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Componente alergênico encontrado em polens, frutas, legumes e nozes (p. ex.: Bet v 1) • PR-10s são sensíveis ao calor e à digestão, e o alimento cozido é muitas vezes tolerado • Frequentemente associada a sintomas locais, como a síndrome da alergia oral • O grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família varia
<p>Polcalcinas (proteínas de ligação de cálcio)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alérgenos encontrados em arbustos, árvores, e polens de gramíneas (não em alimentos), (p. ex.: Bet v 4) • Alto grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família
<p>Profilinas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alérgenos encontrados em alimentos de origem vegetal, látex, grama, arbustos, e polens de árvores (p. ex.: Phl p 12) • Proteínas sensíveis ao calor e à digestão, e o alimento cozido é muitas vezes tolerado • Raramente associadas a sintomas clínicos, mas podem causar reações locais e até mesmo graves em alguns pacientes • Alto grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família
<p>CCD (Determinantes Carboidratos com Reatividade Cruzada)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cadeias de carboidratos encontradas em polens, alimentos vegetais, insetos e venenos (p. ex.: MUXF3) • Raramente provoca reações alérgicas, mas pode produzir resultados positivos em testes <i>in vitro</i> aos alérgenos contendo CCD • Elevado grau de reatividade cruzada
<p>Tropomiosina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estável ao calor e à digestão, podendo causar reações à ingestão do alimento cozido • Como alérgeno alimentar, algumas vezes está associada a reações sistêmicas e quadros clínicos mais graves, além de síndrome da alergia oral • Alto grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família
<p>Lipocalina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alérgeno encontrado em animais de pelo como cachorro, gato, cavalo, boi, rato, camundongo (p. ex.: Can f 1, Can f 2, Fel d 4) • O grau de reatividade cruzada entre as espécies desta família varia
<p>Parvalbumina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alérgeno encontrado em peixes e anfíbios (p. ex.: Gad c 1) • Estável ao calor e à digestão, pode causar reações à ingestão do alimento cozido • Muitas vezes associada a reações sistêmicas e quadros clínicos mais graves, além da síndrome da alergia oral • Alto grau de reatividade cruzada
<p>Albumina sérica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Componente alergênico encontrado em animais (p. ex.: leite de vaca, sangue, carne bovina e epitélios) (p. ex.: Fel d 2) • Bastante sensível ao calor e à digestão • Reatividade clínica é rara (p. ex.: síndrome gato-porco) • Alto grau de reatividade cruzada sorológica entre as espécies desta família, entretanto a relevância clínica é desconhecida

* Adaptada de Canonica et al.¹

risco maior de apresentar reações alérgicas à ingestão de camarão, e se uma resposta IgE para tropomiosina teria um valor preditivo para reações mais graves. Em pacientes com testes de provocação oral positivos para camarão, Yang e cols. demonstraram que a medida de IgE para tropomiosina de camarão teve maior especificidade do que a medida de IgE para camarão¹⁴.

Uma área de particular interesse em nosso meio é o estudo da resposta IgE a alérgenos que apresentam homólogos em parasitas. Sabe-se que parasitas intestinais, particularmente helmintos, induzem resposta IgE e eosinofilia. Este tipo de resposta se assemelha bastante ao padrão de resposta Th2 encontrado em doenças alérgicas. Nos últimos anos, tem sido bem documentado que parasitas têm moléculas homólogas em famílias de alérgenos, incluindo lipocalinas, proteínas EF-hand, superfamília cupin, profilinas, enolase (fungos e látex), albumina (gato), tripsina (alérgenos de ácaros do grupo 3), paramiosina (*Blomia tropicalis* Blo t 11) e tropomiosinas, com extensa semelhança entre essas moléculas¹⁵. Santos e cols.¹⁶ demonstraram que tropomiosina do parasita *Ascaris lumbricoides* compartilha alto grau de identidade de sequência (em torno de 70%) com tropomiosinas de outros invertebrados como ácaros, baratas e camarão. Tropomiosina de *A. lumbricoides* é abundante tanto no verme adulto como na larva L3, que é o estágio de passagem pulmonar do parasita. A identidade de sequência é ainda maior com tropomiosinas de outros parasitas como filaria e *Anisakis simplex* (alérgeno Ani s 3, com 97% de identidade de sequência com tropomiosina de *A. lumbricoides*). Há descrição de reações alérgicas graves incluindo anafilaxia com ingestão de peixe infectado com *A. simplex*, que tem sido atribuídas à presença de IgE para tropomiosina. Pode-se detectar anticorpos IgE antitropomiosina de *A. simplex* Ani s 3, e anti Ani s 1 na plataforma ISAC. Estudos recentes de Santiago e cols.¹⁷ revelaram evidência de reatividade cruzada IgE entre tropomiosina de filaria e de ácaro *Dermatophagides pteronyssinus* (alérgeno Der p 10)¹⁶. De forma semelhante, Santiago e cols.¹⁸ também demonstraram que a glutatona-S-transferase (GST) de filaria e de barata *Blattella germanica* (alérgeno Bla g 5) têm epitópos comuns que podem induzir sensibilização alérgica cruzada. Mais recentemente, Acevedo e cols.¹⁹, do grupo do Dr. Luis Caraballo, na Colômbia, em colaboração com o grupo da Prof^a. Fátima Ferreira, identificaram GST de *Ascaris lumbricoides* com suas isoformas e demonstraram que este novo alérgeno de *A. lumbricoides* apresenta ligação à IgE de pacientes asmáticos. *A. lumbricoides* GST1 apresenta similaridade de sequência de aminoácidos de 50% com GST de barata (Bla g 5), 43% com o alérgeno Blo t 8 de *Blomia tropicalis* e 48% com o alérgeno de *D. pteronyssinus* Der p 8, e uma boa correlação foi encontrada entre IgE

para GST de *A. lumbricoides* e GSTs Bla g 5 e Blo t 8¹⁹. Muitos investigadores acreditam que a resposta IgE a alérgenos evoluiu de resposta inicial de defesa contra parasitas, e a teoria é que após os parasitas terem sido erradicados ou se tornado muito infrequentes em países desenvolvidos, o sistema imune redirecionou a resposta IgE a antígenos ambientais inócuos, particularmente a moléculas compartilhadas¹⁵. Entretanto, em muitas regiões do mundo, incluindo o Brasil, infecções por parasitas ainda são muito prevalentes. Estima-se que atualmente parasitas infectem 1,4 bilhões de indivíduos no mundo inteiro, correspondendo a cerca de um terço da população mundial. É possível que a resposta policlonal IgE induzida durante infecções ativas por parasitas possa potencialmente levar a respostas de reatividade cruzada IgE dirigida para alérgenos inalantes e alimentares, que poderão ter significância clínica, no sentido de promover o desenvolvimento de alergia. Entretanto, a questão se infecções por parasitas promovem ou protegem do desenvolvimento de alergia e asma permanece controversa²⁰.

Neste número do BJA, nosso grupo faz uma revisão de estudos recentes que avaliaram o uso de alérgenos recombinantes para diagnóstico e para imunoterapia alérgeno-específica (Arruda e cols.²¹). Os resultados são promissores, e acredita-se que alérgenos recombinantes vão ser cada vez mais incorporados à prática clínica do alergista. O estudo de Dal Belo e cols.²² revela elevada frequência de rinite em adultos jovens vivendo em Passo Fundo, na região Sul do Brasil. Dentre os pacientes com rinite, houve frequência elevada de sensibilização a ácaros e polens, destacando a importância desses alérgenos no Sul do Brasil. Em outro artigo deste número do BJA, Laura Araújo e Nelson Rosário²³ fazem uma avaliação de diagnóstico molecular de alergia por ISAC, focalizando em alérgenos alimentares, entre crianças e adolescentes com rinite alérgica e asma, sem história de alergia alimentar. De forma interessante, os autores relatam detecção de IgE específica para alérgenos alimentares em aproximadamente 26% dos pacientes, sendo os alérgenos mais frequentemente reconhecidos a tropomiosina de camarão e o alérgeno de pêssego (Pru p 3). Provavelmente, a presença de anticorpos IgE para tropomiosina de camarão ocorreu por reatividade cruzada IgE a tropomiosinas de ácaro (alérgeno Der p 10) e/ou baratas (alérgenos Per a 7 e Bla g 7). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a reatividade a Der p 10 entre esses pacientes foi de 15,8%, enquanto que a reatividade a tropomiosinas de camarão foi muito semelhante, de 15,8% a 16,8%. Já o alérgeno Pru p 3, derivado do pêssego, é uma proteína LTP (*lipid transfer protein*) e considerada como um marcador de gravidade para reações alérgicas alimentares. É possível que neste caso a sensibilização primária tenha sido induzida por alérgeno homólogo

em pólen²³. Portanto, a possibilidade de identificar sensibilização a moléculas compartilhadas por diferentes fontes alergênicas por diagnóstico molecular de alergia tem resultado em uma compreensão crescente de sintomas clínicos complexos e polisensibilização. Ainda neste número do BJA, Mario Geller²⁴ faz um relato muito interessante de uma paciente com anafilaxia induzida por exercício dependente de alimento. Embora tenha ficado muito evidente pela história clínica que o alimento envolvido foi o camarão, a dosagem de IgE específica para camarão foi negativa, e não havia reatividade cruzada clinicamente evidente com outros crustáceos. É pouco provável que haja sensibilidade à tropomiosina nesta paciente descrita, entretanto uma possibilidade seria de haver uma resposta IgE a outros alérgenos de camarão, como Arginina-quinase (AK, alérgeno Pen m 2), Proteína de ligação ao Cálcio Sarcoplasmática (SCP, alérgeno Pen m 4) e Cadeia Leve da Miosina (MLC)²⁵. Os alérgenos de camarão tropomiosina (Pen m 1), Arginina-quinase (Pen m 2) e Proteína de ligação ao Cálcio Sarcoplasmática (Pen m 4) estão disponíveis na nova versão da plataforma ISAC com 112 alérgenos. Seria esta uma situação homóloga à Anafilaxia Induzida por Exercício Dependente de Trigo e alérgeno Tri a 19?

Em conclusão, ainda temos muito a investigar sobre diagnóstico molecular de alergia. Os dados obtidos com esta tecnologia podem ajudar muito, entretanto podem ainda não ser definitivos em determinar prognóstico, riscos e formas ideais de tratamento. É possível que a análise de epitopos possa resultar em maior precisão diagnóstica que almejamos²⁶.

REFERÊNCIAS

1. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J.* 2013; 6:17 <http://www.waojournal.org/content/6/1/17>
2. Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(4):847-52.
3. Radauer C, Nandy A, Ferreira F, Goodman RE, Larsen JN, Lidholm J, et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy* 2014; doi: 10.1111/all.12348.
4. Lupinek C, Wollmann E, Baar A, Banerjee S, Breiteneder H, Broecker BM, et al. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MeDALL allergen-chip. *Methods.* 2013; pii: S1046-2023(13)00404-0. doi: 10.1016/j.jymeth.2013.10.008.
5. Wölbing F, Biedermann T. Anaphylaxis: opportunities of stratified medicine for diagnosis and risk assessment. *Allergy.* 2013;68:1499-508.
6. Santos KS, Galvao CE, Gadermaier G, Resende VM, de Oliveira Martins C, Misumi DS, et al. Allergic reactions to manioc (*Manihot esculenta* Crantz): identification of novel allergens with potential involvement in latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1367-9.
7. Santos KS, Gadermaier G, Vejvar E, Arcuri HA, Galvão CE, Yang AC, et al. Novel allergens from ancient foods: Man e 5 from manioc (*Manihot esculenta* Crantz) cross reacts with Hev b 5 from latex. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(6):1100-9. doi: 10.1002/mnfr.201200433.
8. Vrtala S, Huber H, Thomas WR. Recombinant house dust mite allergens. *Methods.* 2013. pii: S1046-2023(13)00283-1. doi: 10.1016/j.jymeth.2013.07.034
9. Roulias A, Pichler U, Hauser M, Himly M, Hofer H, Lackner P, et al. Differences in the intrinsic immunogenicity and allergenicity of Bet v 1 and related food allergens revealed by site-directed mutagenesis. *Allergy.* 2014;69(2):208-15. doi: 10.1111/all.12306.
10. Wallner M, Pichler U & Ferreira F. Recombinant allergens for pollen immunotherapy. *Immunotherapy.* 2013;5(12):1323-38, doi:10.2217/imt.13.114
11. 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 (2 Pt 1):329-37.
12. Arruda LK. The right timing for shrimp tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160(4):331-3.
13. Pomés A, Arruda LK. Investigating cockroach allergens: aiming to improve diagnosis and treatment of cockroach allergic patients. *Methods.* 2013; pii: S1046-2023(13)00285-5. doi: 10.1016/j.jymeth.2013.07.036.
14. Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MC, Chapman MD, Galvão CE, et al. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(4):872-8.
15. Bielory BP, Mainardi T, Rottem M. Evolutionary immune response to conserved domains in parasites and aeroallergens. *Allergy Asthma Proc.* 2013;34(1):93-102.
16. Santos AB, Rocha GM, Oliver C, Ferriani VP, Lima RC, Palma MS, et al. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(4):1040-6.
17. Santiago HC, Bennuru S, Boyd A, Eberhard M, Nutman TB. Structural and immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: implications for the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(2):479-86.
18. Santiago HC, LeeVan E, Bennuru S, Ribeiro-Gomes F, Mueller E, Wilson M, et al. Molecular mimicry between cockroach and helminth glutathione S-transferases promotes cross-reactivity and cross-sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(1):248-56.
19. Acevedo N, Mohr J, Zakzuk J, Samonig M, Briza P, Erler A, et al. Proteomic and immunochemical characterization of glutathione transferase as a new allergen of the nematode *Ascaris lumbricoides*. *PLoS One.* 2013;8(11):e78353. doi: 10.1371/journal.pone.0078353.
20. Amoah AS, Boakye DA, Van Ree R, Yazdanbakhsh M. Parasitic worms and allergies in childhood: insights from population studies 2008–2013. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013; doi: 10.1111/pai.12174
21. Arruda LK, Barbosa MC, Bardini G, Yang AC, Genov IR, Moreno AS. Alérgenos recombinantes: papel no diagnóstico e na imunoterapia alérgeno-específica. *Braz J Allergy Immunol.* 2013;1(4):211-8.
22. Dal Bello MS, Schneider ML, Doring M, Gomes LM, Mistura TC. Sensibilização a aeroalérgenos em adultos jovens vivendo na região sul do Brasil. *Braz J Allergy Immunol.* 2013;1(4):223-8.
23. Araujo LM, Rosário Filho NA. Determinação de IgE a alérgenos alimentares por microarray (ImmunoCAP-ISAC) em pacientes com rinite alérgica. *Braz J Allergy Immunol.* 2013;1(4):219-22.
24. Geller M. Anafilaxia induzida por exercício com dependência alimentar sem IgE específica. *Braz J Allergy Immunol.* 2013;1(4):236.

25. Ayuso R, Sánchez-García S, Lin J, Fu Z, Ibáñez MD, Carrillo T, et al. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(6):1286-93.
26. Ayuso R, Sánchez-García S, Pascal M, Lin J, Grishina G, Fu Z, et al. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? *Clin Exp Allergy.* 2012;42(2):293-304.