

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARCELA CALEFFI DA COSTA LIMA CANIATTI

Associação entre genes HLA e KIR e sensibilização a ácaros em uma população
brasileira

Maringá
2016

MARCELA CALEFFI DA COSTA LIMA CANIATTI

Associação entre genes HLA e KIR e sensibilização a ácaros em uma população
brasileira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luiza Tamie Tsuneto.

Maringá
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELA CALEFFI DA COSTA LIMA CANIATTI

Associação entre genes HLA e KIR e sensibilização a ácaros em uma população
brasileira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Luiza Tamie Tsuneto
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 16 de dezembro de 2016.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Aos meus pais, Maria Beatriz e Renato, alicerces de amor em minha vida. E ao meu marido, Marcelo, por todas as razões que possam existir.

AGRADECIMENTOS

À professora Luiza, por ter me conduzido durante seis anos de forma primorosa, pela qual eu sinto profundo respeito e admiração. Agradeço a oportunidade conferida a mim e a generosa forma que me ensinou a imunogenética.

Aos meus irmãos, Guilherme e Renato, que representam a extensão do meu amor. A certeza de ter vocês ao meu lado, me faz ir além!

Aos meus familiares, em especial, aos meus avôs, Gabriel e Anna Catarina, pelo zelo e por toda a sabedoria que me transmitem em pequenos e grandes momentos, e aos meus sobrinhos Anna Catarina e Felipe, que por vezes fizeram a minha alma sorrir!

Às minhas queridas amigas Priscila, Carolina, Ivi, Suelen, Fernanda, Ariana e Camila, por caminharem junto comigo, por serem companhias sem começo e sem fim, e por tornarem tudo mais especial.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Imunogenética (LIG-UEM), pela acolhida e por terem contribuído, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

Às professoras Ana Maria Sell e Áurea Regina Telles Pupulin, presentes em minha banca de qualificação, por todas as sugestões e orientações ao trabalho final.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por todo amparo e apoio institucional.

À Fundação Araucária e ao LIG-UEM, pelo apoio financeiro e por tornarem possível esta pesquisa.

Finalmente, a Deus, por ser meu esteio, quem alimenta a minha alma e desperta em mim o melhor que eu posso ser. É o Teu rastro de luz que eu estou seguindo!

“Ainda que a firmeza seja necessária para atingir o fim a que nos propomos em nossas boas obras, é, contudo, necessário empregar muita ternura nos meios.”

(SÃO VICENTE DE PAULO)

Associação entre genes HLA e KIR e sensibilização a ácaros em uma população brasileira

RESUMO

Introdução. A sensibilização aos ácaros afeta entre 15 a 20% da população dos países industrializados e ocorre por influência de diversos fatores genéticos e ambientais. Reações alérgicas são desencadeadas por alérgenos em certos indivíduos pré sensibilizados que possuem anticorpos IgE específicos sobre a superfície dos mastócitos, provocando a liberação de substâncias vasoativas. Genes de resposta imune são um dos candidatos responsáveis à suscetibilidade das atopias. As interações dos isótipos KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), presentes nas células NK (*natural killer*), com certas moléculas HLA (*human leukocyte antigen*) de classe I, são conhecidas por manter a homeostasia. As moléculas HLA são responsáveis pela apresentação dos peptídeos aos linfócitos T e os receptores KIR pela ativação/inibição das células NK, funções que poderiam explicar as associações observadas com certas alergias. **Objetivo.** Realizar um estudo de associação genética, para investigar marcadores de resposta imune em genes HLA de Classe I (-A, -B, and -C), de Classe II (-DRB1) e genes KIR em indivíduos sensíveis a ácaros (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, ou *Blomia tropicalis*) e controles. **Métodos.** O total de 396 participantes foi classificado em sensíveis e não sensíveis a ácaros, após a realização do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata – *Prick Test*TM. A genotipagem dos genes HLA e a verificação da presença/ausência dos genes KIR foram realizadas pelo método PCR-SSO (*polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides*). **Resultados.** Após o teste de heterogeneidade, o loco HLA-DRB1 apresentou diferença significativa entre as frequências dos indivíduos sensíveis e não sensíveis para o alelo *DRB1*04:11* (1,2% vs. 4,4%, $P = 0,0042$, OR = 0,26 e IC95% = 0,09 - 0,70). Para os receptores KIR e seus respectivos ligantes, nenhuma diferença significativa foi observada. **Conclusão.** Nossos resultados sugerem uma possível associação entre os genes HLA-DRB1 à sensibilização aos ácaros.

Palavras-chave: Ácaros; KIR; HLA; associação genética; teste de heterogeneidade; *Dermatophagoides farinae*; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Blomia tropicalis*.

Association between HLA and KIR genes and dust mite sensitization in a Brazilian population

ABSTRACT

Introduction. Sensitization to dust mites affects between 15 to 20% of the population in industrialized countries and is influenced by several genetic and environmental factors. Allergic reactions are triggered by allergens in certain pre-sensitized individuals who have specific IgE antibodies on the surface of the mast cells, causing the release of vasoactive substances. Immune response genes are one of the candidates responsible for the susceptibility of atopic diseases. The interactions of the KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) isotypes, present in NK (natural killer) cells, with certain HLA (human leukocyte antigen) class I molecules are known to maintain homeostasis. HLA molecules are responsible for the presentation of peptides to the T lymphocytes and the KIR receptors controls the activation/inhibition of NK cells, functions that could explain the associations observed with certain allergies. **Objective.** Conduct a genetic association study, to investigate markers of immune response in Class I (-A, -B, and -C) and Class II (-DRB1) HLA genes, and KIR genes in mite-sensitive individuals (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, or *Blomia tropicalis*) and controls. **Methods.** A total of 396 participants were classified as mite-sensitive and mite-insensitive individuals, after the immediate-type hypersensitivity skin test - Prick Test™. Genotyping of HLA (human leukocyte antigen) genes and the presence/absence of KIR genes were performed by PCR-SSO (polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides). **Results.** After the heterogeneity test, the HLA-DRB1 locus presented a significant difference between the frequencies of the sensitive and non-sensitive individuals for the *DRB1*04:11* allele (1.2% vs. 4.4%, $P = 0.0042$, OR = 0.26 and 95% IC = 0.09-0.70). For KIR receptors and their respective ligands, no significant difference was observed. **Conclusion.** Our results suggest a possible association between HLA-DRB1 genes and dust mite sensitization.

Keywords: Mites; KIR; HLA; genetic association; heterogeneity test; *Dermatophagoides farinae*; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Blomia tropicalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1	Esquema representativo da reação de hipersensibilidade do tipo I	21
Figura 2	Mapa genético da região HLA – Figura esquemática mostrando o cromossomo 6, a região HLA e os genes HLA de Classe I e II	26
Figura 3	Representação estrutural da molécula do MHC de Classe I	27
Figura 4	Representação estrutural da molécula do MHC de Classe II	28
Figura 5	Nomenclatura e organização molecular de KIR	30

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1	Classificação da reação de hipersensibilidade tipo I ao alérgeno testado	24
Quadro 2	Especificidade dos receptores KIR e seus ligantes	31

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

ARTIGO 1

Tabela 1	Overview of HLA-DRB1 data associated with sensitization to house dust mites	61
Tabela 2	Allele frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and <i>Blomia tropicalis</i> , and controls	63
Tabela 3	Allele group frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to <i>Dermatophagoides farinae</i> and controls	64
Tabela 4	Allele group frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> and controls	65
Tabela 5	Allele group frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to <i>Blomia tropicalis</i> and controls	66
Tabela 6	Heterogeneity test by chi-square for HLA class I and II	67
Tabela Sup. 1	Allele group frequencies of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and <i>Blomia tropicalis</i> , and controls	68
Tabela Sup. 2	Allele frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and <i>Blomia tropicalis</i> , and controls	72
Tabela Sup. 3	Haplotype frequencies of HLA in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and <i>Blomia tropicalis</i> , and controls	74

ARTIGO 2

Tabela 1	Distribution of <i>KIR</i> genes between individuals sensitized to at least one of the following dust mites <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and/or <i>Blomia tropicalis</i> , and mite-insensitive controls	96
----------	---	----

Tabela 2	Frequencies of KIR genes in the presence of their ligands HLA Class I in individuals sensitized to at least one of the following dust mites <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and/or <i>Blomia tropicalis</i> , and mite-insensitive controls	97
Tabela 3	Frequencies of ligands HLA Class I in individuals sensitized to at least one of the following dust mites <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , and/or <i>Blomia tropicalis</i> , and mite-insensitive controls	98
Tabela 4	Distribution of KIR genes between individuals sensitive (by species) and insensitive	99

LISTA DE ABREVIATURAS

Ig	Imunoglobulinas
IgE	Imunoglobulina de classe E
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
KIR	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
NK	Células <i>Natural Killer</i>
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
LRC	<i>Leukocyte Receptor Complex</i>
ITIMs	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs</i>
ITAMs	<i>Immunoreceptor Tyrosinebased Activating Motifs</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
PCR-SSO	<i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide</i>
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<i>D. farinae</i>	<i>Dermatophagoides farinae</i>
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
DF	<i>Degrees of Freedom</i>
RPE	<i>Relative Predispositional Effects</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
95%CI	<i>95% Confidence Interval</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
χ^2	<i>Chi-square Test</i>
NCRs	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>
SAPE	<i>R-phycoerythrin conjugate</i>

Tese elaborada e formatada conforme as normas da
ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas
(Capítulo II): *Human Immunology* (artigo 1)

disponível em:

<<https://www.elsevier.com/journals/human-immunology/0198-8859/guide-for-authors>> e *PLoS One* (artigo 2) disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#loc-manuscript-organization>>.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	17
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.2	ORIGEM DA HIPERSENSIBILIDADE	17
1.2.1	HIPÓTESE GENÉTICA	18
1.2.2	HIPÓTESE DA HIGIÊNE	18
1.3	HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I	19
1.3.1	COMPONENTES DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I	20
1.3.1.1	ALÉRGENOS	20
1.3.1.2	ÁCAROS	22
1.3.2	MÉTODO DE DETECÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I	23
1.4	SISTEMA IMUNITÁRIO	24
1.5	COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	25
1.6	CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> E SEUS RECEPTORES KIR (<i>KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR</i>)	29
1.7	JUSTIFICATIVA	32
1.8	OBJETIVOS	33
1.8.1	GERAL	33
1.8.2	ESPECÍFICOS	33
1.9	REFERÊNCIAS	34
2	CAPÍTULO II	39
2.1	ARTIGO 1: ASSOCIATION BETWEEN HLA GENES AND DUST MITE SENSITIVITY IN A BRAZILIAN POPULATION	39
2.2	ARTIGO 2: GENES KIR E SENSIBILIDADE A ÁCAROS EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA	76
3	CAPÍTULO III	100
3.1	CONCLUSÕES	100
3.2	PERSPECTIVAS FUTURAS	100

4	ANEXOS	101
4.1	ANEXO I - PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	101
4.2	ANEXO II - MANUAL <i>PRICK TEST</i>	102
4.3	ANEXO III - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	105
5	APÊNDICES	107
5.1	APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	107
5.2	APÊNDICE II - LAUDO <i>PRICK TEST</i>	110

CAPÍTULO I

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A defesa do nosso organismo tem por objetivo manter a integridade da homeostasia, dessa forma, a resposta imune contribui para o reconhecimento de agentes não próprios e desenvolve mecanismos capazes de eliminá-los. Em casos excepcionais, reações de hipersensibilidade são desencadeadas por desvios destes mecanismos, que resultam em uma resposta descontrolada/exacerbada, com danos teciduais e sistêmicos (WANG, 2003). O fenômeno da alergia é extremamente complexo, no entanto, o avanço das pesquisas tem ajudado a revelar mecanismos que permitem o desdobramento das medidas terapêuticas.

As principais manifestações clínicas da hipersensibilidade podem aparecer de forma isolada ou combinada e são de ordem: cutânea, respiratória, ocular e digestiva (ASBAI & SBAN, 2012). A alergia respiratória, como a asma e a rinite, é considerada o maior problema de saúde que atinge a população pediátrica, por causa da alta prevalência e cronicidade, bem como das limitações que impactam a qualidade de vida (TORTAJADA-GIRBÉS et al., 2016). Essas doenças são caracterizadas pela inflamação das vias respiratórias, resultante de uma reação imunológica por anticorpos imunoglobulinas E (IgE) específicos ao alérgeno, fixados sobre superfície de mastócitos. A ativação desses anticorpos desencadeia o rompimento da membrana e conseqüente liberação de substâncias vasoativas dos mastócitos, provocando efeitos inflamatórios, como a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia e a estimulação da secreção de muco (MALE et al., 2014).

A doença alérgica surge devido a uma resposta imediata, que está relacionada com uma série de fatores de riscos, categorizada em predisposição genética, faixa etária, alérgenos, exposições pré-natais, alimentação, infecções, efeitos sazonais, condições climáticas e fatores psicossociais (BUSH; PEDEN, 2009; WALLAERT, 2011).

1.2 ORIGEM DA HIPERSENSIBILIDADE

Uma das dificuldades enfrentadas no diagnóstico da hipersensibilidade é a investigação das causas que possam estar envolvidas na etiologia da doença, diversos estudos são realizados para entender como essa reação se inicia. Existem algumas hipóteses que

fundamentam a origem desse processo, que por sua vez, podem ou não estar relacionadas entre si.

1.2.1 HIPÓTESE GENÉTICA

Essa hipótese defende que a alergia é desencadeada por fatores genéticos individuais, ou seja, afirma que a resposta anormal das IgE é de origem genética e possivelmente passa de geração em geração. Estudos de análise de segregação da atopia confirmam esse traço hereditário (FEIJEN; GERRITSEN; POSTMA, 2000).

O desenvolvimento das técnicas avançadas, na biologia molecular, permite que os estudos de genômica estrutural e funcional, da genética de determinadas populações e da genética evolutiva, ajudem a buscar a compreensão do papel individual que cada gene tem na fisiologia da resposta imune (GOLDBREG; KALIL, 2005).

O efeito de múltiplos genes (poligenia) é umas das causas desse grupo de doenças, uma vez que, cada um dos genes possui variado grau de envolvimento. Estudos indicam um alto grau de complexidade por envolver características individuais, interações gene-gene e mudanças epigenéticas do genoma (STEINKE; RICH; BORISH, 2008).

No homem, o sistema imune é composto por um grande número de genes, com alto grau de polimorfismo genético, isto é, presença de múltiplos alelos num loco, cujas frequências superiores a 1% estão distribuídas nas populações, o que reafirma a complexidade desse sistema, com consequências importantes na fisiopatologia de diversas doenças que acometem o ser humano (GOLDBREG; KALIL, 2005).

Nas doenças alérgicas, a atopia pode ser manifestada através da rinite, asma, dermatite atópica (eczema) e também das alergias alimentares. As características dos indivíduos atópicos são: predisposição hereditária para produção de anticorpos IgE, consequente aumento da concentração desses anticorpos na corrente sanguínea e maior quantidade de receptores FcERI específicos na superfície dos mastócitos (FEIJEN; GERRITSEN; POSTMA, 2000; KAY et al., 2001).

1.2.2 HIPÓTESE DA HIGIENE

Originalmente proposta por Strachan em 1989, foi baseada em estudos epidemiológicos e relaciona a questão de que as doenças alérgicas são muito mais frequentes

em populações da era moderna e países desenvolvidos, dando ênfase na relação inversamente proporcional entre sanitização e desenvolvimento de atopias (STRACHAN, 1989).

Nas sociedades modernas, até 30% da população sofre de doenças atópicas, ou seja, respondem inadequadamente às proteínas estranhas, como ácaros, polens ou mofo (AALBERSE; PLATTS-MILLS, 2004). Percebe-se que nos últimos 40-50 anos houve um aumento súbito das doenças inflamatórias crônicas no mundo ocidentalizado, em especial as atópicas (SIRONI; CLERICI, 2010), com nítida diferença entre regiões Norte e Sul, ao relacionarmos com o nível socioeconômico (BACH, 2005). Autores revelam que a rapidez na elevação das taxas de prevalência das doenças alérgicas sugere uma causa ambiental (TSE; HORNER, 2008).

O conceito inicial dessa hipótese é que exposição diminuída aos microrganismos, bem como a menor frequência de infecções na infância precoce – até mesmo pré-natais – predispõem o indivíduo a um quadro de sensibilidade (VON MUTIUS, 2007). Além disso, foi observado que a razão pela qual essas exposições ocorrem em menor extensão, seria por conta de uma tendência de famílias menores e com melhor condição econômica (BLOOMFIELD et al., 2006).

Nos anos seguintes, outros estudos deram suporte à hipótese da higiene, expandindo as causas da origem das doenças alérgicas, incluindo os seguintes fatores de risco: exposição reduzida a animais domésticos, aumento da prescrição/uso de antibióticos, alteração dos hábitos alimentares, mudança na colonização intestinal da criança e maior exposição aos poluentes (WRIGHT, 2005; YU, 2009; GOLD).

1.3 HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I

A resposta imune adaptativa confere proteção específica contra infecções, oriundas de vírus, bactérias, parasitos e fungos. No entanto, algumas repostas imunes desencadeiam uma reação excessiva ou inadequada, que é chamada de hipersensibilidade (MALE et al., 2012).

Há aproximadamente 100 anos, o termo hipersensibilidade foi introduzido por Richet e Portier (MAY, 1985), que descreveram o resultado do experimento da exposição de um animal pré-sensibilizado ao antígeno, reação com o desfecho denominado de anafilaxia, que se tornou modelo das respostas de hipersensibilidade imediatas (MALE et al., 2012).

Em 1963, os autores Coombs e Gells apresentaram um esquema de classificação, na qual a hipersensibilidade alérgica, descrita anteriormente por Richet e Portier, foi chamada de tipo I (DESCOTES; CHOQUET-KASTYLEVSKY, 2001).

A reação de hipersensibilidade do tipo I decorre de um desvio da resposta do hospedeiro, direcionado à produção de anticorpos IgE contra proteínas estranhas, encontradas no meio ambiente (como os ácaros presentes na poeira domiciliar). As IgE se ligam com grande afinidade aos receptores FcERI presentes, por exemplo, na superfície dos mastócitos – células ricas em substâncias vasoativas, sobretudo a histamina – que, quando ativados, através do contato repetido com o alérgeno, desencadeiam efeitos biológicos (Figura 1) (JANEWAY et al., 2001).

1.3.1 COMPONENTES DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I

1.3.1.1 ALÉRGENOS

Alérgenos são usualmente proteínas, heterogêneas e complexas, formados por diferentes epítopos, que são reconhecidos a partir das imunoglobulinas (Ig) de diferentes especificidades. Essas proteínas referem-se especificamente aos antígenos, que, por sua vez, são capazes de estimular a resposta mediada por IgE, em indivíduos atópicos (MENO, 2011; WORLD ALLERGY ORGANIZATION, 2015).

A caracterização primária dos alérgenos é relacionada com sua via de exposição. Esses antígenos podem acessar o organismo humano, basicamente, por 3 vias: inalação, ingestão ou penetração da pele, e dessa, forma desencadear uma hiperatividade imunológica (MOREIRA, 2006). Via de regra, a forma mais comum de transmissão é por inalação, já que os ácaros ficam dispersos na poeira, são transportados pelo ar e, involuntariamente, inalados. No entanto, a contaminação dos alimentos por ácaros também é recorrente, especialmente aqueles a granel e agrícola, que são mantidos em grandes armazéns, os quais oferecem condições normalmente favoráveis de temperatura e umidade para sua sobrevivência e multiplicação (FRANZOLIN; BAGGIO, 2000).

O alérgeno, quando inalado, atravessa a membrana mucosa e é processado e degradado em peptídeos pelas células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas. Alguns desses peptídeos se ligam às moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de Classe II e, posteriormente, são expostos na superfície da célula e apresentados aos

linfócitos T CD4+. Para os receptores das células T, a sequência dos aminoácidos é que determina o reconhecimento dos antígenos (MENO, 2011).

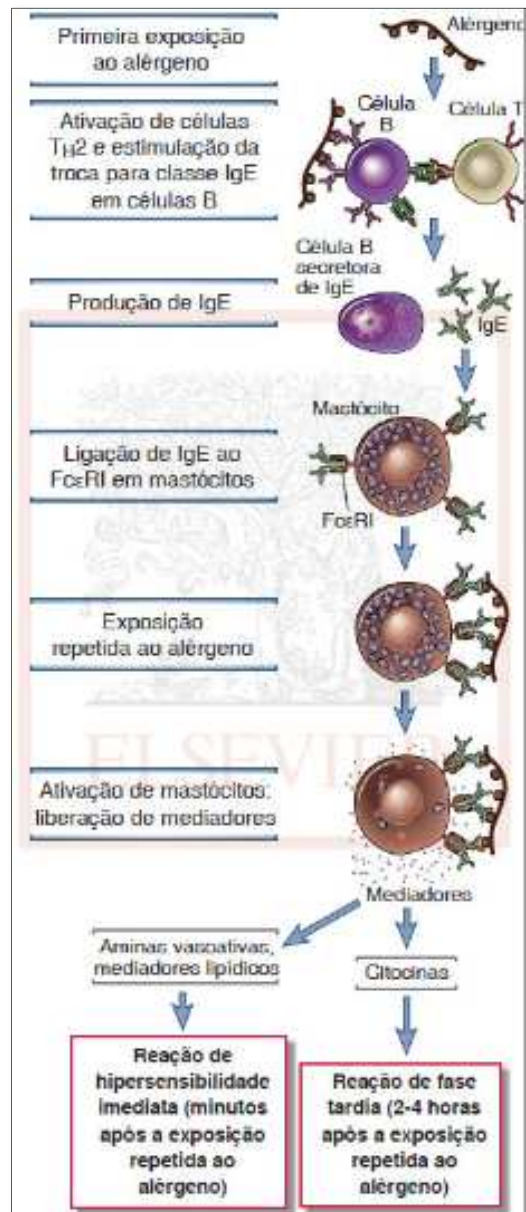


Figura 1 – Esquema representativo da reação de hipersensibilidade do tipo I.

Abbas, Lichtman & Pillai, 2012.

A base estrutural da interação entre os alérgenos e o sistema imune é a formação do complexo entre IgE, alérgeno e receptor IgE de alta afinidade, por isso, a determinação da estrutura dos alérgenos tem sido uma área ativa de pesquisa. Além do mais, para caracterizar

detalhadamente a interação anticorpo-alérgeno, o conhecimento do complexo, tanto de um como do outro, é fundamental (MENO, 2011).

1.3.1.2 ÁCAROS

Os ácaros pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida e subclasse Acari. São os organismos mais abundantes da mesofauna, constituída por animais invertebrados macroscópicos, presentes no solo (CROSSLEY; MULLER; PERDUE, 1992). Atualmente, a subclasse Acari abrange mais de 55.000 espécies (entre ácaros e carrapatos) e formam o maior grupo da classe Arachnida. Muitas dessas espécies são responsáveis por ameaçar, não somente a saúde dos seres humanos, mas também das plantas e animais, provocando grandes perdas econômicas e problemas de saúde pública, em escala global (GU et al., 2014).

Existe uma diversidade considerável da fauna acarina em diferentes partes do mundo, que é atribuída aos fatores climáticos, aos fatores ecológicos e também nutricionais de cada território (BINOTTI et al., 2001; GODINHO et al., 2003).

Os fatores temperatura e umidade relativa do ar são fundamentais para o desenvolvimento e sobrevivência dos ácaros. Para a maioria das espécies, a temperatura ideal situa-se no intervalo entre 20°C a 30°C, porém, em temperaturas mais baixas, a taxa de produtividade e de desenvolvimento é retardada. Em relação à quantidade de água no ar, locais com maior umidade permitem que as populações acarinas se mantenham estáveis. Normalmente, quando a umidade se encontra abaixo dos 55%, a maioria dos ácaros não resiste, salvo algumas espécies (FERREIRA, 2013).

Dentre os ácaros mais estudados nas doenças atópicas estão: *Dermatophagoides pteronyssinus* (que abrange os alérgenos Der p 1-11, 13-15, 18, 20, 21, 23, 24), *Dermatophagoides farinae* (Der f 1-4, 6-8, 10, 11, 13-18, 20-22, 24-35) e *Dermatophagoides microceras* (Der m 1) (<http://www.allergen.org>), os quais são identificados a partir do peso molecular e sequência homóloga (BRUNTON; SAPHIR, 1999). Os alérgenos sensibilizantes dos ácaros estão divididos em grupos, os principais são cisteína-proteases (alérgenos do grupo 1: *D. pteronyssinus* 1, *D. farinae* 1 e *D. microceras* 1), serino-proteases (alérgenos do grupo 9), e as amilases (alérgenos do grupo 4). Essas enzimas alergênicas são provenientes das células do trato gastrointestinal dos ácaros e são encontradas em altas concentrações em suas fezes. São essas proteínas, eliminadas no excremento dos ácaros, responsáveis por estimular a

produção de anticorpos IgE, ao entrarem em contato com o hospedeiro (STEWART et al., 1997; GREIFF et al., 2002; POST et al., 2014).

Em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, os alérgenos provenientes de outras espécies de ácaros, tal como a *Blomia tropicalis*, também é considerada uma importante causa de sensibilização em pacientes predispostos (FERNANDEZ-CALDAS et al., 1993). Diferentes alérgenos já foram identificados para essa espécie (Blo t 1-6, 8, 10, 11-13, 19 e 21), visto que o Blo t 5 é o mais importante (<http://www.allergen.org>).

Esses artrópodes são considerados organismos de vida livre, que se alimentam de fragmentos da pele humana, o que justifica serem frequentemente encontrados em larga escala em camas/colchões, roupas, almofadas, bichos de pelúcia, dentre outros materiais têxteis, presentes no domicílio (MOGHTADERI et al., 2016). Os fungos e outras substâncias proteicas, também servem como fonte de alimento para os ácaros (JENTZSCH; CARMARGOS; MELO, 2002).

A partir de meados de 1960, os ácaros passaram a ser relacionados com os processos alérgicos e serem apontados como responsáveis por desencadear as doenças das vias respiratórias. Atualmente, são classificados como um dos mais importantes alérgenos, uma vez que 50% dos adultos e 90% das crianças asmáticas são sensíveis a ácaros, pois demonstram sinais de alergia, mediada por IgE, diante das proteínas inaladas (MOFFATT et al., 2003; ATAMBAY et al., 2006; ERTABAKLAR; YAMAN; ERTUG, 2006).

De acordo com o estudo de Solé e colaboradores (2014), sobre a epidemiologia da asma na população pediátrica brasileira, a prevalência média entre adolescentes no país, se mantém entre as mais elevadas do mundo. O estudo aponta que viver em ambiente rural, é um fator protetor, tanto no desenvolvimento da asma, como no das outras doenças alérgicas. Outra pesquisa nacional, que incluiu crianças e adolescentes atendidos em serviços brasileiros de alergia, demonstrou índices de positividade de 66,7% para *D. pteronyssinus*, de 64,5% para *D. farinae* e de 55,2% para *Blomia tropicalis* (NASPITZ et al., 2004)

1.3.2 MÉTODO DE DETECÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I

O diagnóstico da alergia é baseado na detecção de uma reação de sensibilização e para tal é realizado o teste de puntura, denominado *Prick Test*. Esse teste é baseado no princípio de

que, tendo o paciente atópico, IgE específico aos alérgenos testados, ocorrerá liberação de substâncias farmacologicamente vasomotoras, além da liberação de substâncias do interior das células, ocasionando edema, hipersecreção e espasmo (Anthygenus™, Rio de Janeiro, Brasil). Essa é considerada a técnica padrão, recomendada para diagnóstico de alergia mediada por IgE (BURBACH et al., 2009; BOUSQUET et al., 2012).

Esse teste é realizado com a suspensão de alérgenos específicos, que são dispensados em pequenas quantidades no antebraço após a assepsia com álcool 70%. Para que a substância penetre na pele, é realizada uma picada ou leve escoriação, com o auxílio de uma lanceta. Passados 15 a 20 minutos, nos casos positivos, surgem uma reação pápulo-eritematosa, que é classificada de acordo com o tamanho do diâmetro em milímetros, cuja magnitude é dada em cruzes (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação da reação de hipersensibilidade tipo I ao alérgeno testado.

Magnitude (nº de cruzes)	Reação	Pápula (mm)	Eritema (mm)	Características visuais
-----	NEGATIVA	-----	-----	Apenas do ponto de inoculação
-----	POSITIVA	-----	-----	Pápula acima de 3mm
+ / 1	FRACA	< 3mm	<15	Pápula de 3mm
++ / 2	MÉDIA	< 6mm	<15	Pápula de 3 a 5mm
+++ / 3	FORTE	7-9mm	16-30	Pápula de 5 a 9mm
++++ / 4	INTENSA	> 9mm	> 30	Pápula de 9mm com ramificações

Anthygenus™, Rio de Janeiro, Brasil.

1.4 SISTEMA IMUNITÁRIO

Nos seres humanos, existem dois sistemas de resposta imunológica distintos que, inclusive, interagem entre si, chamadas de imunidade inata/natural e imunidade adquirida/

adaptativa. Ambos atuam de forma separada, ou em conjunto no desenvolvimento da imunidade (JANEWAY et al., 2007).

Em linhas gerais, a imunidade inata representa a primeira linha de defesa e é caracterizada pela rapidez na resposta e não especificidade, ou seja, permite uma reação “instantânea” no encontro com o antígeno, além disso, não possui memória imunológica e tem atuação de curta duração. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; PACHECO; CARDOSO, 2007).

Em contraste, a resposta adaptativa age lentamente, ao realizar o contato inicial com o antígeno, mas é considerada mais específica e gera memória imunológica. Em um segundo contato com o antígeno, produz uma resposta rápida e vigorosa (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2004; JANEWAY et al., 2007). Esta é mediada por linfócitos e abrange a imunidade celular e a humoral.

As respostas imunes adaptativas atuam por meio de dois padrões: a resposta imune, mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e a resposta imune Th2. Enquanto a resposta imune Th1 ocorre na reação às infecções virais e bacterianas e nas doenças auto-imunes, a Th2 ocorre na reação às infecções helmínticas e nas doenças alérgicas, como a asma, a rinite e o eczema (PONTE; RIZZO; CRUZ, 2007).

A resposta Th2, ao ser ativada através do contato com o antígeno, provoca a liberação de citocinas Th2, tais como, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 que, por sua vez, estimulam a diferenciação dos linfócitos B e a produção de anticorpos de classe IgE, ocasionando a imunidade humoral (LINSINGEN, 2008).

1.5 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O MHC (*Major Histocompatibility Complex*) representa o conjunto de mais de 220 genes com funções diversas, que inclui os genes responsáveis por codificar as moléculas de histocompatibilidade, denominados como sistema HLA. Esse sistema está localizado na porção distal 6p21.3 do cromossomo 6, cujos produtos codificados são localizados em moléculas de superfície celular e podem ser classificados em clássicos e não-clássicos, de acordo com a sua estrutura molecular, distribuição tecidual e função biológica (ROBINSON et al., 2013).

Os genes do MHC são divididos em três grupos distintos: classe I, localizado na porção telomérica do MHC, que codifica os genes clássicos HLA-A, -B e -C e não clássicos HLA-E, -F e -G; classe II, mais próxima ao centrômero, a qual codifica os genes HLA-DRA, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 e -DPB1. Localizada entre as regiões classe I e II, encontra-se a classe III, na qual os genes presentes são: C2, C4b e BF. Outros locos também situados nessa região são: 21 hidroxilase, C2 do sistema Complemento e TNF (fator de necrose tumoral) (CAMPBELL; TROWSDALE, 1993) (Figura 2).

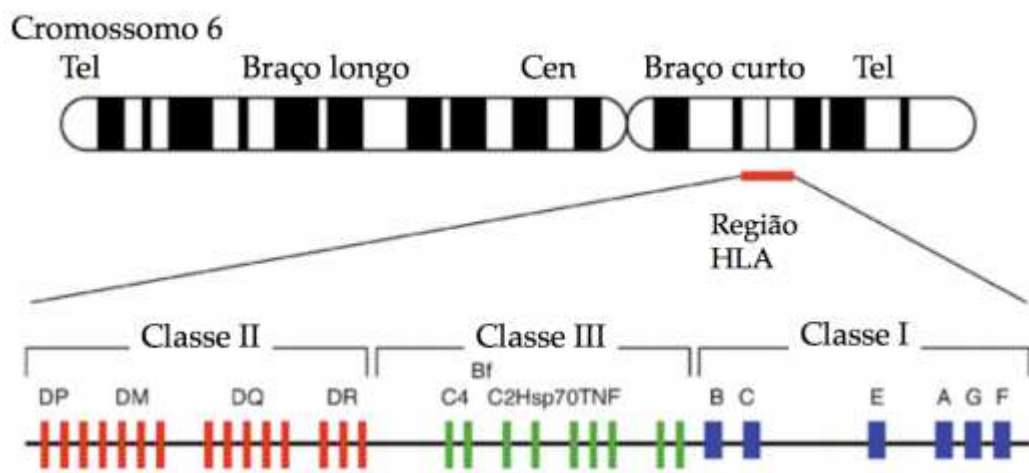


Figura 2 – Mapa genético da região HLA – Figura esquemática mostrando o cromossomo 6, a região HLA e os genes HLA de Classe I e II.

Cen = centrômero; Tel= telômero.

Expert reviews in molecular medicine, 2003, Cambridge University Press.

As moléculas de classe I são heterodímeros, que se expressam em membranas de todas as células nucleadas. São constituídas por duas cadeias polipeptídicas designadas de α e outra β 2-microglobulina (Figura 3). A cadeia alfa possui três módulos funcionais (α 1, α 2 e α 3), seguidos da porção transmembrânica e cauda citoplasmática (BARNSTABLE et al., 1978). A fenda do domínio extracelular da cadeia α acomoda peptídeos de origem citosólica, entre 8 a 10 aminoácidos de comprimento, que são processados no interior da célula e expostos na superfície, através das moléculas MHC. A função biológica dessas moléculas está relacionada com o fenômeno de restrição das células mediadoras de lise, como células T citotóxicas e supressoras (CD8+) e no reconhecimento do peptídeo apresentado (MCDEVITT, 1985; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

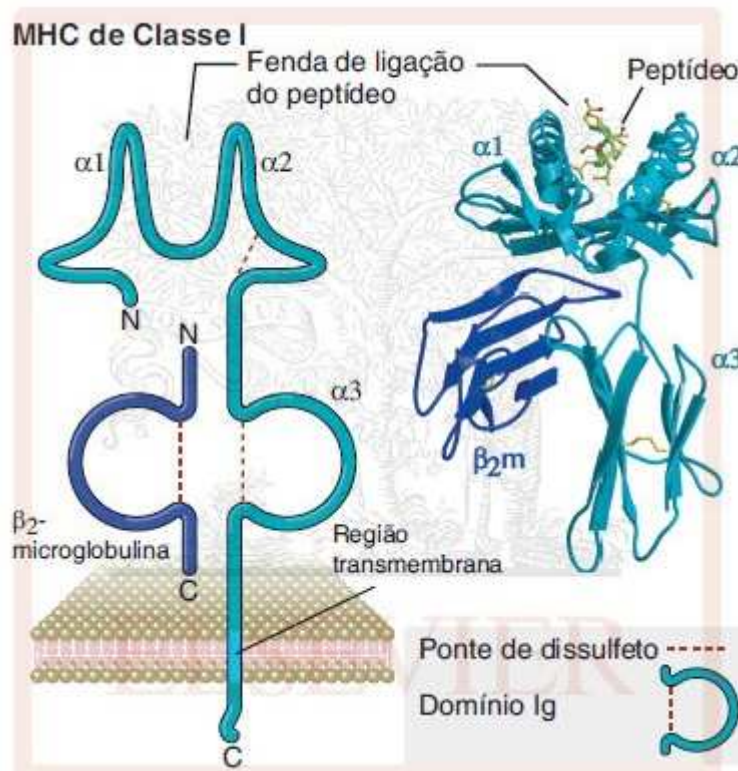


Figura 3 – Representação estrutural da molécula do MHC de Classe I.

Abbas, Lichtman & Pillai, 2012.

As moléculas de classe II são glicoproteínas – constituídas de duas cadeias polipeptídicas, que possuem porções transmembrânicas – são ligadas de forma não covalente, e designadas como cadeia α e cadeia β ; ambas são codificadas por genes distintos (Figura 4). A cadeia α é pouco variável, enquanto a cadeia β , codificada por HLA-DRB1, é altamente polimórfica, especialmente no primeiro domínio. Normalmente, são expressas por células B, macrófagos e células dendríticas (KLEIN et al., 1986). A fenda abriga peptídeos antigênicos, de origem extracelular, com comprimento de aproximadamente 13-25 aminoácidos que, ao serem reconhecidos como não próprios, fazem a apresentação dos peptídeos às células T CD4+ (*helper*) e à regulação das interações entre as células imunocompetentes (DAVIS; BJORKMAN, 1988; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

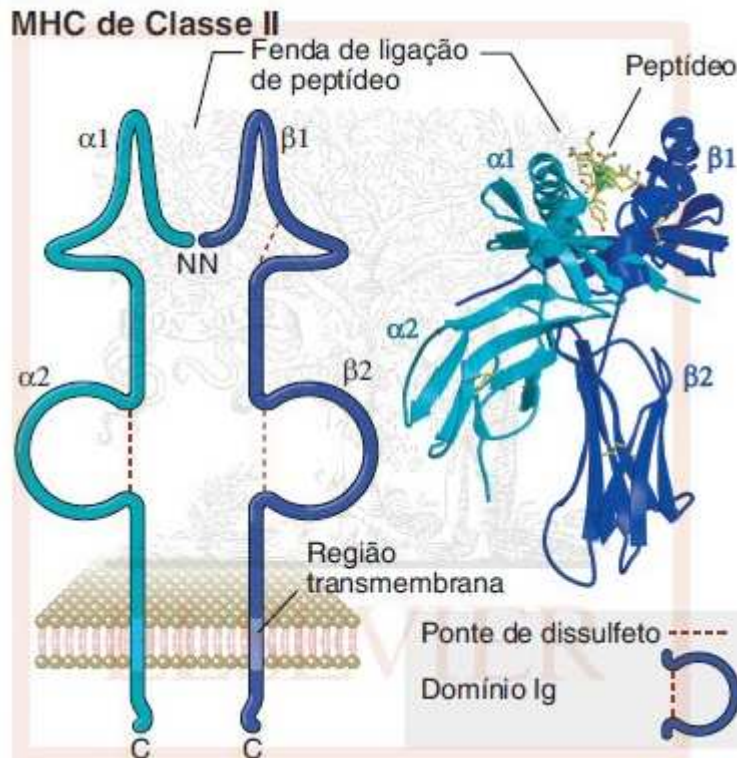


Figura 4 – Representação estrutural da molécula do MHC de Classe II.

Abbas, Lichtman & Pillai, 2012.

Esse sistema é caracterizado pelo alto grau de polimorfismo, distribuição desigual das frequências alélicas em populações e também prevalência de alelos típicos em uma dada população. Segundo Morton et al. (1966), o termo polimorfismo genético refere-se à ocorrência de duas ou mais formas genéticas descontínuas, de uma mesma espécie, em uma mesma população. A mais comum é determinada por um alelo com frequência não superior a 99%. Em outras palavras, se a frequência do alelo mais comum for inferior a 99%, o sistema é classificado como polimórfico. Por outro lado, o sistema é monomórfico quando houver um alelo com frequência superior a 99%, independente do fato de haver apenas um, nenhum ou muitos alelos com frequência inferior a 1%.

Grandes populações urbanas são caracterizadas por um variado número de alelos, sem prevalência de nenhum deles; esse padrão é consequência do processo de miscigenação. Nessas condições, os estudos são pouco informativos, quando se pretende verificar efeitos de outros fatores evolutivos, que não a miscigenação (LIENERT; PARHAM, 1996). Em populações isoladas, fica mais evidente a ação de deriva genética.

1.6 CÉLULAS NATURAL KILLER E SEUS RECEPTORES KIR (KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR)

As células Natural Killer (NK) são derivadas da medula óssea e compõem uma subpopulação de linfócitos granulares, que tem por característica serem heterogêneos e produtores de citocinas. Representam 5 a 25% do total de células mononucleares na circulação sanguínea em condições normais e podem ser encontradas em certos tecidos, como placenta, intestino, fígado e cavidade peritoneal (LANIER, 1998; PARHAM, 2003; CALIGIURI, 2008). Devido ao seu fenótipo de superfície e linhagem, não são linfócitos T, nem B, além de não expressarem somaticamente receptores de antígenos rearranjados e distribuídos clonalmente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

As citocinas IL-2, IL-15 e IL-18 produzidas por outras células, são capazes de ativar as células NK e provocar a expansão delas, podendo migrar para uma variedade de tecidos e órgãos (MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002). As células NK empregam diferentes mecanismos indutores de apoptose, tais como perforinas, granzimas e fatores de necrose tumoral (TNF), com objetivo de lisar as células-alvo de maneira rápida, eficiente e precisa (FLODSTROM et al., 2002).

Essas células integram o sistema imune inato e têm como função principal proporcionar resposta defensiva de primeira linha, fazendo as vezes de sentinelas, com capacidade de detectar e lisar células tumorais ou infectadas por vírus, sem que seja necessária uma sensibilização prévia (CALIGIURI, 2008; VIVIER et al., 2011). Para tanto, é preciso uma regulação cuidadosa dessas respostas, para que haja distinção entre as células doentes e os tecidos vizinhos saudáveis, ou seja, o chamado mecanismo do *missing self* (reconhecimento do próprio). Para tal fim, as células NK lançam mão de sua habilidade em reconhecer a ausência ou expressão reduzida das moléculas HLA de classe I na superfície das células-alvo, o que caracteriza uma expressão anormal, sendo este o sinal que as diferencia das células normais ou próprias do organismo, já que estas expressam normalmente as moléculas HLA (KÄRRE, 2002).

Os receptores das células NK pertencem, dentre outras, à superfamília das imunoglobulinas, na qual os receptores KIR estão inseridos. Estes, são codificados por um grupo de 14 genes, mapeados no cromossoma 19q13.4 situado no LRC (*leukocyte receptor complex*), formados por: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*,

KIR2DS2, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DS1*, além de dois pseudogenes *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (HOU et al., 2012), dos quais *KIR2DS* e *KIR3DS* são classificados como ativadores e *KIR2DL* e *KIR3DL* como genes inibidores, com exceção do *KIR2DL4* (MIDDLETON; GONZELEZ, 2010).

KIRs de inibição apresentam cauda citoplasmática longa, contendo um ou dois motivos de inibição baseados em tirosina, ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*), enquanto KIRs de ativação apresentam cauda citoplasmática curta e possuem um aminoácido no domínio transmembrana, que permite associação com a molécula DAP-12, que libera sinais ativatórios por meio de ITAMs (*immunoreceptor tyrosinebased activating motifs*) (VILCHES; PARHAM, 2002) (Figura 5).

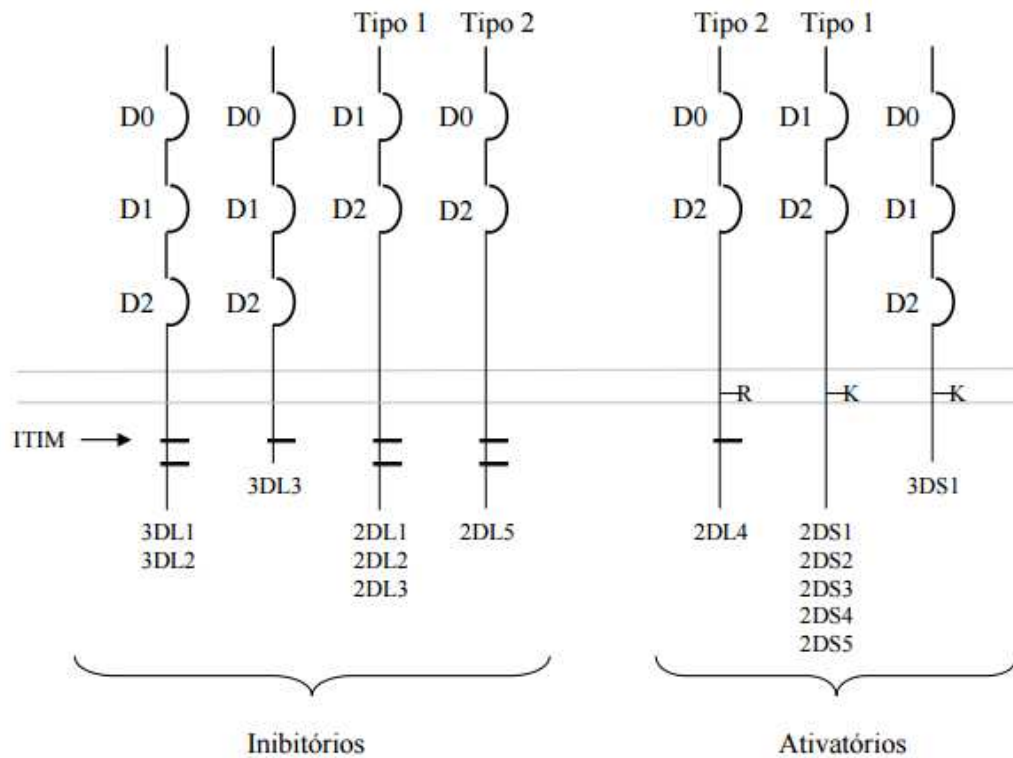


Figura 5 – Nomenclatura e organização molecular de KIR. Marangon et al., 2008.

Os receptores KIR interagem com seus respectivos ligantes HLA, sendo que o reconhecimento ocorre de forma específica com um (ou mais) dos quatro epítomos das moléculas HLA de classe I. Estas apresentam um dimorfismo no loco HLA-C, na posição 80 da hélice $\alpha 1$, onde são classificadas em HLA-C1 e HLA-C2. Receptores *KIR2DL2*, *KIR2DL3* e *KIR2DS2* reconhecem moléculas HLA-C, pertencentes ao grupo 1 (HLA-C1), as quais

incluem os grupos alélicos mais comuns HLA-C*01, C*03, C*07 e C*08, ao passo que *KIR2DL1* e *KIR2DS1* ligam-se às moléculas HLA-C2, em que as mais frequentes correspondem aos grupos alélicos HLA-C*02, C*04, C*05 e C*06 (PISEGNA et al., 2004). Além disso, receptores *KIR3DL2*, *KIR2DS2* e *KIR2DS4* reconhecem o subconjunto de alótipos HLA-A, que correspondem aos epítomos A3/11 (LIU et al., 2014) (Quadro 2).

Quadro 2 – Especificidade dos receptores KIR e seus ligantes.

2DL1 and 2DS1	2DL2/3 and 2DS2	3DL1/S1	3DL2	2DL4	2DS4
HLA-C grp 2	HLA-C grp 1	HLA-B Bw4	HLA-A	HLA-G	
C*02	C*01	B*08	A*03		C*04
C*04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
		B*51			
		B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Carrington & Norman, 2003.

A presença e a ausência de certos genes resultam em uma imensa diversidade haplotípica e, conseqüente, alto grau de polimorfismo, distribuído na população (características mais importantes desse complexo). Em geral, de acordo com a variabilidade do conteúdo gênico, dois grupos básicos são conhecidos, denominados como haplótipos A e haplótipos B (CARRINGTON; NORMAN, 2003).

O haplótipo A contém os genes *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* e *KIR3DL2*, em que *KIR2DS4* é o único gene de ativação. O conteúdo gênico do haplótipo A tem baixa variabilidade genética, contudo apresenta grande extensão alélica. O haplótipo B apresenta maior variação em termos de conteúdo gênico, especialmente em relação aos genes de ativação, que podem variar em diferentes combinações de *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* e *KIR2DS4* e possui menor polimorfismo alélico (CARRINGTON; NORMAN, 2003).

É bem estabelecida a importância dos receptores KIR, na regulação da atividade das células NK, na ativação/inibição da resposta aos ligantes HLA de classe I e como regulador no curso das infecções virais e nas transformações tumorais. Estudos recentes demonstram a participação das células NK em mecanismos adversos, no entanto o conhecimento sobre a sua função e a de seus receptores KIR nas doenças atópicas ainda é muito pouco conhecido.

1.7 JUSTIFICATIVA

Ao considerar a hipersensibilidade aos ácaros uma causa relativamente comum entre as crianças e responsável por desencadear inúmeras respostas cutâneas e respiratórias, além de promover um grande impacto na saúde dessa população, entendemos que esse é um assunto de grande importância na área da saúde humana.

As alergias do aparelho respiratório têm sido umas das principais enfermidades do homem moderno e a alta prevalência dessas doenças está relacionada a uma série de fatores de riscos, dentre eles, o genético. Estudos de análise de segregação das doenças atópicas confirmam o traço genético no desvio da resposta dos anticorpos IgE (FEIJEN; GERRITSEN; POSTMA, 2000).

Em contrapartida, poucos autores investigaram a associação dos genes HLA com os ácaros e até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que aborda essa relação com os receptores KIR.

Após encontrarmos importantes associações entre SNPs (polimorfismos únicos de nucleotídeos) de citocinas e a sensibilização aos ácaros (CANIATTI et al., 2014), em um estudo prévio envolvendo as mesmas amostras da presente pesquisa, foi levantada a hipótese de outras possíveis associações com os genes HLA e KIR.

Em conclusão, os conhecimentos atuais demonstram a importância de continuarmos a investigação dos mecanismos acerca das atopias e, a partir daí, possibilitar novos planos terapêuticos para o controle dessas doenças.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 GERAL

Conduzir um estudo de associação genética para investigar marcadores de resposta imune em genes HLA de Classe I (-A, -B, and -C), e Classe II (-DRB1) e genes KIR, em indivíduos sensíveis e não sensíveis a ácaros.

1.8.2 ESPECÍFICOS

- Classificar todos os participantes em sensíveis (casos) e não-sensíveis (controles) aos ácaros: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, através do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata – *Prick Test*TM;
- Identificar os genes de resposta imune HLA de Classe I (-A, -B, and -C), HLA de Classe II (-DRB1) e KIR nos indivíduos sensíveis e não-sensíveis;
- Estimar as frequências dos alelos, dos grupos alélicos e dos haplótipos dos genes HLA, por contagem direta;
- Estimar as frequências dos genes KIR, bem como de seus ligantes HLA de Classe I, por contagem direta;
- Calcular a distribuição dos genes HLA e KIR, de acordo com cada agente etiológico;
- Avaliar a associação dessas variantes com a susceptibilidade aos ácaros, de acordo com o valor de P , usando o teste exato de Fisher bi caudal, com nível de significância de 5%;
- Avaliar o risco de desenvolver sensibilidade aos ácaros pela determinação de *odds ratio*;
- Comparar os resultados com o método proposto por Hollenbach et al. (2012), aplicando o teste de heterogeneidade e calculando o valor de P , pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

1.9 REFERÊNCIAS

- AALBERSE, R. C.; PLATTS-MILLS, T. A. How do we avoid developing allergy: modifications of the TH2 response from a B-cell perspective. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 113, n. 5, p. 983-986, 2004.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.
- ASBAI (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA) E SBAN (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO). **Guia prático de diagnóstico e tratamento da Alergia às Proteínas do Leite de Vaca mediada pela imunoglobulina E**. Revista brasileira de alergia e imunopatologia. São Paulo, 2012. v. 35, n. 6.
- ATAMBAY, M. et al. The relationship between the skin allergy test and house dust mites. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v. 30, p. 327-329, 2006.
- BACH, F. F. Six questions about the hygiene hypothesis. **Cell Immunology**, v. 233, n. 2, p. 158-161, 2005.
- BARNSTABLE, C. J.; JONES, E. A.; CRUMPTON, M. J. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. **British Medical Bulletin**, v. 34, p. 241-246, 1978.
- BINOTTI, R. S. et al. House Dust Mites in Brazil - An Annotated Bibliography. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1177-1184, 2001.
- BLOOMFIELD, S. F. et al. Too clean, or not too clean: the Hygiene Hypothesis and home hygiene. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 36, n. 4, p. 402-425, 2006.
- BOUSQUET, J. et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. **Allergy**, v. 67, n. 1, p. 18-24, 2012.
- BRUNTON, S. A.; SAPHIR, R. L. Dust mites and asthma. **Hospital Practice**, v. 34, p. 67-68, 1999.
- BURBACH, G. J. et al. GA2 LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. **Allergy**, v. 64, n. 10, p. 1507-1515, 2009.
- BUSH, R. K.; PEDEN, D. B. Advances in environmental and occupational disorders in 2008. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 575-578, 2009.
- CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, p 461-469, 2008.
- CAMBRIDGE UNIVERSITY. **Expert reviews in molecular medicine**. Cambridge University Press. London, 2003. v. 5. Disponível em: <goo.gl/589Y3Y>. Acesso em 10 nov. 2016.
- CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunology Today**, v. 14, p. 349-352, 1993.
- CANIATTI, M. C. C. L. et al. Association of cytokines in individuals sensitive and insensitive to dust mites in a Brazilian population. **PloS One**, v. 9, n. 9, e107921, 2014.

- CARRINGTON, M.; NORMAN, P. **The KIR Gene Cluster**. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/>>. Acesso em 19 set. 2016.
- CROSSLEY JR, D. A.; MULLER, B. R.; PERDUE, J. C. Biodiversity of microarthropods in agricultural soil: relations to processes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 40, p. 37-46, 1992.
- DAVIS, M. M.; BJORKMAN, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature**, v. 334, p. 395-402, 1988.
- DESCOTES, J.; CHOQUET-KASTYLEVSKY, G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? **Toxicology**, v. 158, n. 1-2, p. 43-49, 2001.
- ERTABAKLAR, H.; YAMAN, S.; ERTUG, S. Evaluation of the prevalence of house dust mites in house dust sent to the Adnan Menderes University Medical Faculty Parasitology Laboratory. **Turkish Society for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 29-31, 2006.
- FEIJEN, M.; GERRITSEN, J.; POSTMA, D. S. Genetics of allergic disease. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 894-907, 2000.
- FERNÁNDEZ-CALDAS, E. et al. Mite fauna, Der p I, Der f I and Blomia tropicalis allergen levels in a tropical environment. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 23, n. 4, p. 292-297, 1993.
- FERREIRA, T. C. R. **Estudo da Sensibilização a Ácaros na Ilha de São Miguel – Açores**. Ponta Delgada: Universidade dos Açores, 2013. Disponível em: <goo.gl/zjBrDh>. Acesso em 10 nov. 2016.
- FLODSTROM, M. et al. The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, p. 432- 441, 2002.
- FRANZOLIN, M. R.; BAGGIO, D. Mite contamination in polished rice and beans comercialized in municipal markets. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2000.
- GODINHO, R. et al. Frequency of positive skin tests for airborne allergic agents. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 6, p. 824-828, 2003.
- GOLD, D. R.; WRIGHT, R. Population disparities in asthma. **Annual Review of Public Health**, v. 26, p. 89-113, 2005.
- GOLDBERG, A. C.; KALIL, J. **Imunogenética**, in: GELLER, M.; SCHEINBERG, M. Diagnóstico e tratamento das doenças imunológicas: para médicos, pediatras e residentes. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- GREIFF, F. L. et al. Absorption across the nasal airway mucosa in house dust mite perennial allergic rhinitis. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 22, n. 1, p. 55-57, 2002.
- GU, X. et al. The complete mitochondrial genome of the scab mite *Psoroptes cuniculi* (Arthropoda: Arachnida) provides insights into Acari phylogeny. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 340, 2014.
- HOU, L. et al. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors (KIR) Typing By DNA Sequencing. **Methods in Molecular Biology**, v. 882, p. 431-468, 2012.

- JANEWAY, C. A. et al. Allergy and Hypersensitivity. In: JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology**. 5th ed. New York: Garland Science, 2001.
- JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia** – O Sistema Imune na Saúde e na Doença. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- JENTZSCH, N. S.; CAMARGOS, P. A. M.; MELO, E. M. Compliance to allergen avoidance procedures in asthma. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 25, n. 6, p. 192-199, 2002.
- KÄRRE K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 3, p. 221-228, 2002.
- KAY, A. B. Allergy and Allergic Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 1, p. 30-37, 2001.
- KINDT, T.; GOLDSBY, R.; OSBORNE, B. **Kuby Immunology**. 6ª ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2004.
- KLEIN, J.; FIGUEROA, F. Evolution of the major histocompatibility complex. **Critical Reviews in Immunology**, v. 6, n. 4, p. 295-386, 1986.
- LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 359–393; 1998.
- LIENER, T. K.; PARHAM, P. Evolution of MHC class I genes in higher primates. **Immunology & Cell Biology**, v.74, p.349-356, 1996.
- LINSINGEN, R. V. **Polimorfismos de genes de citocinas e do gene MICA em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical**. Curitiba: UFPR, 2008.
- LIU, J. et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A*11. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 2662-2667, 2014.
- MALE, D. et al. **Immunology**. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.
- MARANGON, A. V. et al. Receptores KIR de células natural killer. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 7, n. 1, p. 153-160, 2008.
- MAY, C. D. The ancestry of allergy: being an account of the original experimental induction of hypersensitivity recognizing the contribution of Paul Portier. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 4, p. 485-495, 1985.
- MCDEVITT, H. O. The HLA system and its relation to disease. **Hospital Practice**, v.15, p. 57-72, 1985.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 338-344, 2000.
- MENO, K. H. Allergen structures and epitopes. **Allergy**, v. 66, n. 95, p. 19–21, 2011.
- MIDDLETON, D.; CURRAN, M.; MAXWELL, L. Natural killer cells and their receptors. **Transplant Immunology**, v. 10, n. 2-3, p. 147-164, 2002.
- MIDDLETON, D.; GONZELEZ, F. The extensive polymorphism of KIR genes. **Immunology**, v. 129, n. 1, p. 8–19, 2010.

- MOFFATT, M. F. et al. Atopy, respiratory function and HLA-DR in Aboriginal Australians. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 625-630, 2003.
- MOREIRA, L. F. **Estudo dos componentes nutricionais e Imunológicos na perda de peso em Camundongos com alergia alimentar**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- MORTON, N. E.; KRIEGER, H.; MI, M. P. Natural selection on polymorphism in Northeastern Brazil. **The American Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 153-171, 1966.
- NASPITZ, C. K. et al. Sensitization to inhalant and food allergens in Brazilian atopic children by in vitro total and specific IgE assay. Allergy Project - PROAL. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 203-210, 2004.
- PACHECO, F.; CARDOSO, E. Imunidade Inata e Adaptativa. In: AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M.; PACHECO, F. C. **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa: Lidel, 2007.
- PARHAM, P.; MCQUEEN, K.L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 108-122, 2003.
- PISEGNA, S. et al. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. **Blood**. v. 104, p. 4157-4164, 2004.
- PONTE, E. V.; RIZZO, J. A.; CRUZ, A. A. Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 335-342, 2007.
- POST, S. et al. Protease-activated receptor-2 activation contributes to house dust mite-induced IgE responses in mice. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e91206, 2014.
- ROBINSON, J. et al. The IMGT/HLA database. **Nucleic Acids Research**, v. 41, D1222–D1227, 2013.
- SIRONI, M.; CLERICI, M. The hygiene hypothesis: an evolutionary perspective. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 6, p. 421-427, 2010.
- SOLÉ, D. et al. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Revista Paulista Pediatria**, v. 32, p. 114-125, 2014.
- STEINKE, J.W.; RICH, S. S.; BORISH, L. 5. Genetics of allergic disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 2, p. S384-387, 2008.
- STEWART, G. A. et al. A comparative study of allergenic and potentially allergenic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* and *Euroglyphus maynei*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 16, n. 1-2, p. 165-180, 1992.
- STRACHAN. D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710. p. 1259-1260, 1989.
- TORTAJADA-GIRBÉS, M. et al. Evidence in immunotherapy for paediatric respiratory allergy: Advances and recommendations. **Allergologia Immunopathologia**, v. 44, p. 1-32, 2016.

TSE, K.; HORNER, A. A. Allergen tolerance versus the allergic march: The hygiene hypothesis revisited. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 8, n. 6, p. 475–483, 2008.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 217-251, 2002.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, p 44–49, 2011.

VON MUTIUS, E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 433-439, 2007

WALLAERT, B. Respiratory allergies. **Soins**, n. 760, p. 38-41, 2011.

WANG, J.Y. The Innate Immune Response in House Dust Mite-Induced Allergic Inflammation. **Allergy Asthma Immunology Research**, v. 5, n. 2, p. 68-74, 2013.

WORLD ALLERGY ORGANIZATION. **IgE in Clinical Allergy and Allergy Diagnosis**. 2015. Disponível em: <http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/ige/>. Acesso em 10 nov. 2016.

YU, L. C. The epithelial gatekeeper against food allergy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 50, n. 6, p.247-254, 2009.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “ASSOCIATION BETWEEN HLA GENES AND DUST MITE SENSITIVITY IN A BRAZILIAN POPULATION”

**ASSOCIATION BETWEEN HLA GENES AND DUST MITE SENSITIVITY IN A
BRAZILIAN POPULATION**

Marcela Caleffi da Costa Lima Caniatti¹, Sueli Donizete Borelli², Ana Lúcia Falavigna Guilherme³, Luiza Tamie Tsuneto⁴.

¹M.S., Post-Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá - PR, Brazil, marcelacclima@hotmail.com; ²Ph.D., Department of Basic Health Sciences, UEM, Maringá - PR, Brazil, sdborelli@uem.br; ³Post-Ph.D., Department of Basic Health Sciences, UEM, Maringá - PR, Brazil, alfguilherme@uem.br; ⁴Ph.D., Department of Basic Health Sciences, UEM, Maringá - PR, Brazil, ltsuneto@uem.br

Address for correspondence: Universidade Estadual de Maringá (UEM). Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) – Laboratório de Imunogenética – Av. Colombo, n° 5790, bloco T20. CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Telephone number +55 44 30114858

marcelacclima@hotmail.com

ABSTRACT

Background. Type I hypersensitivity, also known as IgE-mediated allergy, is a complex, multifactorial condition whose onset and severity are influenced by both genetic and environmental factors. Mite allergens stimulate the production of humoral response (IgE), especially in children, which is closely involved in atopic asthma and rhinitis. **Objective.** This study aimed to investigate the association between HLA class I (-A, -B, and -C), and HLA class II (-DRB1) genes in individuals sensitive to dust mites (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, or *Blomia tropicalis*) and mite-insensitive controls. **Methods.** The 396 participants were grouped as mite-sensitive and mite-insensitive according to immediate hypersensitivity as determined by skin-prick tests, and to HLA genotyping by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO). **Results.** After chi-square heterogeneity testing no significant differences were observed in HLA-A, B, and C genes, except for the HLA-DRB1 locus, which, showed a negative association for *DRB1*04*, between mite-sensitive and mite-insensitive individuals. In high resolution, *DRB1*04:11* allele was significantly different from all other results ($P = 0.0042$, OR = 0.26, and 95%CI = 0.09 – 0.70). The analysis stratified by etiologic agent confirmed these associations. **Conclusion.** Our results suggest a possible association between HLA-DRB1 genes and hypersensitivity to dust mites.

Keywords: Mites; sensitive; genetic association; HLA; disease susceptibility.

1 INTRODUCTION

The development of advanced techniques in molecular biology has allowed the study of structural and functional genomics, the genetics of certain populations, and evolutionary genetics, studies that can help to gain a better understanding of the role of each individual gene in the physiology of the immune response. In humans, the immune system has evolved to protect the host from a universe of pathogens, and is composed of a large number of highly polymorphic genes, i.e., the presence of multiple alleles at a locus, being found at frequencies greater than 5% in certain populations, which results in a complex system with important consequences for the pathophysiology of several diseases that affect humans [1, 2, 3].

Allergy is one of these diseases. It produces immune responses to environmental antigens, causing tissue inflammation and organ dysfunction. The etiology of atopy involves genetic factors that are still poorly understood. Sensitization occurs when antigen presenting cells (APCs) of predisposed individuals process allergens (proteins) and present the resulting peptides within HLA molecules to the allergen-specific CD4⁺ T cells. The latter produce cytokines that induce a class switch in B cells to IgE antibodies, which bind to the high affinity FcεRI on mast cells and basophils (rich in vasoactive substances). Upon a second contact, the allergen crosslinks these IgE antibodies, and the effector cells react immediately to release preformed inflammatory substances within seconds. The ability of these allergens to make individuals become sensitized and respond by producing IgE antibodies varies and is determined by the individual's genetic makeup and by cultural and environmental factors [4, 5].

Both the prevalence and severity of allergic respiratory diseases have increased over the past 5 decades, represent global health problems for all age groups, particularly among children. This is possibly due to environmental changes and increased exposure to allergens. More than 50,000 species of mite allergens have been described, and house dust mites, such

as *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) and *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*), are the most common among the known atopic allergens. These mites have been found in house dust samples worldwide, being more prevalent in warm and humid climates [6, 7, 4].

The human leukocyte antigen (HLA) system is a complex of several loci in the major histocompatibility complex (MHC) region of chromosome 6 in humans, whose encoded products are found in cell-surface molecules and subdivided into class I and II according to their molecular structure, tissue distribution, and biological function. This system is characterized by a high degree of polymorphism, uneven distribution of allele frequencies in the population, and prevalence of typical alleles in certain populations. HLA molecules are responsible for the presentation of peptides to immunocompetent T cells. In addition to interacting with natural killer cell receptors the HLA molecules are considered to play a key role in the adaptive immune response, since they are involved in the onset, maintenance, protection, or predisposition to certain diseases [8, 9, 10].

In a previous study, allelic and genotypic associations in pro-inflammatory (*IL1A*⁻⁸⁸⁹ and *IL2*⁻³³⁰), and anti-inflammatory (*IL4*⁻⁵⁹⁰, *IL4RA*⁺¹⁹⁰² and *IL10*⁻⁵⁹²) cytokine variants were observed in allergic individuals [11]. Considering that HLA molecules are also immune response genes and connect innate and adaptive immune responses, the prior results led us to the current study. In addition, no other study has yet distinguished between the three most frequent allergen sources in tropical regions.

It is worth mentioning that in the southern hemisphere, no database exists for the sensitization to the most important allergen sources, namely the different species of dust mites.

To date, some studies have investigated the relationship between HLA genes and sensitivity to dust mites (Table 1), however, the importance of these associations remains unclear. Considering that the identification of candidate genes in mite-sensitive individuals could reveal mechanisms of interaction between allergens and hosts, the aim of the present study was to conduct a genetic association study to investigate markers of immune response in HLA class I (-A, -B, and -C), and HLA class II (-DRB1) genes in individuals sensitive to dust mites (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, or *Blomia tropicalis*) compared to mite-insensitive controls.

2 METHODS

2.1 Ethical Considerations

The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Estadual de Maringá (protocol No. 412.420/2013) and conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent prior to their inclusion in the study. In the case of minors, under 18 years of age, written consent was obtained from their parents/legal guardian.

2.2 Participants, Inclusion and Exclusion Criteria

This cross-sectional study included 343 children (individuals under 14 years of age) and 53 adolescents and educators (individuals over 14 years of age) from 3 public institutions located in the city of Maringá (Paraná, southern Brazil: latitude 23° 25' 31" S and longitude 51° 56' 19" W) who voluntarily agreed to participate in the study. Individuals were randomly invited to participate, and 396 agreed to enter the study.

The exclusion criteria included consanguineous individuals and Asian descent. Whereas to the ethnical group, considering the rejection of subjects of Asian origin, all other

participants were considered to be white Brazilians, bearing in mind that, the Brazilian population is heterogeneous as well as highly mixed.

2.3 Allergy Testing, and Sample Collection

Each participant's sensitized status was determined by skin prick testing. At least 1 of the 3 tested mite allergens (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*) had to be positive. A positive response was defined as presence of erythema ranging from <15 mm (+) to >30 mm (++++). For each individual, a negative and a positive control parameter were tested. Reactions were read and noted by two specialists, 10 to 15 minutes after the reagents were applied, according to the manufacturer's instructions (Anthygenus™, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The mite-insensitive group consisted of individuals with no history of allergy and who showed no simultaneous reaction to the 3 allergens, serving as healthy controls.

Peripheral blood samples (10 mL) were collected from all individuals into tubes containing EDTA as anticoagulant. DNA was then extracted using the commercial kit (Biopur™, Reinach, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA (OD ratio 260/280 of 1.6-1.9) was adjusted to a concentration of 20 to 50 ng/μL.

2.4 HLA Class I and II Genotyping

HLA class I (HLA-A, -B, and -C) and class II (HLA-DRB1) were genotyped by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) using the commercial kit SSO LabType™ (One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

The amplified product was denatured and hybridized with microbeads linked to specific oligonucleotide probes for determination of HLA genotypes. Complementary products were detected by chemiluminescence and analyzed using the Luminex™ flow

cytometer (LabScan™ 100), and the results were interpreted using HLA Fusion™, version 3.1 (One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

2.5 Ambiguities

One of the alternatives to solve the ambiguities found in the PCR-SSO technique, was the use of PCR-SSP method [12] followed by PCR-SBT. When one of the ambiguities suggested unusual genotypes, it was adopted as a criterion the inclusion of the most common genotypes, based on our database of bone marrow donors. Most ambiguities of the HLA-B locus were resolved by specific primers of Bw4 group provided by the commercial kit SSO LabType™ (catalog RSSO1S4). In addition, allele and haplotype frequencies obtained were compared using the Allele Frequencies Net Database (AFND) (<http://www.allelefrequencies.net>).

2.6 Statistical Analysis

The high levels of polymorphism and strong linkage disequilibrium (LD) associated with the HLA loci must be taken specifically for this purpose when analyzed data for disease association studies, in order to avoid confounding results. Population analyses, including calculations of alleles and genotype frequencies, tests for fit to expectations under Hardy-Weinberg equilibrium, and estimations of haplotype frequencies, were the initial steps in this study involving immunogenetic data [13].

According to Hollenbach et al. [14], the second step was to use a contingency table to test the difference, or independence, of frequency distributions for categorical variables. This table was constructed utilizing raw counts data. The approach in this type of analysis for highly polymorphic immunogenetic data was to first examine heterogeneity in overall allele frequency distributions in cases *vs.* controls for a particular locus, using a $2 \times k$ row by

column ($r \times c$) contingency table, in OpenEpi software (version 3.01), available on: <http://www.openepi.com>.

For rare alleles, there is a particular difficulty, although the χ^2 test has been the standard approach for testing fit at the overall locus-level, this test can lead to false acceptance or rejection of the null hypothesis when the expected genotype counts in a contingency table are small (sparse cells), in accordance with Hollenbach et al. [14], the χ^2 test is inappropriate if any of the expected counts are less than one or if the expected counts are less than five in more than 20% of all cells in a contingency table. Albeit Yates' correction for continuity is sometimes applied to account for numerous sparse cells, this may be overly conservative, and the preferred method is to combine low frequency alleles into a single category, often referred to as the "binned" category.

Therefore, the conservative approach was respected, combining alleles with expected value of less than five in cases or controls into the binned category prior to calculation of the χ^2 statistic.

The degrees of freedom (DF) for the goodness of fit χ^2 analysis were calculated from the number of alleles with expected values in cases and controls of five or greater, plus the combined category, -1 (i.e., $k - 1$). A p-value was obtained by comparing the test statistic to the χ^2 distribution for the appropriate degrees of freedom.

Whereas to results that were significant at the overall locus level, additional testing were used 2×2 contingency tables for each allele (expected counts of five or more only) against all other alleles.

In Relative Predispositional Effects (RPE) analysis [15], by means of the OpenEpi software (version 3.01), alleles, haplotypes, or genotypes with the strongest predisposing (PRE) or protective (PRO) effects were sequentially removed from the analysis, until there is

no further significant heterogeneity detected either overall or for an individual allele, to reveal the relative predispositional effects of the HLA alleles that are associated with the disease.

Allele frequencies were determined by direct counting and compared using a 2×2 contingency table. The significance of the differences was evaluated using two-tailed Fisher's exact test [16], and *P*-values less than 0.05 were considered significant, obtained by use of the Epi Info™ (version 7.0). Odds ratio (OR) was calculated, with a 95% confidence interval (95%CI) according to Woolf [17], using Epi Info™ (version 7.0). Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the method described by Guo and Thompson [18] with the Arlequin software, version 3.5 [19].

Because the gametic phase is unknown, maximum-likelihood estimates of haplotype frequencies were obtained from multilocus genotype data and computed using the expectation-maximization (EM) algorithm [20], also using the Arlequin software, version 3.5 [19].

3 RESULTS

Of 396 individuals, 45.5% (180/396) were male and 54.5% (216/396) were female. A total of 249 (63%) were included as cases (individuals who were atopic to at least one mite) and 147 (37%) as controls (non-atopic individuals). There was no difference in sex distribution between cases and controls (*P* = 0.2509).

Regarding age, only 13% (53/396) of the total participants were adults, the group of sensitized individuals had a mean (SD) age of 12.5 (6.9) years (range, 4-48 years), while non-sensitized controls had a mean (SD) age of 11.5 (5.8) years (range, 5-37 years). There was no difference in age between the two groups (*P* = 0.1408).

Overall, 56% tested positive for *D. farinae*, 43% for *D. pteronyssinus*, 37% for *Blomia tropicalis*, and 29% for the 3 mites simultaneously.

The observed and expected frequencies between genotypes for loci A, B, C, and DRB1 showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in cases or controls, with *P*-values greater than 0.05.

The frequencies of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele groups were calculated and no differences were found between the populations studied, except for the DRB1 locus, which showed a statistically significant difference for the *DRB1*04* allele group (8.8% vs. 14.6%, *P* = 0.0135, OR = 0.56, and 95%CI = 0.36 – 0.88), when compared to sensitized individuals to at least one of the dust mites and controls (supplementary Table 1).

As shown in Table 2 (supplementary Table 2), when HLA-DRB1 high-resolution allele frequencies were compared, the most frequent allele in both case and control groups was *DR*07:01*, with 13.4% vs. 12.2%. However, the *DRB1*04:05* and *DRB1*04:11* alleles was significantly less frequent in cases (1.0% vs. 3.1%, *P* = 0.0481, OR = 0.32, and 95%CI = 0.10 – 0.96 and 1.2% vs. 4.4%, *P* = 0.0067, OR = 0.26, and 95%CI = 0.09 – 0.70), respectively.

For the DRB1 locus, the frequencies of HLA alleles were compared for each mite species (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*) separately. All species differed statistically, and were associated on resistance to sensitization.

The *DRB1*04* allele group had a negative association with allergy to *D. farinae* and *D. pteronyssinus* (*P* = 0.0339, OR = 0.60 and *P* = 0.0166, OR = 0.53), respectively (Tables 3 and 4). There was also a negative association between allergy to *Blomia tropicalis* and both the

*DRB1*04* allele group ($P = 0.0089$ and $OR = 0.49$) and the *DRB1*15* allele group ($P = 0.0295$ and $OR = 0.54$) (Table 5).

For the chi-square heterogeneity test, there were no significant heterogeneity in allele counts in HLA class I. However, for the HLA class II, the *DRB1* locus (in high-resolution) was the only one to show significant differences between cases and controls ($\chi^2 = 45.26$ e $P = 0.0006$) (Table 6).

In Relative Predispositional Effects (RPE) analysis, no significant heterogeneity was detected when *DRB1*04:11* was removed, revealing the relative predispositional effects of this HLA allele associated with the disease. The results of *DRB1*04:11* in the chi-square test using 2×2 contingency table were: 1.2% vs. 4.4%, $P = 0.0042$, $OR = 0.26$, and 95% $CI = 0.09 - 0.70$.

In relation to haplotypes, no significant difference was found between mite-sensitive and mite-insensitive individuals, and the most frequent haplotype was *HLA-A*01 B*08 C*07 DRB1*03*, with 2.2% vs. 2.4%, respectively (supplementary Table 3).

The genotype and allele frequencies of HLA-C killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) ligands, called C1 and C2, were also compared; however, no significant difference was found.

Finally, analyses based on a series of 2×2 tests requires corrections for multiple comparisons (usually utilizing the Bonferroni method), with a correction factor minimally equivalent to the number of alleles tested. However, when significance of the association of all individual alleles was assessed with a priori knowledge of *overall* heterogeneity at the locus, it was not necessary to correct for multiple comparisons in subsequent 2×2 tests

intended to identify the allele(s) with significant contributions to the overall deviation at the locus [14, 21].

4 DISCUSSION

Allergy is a complex phenomenon with manifestations involving the skin, digestive tract, and even the eyes (among many other sites). It is considered a multifactorial condition whose onset and severity are influenced by both genetic and environmental factors [22].

The production of IgE antibodies against allergens from house dust mites is closely involved in the development of atopic asthma and rhinitis. Although several family-based studies have confirmed the participation of genetic control in this response, the mechanism that explains this relationship remains to be fully elucidated [23].

Ninety percent of asthmatic children show signs of IgE-mediated allergy to inhaled proteins, described as allergens [24]. It is known that these specific IgE responses to allergens provide useful models for understanding the genetic factors that control immune responses [25].

Solé et al. [26], in a study on the epidemiology of asthma in the Brazilian pediatric population, reported that the mean prevalence of asthma in Brazilian adolescents remains among the highest averages in the world. The study points out that living in a rural environment is a protective factor in the development of asthma and allergic diseases. Another nationwide survey, which included children and adolescents treated at different Brazilian allergy centers, showed positivity rates of 66.7% for *D. pteronyssinus*, 64.5% for *D. farinae*, and 55.2% for *Blomia tropicalis* [27].

In our previous studies, we found a strong association with single nucleotide polymorphisms (SNPs) of cytokines in mite-sensitive individuals. In particular, IL-4 [11],

which is involved in IgE production of B cells, is associated with mite-sensitivity. The immunological reaction triggered by the interaction of HLA and peptide may alter the presentation to CD4+ T cells and consequently the activation of certain cytokines.

HLA class I and II genes have been revealed as candidates for involvement in the etiology of allergic respiratory diseases, such as asthma [28, 29]. Initially, a relationship between HLA class II molecules and IgE responses was observed in patients sensitized to allergens. Later, different studies involving epidemiological investigation revealed a number of HLA-DR and DQ genes that were able to restrict the recognition of allergens from house dust mites [23].

Other studies already reported the involvement of HLA-DRB1 allele group in individuals with diagnosis of rhinoconjunctivitis and/or bronchial asthma and a positive skin prick test [30]. Another finding, described that *HLA-DRB1*03:01* plays an important function in Th2-predominant immune response to house dust mite [31], as well as *HLA-DRB1*07* with susceptibility to and *DRB1*04* and *DRB1*14* as protective factors against the development of allergy to *D. pteronyssinus* [23].

In the present study, when mite species were evaluated individually, the *DRB1*04* allele group showed a protective effect for all of 3 mites (*D. farinae*, *D. pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*). When high-resolution allele frequencies were compared, the *DRB1*04:11* allele was significantly different between cases and controls. In our Brazilian population, the frequency of this allele is approximately 1.7%, being a typical allele in Amerindian populations in South America. High frequencies of this allele have been observed among the Guarani-M'yba (26.8%) of Brazil, the Ache (74.1%) of Paraguay, and the Yucpa (60.2%) of Venezuela. Considering that this allele would be more advantageous to the survival of individuals exposed to greater environmental adversity, it is possible to make an association

between the effect of the diversifying selection pressure exerted by pathogens, the overdominance effect of HLA genes, and frequency-dependent selection [32].

In a Korean research with 178 atopic individuals (to *D. pteronyssinus*) and 99 non-atopic controls, Kim et al. [23] suggested a strong negative association (27.5% vs. 45.5%, $P = 0.002$) for *DRB1*04*. In another study, with the same researchers, investigating Koreans with asthma induced by the citrus red mite, negative association was also observed for the same allele group (19.8% vs. 40.8%, $P_c = 0.01$) [25]. In Hungary, Bede et al. [33] conducted a case-control study involving 57 patients with bronchial asthma caused by mite allergy and two control groups, one with 57 non-atopic children and the other with 45 mite-insensitive asthmatic children, to examine the frequencies of *DRB1*07* and *DRB1*04* alleles groups. The authors found a negative association for the *DRB1*04* allele group when frequencies were compared between cases and non-atopic controls ($P = \leq 0.01$ and OR = 0.21). These findings are consistent with the present results, since, according to OR values, the *DRB1*04* allele group was associated as a protective gene for the disease.

Parapanissiou et al. [34], investigated 60 Greek children with allergic bronchial asthma due to mite sensitivity (*D. farinae* and *D. pteronyssinus*) and 125 controls, they observed an important factor in susceptibility to asthma with sensitivity to mites related to *DRB1*04*.

Concerning diverging results, it is understood that the allelic group ranges a great variety of alleles, which only through high-resolution could the association be determined. Moreover, it is to be considered that our results displayed association to the *DRB1*04:11* allele which is only found in Amerindian populations.

In addition to being associated with protection against allergic respiratory disease, the *DRB1*04* allele group is also an important marker of susceptibility to other diseases, such as

rheumatoid arthritis. Studies conducted in Korea ($P < 0.00005$) [35], in China [36], in Japan [37], and in Hungary [38] have well elucidated the association of this gene with susceptibility to rheumatoid arthritis.

Soriano et al. [39], in a study conducted in Spain after 26 outbreaks of asthma caused by the inhalation of soybean dust, affecting 688 individuals, raised the hypothesis that a genetic determinant, in this case the HLA class II molecules, could have influenced the susceptible individuals. Indeed, their results showed that the risk of epidemic asthma was particularly associated with the *DRB1*13* gene ($P < 0.02$). In the present study, this gene also showed a tendency towards positive association with mite allergy but the allele *DRB1*13:01* was excluded after the heterogeneity test was applied.

The HLA-DR alleles have also been investigated by researchers from China, who evaluated the association between tumor necrosis factor, HLA-DR molecules, and IgE-mediated asthma in 80 Taiwanese adolescents with asthma and 69 without asthma. The *DRB1*13* gene showed a positive association (11.3% vs. 1.5%; $P = 0,021$) and was related to both high dust-mite-specific IgE and high total serum IgE, especially for *D. farinae* [40], findings that are in contrast to the results observed in the current study.

The *DRB1*15*, in the present study, was associated with a resistance effect in the development of hypersensitivity to *Blomia tropicalis*, but after the heterogeneity test, it was disregarded. This gene was also investigated in a case-control study involving 103 children with asthma and 152 controls, and the results showed a negative association with asthma (35% vs. 80%, $P = 0.003$, OR = 0.46, and 95%CI = 0.28 – 0.78) [41]. Reinforcing such evidence, Kalpaklıoğlu et al. [42] revealed that for this given gene, a relation of resistance between cockroach sensitivity and cutaneous reactivity to aeroallergens ($P < 0.001$). In addition, *DRB1*15* was also reported to play a protective role in the development of asthma

in the Asian Indian population, since this is the most common class II allele in this population, which may explain the lower incidence of asthma compared to other regions of the world [43].

Finally, this study allows us to expand our horizons in the understanding of the immune response and sensitivity to dust mite, in the future we may be able to analyze the complex interaction of the effector sites of the HLA molecule with different peptides. Other genetic markers of immune response may also be investigated, such as MICA and KIR genes, to better understand the relationship between gene expression and allergy.

For the elucidation of the obtained data, we suggest further studies in different populations, for example, the Amerindians, using high-resolution methodology for defining alleles. Our results could be the basis for a three-dimensional study of analysis of HLA epitopes with the peptides, and the interrelation with clinical and laboratory aspects (IgE and cytokines).

In conclusion, our results support previously reported associations between the *DRB1*04* allele group and protection against developing IgE-mediated allergy to *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*.

5 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all the participants for their contribution to the study.

5.1 Funding

This work was supported by Araucária Foundation [Agreement 268/14 Protocol 37803 - 24/2012 Project Number].

6 REFERENCES

- [1] A.C. Goldberg, J. Kalil, *Imunogenética*, in: M. Geller, M. Scheinberg (Eds.), *Diagnóstico e tratamento das doenças imunológicas: para médicos, pediatras e residentes*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2005, pp. 21-25.
- [2] J. Hoh, J. Ott, Genetic dissection of diseases: design and methods, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14 (2004) 229-232.
- [3] D.D. Chaplin, Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) S3-23.
- [4] T.G. Parslow, D.P. Stites, A.I. Terr, J.B. Imboden, *Imunologia médica*, tenth ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- [5] D.Y. Wang, Risk factors of allergic rhinitis: genetic or environmental?, *Ther. Clin. Risk Manag.* 1 (2005) 115-123.
- [6] J. Bousquet, H.J. Schünemann, B. Samolinski, P. Demoly, C.E. Baena-Cagnani, C. Bachert, S. Bonini, L.P. Boulet, P.J. Bousquet, J.L. Brozek, G.W. Canonica, T.B. Casale, A.A. Cruz, W.J. Fokkens, J.A. Fonseca, R.G. van Wijk, L. Grouse, T. Haahtela, N. Khaltaev, P. Kuna, R.F. Lockey, K.C. Lodrup Carlsen, J. Mullol, R. Naclerio, R.E. O’Hehir, K. Ohta, S. Palkonen, N.G. Papadopoulos, G. Passalacqua, R. Pawankar, D. Price, D. Ryan, F.E. Simons, A. Togias, D. Williams, A. Yorgancioglu, O.M. Yusuf, W. Aberer, M. Adachi, I. Agache, N. Aït-Khaled, C.A. Akdis, A. Andrianarisoa, I. Annesi-Maesano, I.J. Ansotegui, I. Baiardini, E.D. Bateman, A. Bedbrook, B. Beghé, M. Beji, E.H. Bel, A. Ben Kheder, K.S. Bennoor, K.C. Bergmann, F. Berrissoul, T. Bieber, C. Bindslev Jensen, M.S. Blaiss, A.L. Boner, J. Bouchard, F. Braido, C.E. Brightling, A. Bush, F. Caballero, M.A. Calderon, M.A. Calvo, P.A. Camargos, L.R. Caraballo, K.H. Carlsen, W. Carr, A.M. Cepeda, A. Cesario, N.H. Chavannes, Y.Z. Chen, A.M. Chiriac, T. Chivato Pérez, E. Chkhartishvili, G. Ciprandi, D.J. Costa, L. Cox, A. Custovic, R. Dahl, U. Darsow, F. De Blay, D. Deleanu, J.A. Denburg, P. Devillier, T. Didi, D. Dokic, W.K. Dolen, H. Douagui, R. Dubakiene, S.R. Durham, M.S. Dykewicz, Y. El-Gamal, A. El-Meziane, R. Emuzyte, A. Fiocchi, M. Fletcher, T. Fukuda, A. Gamkrelidze, J.E. Gereda, S. González Diaz, M. Gotua, M.A. Guzmán, P.W. Hellings, B. Hellquist-Dahl, F. Horak, J.O. Hourihane, P. Howarth, M. Humbert, J.C. Ivancevich, C. Jackson, J. Just, O. Kalayci, M.A. Kaliner, A.F. Kalyoncu, T. Keil, P.K. Keith, G. Khayat, Y.Y. Kim, B. Koffi N’goran, G.H. Koppelman, M.L. Kowalski, I. Kull, V. Kvedariene, D. Larenas-Linnemann, L.T. Le, C. Lemièrre, J. Li, P. Lieberman, B. Lipworth, B. Mahboub, M.J. Makela, F. Martin, G.D. Marshall, F.D. Martinez, M.R. Masjedi, M. Maurer, S. Mavale-Manuel, A. Mazon, E. Melen, E.O. Meltzer, N.H. Mendez, H. Merk, F. Mihaltan, Y. Mohammad, M. Morais-Almeida, A. Muraro, S. Nafti, L. Namazova-Baranova, K. Nekam, A. Neou, B. Niggemann, E. Nizankowska-Mogilnicka, T.D. Nyembue, Y. Okamoto, K. Okubo, M.P. Orru, S. Ouedraogo, C. Ozdemir, P. Panzner, I. Pali-Schöll, H.S. Park, B. Pigearias, W. Pohl, T.A. Popov, D.S. Postma, P. Potter, K.F. Rabe, J. Ratomaharo, S. Reitamo, J. Ring, R. Roberts, B. Rogala, A. Romano, M. Roman Rodriguez, J. Rosado-Pinto, L. Rosenwasser, M. Rottem, M.

Sanchez-Borges, G.K. Scadding, P. Schmid-Grendelmeier, A. Sheikh, J.C. Sisul, D. Solé, T. Sooronbaev, V. Spicak, O. Spranger, R.T. Stein, S.W. Stoloff, J. Sunyer, A. Szczeklik, A. Todo-Bom, E. Toskala, Y. Tremblay, R. Valenta, A.L. Valero, D. Valeyre, A. Valiulis, E. Valovirta, P. Van Cauwenberge, O. Vandenplas, C. van Weel, P. Vichyanond, G. Viegi, D.Y. Wang, M. Wickman, S. Wöhrl, J. Wright, B.P. Yawn, P.K. Yiallourous, H.J. Zar, M.E. Zernotti, N. Zhong, M. Zidarn, T. Zuberbier, P.G. Burney, S.L. Johnston, J.O. Warner; World Health Organization Collaborating Center for Asthma and Rhinitis, Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA): achievements in 10 years and future needs, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2012) 1049-1062.

[7] C.C.T. Souza, N.A.R Filho, Perfil de aeroalérgenos intradomiciliares comuns no Brasil: revisão dos últimos 20 anos, *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.* 35 (2012) 47-52.

[8] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, third ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, 2009.

[9] T. Profaizer, D. Eckels, HLA alleles and drug hypersensitivity reactions, *Int. J. Immunogenet.* 39 (2012) 99-105.

[10] A.M. Krensky, The HLA system, antigen processing and presentation, *Kidney Int. Suppl.* 58 (1997) S2-7.

[11] M.C. Caniatti, A.A. Marchioro, A.L. Guilherme, L.T. Tsuneto, Association of cytokines in individuals sensitive and insensitive to dust mites in a Brazilian population, *PLoS One* 9 (2014) e107921.

[12] M. Bunce, C.M. O'Neill, M. C. Barnardo, P. Krausa, M. J. Browning, P. J. Morris, K. I. Welsh. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP), *Tissue Antigens* 46 (1995) 355-367.

[13] J.A. Hollenbach, S.D. Thompson, T.L. Bugawan, M. Ryan, M. Sudman, M. Marion, C.D. Langefeld, G. Thomson, H.A. Erlich, D.N. Glass, Juvenile idiopathic arthritis and HLA class I and class II interactions and age-at-onset effects, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 1781-1791.

[14] J.A. Hollenbach, S.J. Mack, G. Thomson, P.A. Gourraud, Analytical methods for disease association studies with immunogenetic data, *Methods Mol. Biol.* 882 (2012) 245-266.

[15] H. Payami, S. Joe, N.R. Farid, V. Stenszky, S.H. Chan, P.P. Yeo, J.S. Cheah, G. Thomson, Relative predispositional effects (RPEs) of marker alleles with disease: HLA-DR alleles and Graves disease, *Am. J. Hum. Genet.* 45 (1989) 541-546.

[16] R.A. Fisher, On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P, *J. R. Stat. Soc.* 85 (1922) 87-94.

[17] B. Woolf, On estimating the relation between blood group and disease, *Ann. Hum. Genet.* 19 (1955) 251- 253.

- [18] S.W. Guo, E.A. Thompson, A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 1111–1126.
- [19] L. Excoffier, H.E. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Resour.* 10 (2010) 564–567.
- [20] L. Excoffier, M. Slatkin, Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population, *Mol. Biol. Evol.* 12 (1995) 921–927.
- [21] G. Thomson, N. Marthandan, J.A. Hollenbach, S.J. Mack, H.A. Erlich, R.M. Single, M.J. Waller, S.G. Marsh, P.A. Guidry, D.R. Karp, R.H. Scheuermann, S.D. Thompson, D.N. Glass, W. Helmborg, Sequence feature variant type (SFVT) analysis of the HLA genetic association in juvenile idiopathic arthritis, *Pac. Symp. Biocomput.* (2010) 359–370.
- [22] H.D. Shin, L.H. Kim, B.L. Park, Y.H. Choi, H.S. Park, S.J. Hong, B.W. Choi, J.H. Lee, C.S. Park, Association of interleukin 18 (IL18) polymorphisms with specific IgE levels to mite allergens among asthmatic patients, *Allergy* 60 (2005) 900–906.
- [23] Y.K. Kim, H.B. Oh, S.Y. Oh, S.H. Cho, Y.Y. Kim, K.U. Min, HLA-DRB1*07 may have a susceptibility and DRB1*04 a protective effect upon the development of a sensitization to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Clin. Exp. Allergy* 31 (2001) 110–115.
- [24] M.F. Moffatt, J.A. Faux, S. Lester, P. Paré, J. McCluskey, R. Spargo, A. James, A.W. Musk, W.O. Cookson, Atopy, respiratory function and HLA-DR in Aboriginal Australians, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 625–630.
- [25] S.H. Cho, Y.K. Kim, H.B. Oh, J.W. Jung, J.W. Son, M.H. Lee, H.S. Jee, Y.Y. Kim, K.U. Min, Association of HLA-DRB1(*)07 and DRB1(*)04 to citrus red mite (*Panonychus citri*) and house dust mite sensitive asthma, *Clin. Exp. Allergy* 30 (2000) 1568–1575.
- [26] D. Solé, I.C. Camelo-Nunes, G.F. Wandalsen, M.C. Mallozi, Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), *Rev. Paul. Pediatr.* 32 (2014) 114–125.
- [27] C.K. Naspitz, D. Solé, C.A. Jacob, E. Sarinho, F.J. Soares, V. Dantas, M.C. Mallozi, N.F. Wandalsen, W. Borges, W. Rocha Filho, Grupo PROAL, Sensitization to inhalant and food allergens in Brazilian atopic children by in vitro total and specific IgE assay - Allergy Project – PROAL, *J. Pediatr.* 80 (2004) 203–210.
- [28] G.A.O. Jinming, L.I.N. Yaoguang, Q.I.U. Changchun, L.I.U. Yiwen, M.A. Yi, L.I.U. Ying, Association between HLA-DQA1, -DQB1 gene polymorphisms and susceptibility to asthma in northern Chinese subjects, *Chin. Med. J.* 116 (2003) 1078–1082.
- [29] A.M. Little, P. Parham, Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules, *Rev. Immunogenet.* 1 (1999) 105–123.

- [30] M.J. Torres-Galván, J. Quiralte, C. Blanco, R. Castillo, T. Carrillo, P. Pérez-Aciego, F. Sánchez-García, Pocket 4 in the HLA-DRB1 antigen-binding groove: an association with atopy, *Allergy* 55 (2000) 398-401.
- [31] G. Rajagopalan, A.Y. Tilahun, K. Iijima, C.S. David, H. Kita, Y.J. Juhn, HLA-DR polymorphism modulates response to house dust mites in a transgenic mouse model of airway inflammation, *Tissue Antigens* 77 (2011) 589-592.
- [32] L.T. Tsuneto, C.M. Probst, M.H. Hutz, F.M. Salzano, L.A. Rodriguez-Delfin, M.A. Zago, K. Hill, A.M. Hurtado, A.K. Ribeiro-dos-Santos, M.L. Petzl-Erler, HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché, *Tissue Antigens* 62 (2003) 512-526.
- [33] O. Bede, K. Gyurkovits, E. Endreffy, Frequencies of HLA-DR7 and HLA-DR4 Alleles in Hungarian Asthmatic Children with Mite Allergy, *Int. J. Hum. Genet.* 2 (2002) 45-48.
- [34] E. Parapanissiou, T. Papastavrou, A. Deligiannidis, K. Adam, F. Kanakoudi, M. Daniilidis, Z. Polymenidis, HLA antigens in Greek children with allergic bronchial asthma, *Tissue Antigens* 65 (2005) 481-484.
- [35] G.H. Hong, M.H. Park, F. Takeuchi, M.D. Oh, Y.W. Song, H. Nabeta, K. Nakano, K. Ito, K.S. Park, Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value, *J. Rheumatol.* 23 (1996) 1699-1703.
- [36] Y. Zhou, L. Tan, Q. Que, H. Li, L. Cai, L. Cao, Q. Ye, J. Xiong, Study of association between HLA-DR4 and DR53 and autoantibody detection in rheumatoid arthritis, *J. Immunoassay Immunochem.* 34 (2013) 126-133.
- [37] C. Terao, K. Yano, K. Ikari, M. Furu, N. Yamakawa, S. Yoshida, M. Hashimoto, H. Ito, T. Fujii, K. Ohmura, K. Yurugi, Y. Miura, T. Maekawa, A. Taniguchi, S. Momohara, H. Yamanaka, T. Mimori, F. Matsuda, Brief Report: Main Contribution of DRB1*04:05 Among the Shared Epitope Alleles and Involvement of DRB1 Amino Acid Position 57 in Association With Joint Destruction in Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis, *Arthritis Rheumatol.* 67 (2015) 1744-1750.
- [38] A. Kapitány, E. Zilahi, S. Szántó, G. Szücs, Z. Szabó, A. Végvári, P. Rass, S. Sipka, G. Szegedi, Z. Szekanecz, Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1051 (2005) 263-270.
- [39] J.B. Soriano, G. Ercilla, J. Sunyer, F.X. Real, C. Lázaro, M.J. Rodrigo, X. Estivill, J. Roca, R. Rodríguez-Roisín, F. Morell, J.M. Antó, HLA Class II Genes in Soybean Epidemic Asthma Patients, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 (1997) 1394-1398.
- [40] Y.C. Lin, C.C. Lu, H.J. Su, C.Y. Shen, H.Y. Lei, Y.L. Guo, The association between tumor necrosis factor, HLA-DR alleles, and IgE-mediated asthma in Taiwanese adolescents, *Allergy* 57 (2002) 831-834.

- [41] M.N. Mishra, P. Dudeja, R.K. Gupta, Association of HLA-Class II and IgE serum levels in pediatric asthma, *Iran J. Immunol.* 11 (2014) 21-28.
- [42] A.F. Kalpaklıođlu, M. Turan, Possible association between cockroach allergy and HLA class II antigens, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89 (2002) 155-158.
- [43] S.R. Kankonkar, U. Shankarkumar, HLA DRB1 Gene study in different population groups from Mumbai, Maharashtra, India, *Int. J. Hum. Genet.* 5 (2005) 267-271.
- [44] R.P. Young, J.W. Dekker, B.P. Wordsworth, C. Schou, K.D. Pile, F. Matthiesen, W.M. Rosenberg, J.I. Bell, J.M. Hopkin, W.O. Cookson, HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens, *Clin. Exp. Allergy* 24 (1994) 431-439.
- [45] M.L. Lara-Marquez, J.J. Yunis, Z. Layrisse, F. Ortega, E. Carvallo-Gil, S. Montagnani, N.J. Makhatadze, M. Pocino, C. Granja, E. Yunis, Immunogenetics of atopic asthma: association of DRB1*1101 DQA1*0501 DQB1*0301 haplotype with *Dermatophagoides* spp.-sensitive asthma in a sample of the Venezuelan population, *Clin. Exp. Allergy* 29 (1999) 60-71.
- [46] Y. Zhao, Y. Zhao, J. Li, Y. Zhang, L. Zhang, HLA-DRB1*08:03:02 and HLA-DQB1*06:01:01 are associated with house dust mite-sensitive allergic rhinitis in Chinese subjects, *Int. Forum Allergy Rhinol.* (2016) 854-861.
- [47] V. Stephan, V. Schmid, T. Frischer, S. Sparholt, J. Forster, V. Wahn, J. Kuehr, Mite allergy, clinical atopy, and restriction by HLA class II immune response genes, *Pediatr Allergy Immunol.* 7 (1996) 28-34.

Table 1. Overview of HLA-DRB1 data associated with sensitization to house dust mites.

HLA alleles groups	OR	P	Investigation
<i>DRB1*04</i>	<1	0.002	Development of a sensitization to house dust mite <i>D. pteronyssinus</i> [23]. The risk of developing asthma in citrus red mite-exposed adults [25]. HLA-DR genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens [44].
	<1	0.010*	
	>1	0.006	
<i>DRB1*07</i>	>1	0.009	Development of a sensitization to house dust mite <i>D. pteronyssinus</i> [23]. The risk of developing asthma in citrus red mite-exposed adults [25].
	>1	0.010*	
<i>DRB1*11</i>	>1	0.020*	The influence of the MHC class I and class II genes in the susceptibility to atopic asthma in a Venezuelan population [45].
<i>DRB1*13</i>	>1	0.021	The association between tumor necrosis factor, HLA-DR alleles, and IgE-mediated asthma in Taiwanese adolescents [40].
<i>DRB1*14</i>	<1	0.020	Development of a sensitization to house dust mite <i>D. pteronyssinus</i> [23].
HLA allele	OR	P	Investigation
<i>DRB1*08:03:02</i>	>1	0.009	Association between HLA

HLA haplotypes	OR	P	Investigation
<i>DRB1*11:01/DQA1*05:01/DQB1*03:01</i>	>1	< 0.010*	class II genes alleles and Allergic rhinitis in house dust mites sensitive Chinese subjects [46].
<i>DRB1*11:01/DQA1*05:01/DQB1*03:01</i>	>1	< 0.010*	The influence of the MHC class I and class II genes in the susceptibility to atopic asthma in a Venezuelan population [45].
<i>DRB*01/DRB1*03/DRB1*11</i>	>1	< 0.010	The relevance of HLA-class II molecules to the regulation of immune response to the mite allergen <i>D. pteronyssinus</i> and to clinical atopic disorders [47].
<i>DQB *03:03/*05:03, DRB1 *02/DRB1*07, and DPB* 04:02</i>	<1	< or = 0.01	The relevance of HLA-class II molecules to the regulation of immune response to the mite allergen <i>D. pteronyssinus</i> and to clinical atopic disorders [47].

*Corrected P value; OR= odds ratio.

Table 2. Allele frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*, and controls.

HLA	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95%CI
	n= 249	%	n= 147	%			
<i>DRB1*01:01</i>	31	6.2	15	5.1	0.6374	1.23	0.65-2.32
<i>DRB1*01:02</i>	20	4.0	8	2.7	0.4273	1.49	0.65-3.44
<i>DRB1*03:01</i>	41	8.2	28	9.5	0.6021	0.85	0.51-1.41
<i>DRB1*04:04</i>	6	1.2	9	3.1	0.1017	0.38	0.13-1.09
<i>DRB1*04:05</i>	5	1.0	9	3.1	0.0481*	0.32	0.10-0.96
<i>DRB1*04:11</i>	6	1.2	13	4.4	0.0067*	0.26	0.09-0.70
<i>DRB1*07:01</i>	67	13.4	36	12.2	0.6629	1.11	0.72-1.71
<i>DRB1*08:01</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>DRB1*08:04</i>	7	1.4	10	3.4	0.0758	0.40	0.15-1.07
<i>DRB1*09:01</i>	7	1.4	10	3.4	0.0758	0.40	0.15-1.07
<i>DRB1*10:01</i>	8	1.6	8	2.7	0.3032	0.58	0.21-1.57
<i>DRB1*11:01</i>	43	8.6	17	5.8	0.1651	1.53	0.86-2.75
<i>DRB1*11:02</i>	9	1.8	8	2.7	0.4494	0.65	0.25-1.72
<i>DRB1*11:04</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>DRB1*13:01</i>	39	7.8	12	4.1	0.0503	1.99	1.02-3.87
<i>DRB1*13:02</i>	19	3.8	9	3.1	0.6920	1.25	0.56-2.81
<i>DRB1*14:01</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>DRB1*15:01</i>	25	5.0	22	7.5	0.1637	0.65	0.36-1.18
<i>DRB1*15:03</i>	11	2.2	13	4.4	0.0884	0.48	0.21-1.10
Binned	118	23.9	43	14.6	0.0018*	1.83	1.24-2.68

HLA= human leukocyte antigen; OR= odds ratio; *P*= two-tailed Fisher's exact test; 95%CI= 95% confidence interval; Binned= sum of values < 5 in cases or controls.

Table 3. Allele group frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to *Dermatophagoides farinae* and controls.

HLA	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95%CI
	n= 223	%	n= 147	%			
<i>DRB1*01</i>	52	11.7	23	7.8	0.1055	1.55	0.92-2.60
<i>DRB1*03</i>	42	9.4	31	10.5	0.6165	0.88	0.54-1.43
<i>DRB1*04</i>	42	9.4	43	14.6	0.0339*	0.60	0.38-0.95
<i>DRB1*07</i>	61	13.7	36	12.2	0.6563	1.13	0.73-1.76
<i>DRB1*08</i>	33	7.4	24	8.2	0.7783	0.89	0.51-1.55
<i>DRB1*09</i>	7	1.6	10	3.4	0.1323	0.45	0.17-1.20
<i>DRB1*10</i>	5	1.1	8	2.7	0.1508	0.40	0.13-1.25
<i>DRB1*11</i>	60	13.5	34	11.6	0.4991	1.18	0.75-1.86
<i>DRB1*13</i>	59	13.2	26	8.8	0.0771	1.57	0.96-2.55
<i>DRB1*14</i>	19	4.3	10	3.4	0.6993	1.26	0.57-2.75
<i>DRB1*15</i>	42	9.4	38	12.9	0.1469	0.70	0.43-1.11
<i>DRB1*16</i>	13	2.9	7	2.4	0.8178	1.23	0.48-3.12
Binned	11	2.5	4	1.4	0.4255	1.83	0.57-5.81

HLA= human leukocyte antigen; OR= odds ratio; *P*= two-tailed Fisher's exact test; 95%CI= 95% confidence interval; Binned= sum of values < 5 in cases or controls.

Table 4. Allele group frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to *Dermatophagoides pteronyssinus* and controls.

HLA	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95%CI
	n= 174	%	n= 147	%			
<i>DRB1*01</i>	35	10.1	23	7.8	0.3374	1.31	0.75-2.28
<i>DRB1*03</i>	36	10.3	31	10.5	1.0000	0.97	0.58-1.62
<i>DRB1*04</i>	29	8.3	43	14.6	0.0166*	0.53	0.32-0.87
<i>DRB1*07</i>	50	14.4	36	12.2	0.4857	1.20	0.75-1.90
<i>DRB1*08</i>	25	7.2	24	8.2	0.6572	0.87	0.48-1.55
<i>DRB1*09</i>	5	1.4	10	3.4	0.1194	0.41	0.13-1.22
<i>DRB1*10</i>	6	1.7	8	2.7	0.4264	0.62	0.21-1.82
<i>DRB1*11</i>	48	13.8	34	11.6	0.4092	1.22	0.76-1.95
<i>DRB1*13</i>	46	13.2	26	8.8	0.1022	1.57	0.94-2.61
<i>DRB1*14</i>	11	3.2	10	3.4	1.0000	0.92	0.38-2.21
<i>DRB1*15</i>	36	10.3	38	12.9	0.3230	0.77	0.47-1.26
<i>DRB1*16</i>	12	3.4	7	2.4	0.4893	1.46	0.56-3.76
Binned	9	2.6	4	1.4	0.4004	1.92	0.58-6.31

HLA= human leukocyte antigen; OR= odds ratio; *P*= two-tailed Fisher's exact test; 95%CI= 95% confidence interval; Binned= sum of values < 5 in cases or controls.

Table 5. Allele group frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to *Blomia tropicalis* and controls.

HLA	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95%CI
	n= 148	%	n= 147	%			
<i>DRB1*01</i>	37	12.5	23	7.8	0.0760	1.68	0.97-2.91
<i>DRB1*03</i>	33	11.1	31	10.5	0.8948	1.06	0.63-1.78
<i>DRB1*04</i>	23	7.8	43	14.6	0.0089*	0.49	0.28-0.83
<i>DRB1*07</i>	41	13.9	36	12.2	0.6253	1.15	0.71-1.86
<i>DRB1*08</i>	21	7.1	24	8.2	0.6449	0.85	0.46-1.57
<i>DRB1*09</i>	7	2.4	10	3.4	0.4730	0.68	0.25-1.83
<i>DRB1*11</i>	44	14.9	34	11.6	0.2741	1.33	0.82-2.15
<i>DRB1*13</i>	36	12.2	26	8.8	0.2269	1.42	0.83-2.43
<i>DRB1*14</i>	12	4.1	10	3.4	0.8286	1.20	0.51-2.82
<i>DRB1*15</i>	22	7.4	38	12.9	0.0295*	0.54	0.31-0.93
<i>DRB1*16</i>	7	2.4	7	2.4	1.0000	0.99	0.34-2.86
Binned	13	4.4	12	4.1	1.0000	1.07	0.48-2.40

HLA= human leukocyte antigen; OR= odds ratio; *P*= two-tailed Fisher's exact test; 95%CI= 95% confidence interval; Binned= sum of values < 5 in cases or controls.

Table 6. Heterogeneity test by chi-square for HLA class I and II.

Locus	Chi-square (χ^2)	DF	<i>P</i>
HLA-A	16.69	12	0.1615
HLA-B	24.19	22	0.3374
HLA-C	16.61	13	0.2176
HLA-DRB1 ¹	45.26	19	0.0006*

DF= degrees of freedom; *P*= Uncorrected p-value from the chi-square test of heterogeneity.

¹High-resolution.

Supplementary Table 1. Allele group frequencies of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*, and controls.

HLA	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95%CI
	n= 249	%	n= 147	%			
A*01	47	9.4	30	10.2	0.7117	0.91	0.56-1.48
A*02	118	23.7	75	25.5	0.6073	0.90	0.64-1.26
A*03	45	9.0	29	9.9	0.7060	0.90	0.55-1.48
A*11	31	6.2	13	4.4	0.3367	1.43	0.73-2.78
A*23	25	5.0	15	5.1	1.0000	0.98	0.50-1.89
A*24	47	9.4	21	7.1	0.2952	1.35	0.79-2.31
A*25	5	1.0	6	2.0	0.3455	0.48	0.14-1.60
A*26	15	3.0	9	3.1	1.0000	0.98	0.42-2.27
A*29	28	5.6	14	4.8	0.7430	1.19	0.61-2.30
A*30	27	5.4	12	4.1	0.4972	1.34	0.67-2.70
A*31	19	3.8	16	5.4	0.2879	0.68	0.34-1.36
A*32	19	3.8	6	2.0	0.2088	1.90	0.75-4.82
A*33	23	4.6	10	3.4	0.4655	1.37	0.64-2.93
A*34	4	0.8	6	2.0	0.1862	0.38	0.10-1.38
A*36	3	0.6	2	0.7	1.0000	0.88	0.14-5.32
A*68	33	6.6	25	8.5	0.3269	0.76	0.44-1.31
A*74	9	1.8	5	1.7	1.0000	1.06	0.35-3.20
HLA	n= 249	%	n= 147	%	<i>P</i>	OR	95%CI
B*07	30	6.0	28	9.5	0.0893	0.60	0.35-1.04
B*08	24	4.8	16	5.4	0.7380	0.87	0.45-1.68
B*13	13	2.6	5	1.7	0.4691	1.54	0.54-4.39

<i>B*14</i>	33	6.6	16	5.4	0.5448	1.23	0.66-2.28
<i>B*15</i>	42	8.4	29	9.9	0.5209	0.84	0.51-1.38
<i>B*18</i>	32	6.4	10	3.4	0.0721	1.95	0.94-4.02
<i>B*27</i>	17	3.4	9	3.1	0.8397	1.11	0.49-2.54
<i>B*35</i>	58	11.6	29	9.9	0.4815	1.20	0.75-1.92
<i>B*37</i>	5	1.0	3	1.0	1.0000	0.98	0.23-4.14
<i>B*38</i>	7	1.4	2	0.7	0.4967	2.08	0.42-10.08
<i>B*39</i>	12	2.4	6	2.0	0.8100	1.18	0.44-3.19
<i>B*40</i>	26	5.2	13	4.4	0.7345	1.19	0.60-2.35
<i>B*41</i>	3	0.6	4	1.4	0.4336	0.43	0.09-1.97
<i>B*42</i>	8	1.6	9	3.1	0.2062	0.51	0.19-1.35
<i>B*44</i>	54	10.8	26	8.8	0.3950	1.25	0.76-2.05
<i>B*45</i>	9	1.8	3	1.0	0.5502	1.78	0.47-6.64
<i>B*46</i>	0	0	1	0.3	0.3712	0	Undef
<i>B*47</i>	0	0	1	0.3	0.3712	0	Undef
<i>B*48</i>	2	0.4	2	0.7	0.6302	0.58	0.08-4.20
<i>B*49</i>	8	1.6	9	3.1	0.2062	0.51	0.19-1.35
<i>B*50</i>	16	3.2	5	1.7	0.2551	1.91	0.69-5.29
<i>B*51</i>	33	6.6	29	9.9	0.1313	0.64	0.38-1.09
<i>B*52</i>	21	4.2	8	2.7	0.3310	1.57	0.68-3.60
<i>B*53</i>	13	2.6	6	2.0	0.8170	1.28	0.48-3.42
<i>B*54</i>	1	0.2	0	0	1.0000	Undef	Undef
<i>B*55</i>	2	0.4	4	1.4	0.2020	0.29	0.05-1.60
<i>B*56</i>	3	0.6	0	0	0.2988	Undef	Undef
<i>B*57</i>	14	2.8	10	3.4	0.6709	0.82	0.36-1.87

<i>B*58</i>	11	2.2	9	3.1	0.4872	0.71	0.29-1.74
<i>B*59</i>	0	0	1	0.3	0.3712	0	Undef
<i>B*81</i>	1	0.2	1	0.3	1.0000	0.58	0.03-9.46
HLA	n= 249	%	n= 147	%	<i>P</i>	OR	95%CI
<i>C*01</i>	13	2.6	11	3.7	0.3951	0.68	0.30-1.55
<i>C*02</i>	36	7.2	23	7.8	0.7803	0.91	0.53-1.58
<i>C*03</i>	42	8.4	26	8.8	0.8957	0.94	0.56-1.58
<i>C*04</i>	81	16.3	40	13.6	0.3578	1.23	0.81-1.85
<i>C*05</i>	32	6.4	11	3.7	0.1431	1.76	0.87-3.56
<i>C*06</i>	47	9.4	22	7.5	0.3648	1.28	0.75-2.18
<i>C*07</i>	97	19.5	71	24.1	0.1267	0.75	0.53-1.07
<i>C*08</i>	35	7.0	20	6.8	1.0000	1.03	0.58-1.83
<i>C*12</i>	32	6.4	12	4.1	0.1993	1.61	0.81-3.18
<i>C*14</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>C*15</i>	20	4.0	21	7.1	0.0672	0.54	0.28-1.02
<i>C*16</i>	38	7.6	15	5.1	0.1873	1.53	0.83-2.84
<i>C*17</i>	11	2.2	12	4.1	0.1872	0.53	0.23-1.21
<i>C*18</i>	2	0.4	2	0.7	0.4746	0.58	0.08-4.20
HLA	n= 249	%	n= 147	%	<i>P</i>	OR	95%CI
<i>DRB1*01</i>	56	11.2	23	7.8	0.1408	1.49	0.89-2.48
<i>DRB1*03</i>	48	9.6	31	10.5	0.7133	0.90	0.56-1.45
<i>DRB1*04</i>	44	8.8	43	14.6	0.0135*	0.56	0.36-0.88
<i>DRB1*07</i>	67	13.5	36	12.2	0.6629	1.11	0.72-1.71
<i>DRB1*08</i>	36	7.2	24	8.2	0.6772	0.87	0.51-1.50
<i>DRB1*09</i>	7	1.4	10	3.4	0.0758	0.40	0.15-1.07

<i>DRB1*10</i>	8	1.6	8	2.7	0.3032	0.58	0.21-1.57
<i>DRB1*11</i>	68	13.7	34	11.6	0.4427	1.20	0.77-1.87
<i>DRB1*12</i>	12	2.4	4	1.4	0.4350	1.79	0.57-5.60
<i>DRB1*13</i>	67	13.5	26	8.8	0.0528	1.60	0.99-2.58
<i>DRB1*14</i>	21	4.2	10	3.4	0.7051	1.25	0.58-2.69
<i>DRB1*15</i>	48	9.6	38	12.9	0.1574	0.71	0.45-1.12
<i>DRB1*16</i>	16	3.2	7	2.4	0.6622	1.36	0.55-3.34

HLA= human leukocyte antigen; OR= odds ratio; *P*= two-tailed Fisher's exact test; 95% CI= 95% confidence interval; Undef= undefined.

Supplementary Table 2. Allele frequencies of HLA-DRB1 in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*, and controls.

HLA	Cases		Controls		<i>P</i>	OR	95%CI
	n= 249	%	n= 147	%			
<i>DRB1*01:01</i>	31	6.2	15	5.1	0.6374	1.23	0.65-2.32
<i>DRB1*01:02</i>	20	4.0	8	2.7	0.4273	1.49	0.65-3.44
<i>DRB1*01:03</i>	4	0.8	0	0	0.3026	Undef	Undef
<i>DRB1*01:04</i>	1	0.2	0	0	1.0000	Undef	Undef
<i>DRB1*03:01</i>	41	8.2	28	9.5	0.6021	0.85	0.51-1.41
<i>DRB1*03:02</i>	7	1.4	3	1.0	0.7519	1.38	0.35-5.38
<i>DRB1*04:01</i>	9	1.8	2	0.7	0.2269	2.68	0.57-12.52
<i>DRB1*04:02</i>	4	0.8	3	1.0	0.7146	0.78	0.17-3.53
<i>DRB1*04:03</i>	7	1.4	1	0.3	0.2697	4.17	0.51-34.12
<i>DRB1*04:04</i>	6	1.2	9	3.1	0.1017	0.38	0.13-1.09
<i>DRB1*04:05</i>	5	1.0	9	3.1	0.0481*	0.32	0.10-0.96
<i>DRB1*04:06</i>	0	0	1	0.3	0.0516	0	Undef
<i>DRB1*04:07</i>	5	1.0	2	0.7	1.0000	1.48	0.28-7.68
<i>DRB1*04:08</i>	2	0.4	2	0.7	0.6302	0.58	0.08-4.20
<i>DRB1*04:09</i>	0	0	1	0.3	0.3712	0	Undef
<i>DRB1*04:11</i>	6	1.2	13	4.4	0.0067*	0.26	0.09-0.70
<i>DRB1*07:01</i>	67	13.4	36	12.2	0.6629	1.11	0.72-1.71
<i>DRB1*08:01</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>DRB1*08:02</i>	12	2.4	4	1.4	0.4350	1.79	0.57-5.60
<i>DRB1*08:03</i>	5	1.0	1	0.3	0.4207	2.97	0.34-25.56
<i>DRB1*08:04</i>	7	1.4	10	3.4	0.0758	0.40	0.15-1.07

<i>DRBI*08:07</i>	0	0	1	0.3	0.3712	0	Undef
<i>DRBI*09:01</i>	7	1.4	10	3.4	0.0758	0.40	0.15-1.07
<i>DRBI*10:01</i>	8	1.6	8	2.7	0.3032	0.58	0.21-1.57
<i>DRBI*11:01</i>	43	8.6	17	5.8	0.1651	1.53	0.86-2.75
<i>DRBI*11:02</i>	9	1.8	8	2.7	0.4494	0.65	0.25-1.72
<i>DRBI*11:03</i>	4	0.8	1	0.3	0.6563	2.37	0.26-21.32
<i>DRBI*11:04</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>DRBI*12:01</i>	12	2.4	4	1.4	0.4350	1.79	0.57-5.60
<i>DRBI*13:01</i>	39	7.8	12	4.1	0.0503	1.99	1.02-3.87
<i>DRBI*13:02</i>	19	3.8	9	3.1	0.6920	1.25	0.56-2.81
<i>DRBI*13:03</i>	8	1.6	3	1.0	0.7547	1.58	0.41-6.01
<i>DRBI*13:05</i>	1	0.2	2	0.7	0.5589	0.29	0.02-3.25
<i>DRBI*14:01</i>	12	2.4	8	2.7	0.8169	0.88	0.35-2.18
<i>DRBI*14:02</i>	7	1.4	2	0.7	0.4967	2.08	0.42-10.08
<i>DRBI*14:04</i>	1	0.2	0	0	1.0000	Undef	Undef
<i>DRBI*14:06</i>	1	0.2	0	0	1.0000	Undef	Undef
<i>DRBI*15:01</i>	25	5.0	22	7.5	0.1637	0.65	0.36-1.18
<i>DRBI*15:02</i>	12	2.4	3	1.0	0.1897	2.93	0.67-8.55
<i>DRBI*15:03</i>	11	2.2	13	4.4	0.0884	0.48	0.21-1.10
<i>DRBI*16:01</i>	6	1.2	4	1.4	1.0000	0.88	0.24-3.15
<i>DRBI*16:02</i>	10	2.0	3	1.0	0.3912	1.98	0.54-7.28

HLA= human leukocyte antigen; OR= odds ratio; *P*= two-tailed Fisher's exact test; 95% CI= 95% confidence interval; Undef= undefined.

Supplementary Table 3. Haplotype frequencies of HLA in individuals sensitized to at least one of the following dust mites: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*, and controls.

Haplotypes	Cases		Controls		<i>P</i>
	n= 249	%	n= 147	%	
A*01-B*08-C*07-DRB1*03	11	2.2	7	2.4	ns
A*29-B*44-C*16-DRB1*07	10	2.0	3	1.0	ns
A*02-B*35-C*04-DRB1*11	10	2.1	0	0	ns
A*33-B*14-C*08-DRB1*01	8	1.6	3	1.0	ns
A*03-B*07-C*07-DRB1*15	6	1.2	6	2.0	ns
A*11-B*35-C*04-DRB1*07	5	1.0	0	0	ns
A*02-B*44-C*05-DRB1*04	5	1.0	0	0	ns
A*02-B*13-C*06-DRB1*07	4	0.8	3	1.0	ns
A*02-B*44-C*05-DRB1*13	3	0.6	3	1.0	ns
A*02-B*15-C*07-DRB1*13	3	0.6	3	1.0	ns
A*02-B*44-C*04-DRB1*07	2	0.4	3	1.0	ns
A*24-B*44-C*16-DRB1*11	1	0.2	3	1.0	ns
A*02-B*07-C*07-DRB1*01	1	0.2	4	1.4	ns
A*68-B*40-C*03-DRB1*04	0	0	4	1.4	ns
A*68-B*15-C*03-DRB1*08	0	0	5	1.7	ns
A*24-B*35-C*04-DRB1*04	0	0	3	1.0	ns
A*02-B*52-C*07-DRB1*04	0	0	3	1.0	ns
A*02-B*51-C*15-DRB1*04	0	0	4	1.4	ns

A*02-B*49-C*07-DRB1*11	0	0	3	1.0	ns
Others	429		234		

P= two-tailed Fisher's exact test; ns= nonsignificant.

Artigo 2: “ASSOCIATION BETWEEN KIR GENES AND DUST MITE SENSITIZATION IN A BRAZILIAN POPULATION”

Association between KIR genes and dust mite sensitization in a Brazilian population

Marcela Caleffi da Costa Lima Caniatti¹, Sueli Donizete Borelli², Ana Lúcia Falavigna Guilherme², Soraya Barrionuevo Franzener¹, Luiza Tamie Tsuneto².

¹Post-Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil.

²Department of Basic Health Sciences, UEM, Maringá, Paraná, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: marcelacclima@hotmail.com

Abstract

Background. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), found on the surface of natural killer (NK) cells, play a key role in controlling the innate and acquired response. Such response depends on a series of cellular interactions associated with genetic patterns inherited by individuals. Atopic diseases have been associated with genes that regulate cytokine production and with immune response genes, which may either protect or predispose to hypersensitivity. Recent studies have demonstrated the involvement of NK cells in adverse mechanisms. However, little is known about the role of these cells and their receptors in atopic disease. **Objective.** We conducted an association study of KIR genes with sensitization to the following mites: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*. **Methods.** A total of 341 children aged up to 14 years, were classified as mite-sensitive or mite-insensitive after undergoing a skin prick test for immediate allergic reactions. The presence/absence of KIR genes and their human leukocyte antigen (HLA) ligands was determined by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) with the commercial kit LabType™ using Luminex™. **Results.** The frequencies of KIR genes and their respective class I HLA ligands and the frequency of each of these ligands were performed in sensitive and insensitive individuals, and no significant differences were found. **Conclusion.** Our results suggest no influence of KIR genes on resistance/susceptibility to sensitization to dust mites.

Keywords: Mites; KIR receptors; HLA antigens; genetic association studies; genetic heterogeneity.

Introduction

According to Darwin's theory, living beings have been perpetuated and may continue to evolve due to genetic enhancement and adaptation to external factors in their *habitat*. Diversity within the same species contributes to a greater chance of survival of the species. As a result, self-nonsel self discrimination mechanisms have been developed over time and consist of a complex network of highly specialized cells that interact to eliminate harmful agents in order to maintain homeostasis [1].

Atopic diseases, such as asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, and food allergies, are caused by a number of risk factors, including genetic predisposition, age, allergens, prenatal exposure, diet, infections, seasonal effects, climate, and psychosocial factors. Some studies have shown that environmental factors have a modifying effect on the expression of different genes in atopic disease [2].

Chronic and allergic inflammatory diseases affect millions of people worldwide [3]. In developing countries, particularly in Latin America, the prevalence of asthma in children is high [4], and most of these children have allergic sensitization. In tropical countries, such as Brazil, mites are the main aeroallergens responsible for respiratory allergies [5]. In Thailand, a region also considered to have a tropical climate, a study showed that more than 70% of children with respiratory allergy were sensitized to mites [6].

Hypersensitivity to house dust mite allergens is a usual allergic reaction. *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) are the most common house dust mites. These arthropods thrive in high temperatures and humidity levels [7] and are often found in beds, mattresses, carpets, and other fabric-covered items, as they feed on human skin scales [8]. Type I hypersensitivity

reactions occur due to deviation of the host immune response toward the production of IgE antibodies, which bind to the surface of cells rich in vasoactive substances (especially histamine) and, once activated by repeated contact with the allergen, trigger inflammatory processes [9], such as vasodilation, increased vascular permeability, attraction of polymorphonuclear leukocytes, cytokine release, and stimulation of mucus secretion.

Natural killer (NK) cells are key components of the immune system. A major function of NK cells is to control cell interactions and death and to release cytokines. Other than their well-established role in controlling tumor activity, NK cells are now reported to play a role in many other diseases. Mandal and Viswanathan [10] reported that NK cells are a major determinant of the development of viral-associated asthma. This is related to their biological role, as NK cells contribute to the progress of T-cell-mediated allergic response during the allergen-specific sensitization phase [10], such as in house dust mite sensitization.

The function of NK cells is regulated by cell-surface receptors belonging to three major families: killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), natural cytotoxicity receptors (NCRs), and C-type lectins [11]. The KIR locus in chromosomal region 19q13.4 is characterized by unusually high diversity in the numbers of both genes and their alleles [12]. The region varies in size from 100 to 350 kb as a result of structurally diverse haplotypes with duplicated segments, large deletions, and gene fusions [13, 14]. As a consequence of this plasticity, the 13 distinct KIR genes (*KIR2DL1* [MIM: 604936], *KIR2DL2* [MIM: 604937], *KIR2DL4* [MIM: 604945], *KIR3DL1* [MIM: 604946], *KIR3DL2* [MIM: 604947], *KIR2DS1* [MIM: 604952], *KIR2DS2* [MIM: 604953], *KIR2DS3* [MIM: 604954], *KIR2DS4* [MIM: 604955], *KIR2DS5* [MIM: 604956], *KIR2DL5* [MIM: 605305], *KIR3DL3* [MIM: 610095], and *KIR3DP1* [MIM: 610604]) are combined in numerous ways. Haplotypes have between four and twenty KIR genes, and the most common KIR region haplotype has seven genes [15]. Each KIR gene is highly polymorphic, reaching to an extent that over 600 KIR alleles

are currently defined [16], among these, there are two pseudogenes, *KIR2DP1* and *KIR3DP1* [17]. The presence or absence of certain genes results in extensive haplotype diversity and consequently high degree of polymorphism within populations. In general, based on the variability of KIR gene content, the haplotypes are divided into two primary sets, termed haplotypes A and B [18].

KIRs interact with their human leukocyte antigen (HLA) ligands, which are found in almost all nucleated cells [19]. Recognition occurs specifically with one (or more) of the four epitopes of class I HLA molecules. These molecules show a dimorphism at position 80 in the $\alpha 1$ helix of the HLA-C locus, where they are classified as HLA-C1 and HLA-C2. The receptors *KIR2DL2*, *KIR2DL3* and *KIR2DS2* recognize HLA-C1 molecules, which include the most common allelic groups (*HLA-C*01*, *C*03*, *C*07*, and *C*08*), while *KIR2DL1* and *KIR2DS1* bind to HLA-C2 molecules, with the most common allelic groups corresponding to *HLA-C*02*, *C*04*, *C*05*, and *C*06* [20]. In addition to that, the receptor *KIR3DL2* recognizes and interacts with HLA-A3 and -A11 [21]. Other ligands recognized by KIRs include HLA-Bw4 molecules, which differ from Bw6 based on the variability of their amino acids at positions 77-83 of the transcribed gene [22]. While Bw6 is found only in HLA-B epitopes, Bw4 is present in HLA-B and some HLA-A molecules [23].

Advances in the understanding of the KIR complex are extremely important primarily because of their biological function, but also because of the need for a better understanding of how these genes affect the activation and regulation of inflammatory processes. Although recent studies have demonstrated the involvement of NK cells in adverse mechanisms, little is known about the role of these cells and their receptors in atopic disease.

Considering that previous studies have presented results suggesting an association of cytokine genes [24] and certain HLA molecules [25] with mite sensitivity, the aim of the

present study was to investigate the role of KIR genes and their HLA ligands in sensitization to the following mites: *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*.

Material and methods

Ethical considerations

The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Estadual de Maringá (protocol No. 412.420/2013) and conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent prior to their inclusion in the study that was obtained from their parents/legal guardian.

Study design

The sample consisted of 341 individuals, randomly selected from three public institutions in the city of Maringá (Paraná, southern Brazil: latitude 23° 25' 31" S and longitude 51° 56' 19" W), who voluntarily agreed to participate in the study. Children aged up to 14 years were included in the study. Of these, 177 (52%) were female and 164 (48%) were male. The mean (SD) age of the sample was 10 (2.1) years.

Two groups were formed, one of individuals that are sensitive to at least one of the dust mites investigated (n = 211), and other one with insensitive controls (n = 130).

Consanguineous individuals and those of Asian descent were excluded from the study. It is known that HLA alleles have a heterogeneous distribution across racial groups. Our region has a strong Asian component due to Japanese immigration to Brazil in the 20th century. Therefore, based on information about their ancestors, individuals of Asian descent were excluded from the sample. Based on this (exclusion) criterion, all other participants were

considered Brazilian whites, and ethnicity matching was not required because the Brazilian population is heterogeneous.

Biological samples

Blood samples (10 mL) were collected from all individuals into tubes containing EDTA as anticoagulant and kept frozen until extraction. Genomic DNA was extracted using the commercial kit Biopur™ (Reinach, Switzerland), according to the manufacturer's instructions, quantified using the NanoDrop™ 2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and adjusted to a concentration of 30 to 50 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, with a purity of 1.6-1.9 (OD 260/280).

Allergy testing

The participants' allergic status was determined by skin prick testing (Anthygenus™, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Participants were defined as sensitive when they showed hypersensitivity to at least one of the three investigated mites: *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and/or *Blomia tropicalis*. Individuals who did not react to any of the tested allergen extracts served as (insensitive) controls.

Each participant underwent a skin prick test for immediate allergic reactions. The right forearm was cleaned with 70% alcohol and the allergen extracts of the three investigated mites were applied using a disposable prick lancet (3 to 4 cm apart), followed by a positive control (0.01% histamine chlorohydrate) and a negative control. Results were obtained 15 to 20 minutes after the test was applied and interpreted by two observers, followed by proper recording. A positive reaction was defined as the presence of red papule formation (reaction indicative of IgE), which was classified using plus signs (+) to indicate intensity [< 15 mm (+) to > 30 mm (++++)], while a negative reaction was defined as the absence of papule or

erythema formation, a result indicative of insensitivity. Based on information provided, none of the participants were taking any medication that could influence the skin test results.

Typing of KIR and HLA class I genes

The presence/absence of KIR genes and HLA class I types (-A, -B, and -C) was determined by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) with the commercial kit LabType™ SSO (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) using Luminex™. Each PCR product was biotinylated to be detected by streptavidin R-phycoerythrin conjugate (SAPE) and then denatured and hybridized with probes conjugated with encoded fluorescent microbeads. Complementary products were detected by chemiluminescence, which identifies phycoerythrin fluorescence intensity in each microbead, and analyzed on a flow cytometer (LabScan™ 100). The results were interpreted using HLA Fusion™ version 3.1 and Fusion Research version 3.0 (One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

Statistical analysis

KIR gene and HLA molecule frequencies were determined by direct counting in mite-sensitive and mite-insensitive individuals. Bw4, C1 and C2 groups were defined based on information obtained from the IMGT/HLA database, according to the locus of the positions of typed genotypes. A 95% confidence interval (95%CI) was adopted according to Woolf [26]. The significance of differences was evaluated using two-tailed Fisher's exact test [27], and a *P*-value less than 0.05 was considered significant. For values below the level of significance, odds ratio (OR) was calculated. Data were processed and analyzed using Epi Info™ (version 7.0).

The heterogeneity test proposed by Hollenbach et al. [28] was also used and calculated based on a $2 \times k$, row-by-column ($r \times c$) contingency table. *P*-values were estimated using the chi-square test (χ^2) in OpenEpi (version 3.01), available at: <http://www.openepi.com>. Based on this method, allele frequencies with an expected value of less than 5 in cases or controls were combined into a single category, referred to as the *binned* category. The degrees of freedom for the χ^2 analysis were calculated from the number of alleles -1 (e.g., $k - 1$).

Results

Out of 341 individuals, 211 (61.9%) were sensitive to at least one of the three investigated mites (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and/or *Blomia tropicalis*), while 130 (38.1%) were included as mite-insensitive controls. The frequencies of the KIR genes *2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5*, *2DP1*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *3DP1*, and *3DS1* in participants sensitive to at least one mite and in controls are shown in Table 1. As expected, *2DL4*, *3DL2*, *3DL3* and *3DP1* were present in all individuals in both groups, as they are framework genes. When mite-sensitive and mite-insensitive groups were compared, using Fisher's exact test and the heterogeneity test, there was no significant difference between the two groups.

An analysis of KIR genes and their respective class I HLA ligands and of the frequency of each of these ligands was performed in individuals sensitive to at least mite and controls, and the results are shown in Tables 2 and 3, respectively. However, no significant differences were found between cases and controls.

Table 4 shows the distribution of KIR gene frequencies among individuals who were sensitive to a mite species vs individuals insensitive to this species (including mite-insensitive

controls). Most individuals were sensitive to *D. farinae* (n = 55.4%), followed by *D. pteronyssinus* (n = 43.0%) and *Blomia tropicalis* (n = 40.8%).

When comparing sensitive individuals (according to the species) with the insensitive group, using a 2×2 contingency table and heterogeneity test, no significant differences were found (Table 4).

No association was found between the frequencies of KIR genes and their ligands (HLA-C1, HLA-C2, HLA-Cw4, HLA-Bw4, and HLA-A3/A11) for any mite species (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and *Blomia tropicalis*) or controls.

Discussion

How to explain the fantastic genetic versatility and epigenetic changes of the human body in response to factors that are related to gender, age, psychological, emotional, hormonal, seasonal, nutritional and hygienic phenomena?

Despite problems of methodological order, statistical analysis and lack of insight regarding cellular interaction and biologic function which lead to dubious interpretations, the influence of these factors, can bias the true inference of the study: which is to know whether these genes contribute or not towards susceptibility/protection of the disease in question, hypersensitivity to mites.

Even though the studies are complex, many of them have already shown conclusive results in the biological relationship with the participation of some related genes, as has also been presented in our previous studies. The first work [24] demonstrates the participation of cytokine genes, especially *IL4*⁻⁵⁹⁰ (pc = 0.000055) in susceptibility to mite sensitivity,

whereas in the second study [25], with a larger sample number, we revealed the association between HLA-DRB1 genes and hypersensitivity to dust mites.

It is well established that KIRs play an essential role in the regulation of NK cell activity, in the activation/inhibition of response to class I HLA ligands and as a regulator of the course of viral infections and tumor transformation [29]. Numerous studies have demonstrated the involvement of KIR genes in the pathogenesis of several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis [30], ankylosing spondylitis [31], and systemic lupus erythematosus [32]. However, to the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate a relationship between mite hypersensitivity and KIR genes. From this relationship, we did not find significant statistical difference among the studied groups, however, we believe that even though we did not find such differences, these data open space for the discussion of this new relationship, not yet investigated by other researchers.

Regarding the data analysis, of complex genes such as HLA and KIR, Hollenbach et al. [28], consider that there are some limitations that permeate this data. Among the specific questions for KIR data in disease studies are: the treatment of presence/absence or gene-content typing data; the incorporation of HLA interaction effect; the controlling for other HLA associations; the use of estimated haplotypes designations; and the treatment of haplotypic data [28].

Despite a knowledge of the mechanisms of sensitization and triggering of allergic diseases and of several experimental models of allergy, controversies still exist regarding the involvement of regulatory cells and their activated products. The allergens that can trigger the activation of the immune response are extremely variable in nature, and most of them contain protease activity, such as group I house dust mites, called cysteine proteases (e.g., Der p 1) [33]. Predictably, some authors have described that the development of Th2 immunity to

inhaled house dust mite allergens is associated with different degrees of activity of these proteases [34, 35, 36, 37]. These studies opened up new ways of research that revealed the indifferent role of basophils, as dendritic cells alone are sufficient to trigger Th2 responses to inhaled house dust mite allergens/antigens and migrate to lymph nodes [33].

In the meantime, NK cells have also been shown to play a key role in allergic processes by actively participating in antigen-specific immunological suppression and IgE production [38]. Some authors have reported that atopic individuals, such as asthmatic patients, show increased NK cell activity, which decreases after allergen exposure. This can be explained by the fact that these cells are transported through the circulation toward the lungs and lymphoid organs [10].

Niepiekło-Miniewsk et al. [39], in a study of atopic dermatitis and KIRs, investigated 240 patients and 570 healthy controls and observed a protective effect of *KIR2DS1* on disease development ($P_{\text{corr}} = 0.0158$ and $\text{OR} = 0.658$). Atopic dermatitis, due to the immune response to allergic challenge, is considered one of the most common manifestations in mite-sensitive individuals.

The uneven distribution of KIR alleles and the diversity of their haplotypes have been described in several ethnic groups in different populations [40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]. The constant search for understanding the distribution of KIR genes in population groups allows us to expand the understanding of their characteristics and determine whether these peculiarities are in some way related to protection/susceptibility to certain diseases. Therefore, we believe these preliminary findings may provide further insight into defining the importance of these genes, and after a deeper analysis of these data, as described, we can more concisely determine the participation (or not) of KIR genes in hypersensitivity to dust mites.

A limitation of the present study is the KIR genotyping method, which determines only the presence/absence of genes; therefore, the alleles of each gene and the amount of expressed product were not defined. A future perspective from our study would be to conclude that there is no relationship of NK cells to sensitization to mites or conduct more in-depth research at the allele level on genes that regulate the expression of products, on products expressed in soluble forms, on interactions with other HLA-G ligands and on different populations. According Norman et al. [47], the development of methods for assessing the nature and extent of KIR genomic diversity has been limited by the complexity of the region. The widely used methods that exist for typing KIRs focus principally on gene content. In contrast, the methods being used for determining allelic variation are costly, time consuming, and unsuitable for high-throughput studies. The results of the few allele-level population studies of KIRs, however, show that such investigation is likely to be informative. For example, some KIRs are restricted to population groups of specific geographic ancestry. Other KIRs have lost expression but appear common and widely distributed. To extend such studies to other populations, as well as disease cohorts, they have developed a sequencing and bioinformatics method that determines complete KIR and HLA class I genomic diversity. Further advances are still needed in the etiopathogenesis of mite sensitivity to clarify the causes and pathogenic mechanisms underlying this condition.

Data were analyzed using two statistical methods: one that is traditionally used in case-control association studies, based on comparisons in a 2×2 contingency table, where *P*-values are calculated by two-tailed Fisher's exact test, and another that uses the heterogeneity test proposed by Hollenbach et al. [28].

Conclusion

This preliminary study suggests no influence of KIR genes on resistance/susceptibility to sensitization to dust mites. However, we consider that these results are not conclusive enough to reject this hypothesis.

Acknowledgments

We would like to thank the “Colégio de Aplicação Pedagógica” from UEM, and the institutions “Lar Escola de Maringá” and “Sistema de Apoio à Saúde São Rafael”.

References

- [1] Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125: S3-23.
- [2] Chung EK, Miller RL, Wilson MT, McGeady SJ, Culhane JF. Antenatal risk factors, cytokines and the development of atopic disease in early childhood. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92: F68-73.
- [3] Ai C, Zhang Q, Ren C, Wang G, Liu X, Tian F, et al. Genetically engineered *Lactococcus lactis* protect against house dust mite allergy in a BALB/c mouse model. *PLoS One*. 2014; 9: e109461.
- [4] Rodrigues AM, Roncada C, Santos G, Heinzmann-Filho JP, Souza RG, Vargas MHM, et al. Clinical characteristics of children and adolescents with severe therapy-resistant asthma in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2015; 41: 343–350.
- [5] Andiappan AK, Puan KJ, Lee B, Nardin A, Poidinger M, Connolly J, et al. Allergic airway diseases in a tropical urban environment are driven by dominant mono-specific sensitization against house dust mites. *Allergy*. 2014; 69: 501-509.
- [6] Manuyakorn W, Padungpak S, Luecha O, Kamchaisatian W, Sasisakulporn C, Vilaiyuk S, et al. Assessing the efficacy of a novel temperature and humidity control machine to minimize house dust mite allergen exposure and clinical symptoms in allergic rhinitis children sensitized to dust mites: a pilot study. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2015; 33: 129-135.
- [7] Arlian LG, Neal JS, Morgan MS, Vyszynski-Moher DL, Rapp CM, Alexander AK. Reducing relative humidity is a practical way to control dust mites and their allergens in homes in temperate climates. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107: 99-104.
- [8] Moghtaderi M, Farjadian S, Fereidouni M, Nasiri M, Nejat A. Indoor Dust Allergen Levels in the Homes of Patients with Childhood Asthma: An Experience From Southwestern Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2016; 15:132-137.
- [9] Wang JY. The Innate Immune Response in House Dust Mite-Induced Allergic Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013; 5: 68–74.

- [10] Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015; 8: 47-55.
- [11] Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro AS, Falcão RR, et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. 2011; *Hum Immunol.* 2011; 72: 319-329.
- [12] Parham P, Moffett A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 133–144.
- [13] Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, et al. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res.* 2012; 22: 1845–1854.
- [14] Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D, et al. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome Res.* 2009; 19: 757–769.
- [15] Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 4778–4783.
- [16] Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D423–D431.
- [17] Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology.* 2010; 129: 8–19.
- [18] Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster. 28 Maio 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/>
- [19] Augusto DG, Piovezan BZ, Tsuneto LT, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML. KIR gene content in amerindians indicates influence of demographic factors. *PLoS One.* 2013; 8: e56755.
- [20] Pisegna S, Pirozzi G, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Palmieri G. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood.* 2004; 104: 4157-4164.

- [21] Döhning C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J. Immunol.* 1996; 156: 3098–3101
- [22] Gumperz JE, Barber LD, Valiante NM, Percival L, Phillips JH, Lanier LL, et al. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol.* 1997; 158: 5237-5241.
- [23] Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med.* 1995; 181: 1133-1144.
- [24] Caniatti MC, Marchioro AA, Guilherme AL, Tsuneto LT. Association of cytokines in individuals sensitive and insensitive to dust mites in a Brazilian population. *PLoS One.* 2014; 9: e107921.
- [25] Caniatti MCCL, Borelli SD, Guilherme AL, Tsuneto LT. Association between HLA genes and dust mite sensitivity in a Brazilian population. *Hum Immunol.* 2016 Oct 22. pii: S0198-8859(16)30470-0. doi: 10.1016/j.humimm.2016.10.014.
- [26] Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.* 1995; 19: 251- 253.
- [27] Fisher RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J. R. Stat. Soc.* 1922; 85: 87–94.
- [28] Hollenbach JA, Mack SJ, Thomson G, Gourraud PA. Analytical methods for disease association studies with immunogenetic data. *Methods Mol. Biol.* 2012; 882: 245-266.
- [29] Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens.* 2013; 82: 363-373.
- [30] Nazari M, Mahmoudi M, Rahmani F, Akhlaghi M, Beigy M, Azarian M, et al. Association of Killer Cell Immunoglobulin- Like Receptor Genes in Iranian Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One.* 2015; 10: e0143757.
- [31] Mahmoudi M, Jamshidi AR, Karami J, Mohseni A, Amirzargar AA, Farhadi E, et al. Analysis of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genes and Their HLA Ligands in

Iranian Patients with Ankylosing Spondylitis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2016; 15: 27-38.

[32] Akhtari M, Farazmand A, Mahmoudi M, Akbarian M, Ahmadzadeh N, Mirkazemi Z, et al. Analysis of killer cell immunoglobulin-like receptors and their human leukocyte antigen-ligands gene polymorphisms in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2016; 25: 1244-1253.

[33] Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med.* 2010; 207: 2097-2111.

[34] Hammad H, Charbonnier AS, Duez C, Jacquet A, Stewart GA, Tonnel AB, et al. Th2 polarization by Der p 1-pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood.* 2001; 98: 1135-1141.

[35] Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med.* 2009; 15: 410-416.

[36] Barrett NA, Maekawa A, Rahman OM, Austen KF, Kanaoka Y. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol.* 2009; 182: 1119-1128.

[37] Nathan AT, Peterson EA, Chakir J, Wills-Karp M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123: 612-618.

[38] Deniz G, Van de Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132: 527-535.

- [39] Niepiekło-Miniewska W, Majorczyk E, Matusiak L, Gendzekhadze K, Nowak I, Narbutt J, Lesiak A, et al. Protective effect of the KIR2DS1 gene in atopic dermatitis. *Gene*. 2013; 527: 594-600.
- [40] Omar SY, Alkuriji A, Alwasel S, Dar JA, Alhammad A, Christmas S, et al. Genotypic diversity of the Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and their HLA class I Ligands in a Saudi population. *Genet Mol Biol*. 2016; 39: 14-23.
- [41] Guha P, Bhattacharjee S, Chaudhuri TK. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Bengali population of northern West Bengal, India. *Scand J Immunol*. 2014; 80: 441-451.
- [42] Shen Y, Cao D, Li Y, Kulski JK, Shi L, Jiang H, et al. Distribution of HLA-A, -B, and -C alleles and HLA/KIR combinations in Han population in China. *J Immunol Res*. 2014; 2014:565296.
- [43] Velickovic M, Velickovic Z, Panigoro R, Dunckley H. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Indonesian populations of Java, Kalimantan, Timor and Irian Jaya. 2009; 73: 9-16.
- [44] Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A, Slavcev A. Distribution of KIR genes in the Czech population. *Int J Immunogenet*. 2008; 35: 57-61.
- [45] Bontadini A, Testi M, Cuccia MC, Martinetti M, Carcassi C, Chiesa A, et al. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population. *J Transl Med*. 2006; 4: 44.
- [46] Gutiérrez-Rodríguez ME, Sandoval-Ramírez L, Díaz-Flores M, Marsh SG, Valladares-Salgado A, Madrigal JA, et al. KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. *Hum Immunol*. 2006; 67: 85-93.
- [47] Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, Marin WM, Norberg SJ, Ashouri E, et al. Defining KIR and HLA Class I Genotypes at Highest Resolution via High-Throughput Sequencing. *Am J Hum Genet*. 2016 99: 375-391.

Table 1. Distribution of *KIR* genes between individuals sensitized to at least one of the following dust mites *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and/or *Blomia tropicalis*, and mite-insensitive controls.

Genes ¹	Cases		Controls		<i>P</i>
	n= 211	%	n= 130	%	
<i>2DL1</i>	207	98.1	125	96.2	ns
<i>2DL2</i>	116	55.0	77	59.2	ns
<i>2DL3</i>	186	88.2	116	89.2	ns
<i>2DL4</i>	211	100	130	100	ns
<i>2DL5</i>	114	54.0	67	51.5	ns
<i>2DP1</i>	208	98.6	128	98.5	ns
<i>2DS1</i>	80	37.9	50	38.5	ns
<i>2DS2</i>	114	54.0	70	53.8	ns
<i>2DS3</i>	55	26.1	31	23.8	ns
<i>2DS4</i>	195	92.4	125	96.2	ns
<i>2DS5</i>	80	37.0	48	36.9	ns
<i>3DL1</i>	198	93.8	126	96.9	ns
<i>3DL2</i>	211	100	130	100	ns
<i>3DL3</i>	211	100	130	100	ns
<i>3DP1</i>	211	100	130	100	ns
<i>3DS1</i>	81	38.4	51	39.2	ns

P = two-tailed Fisher's exact test; OR = odds ratio; 95%CI = 95% confidence interval; ns = non-significant.

¹Heterogeneity test - $\chi^2 = 0.77$, *P* = > 0.99 and degrees of freedom = 15.

Table 2. Frequencies of KIR genes in the presence of their ligands HLA Class I in individuals sensitized to at least one of the following dust mites *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and/or *Blomia tropicalis*, and mite-insensitive controls.

KIR-Ligands ¹	Cases		Controls		P
	n= 211	%	n= 130	%	
<i>2DL1-C2</i>	146	70.5	90	72.0	ns
<i>2DL2-C1</i>	90	77.6	64	83.1	ns
<i>2DL3-C1</i>	152	81.7	96	82.8	ns
<i>2DS1-C2</i>	59	73.8	36	72.9	ns
<i>2DS4-Cw4</i>	61	31.3	30	24.0	ns
<i>3DL1-Bw4</i>	137	69.2	81	64.3	ns
<i>3DL2-A3A11</i>	59	28.0	34	26.2	ns
<i>3DP1-Bw4</i>	141	66.8	85	65.4	ns

P = two-tailed Fisher's exact test; OR = odds ratio; 95%CI = 95% confidence interval; ns = non-significant.

¹Heterogeneity test - $\chi^2 = 2.02$, $P = 0.95$ and degrees of freedom = 7.

Table 3. Frequencies of ligands HLA Class I in individuals sensitized to at least one of the following dust mites *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and/or *Blomia tropicalis*, and mite-insensitive controls.

Ligands ¹	Cases		Controls		<i>P</i>
	n= 211	%	n= 130	%	
A3A11	62	29.4	34	26.2	ns
Bw4	141	66.8	85	65.4	ns
C1	170	80.6	110	84.6	ns
C2	148	70.1	92	70.8	ns
Cw4	65	30.8	32	24.6	ns

P = two-tailed Fisher's exact test; OR = odds ratio; 95%CI = 95% confidence interval; ns = non-significant.

¹Heterogeneity test - $\chi^2 = 1.46$, *P* = 0.83 and degrees of freedom = 4.

Table 4. Distribution of KIR genes between individuals sensitive (by species) and insensitive.

Genes	Cases sensitive to <i>D. farinae</i> ¹	Insensitive	Cases sensitive to <i>D. pteronyssinus</i> ²	Insensitive	Cases sensitive to <i>Blomia tropicalis</i> ³	Insensitive
	n= 189 (%)	n= 152 (%)	n= 139 (%)	n= 202 (%)	n= 116 (%)	n= 225 (%)
<i>2DL1</i>	185 (97.9)	147 (96.7)	136 (97.8)	196 (97.0)	114 (98.3)	219 (97.3)
<i>2DL2</i>	104 (55.0)	89 (58.6)	81 (58.3)	112 (55.4)	68 (58.6)	125 (55.6)
<i>2DL3</i>	165 (87.3)	137 (90.1)	125 (89.9)	177 (87.6)	101 (87.1)	201 (89.3)
<i>2DL4</i>	189 (100)	152 (100)	139 (100)	202 (100)	116 (100)	225 (100)
<i>2DL5</i>	103 (54.5)	78 (53.1)	71 (51.1)	108 (53.5)	61 (52.6)	120 (53.3)
<i>2DP1</i>	186 (98.4)	150 (98.7)	137 (98.6)	199 (98.5)	113 (97.4)	223 (99.1)
<i>2DS1</i>	73 (38.6)	57 (37.5)	51 (36.7)	79 (39.1)	42 (36.2)	88 (39.1)
<i>2DS2</i>	103 (54.5)	81 (53.3)	79 (56.8)	105 (52.0)	67 (57.8)	117 (52.0)
<i>2DS3</i>	50 (26.5)	36 (23.7)	36 (25.8)	50 (25.8)	31 (26.7)	55 (24.4)
<i>2DS4</i>	174 (92.1)	146 (96.1)	126 (90.6)	194 (96.0)	109 (94.0)	211 (93.8)
<i>2DS5</i>	71 (37.6)	57 (37.5)	52 (37.4)	76 (37.6)	43 (37.1)	85 (37.8)
<i>3DL1</i>	177 (93.7)	147 (96.7)	128 (92.1)	196 (97.0)	111 (95.7)	213 (94.7)
<i>3DL2</i>	189 (100)	152 (100)	139 (100)	202 (100)	116 (100)	225 (100)
<i>3DL3</i>	189 (100)	152 (100)	139 (100)	202 (100)	116 (100)	225 (100)
<i>3DP1</i>	189 (100)	152 (100)	139 (100)	202 (100)	116 (100)	225 (100)
<i>3DS1</i>	73 (38.6)	59 (38.8)	53 (38.1)	79 (39.1)	41 (35.3)	91 (40.4)

P = two-tailed Fisher's exact test; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval; ns = non-significant.

¹Heterogeneity test - $\chi^2 = 1.26$, *P* = 1.00 and degrees of freedom = 15.

²Heterogeneity test - $\chi^2 = 1.26$, *P* = 1.00 and degrees of freedom = 15.

³Heterogeneity test - $\chi^2 = 1.53$, *P* = 1.00 and degrees of freedom = 15.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem uma possível associação entre os genes HLA-DRB1 na resistência à sensibilização aos ácaros.

- ✓ O grupo alélico *DRB1*04* foi associado como fator de proteção no desenvolvimento da alergia, mediada por IgE, de acordo com cada agente etiológico: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*.

- ✓ Genes KIR não demonstraram associação com a hipersensibilidade aos ácaros.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo permitiu expandir o conhecimento da resposta imune na sensibilização aos ácaros e aprofundar o entendimento dessa relação, abrindo caminho para analisar, no futuro, a interação dos sítios efetores das moléculas HLA, com diferentes tipos de peptídeos.

A interação de genes KIR e HLA é ainda muito obscura e pouco investigada e, por isso, requer estudos mais aprofundados sobre os mecanismos que regulam a expressão dos produtos; quais alelos desses genes são significativos; quando, onde e por que os produtos são expressos na forma solúvel; como ocorre a interação com outros ligantes HLA-G e também qual é a distribuição desses genes em diferentes populações. Outras perspectivas seriam em torno da etiopatogenia da sensibilidade aos ácaros, para o entendimento das causas e dos mecanismos patogênicos que permeiam essa condição.

Diferentes marcadores genéticos de resposta imune também podem ser investigados, como, por exemplo, os genes MICA, DQ e DP, para melhor entendermos a associação entre a expressão gênica e a alergia.

ANEXOS

4.1 ANEXO I – Publicação do Artigo 1

Hum Immunol. 2016 Oct 22. pii: S0198-8859(16)30470-0. doi: 10.1016/j.humimm.2016.10.014. [Epub ahead of print]

Association between HLA genes and dust mite sensitivity in a Brazilian population.

da Costa Lima Caniatti MC¹, Borelli SD², Guilherme AL³, Tsuneto LT⁴.

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: Type I hypersensitivity, also known as IgE-mediated allergy, is a complex, multifactorial condition whose onset and severity are influenced by both genetic and environmental factors. Mite allergens stimulate the production of humoral response (IgE), especially in children, which is closely involved in atopic asthma and rhinitis.

OBJECTIVE: This study aimed to investigate the association between HLA class I (-A, -B, and -C), and HLA class II (-DRB1) genes in individuals sensitive to dust mites (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, or *Blomia tropicalis*) and mite-insensitive controls.

METHODS: 396 participants were grouped as mite-sensitive and mite-insensitive according to immediate hypersensitivity as determined by skin-prick tests, and to HLA genotyping by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO).

RESULTS: After chi-square heterogeneity testing no significant differences were observed in HLA-A, B, and C genes, except for the HLA-DRB1 locus, which, showed a negative association for DRB1*04, between mite-sensitive and mite-insensitive individuals. In high resolution, DRB1*04:11 allele was significantly different from all other results (P=0.0042, OR=0.26, and 95%CI=0.09-0.70). The analysis stratified by etiologic agent confirmed these associations.

CONCLUSION: Our results suggest a possible association between HLA-DRB1 genes and hypersensitivity to dust mites.

Copyright © 2016 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Disease susceptibility; Genetic association; HLA; Mites; Sensitive

4.2 ANEXO II – Manual *Prick Test* - (Anthygenus™, Rio de Janeiro, Brasil)

TESTE DE PUNTURA (PRICK TEST)

FORMA FARMACÊUTICA:

Solução glicerinada contendo extrato alergênico indicado no rótulo.

VIA DE ADMINISTRAÇÃO:

Uso Epicutâneo (Puntura).

APRESENTAÇÃO:

Frasco conta-gotas em vidro âmbar, contendo 2,5mL ou 5,0mL de extrato conforme descrito no rótulo.

USO ADULTO/PEDIÁTRICO:

COMPOSIÇÃO:

As substâncias ativas são frações protéicas de antígenos específicos, conforme descrito no rótulo. O veículo é composto por glicerina, cloreto de sódio e fenol.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS:

CUIDADOS DE ADMINISTRAÇÃO:

*Fazer assepsia, limpando o antebraço ou o local onde será realizado o teste com álcool 70%.

*Em intervalos de 3 a 4 centímetros de distância entre os testes aplicar uma gota da solução do frasco.

*Em seguida proceder ligeira pressão no centro da gota com um puntor descartável.

*Aguardar de 15 a 20 minutos.

*Anotar a intensidade da reatividade local através de medida do diâmetro do eritema e/ou pápula formada.

*Eritemas com diâmetro igual ou maior que quinze milímetros indicam hipersensibilidade ao antígeno, assim como pápula igual a três milímetros ou maior.

*Lembrando que este resultado deve ser confrontado com o controle negativo e positivo.

USO EXCLUSIVO PARA PUNTURA.

ALTERAÇÕES NOS TESTES:

Pode ocorrer resultado falso negativo no caso do paciente estar em tratamento ou utilizando medicamentos imunossupressores (quimioterapia ou radioterapia, bloqueadores H1, corticosteróides).

Algumas patologias podem causar alterações no teste. Terapia dessensibilizante ao antígeno específico. Uso das substâncias ranitidina, amitriptilina, nortriptilina e imipramina. Podem ocorrer alterações nos resultados com o uso de puntores inadequados, anestésicos locais, dermatografismo. Testes intradérmicos aos antígenos específicos, realizados com intervalo menor que 10 dias.

PRAZO DE VALIDADE:

Um ano a partir da data de manipulação, observando os cuidados de conservação.

TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DE CRIANÇAS.

INDICAÇÕES E USO:

Pesquisa de hipersensibilidade imediata ao antígeno descrito no rótulo.

FARMACOIMUNOLOGIA:

Os testes de punção baseiam-se no princípio de que, tendo o paciente atópico imunoglobulinas da classe E (IgE), específico aos antígenos que estão sendo testados, ocorrerá liberação de substâncias farmacologicamente vasomotoras e liberação de substâncias do interior das células (predominantemente mastócitos), produzindo edema, hipersecreção e espasmo (Reação do tipo I de *Gel e Coombs*).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Reação positiva ao antígeno testado indica que o paciente apresenta uma hipersensibilidade ao mesmo. Este paciente deve ser encaminhado ao médico assistente especializado para avaliação da melhor terapia.

Uma reação positiva caracteriza-se pelo tamanho do eritema em milímetros, cuja magnitude é dada em número de cruzes de 1 a 4 (Tabela ao lado), e a presença ou não de ramificações. Comparar com o controle positivo e negativo.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:

Os testes para avaliação de hipersensibilidade são testes diagnósticos complementares e como tais tem de ser vistos como uma informação que deve ser interpretada junto com a anamnese e ao histórico clínico do paciente.

USO GERIÁTRICO:

O tamanho médio das pápulas/eritema diminui com o aumento da idade.

USO PEDIÁTRICO:

O tamanho médio das pápulas/eritema podem ser menores em crianças.

Magnitude (nº de cruzes)	Reação	Pápula (mm)	Eritema (mm)	Características visuais
-----	NEGATIVA	-----	-----	Apenas do ponto de inoculação
-----	POSITIVA	-----	-----	Pápula acima de 3mm
+ / 1	FRACA	< 3mm	<15	Pápula de 3mm
++ / 2	MÉDIA	< 6mm	<15	Pápula de 3 a 5mm
+++ / 3	FORTE	7-9mm	16-30	Pápula de 5 a 9mm
++++ / 4	INTENSA	> 9mm	> 30	Pápula de 9mm com ramificações

CONTROLE NEGATIVO: Apenas o ponto de inoculação. Quando ocorrer reação deve-se descontinuar a medida dos demais resultados.

CONTROLE POSITIVO: Geralmente igual ou maior que 3mm de pápula.

REAÇÕES ADVERSAS:

O eritema pode permanecer por algumas horas. Caso o paciente sinta-se muito incomodado com a reação de formigamento e prurido, recomenda-se ao médico assistente administrar um anti-histamínico. E em caso de ocorrer reação anafilática sistêmica, aplicar um torniquete acima do local de injeção e injetar 1:1000 de epinefrina intramuscular ou subcutânea no lado oposto ao braço. Afrouxar o torniquete antes de 10 minutos. Não obstrua o fluxo de sangue arterial com o torniquete. A dose de epinefrina será determinada pelo médico assistente avaliando o quadro do paciente adulto ou pediátrico.

Fonte: *J. Allergy Clin. Immunol.* 77(2) 271-273, 1986.

CUIDADOS DE CONSERVAÇÃO:

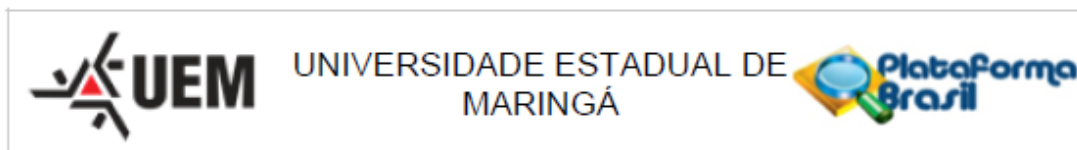
Armazenar sob refrigerador, em temperatura entre 2°C e 8°C. Não congelar.

VALIDADE: 12 Meses após a data de Manipulação.

VENDA SOMENTE A PROFISSIONAL HABILITADO OU ENTIDADES ESPECIALIZADAS

Farm. Resp.: Anderson B. A. Matos - CRF-RJ - 11.837
 Manipulado por: Anthygenus Pesquisa Comércio e Manipulação de Vacinas
 Especiais para Alergia e Imunologia LTDA
 Tel: (21) 2532-2224 - FAX: (21) 2240-6722
 Av. Rio Branco, 277 - Sala 1107
 Rio de Janeiro - RJ
 CNPJ: 05.382.206/0001-47
 E-mail: anthygenus@anthygenus.com.br

4.3 ANEXO III – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DE GENES HLA E KIR EM INDIVÍDUOS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS A ÁCAROS (Dermatophagoides farinae, Dermatophagoides pteronyssinus, Blomia tropicalis)

Pesquisador: LUIZA TAMIE TSUNETO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 17098913.5.0000.0104

Instituição Proponente: CCS - Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 412.420

Data da Relatoria: 16/09/2013

Apresentação do Projeto:

A reação alérgica aos ácaros é relativamente comum entre as crianças, sendo responsável por desencadear diferentes respostas cutâneas e respiratórias, as quais promovem um grande impacto na saúde desta população. A hipersensibilidade tipo I, também chamada de anafilática, ocorre em certos indivíduos (previamente sensibilizados), devido a um desvio da resposta imune para Th2 induzida por citocinas, que é caracterizada por apresentar altos níveis de anticorpos IgE, fixados sobre a superfície dos mastócitos, basófilos e eosinófilos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é realizar um estudo de associação genética de marcadores de resposta imune entre pacientes sensíveis a ácaros e um grupo controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avalia-se que os possíveis riscos a que estarão submetidos os sujeitos da pesquisa serão suportados pelos benefícios apontados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo de pesquisa restou pendente para que a pesquisadora descrevesse no projeto e no

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900
UF: PR **Município:** MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** copep@uem.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 412.420

TCLE os riscos e desconfortos relativos ao exame de alergias. A pesquisadora atendeu a pendência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram juntados os termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação do protocolo de pesquisa apresentado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação do protocolo de pesquisa em tela. observa-se, contudo, de que não se trata de pesquisa em área temática especial, como especificado pela pesquisadora.

APÊNDICES

5.1 APÊNDICE I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES

Gostaríamos de solicitar sua autorização para a participação de seu filho(a) na pesquisa intitulada Associação de genes HLA e KIR em indivíduos sensíveis e não sensíveis a ácaros (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*), que faz parte do curso de pós graduação em Ciências da Saúde e é orientada pela prof. Luiza Tamie Tsuneto da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O objetivo da pesquisa é definir se há determinadas diferenças genéticas (informações do DNA que a pessoa possui) nos marcadores genéticos que poderiam influenciar na ocorrência da alergia aos ácaros. Para isto a participação de seu filho(a) é muito importante, e ela se daria da seguinte forma: será realizada a coleta de uma amostra de sangue de 20ml (o equivalente a aproximadamente 2 colheres de sopa), que será obtida pela veia do braço (com material estéril e descartável, sem risco de contaminação para o participante). Informamos que poderão ocorrer desconforto relacionado somente à picada da agulha, que pode gerar um leve ardor no local da coleta. Em seguida, será realizado o teste alérgico, chamado “prick test”, para avaliar se o participante apresenta reação alérgica aos ácaros, fungos do ar, leite, amendoim, caseína, gliadina e clara de ovo. Para isso, será aplicada uma gota de cada substância a ser testada no antebraço, seguido de um pequeno movimento de escoriação (de forma suave, o produto será raspado na pele), permanecendo por 10 minutos. Destaca-se que o “prick test” pode trazer incômodo em relação à coceira e vermelhidão no local da aplicação, que desaparecerá dentro de alguns minutos. O teste não oferece riscos ao participante, uma vez que, todo material utilizado será estéril e descartável. Gostaríamos de esclarecer que a participação de seu filho(a) é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a autorizar tal participação, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa ou à de seu filho(a). Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a identidade, sua e a de seu (sua) filho(a), destaca-se que, o material genético deverá ficar conservado no Laboratório de Imunogenética da UEM por pelo menos 5 anos. Caso seja utilizado em outros projetos, um novo termo de consentimento será solicitado ao participante após aprovação pelo Comitê de Ética. Em relação aos benefícios esperados, *a priori* achamos que não haverá benefício imediato ao conhecermos a constituição genética individual em desenvolver a doença, pois trata-se de uma doença multifatorial, onde o risco relativo de cada gene contribui com uma pequena parcela de suscetibilidade à doença. O que queremos saber é se existe a participação ou não desses genes. Por estarmos realizando o teste alérgico, podemos informar o diagnóstico (resultados do teste), o que irá beneficiar o paciente portador de alergias.

Caso você tenha mais dúvidas ou necessite maiores esclarecimentos, pode entrar em contato nos endereços a seguir ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta neste documento.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Além da assinatura nos campos específicos pelo pesquisador e por você, solicitamos que sejam rubricadas todas as folhas deste documento. Isto deve ser feito por ambos (pelo pesquisador e por você, como sujeito ou responsável pelo sujeito da pesquisa) de tal forma a garantir o acesso ao documento completo.

Eu, _____ (nome por extenso do responsável pelo menor) declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE da pesquisa coordenada pela Prof.^a Luiza Tamie Tsuneto.

_____ Data: _____

Assinatura do RESPONSÁVEL PELO MENOR

Campo para assentimento do sujeito menor de pesquisa (para crianças escolares e adolescentes com capacidade de leitura e compreensão):

Eu, _____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa /menor de idade) declaro que recebi todas as explicações sobre esta pesquisa e concordo em participar da mesma, desde que meu pai/mãe (responsável) concorde com esta participação.

_____ Data: _____

Assinatura do MENOR DE IDADE

Eu, _____ (nome do pesquisador ou do membro da equipe que aplicou o TCLE), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa supra-nominado.

_____ Data: _____

Assinatura do PESQUISADOR

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, conforme o endereço abaixo:

→ Nome: Luiza Tamie Tsuneto

Endereço: Av. Colombo, nº 5.790 - Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) – Laboratório de Imunogenética - bloco T20, sala 111. Maringá, Paraná

E-mail: lttsuneto@uem.br

Qualquer dúvida com relação aos aspectos éticos da pesquisa poderá ser esclarecida com o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa (COPEP) envolvendo Seres Humanos da UEM, no endereço abaixo:

→ COPEP/UEM

Universidade Estadual de Maringá.

Av. Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.

Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.

CEP 87020-900. Maringá - PR. Tel: (44) 3261-4444

E-mail: copep@uem.br

5.2 APÊNDICE II – Laudo *Prick Test*

Ficha Nº:

Nome do Paciente:

Data do exame:

Prick Test® - KIT: Anthygenus

Manifestação alérgica	
Magnitude (Nº de cruces)	Reação
+ / 1	FRACA
++ / 2	MÉDIA
+++ / 3	FORTE
++++ / 4	INTENSA

Resultado do teste:

Ordem	Alérgenos utilizados	Resultados
01	<i>Dermatophagoides farinae</i>	-
02	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
03	<i>Blomia tropicalis</i>	-
04	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	-
05	Fungos do ar, em geral	-
06	Gliadina	-
07	Amendoim	-
08	Caseína	-
09	Clara de ovo	-
10	Leite	-

Maringá, ____ de Junho de 2014.

Profa. Dra. Luiza Tamie Tsuneto
Pesquisadora Responsável

Descrição dos alérgenos:

01 e 04) ***Dermatofagoides farinae*** e ***Dermatophagoides pteronyssinus***: são duas espécies de ácaros, as mais prevalentes no Brasil. Os *dermatophagoides* ("ácaros de cama") são organismos que se alimentam de pele descamada, que se soltam na cama e também em roupas, almofadas, bichos de pelúcia e bonecas de pano. Além disso, são abundantemente encontrados na poeira domiciliar.

02) ***Aspergillus fumigatus***: é um fungo presente no ar e na mucosa das vias respiratórias.

03) ***Blomia tropicalis***: é uma espécie de ácaro presente na poeira dentro do domicílio. É causador de alergias e crises de asma e rinite alérgica. É um ácaro encontrado em colchões e carpetes/tapetes.

05) **Fungos do ar**, em geral: são transportados pelo ar e agem como alérgenos, quando inspirados causam sintomas respiratórios alérgicos nos pacientes sensíveis a eles. Estão presentes na poeira, no domicílio, especialmente em locais com umidade elevada, mal ventilados e quentes.

06) **Gliadina**: é uma proteína que compõe o glúten, o qual é naturalmente encontrado em alguns cereais, tais como: trigo (ex. farinha de trigo), aveia, centeio e cevada.

07) **Amendoim**: alimento consumido popularmente de diferentes formas: doces (ex. paçoca), torrados, crus ou mesmo como manteiga. O amendoim está entre os cinco alimentos mais alergênicos.

08) **Caseína**: é a proteína encontrada amplamente no leite de vaca.

09) **Clara de ovo**: presente no ovo, é o segundo alimento que mais causa alergia no Brasil. Encontrado em sua forma natural, ou em preparações como doces, pães e bolos.

10) **Leite**: o leite de vaca é o principal responsável pelas alergias de origem alimentar no Brasil. Pode ser encontrado em sua forma natural, ou em alimentos que dele derivam, como iogurtes e queijos.

Como eu evito ácaros e fungos do ar?

Ambiente

- Evite carpetes e objetos que acumulam poeira, como pelúcias, tapetes e cobertores.
- Lave os lençóis, fronhas e capas com água quente (60°C).
- Aspire seu colchão mensalmente.
- Assegure que sua casa seja ventilada várias vezes por dia, mantendo a menor umidade possível.
- Se o banheiro ficar muito úmido após o banho, ele também deve ser bem arejado.
- Remova os mofos formados nas paredes, embaixo das pias, armários e banheiros.
- Evite guardar roupas por muito tempo. As roupas de inverno devem ser lavadas e arejadas, para evitar a formação de mofos.
- Evite manter alimentos velhos, frutas passadas e flores frescas por muito tempo, pois facilitam o crescimento dos fungos.