

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Associação entre a resposta de anticorpos IgE a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar e a resposta de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes atópicos e não atópicos**

**Jorge Fernando Carísio Fernandes**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG**

**Julho – 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Associação entre a resposta de anticorpos IgE a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar e a resposta de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes atópicos e não atópicos**

**Jorge Fernando Carísio Fernandes**

**Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia - MG**

**Julho – 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Associação entre a resposta de anticorpos IgE a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar e a resposta de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes atópicos e não atópicos**

**Jorge Fernando Carísio Fernandes**

**Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi**

Homologado pela coordenação do Curso de Ciências Biológicas em \_\_/\_\_/\_\_

**Vera Lúcia Campos Brites**  
**Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas**


**Uberlândia - MG**  
**Julho - 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

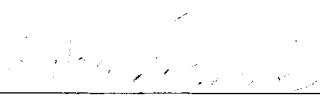
**Associação entre a resposta de anticorpos IgE a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar e a resposta de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em pacientes atópicos e não atópicos**

**Jorge Fernando Carísio Fernandes**

Aprovado pela Banca Examinadora em: 24 / 07 / 07 Nota: 1000

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Roberto Mineo

  
\_\_\_\_\_  
MSc. Rafael de Oliveira Resende

**Uberlândia - MG**  
**Julho - 2007**

*Dedico este estudo à minha família que sempre me apoiou e participou de todos os momentos importantes da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela presença constante e mãos estendidas abençoando minha vida.*

*Aos meus pais, Jorge e Maysa, pelo amor incondicional.*

*Aos meus irmãos, Leandro e Murilo, pelo apoio e companheirismo.*

*Aos meus avós, Esoly e Suelly, João e Elisabeth, pelo carinho eterno.*

*À tia Mylene e à Pollyanna, pela atenção nas horas precisas.*

*À Renata, pelo amor a mim dedicado e compreensão nos momentos de ausência.*

*Ao Professor Dr. Ernesto Akio Taketomi pelos ensinamentos e confiança em mim depositada.*

*À Professora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela dedicação e carinho que tem demonstrado durante a minha formação acadêmica, se tornando para todos nós uma verdadeira “mãe científica”.*

*Ao Professor Dr. José Roberto Mineo e Rafael de Oliveira Resende por abdicarem de seu tempo para auxiliarem na concretização desse trabalho.*

*Ao grande amigo Ronaldo Alves, pela solicitude e pela imensurável ajuda concedida durante todas as etapas deste estudo.*

*Aos demais amigos da alergia, Leandro, Karine, Priscila, Cristiane, Renato, Juliana, Sheila, Gesmar, Diego, Fabíola, Meimei, e aos amigos do laboratório de Imunoparasitologia, Ana Cláudia, Dâmaso, Samantha, Gabriele, Carolina, Cristina, Taísa, Celene, Marley, Pablo,..., pelos momentos de alegria e aprendizado.*

*A todos os colegas da 57ª turma de Ciências Biológicas, em especial, Andréia, Bruno, Melina, Sabrina, pela amizade verdadeira.*

*Aos funcionários do laboratório de Imunologia, Max, Andréia e Antônio Júnior, pelo auxílio nos momentos necessários.*

*Ao secretário da Coordenação de Ciências Biológicas, Antônio, pelo carisma e prestabilidade.*

*À Coordenadora do curso de Ciências Biológicas, Dr. Vera Lúcia de Campos Brites, pelo apoio durante toda minha formação acadêmica.*

*A todos os pacientes que colaboraram para a execução deste trabalho.*

*E a todos aqueles que porventura não mencionei e contribuíram direta ou indiretamente para a execução ou elaboração deste trabalho.*

## RESUMO

A resposta imune a ácaros da poeira domiciliar como *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* é predominantemente Th2 enquanto a resposta a parasitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* é tipicamente Th1. Segundo a hipótese da higiene, a menor exposição a infecções está associada com aumento na prevalência de doenças alérgicas. O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre anticorpos IgE específicos a alérgenos de ácaros em pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*. Um total de 217 indivíduos foram selecionados e avaliados por teste cutâneo de puntura a alérgenos de ácaros e ELISA para detectar níveis de IgE sérica total, IgE sérica específica aos alérgenos e anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Indivíduos soropositivos a *T. gondii* (45%) apresentaram menor sensibilização alérgica a *D. pteronyssinus* (30%) e *D. farinae* (33%), mas não a *B. tropicalis* (22%) em relação aos indivíduos soronegativos (45%, 50% e 34%, respectivamente;  $P < 0,05$ ). A soropositividade para *T. gondii* foi significativamente maior em indivíduos não atópicos (54%) do que em atópicos (35%;  $P < 0,05$ ). A resposta de IgE sérica total, particularmente em indivíduos atópicos, não mostrou diferenças significantes entre os indivíduos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*. Entre os indivíduos soropositivos a *T. gondii* houve uma maior proporção de não-atópicos, mas esta diferença não foi observada entre os indivíduos soronegativos. Em conclusão, a associação negativa entre atopias e infecção por *T. gondii* foi evidenciada, demonstrando que a presença da infecção pelo parasito pode influenciar negativamente na indução de respostas alérgicas, reforçando o papel protetor desta infecção no desenvolvimento de doenças alérgicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Toxoplasma gondii*, hipótese da higiene, anticorpos IgE



## ABSTRACT

The immune response to house dust mites as *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* and *Blomia tropicalis* is predominantly a Th2 profile while the response to intracellular parasites as *Toxoplasma gondii* is typically a Th1 response. According to the hygiene hypothesis, a lower exposure to infections is associated with increased prevalence of allergic diseases. The aim of this study was to investigate the relationship between specific IgE antibodies to mite allergens in *T. gondii*-seropositive and -seronegative patients. A total of 217 subjects were selected and evaluated by skin prick test to mite allergens and ELISA for the detection of total serum IgE, specific IgE to mite allergens and IgG anti-*T. gondii* antibodies. *T. gondii*-seropositive subjects (45%) showed lower allergen sensitization to *D. pteronyssinus* (30%) and *D. farinae* (33%), but not to *B. tropicalis* (22%) allergens as compared to *T. gondii*-seronegative subjects (45%, 50% and 34%, respectively;  $P < 0.05$ ). Seropositivity to *T. gondii* was significantly higher in non-atopic (54%) than in atopic (35%) subjects ( $P < 0.05$ ). Total serum IgE response, particularly in atopic subjects, did not show any significant difference between *T. gondii*-seropositive and -seronegative subjects. Among *T. gondii*-seropositive subjects there was a higher proportion of non-atopics, but this difference was not observed in *T. gondii*-seronegative subjects. In conclusion, a negative association between atopy and *T. gondii* infection was demonstrated, indicating that the presence of parasite infection might negatively influence for inducing allergic responses, reinforcing the protective role of this infection in the development of allergic diseases.

**KEY-WORDS:** *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Toxoplasma gondii*, hygiene hypothesis, IgE antibody

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	
TABELA	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Atopia e alergia	1
1.2. Fisiopatologia da resposta imune alérgica	1
1.3. Ácaros da poeira domiciliar	3
1.4. Toxoplasmose e <i>Toxoplasma gondii</i>	4
1.5. Associação entre atopia e marcadores de infecção	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Pacientes	10
3.2. Teste cutâneo de puntura	10
3.3. Amostras de sangue	11
3.4. Extratos alergênicos	11
3.5. Manutenção e obtenção de <i>T. gondii</i>	12
3.6. Obtenção do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	12
3.7. ELISA para detecção de anticorpos IgE contra alérgenos de ácaros	12
3.8. ELISA para detecção de IgE sérica total	13
3.9. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	14
3.10. Análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Características dos pacientes	15
4.2. IgE específica a alérgenos de ácaros em pacientes soropositivos e soronegativos a <i>T. gondii</i>	15
4.3. IgG anti- <i>T. gondii</i> em pacientes atópicos e não atópicos	18
4.4. IgE sérica total em pacientes soropositivos e soronegativos a <i>T. gondii</i>	18
4.5. Associação entre atopia e infecção por <i>T. gondii</i>	19
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXO 1A	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid</i> (Ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico])
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
BSA	Soroalbumina bovina
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
et al.	E colaboradores
FcεRI	Receptor 1 de IgE de alta afinidade
g	Grama
G	Força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
Hz	Hertz
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
M	Molar
mg	Miligrama
MG	Estado de Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
n	Número de indivíduos
n°	Número
N	Normal
NK	Células Natural Killer
nm	Nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado

pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl</i> (Fenilmetilsulfonil)
SP	Estado de São Paulo
TCP	Teste cutâneo de puntura
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TG+	Grupo soropositivo a <i>Toxoplasma gondii</i>
TG-	Grupo soronegativo a <i>Toxoplasma gondii</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UI	Unidades Internacionais

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Níveis de anticorpos IgE expressos em índice ELISA (IE) específicos a alérgenos de *D. pteromyssinus* (A), *D. farinae* (B) e *B. tropicalis* (C) em amostras de soros de pacientes soropositivos (TG+, n=98) e soronegativos (TG-, n=119) a *T. gondii*. As barras horizontais representam a mediana obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (IE > 1.2). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgE contra cada alérgeno também estão indicadas. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . 18

**Figura 2.** Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de soros de pacientes atópicos (n=102) e não-atópicos (n=115). As barras horizontais representam a mediana obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (IE > 1,2). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgG anti-*T.gondii* também estão indicadas.\*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . 19

**Figura 3.** Níveis de IgE sérica total, expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL), em amostras de soros de pacientes soropositivos (TG+, n=98) e soronegativos (TG-, n=119) a *T. gondii*. As barras horizontais representam a mediana obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (> 100 UI/mL). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgE sérica total também estão indicadas. \*\*\*  $P < 0,001$ . 20

**Figura 4.** Associação entre atopia e infecção por *T. gondii*. (A) Proporção (%) de indivíduos atópicos e não atópicos entre os grupos soropositivos (TG+) e soronegativos (TG-) a *T. gondii*. (B) Proporção (%) global de pacientes soropositivos/atópicos (TG+IgE+), soropositivos/não atópicos (TG+IgE-), soronegativos/atópicos (TG-IgE+) e soronegativos/não atópicos (TG-/IgE-). 21

**TABELA**

**Tabela 1.** Características demográficas e imunológicas dos indivíduos do estudo. 17

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Atopia e alergia

O termo atopia refere-se à tendência pessoal ou familiar de produzir anticorpos IgE em resposta à baixas doses de alérgenos ambientais, tais como proteínas antigênicas de ácaros, fungos e pólenes, e desenvolver doenças típicas, como asma, rinite ou dermatite atópica (JOHANSSON et al., 2001).

A alergia é definida como o resultado de reações associadas a anticorpos IgE induzidos principalmente por alérgenos em indivíduos geneticamente predispostos e são evidenciadas clinicamente como respostas de hipersensibilidade do tipo I ou imediata (PLATTS-MILLS; SOLOMON, 1993; CRONWELL, 1997). Portanto, a alergia ou hipersensibilidade imediata é característica de indivíduos atópicos.

Há vários fatores que podem influenciar no desenvolvimento da atopia. Dentre eles, destacam-se os fatores genéticos, como evidenciado pela maior ocorrência de atopia entre gêmeos univitelinos do que em gêmeos bivitelinos, bem como a associação entre atopia e polimorfismos do receptor 1 de alta afinidade da IgE (FcεR1) no cromossomo 11q e do gene da interleucina-4 (IL-4) no cromossomo 5 humanos (COOKSON, 1999).

A rinite alérgica está ganhando grande importância devido ao rápido aumento de sua prevalência mundial (SETTIPANE; HAGY; SETTIPANE, 1994), afetando 30% a 40% de crianças e adolescentes (SKONER, 2001). No Brasil, a prevalência média de rinite foi de 26,6% e 34,2% em grupos de crianças e adolescentes com seis e sete anos e 13-14 anos, respectivamente, com maior prevalência nos centros urbanos (SOLE et al., 2004). Embora a rinite alérgica não seja uma doença grave, modifica a vida social dos pacientes e afeta o desempenho escolar e a produtividade no trabalho (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2002).

## 1.2. Fisiopatologia da resposta imune alérgica

O desencadeamento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados à célula T CD4<sup>+</sup> em associação com moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MARONE, 1998).

O reconhecimento de peptídeos/MHC II pela célula T CD4<sup>+</sup> reforçado pela ligação de moléculas co-estimulatórias (B7-1/B7-2 e CD28) leva à ativação da célula Th (T *helper* ou T auxiliadora), particularmente do fenótipo Th2, o qual está associado com resposta imune a alérgenos e helmintos. A célula Th2 ativada secreta citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4 bem como ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-5 é um importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos. Entretanto, uma variedade de citocinas tem sido implicadas na modulação da síntese de IgE. A presença de IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  produzidas por células do perfil Th1 inibem a síntese de IgE pelas células B, enquanto IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 estimulam sua síntese (WORM; HENZ, 1997).

Subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> denominadas de células T reguladoras produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10 têm sido reconhecidas com propriedades imunomoduladoras do perfil Th1 bem como estímulo para a produção de anticorpos da classe IgA (WEINER, 1997). Recentes estudos têm mostrado que o mecanismo de supressão das respostas em diferentes condições patológicas (autoimunidade, respostas alérgicas e infecciosas, entre outras) é dependente da produção e secreção de mediadores como TGF- $\beta$  e/ou IL-10 (PICCIRILLO et al., 2002).

Desta forma, no desenvolvimento da hipersensibilidade imediata, as principais etapas consistem de: (1) exposição ao alérgeno que estimula respostas imunes com padrão Th2 com conseqüente produção de IgE; (2) ligação do anticorpo IgE a receptores Fc $\epsilon$  nos mastócitos; (3) ligação cruzada de IgE e receptores Fc $\epsilon$  pelo alérgeno; (4) ativação de mastócitos e liberação de mediadores pré-formados, como histamina e derivados de lipídeos, como os leucotrienos e prostaglandinas. As manifestações clínicas e patológicas da hipersensibilidade imediata consistem na reação vascular e da musculatura lisa, que se desenvolve rapidamente após a re-exposição ao alérgeno (reação imediata) ou como uma reação tardia representada principalmente por um processo inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Poucos minutos após o contato com o alérgeno, os mediadores pré-formados e os recém sintetizados iniciam sintomas característicos da rinite alérgica, incluindo espirro, coceira, coriza e congestão. Estas respostas da fase imediata são também atribuídas à liberação de leucotrienos, prostaglandinas, histamina e citocinas (WHITE; KALINER, 1992; TOGIAS, 2000). Os principais mediadores da resposta tardia são as citocinas, sobretudo as interleucinas do tipo Th2, os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão (GALLI; LANTZ, 1999).



Recentemente, Devos e colaboradores (2006) apontaram a IL-9 como outra citocina do perfil Th2 que apresenta correlação existente entre indução da produção de IgE e asma.

### 1.3. Ácaros da poeira domiciliar

A poeira domiciliar consiste de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas e é constituída por um aglomerado de fibras vegetais e de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microrganismos (bactérias, vírus e fungos) e macroorganismos (animais domésticos, insetos e ácaros) (SELTZER, 1994).

Dentre os ácaros da poeira domiciliar, destacam-se duas espécies da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*) e uma da família Echimyopodidae (*Blomia tropicalis*) que são considerados importantes fontes de alérgenos para sensibilização em pacientes geneticamente predispostos (HART et al., 2007; MIRANDA; QUINTERO; ALMANZA, 2002).

*D. pteronyssinus* e *D. farinae* são os ácaros mais encontrados na poeira domiciliar, sendo representados por 80 a 90% do total e são importantes fontes de alérgenos em áreas geográficas úmidas (HALLAS, 1991; ARLIAN; BERNSTEIN; FRIEDMAN, 1992). Eles estão entre os maiores causadores de doenças alérgicas respiratórias, incluindo asma (COLLOFF et al., 1992; SOLARZ, 2001a; 2001b).

A espécie *D. pteronyssinus* foi caracterizada em 1897 pelo zoologista francês Trouessart e é popularmente conhecida como ácaro europeu. Além de países europeus, é encontrado em países americanos e é considerado uma das principais fontes de alérgenos presentes na poeira domiciliar (VOORHORST, 1977; ARLIAN; BERNSTEIN; FRIEDMAN, 1992). Assim como *D. farinae*, esta espécie necessita de altas temperaturas e umidades para a sua sobrevivência e proliferação (BOQUETE et al. 2006).

O ácaro *D. farinae* também é reconhecido como importante fonte de alérgenos em todo o mundo, exercendo um relevante papel nas doenças alérgicas, particularmente asma e rinite alérgica, em indivíduos geneticamente predispostos. A proliferação do ácaro e sua sobrevivência são dependentes de diversas condições, principalmente da temperatura e umidade, os quais parecem ser os fatores decisivos e limitantes para o seu desenvolvimento (DUFF; PLATTS-MILLS, 1992).

No Brasil, diversos estudos relatam a prevalência de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. Na cidade de Uberaba-MG, em trabalho realizado por nossa equipe, Terra e colaboradores (2004)

encontraram que *D. pteronyssinus* foi a espécie de maior frequência (15,3%), seguida por *D. farinae* (12,3%), por meio de identificação morfológica. Em um estudo realizado em São Paulo-SP por Arruda e colaboradores (1991), foi verificada alta frequência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus* na maioria das crianças estudadas (95%).

*Blomia tropicalis* foi primeiramente descrito por Van Bronswijk, De Cock e Oshima (1973), sendo inicialmente registrado como ácaro de estocagem. É muito encontrado em países tropicais e sub-tropicais (ARRUDA; CHAPMAN, 1992). Segundo um recente estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa na cidade de Uberlândia-MG, a maioria dos pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* também estão sensibilizados a *D. pteronyssinus* (89%), indicando uma alta reatividade cruzada entre essas duas espécies (ALMEIDA et al., 2006). Em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, os níveis de sensibilização aos ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* na população de Uberlândia-MG foram, respectivamente, 61,7%, 59,9% e 54,7%, confirmando sua importância como fonte de alérgenos em pacientes desta região (SOARES et al., 2007).

#### **1.4. Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii***

Toxoplasmose é uma das mais comuns zoonoses parasitárias, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que acomete uma ampla faixa de hospedeiros, incluindo humanos, animais domésticos e aves. É um dos parasitos mais intensamente estudados entre os coccídeos, não só por ser agente causal de uma zoonose como também pela sua importância médica e veterinária, já que pode causar abortos ou infecções congênitas em seus hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

*T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa (FARHAT et al., 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004), que pode infectar todas células nucleadas, causando ruptura celular devido à proliferação dos taquizoítas (KIM et al., 2006). As principais vias de infecção para o homem compreendem: (1) a ingestão de oocistos maduros contendo esporozoítas encontrados em água e alimentos contaminados; (2) a ingestão de cistos contendo bradizoítas encontrados na carne crua; (3) a transferência de taquizoítas através da placenta ou secreções como saliva, urina, espermatozoides e leite; e (4) transferência de taquizoítas por órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (DUBEY, 1998; NEVES, 2005).

A infecção por *T. gondii* tem sido alvo de crescente interesse em humanos pelo fato de causar a encefalite toxoplásmica, um dos mais sérios problemas de infecções oportunistas que

ocorre em aproximadamente 30% de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e em pacientes com câncer ou transplantados sob terapia imunodepressora, principalmente devido à reativação de cistos teciduais (AMBROISE-THOMAS; PELLOUX, 1993).

Estima-se que mais de um terço da população adulta no mundo tenha sido exposta ao parasito, embora a maioria das infecções seja assintomática em indivíduos adultos imunocompetentes. Ocasionalmente, sintomas moderados podem ser observados, sendo a linfadenopatia a manifestação clínica predominante. Entretanto, as infecções congênitas que geralmente ocorrem devido à infecção aguda durante a gravidez, resultando em graves problemas ao feto (aborto, encefalite, retardo mental), constituem as mais sérias formas da doença. Além disso, *T. gondii* é também reconhecido como uma importante causa de retinocoroidite, não só como seqüela de infecção congênita (ROTHOVA, 1993), mas também como resultado de uma infecção adquirida (SILVEIRA et al., 1988).

A resposta imune a *T. gondii* envolve mecanismos da imunidade mediada por células, mas a resposta imune humoral também destrói muitos taquizoítas. Anticorpos IgM específicos podem ser detectados aos 7 dias após a infecção, alcançam títulos máximos em poucas semanas e gradualmente declinam. Anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1 a 2 semanas após a infecção, atingem títulos máximos em aproximadamente 6 semanas e declinam gradualmente até a persistência de baixos títulos durante toda a vida (CAMARGO et al., 1978). Os taquizoítas que escapam da destruição se transformam em bradizoítas e ficam dentro de cistos. Desta forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítas e a destruição da célula hospedeira. Assim, os anticorpos não são importantes para estabelecer a imunidade, mas podem prevenir a disseminação dos parasitos durante a infecção crônica.

A toxoplasmose aguda pode ser caracterizada sorologicamente pela presença de anticorpos IgM e/ou IgA específicos. Por outro lado, altos títulos de IgG nem sempre indicam infecção recente e são característicos da fase de transição entre as fases aguda e crônica. Em infecções recentes, anticorpos IgG estão presentes mas apresentam baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção e a maturação da resposta imune, anticorpos IgG vão apresentando avidéz crescente de modo que nas infecções de longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos IgG de alta avidéz (CAMARGO et al., 1991).

O mais importante mecanismo de controle da infecção por *T. gondii* é a imunidade mediada por células, com a participação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e células

*natural killer* (NK) (KASPER; BOOTHROYD, 1993). Durante a infecção aguda por *T. gondii*, IL-12 é produzida por macrófagos infectados e estimula células NK a produzirem IFN- $\gamma$  induzindo a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- $\gamma$ , que são críticos para a sobrevivência do hospedeiro. Células T CD8<sup>+</sup> contribuem para controlar as infecções agudas e crônicas por *T. gondii* devido à produção de IFN- $\gamma$  em associação com macrófagos ativados. Desta forma, células infectadas seriam lisadas por células T CD8<sup>+</sup> liberando taquizoítas livres no microambiente extracelular que seriam destruídos por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  (DENKERS; GAZZINELLI; MARTIN, 1993).

Outra citocina importante na regulação da resposta imune celular a *T. gondii* é a IL-10, que é detectada em níveis aumentados na fase aguda da infecção (KHAN; MATSURRA; KASPER, 1995). Esta citocina tem efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , a diferenciação de clones Th1, a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de IL-12 por células acessórias. Em experimentos com camundongos infectados na ausência de IL-10 endógena, foi observado que estes animais apresentaram lesões hepáticas exacerbadas e mortalidade acelerada em consequência de excessivas produções de IL-12 e IFN- $\gamma$  resultando em imunopatologia (GAZZINELLI et al., 1996). Assim, a regulação negativa induzida por IL-10 na fase aguda da infecção por *T. gondii* mostrou ser importante para a sobrevivência do hospedeiro.

### **1.5. Associação entre atopia e marcadores de infecção**

A prevalência de doenças alérgicas, tais como asma, rinite alérgica e dermatite atópica aumentou consideravelmente nos últimos 30 a 40 anos (ISAAC, 1998; SLY, 1999). Entre os fatores responsáveis por esta crescente prevalência, destaca-se a ocorrência de alterações significativas nos diferentes microambientes, como aumento da temperatura ambiental, baixa ventilação, utilização de carpetes e tapetes, uso de objetos decorativos que retêm poeira e a utilização de condicionadores de ar. Estas alterações ambientais podem contribuir para um aumento na quantidade de substâncias transportadas pelo ar nos ambientes fechados e que podem ser inaladas pelos indivíduos, refletindo assim em maior prevalência da sensibilização alérgica e doenças respiratórias, como asma e rinite alérgica (POLLART; WARD; PLATTS-MILLS, 1987; PLATTS-MILLS, 1994).

As doenças alérgicas são causadas por respostas imunes específicas a alérgenos comuns presentes no ambiente. Estas respostas são iniciadas por células T CD4<sup>+</sup> tipo Th2 que

produzem citocinas após o contato com peptídeos derivados dos alérgenos. Estas citocinas induzem o desenvolvimento e recrutamento de eosinófilos, contração do músculo liso das vias aéreas, produção de anticorpos IgE específicos por células B, desgranulação de mastócitos e produção de muco, levando à hiperreatividade das vias aéreas (HERZ et al., 2000).

De acordo com a hipótese da higiene, uma menor exposição a certas infecções está associada a uma tendência crescente de doenças alérgicas. Tal hipótese argumenta sobre a prevalência de doenças atópicas, dominadas por um perfil de resposta imune Th2, ser reduzida como resultado de uma polarização para a resposta Th1 associada com tais infecções (STRACHAN, 2000).

Observações epidemiológicas têm evidenciado que (1) asma e atopia são maiores entre indivíduos que vivem em ambientes muito limpos (hipótese da higiene); (2) crianças que estão em contato com animais de fazenda geralmente não desenvolvem asma e atopia; e (3) a ocorrência de atopia e asma é menor em casas que apresentam cães e gatos. Além disso, a natureza, a dose do alérgeno e infecções por vírus, helmintos e a constituição da flora intestinal de um indivíduo são fatores determinantes para a progressão da doença alérgica (BABU; ARSHAD, 2003).

Infecções por *T. gondii*, *Helicobacter pylori* e vírus da hepatite A podem proteger de doenças alérgicas. Estes dados se baseiam no fato que tais infecções induzem forte resposta Th1 com produção de IFN- $\gamma$  que exerce efeitos inibitórios sobre as respostas Th2 predominantes em alergias (MATRICARDI et al., 2000; 2002, LINNEBERG et al., 2003). Por outro lado, em um estudo realizado pelo nosso grupo, foi observado que a infecção por *Myocoptes musculus*, um ácaro da sarna de camundongos que induz resposta Th2, influenciou no desenvolvimento de resposta imune protetora em camundongos infectados por *T. gondii*. Além disso, as lesões intestinais causadas pela resposta imune Th1 excessiva em camundongos susceptíveis ao protozoário apresentaram menor gravidade naqueles co-infectados com *M. musculus* e *T. gondii* em comparação com animais infectados apenas pelo protozoário (WELTER et al., 2006).

Alguns fatores inversamente relacionados às alergias respiratórias são aqueles relacionados à exposição a animais de fazenda e ao consumo de leite não pasteurizado (RIEDLER et al., 2001; WICKENS et al., 2002). Recentemente, Radon e colaboradores (2004) demonstraram que os principais fatores de risco para a infecção por *T. gondii* foram a moradia em fazenda durante os primeiros três anos de vida, o contato regular com estábulos de animais e o consumo de leite não pasteurizado durante a infância. Assim, exposição a ambientes rurais na infância pode predizer a soropositividade a *T. gondii* e o contato regular

com animais de fazenda pode ser considerado um preditor negativo para atopia em indivíduos que residem em fazendas.

De acordo com a hipótese da higiene, doenças alérgicas podem ser prevenidas por exposição a agentes infecciosos, particularmente durante a infância (HOLT, 1995). Entretanto, tem sido especulado se a remoção desta proteção durante a vida adulta, por uma exposição reduzida a microrganismos, poderia favorecer o aparecimento de alergia em indivíduos geneticamente predispostos (MATRICARDI, 1997). Neste contexto, um recente estudo envolvendo imigrantes da Albânia para Itália mostrou que, apesar da baixa prevalência de doenças alérgicas e sensibilização em seu país de origem, houve uma prevalência crescente de sensibilização a alérgenos locais e sintomas respiratórios nos indivíduos após a imigração, sugerindo um papel permanente da exposição alérgênica e fatores ambientais, como diferentes estilos de vida e conseqüente exposição reduzida a infecções, em influenciar o aparecimento de doenças alérgicas (VENTURA et al., 2004).

## 2. OBJETIVOS

- 2.1. Investigar a associação entre atopia e infecção por *T. gondii* em humanos.
- 2.2. Analisar a relação entre a resposta de anticorpos IgE específicos aos alérgenos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* e resposta de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em pacientes atópicos e indivíduos não atópicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Pacientes

Foram selecionados 102 pacientes de ambos os sexos e idade entre 18 e 60 anos, que foram atendidos no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Os critérios de inclusão para a seleção dos pacientes foram: (1) história clínica de sintomas respiratórios relacionados com exposição à poeira domiciliar e (2) teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a pelo menos um de três alérgenos inaláveis de ácaros da poeira domiciliar: *D. pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df) e *B. tropicalis* (Bt). Os critérios de exclusão para o estudo foram: (1) uso de anti-histamínicos ou corticosteróides, por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste; (2) uso de corticosteróides sistêmicos por período de tempo prolongado; (3) presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo.

Foram também selecionados 115 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos e idade entre 18 e 60 anos, sem sintomas ou histórico clínico de doenças alérgicas e com TCP negativo a alérgenos inaláveis (não-atópicos). Estes indivíduos foram selecionados entre os alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição (Anexos 1A e 1B). Todos os indivíduos do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) e responderam um questionário clínico, segundo os critérios adotados pelo ISAAC – *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998) (Anexo 3).

#### 3.2. Teste cutâneo de puntura

Todos os indivíduos foram submetidos ao TCP realizado de acordo com Ownby (1988), utilizando extratos brutos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* que foram preparados a uma concentração protéica final de 2mg/mL em PBS contendo 0,4% de fenol e 50% de glicerina como anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Para o controle positivo, foi utilizado cloridrato de histamina a 10mg/mL (*Hollister-Stier Laboratories LLC, Spokane, EUA*) e, para o controle negativo, diluente da preparação alérgica tamponado com glicerol a 50%. Foram considerados positivos os testes cutâneos que apresentaram pápulas



com diâmetro médio maior ou igual a 3mm que aquelas do controle negativo (Anexo 4). (McKAY et al., 2006)

### 3.3. Amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue de cada indivíduo por punção venosa na região do antebraço no momento da realização do TCP. As amostras de sangue (aproximadamente 10mL) foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos teste sorológicos.

### 3.4. Extratos alergênicos

A extração dos alérgenos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Em resumo, aproximadamente 200g de material seco de cultivo dos ácaros (gentilmente cedido pelo Dr. Federico Montealegre, Medical School of Ponce, Porto Rico, EUA) foram peneirados (Granutest-Telastem Peneiras para Análise Ltda, ABNT 35, abertura em mm = 0,50/TYLER 32, São Paulo, SP, Brasil) para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Em seguida, 5g do material peneirado foram misturados a 50mL de solução salina tamponada com borato a 5mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases (leupeptina a 50µg/mL; fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF] a 1,6mM; benzamidina a 1mM; aprotinina a 10µg/mL; Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), macerados em nitrogênio líquido para ruptura do ácaro e, posteriormente, incubados durante 18 horas a 4°C sob agitação orbital contínua. Em seguida, o material foi centrifugado a 30.000 x g durante 45 minutos a 4°C. O sobrenadante (extrato total) foi concentrado e dialisado em Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA) utilizando membrana YM-10 (10kDa, Whatman International Ltda, Maidstone, Inglaterra) contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS), sob agitação suave. Os extratos alergênicos foram distribuídos em alíquotas e sua concentração protéica determinada (LOWRY et al., 1951).

Uma parte dos extratos alergênicos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* foi utilizada no TCP, preparados a uma concentração protéica final de 2mg/mL em PBS contendo 0,4% de fenol e 50% de glicerina como acima descrito e o restante foi posteriormente armazenado a -20°C até a sua utilização nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos IgE anti-alérgenos.

### 3.5. Manutenção e obtenção de *T. gondii*

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss através de passagens seriadas a intervalos de 48 a 72 horas de um inóculo de aproximadamente  $10^6$  taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO et al., 1980). O exsudato peritoneal foi obtido por lavagem da cavidade abdominal com PBS estéril e após centrifugação a  $720 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , o sedimento resultante foi lavado duas vezes com PBS e o sedimento final armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

### 3.6. Obtenção do antígeno solúvel de *T. gondii*

Os sedimentos de taquizoítas de *T. gondii* foram ressuspensos em PBS contendo inibidores de proteases (PMSF a  $1.6\text{mM}$ , leupeptina a  $50\mu\text{g/mL}$  e aprotinina a  $10\mu\text{g/mL}$ ; Sigma Chemical Co.) e, então, submetidos a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  seguidos por seis ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante um minuto a  $60\text{Hz}$  em banho de gelo. Após centrifugação a  $5.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , o sobrenadante foi coletado e analisado quanto à concentração protéica (LOWRY et al., 1951) e, posteriormente, armazenado em alíquotas a  $-20^\circ\text{C}$ , até ser utilizado como antígeno solúvel nos testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

### 3.7. ELISA para detecção de anticorpos IgE contra alérgenos de ácaros

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para a detecção de anticorpos IgE contra alérgenos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* em amostras de soros dos pacientes como anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005), com algumas modificações. Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com os extratos alergênicos de Dp, Df e Bt na concentração protéica de  $20\mu\text{g/mL}$  em tampão carbonato-bicarbonato  $0.06\text{M}$  (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a  $4^\circ\text{C}$ .

As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a  $0.05\%$  (PBS-T) e os sítios ativos foram bloqueados com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA, Sigma

Chemical Co.) a 1% por uma hora à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as amostras de soros foram adicionadas na diluição 1:2 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Em paralelo, soros controles negativos foram incluídos em cada placa.

Após um ciclo de seis lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgE humana biotilado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA 1% por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA 1%. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e novas lavagens, as placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático (2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid [ABTS] a 0,01M em tampão citrato-fosfato a 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Os valores de densidade óptica (D.O.) foram determinados em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405nm. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula:  $IE = D.O. amostra / cut\ off$ , onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de  $IE > 1,2$  foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos valores de  $IE = 1,0$ .

### **3.8. ELISA para detecção de IgE sérica total**

ELISA para detecção de IgE sérica total foi realizada segundo a técnica descrita anteriormente (SILVA et al., 2001). Placas de alta afinidade (Immulon 2, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgE humana (clone GE-1; Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:5.000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente.

As amostras de soro foram diluídas a 1:5, 1:50 e 1:500 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) na diluição de 1:4.000 e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Etapas subseqüentes (conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático) foram similares ao ELISA para detecção de IgE específica aos alérgenos.

Resultados foram expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de acordo com uma curva controle obtida por diluições duplas seriadas de um soro humano (LHY)

subpadronizado que continha 500UI/mL de IgE sérica total. Valores de IgE sérica total > 100 UI/mL foram considerados positivos.

### **3.9. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii***

ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros humanos foi realizado conforme descrito anteriormente (MINEO et al., 1980). Placas de microtitulação de poliestireno de baixa afinidade (Kartell SPA, Milão, Itália) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *T. gondii* a 10µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C.

As placas foram incubadas com amostras de soros, em duplicata, na diluição de 1:64 em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-T-M) durante 1 hora a 37°C. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. Após um ciclo de seis lavagens com PBS-T foi adicionado o conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:2000 e incubado por 1 hora a 37°C.

Após novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (ortofenilenodiamina [OPD] em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03%). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N e a leitura determinada a 492nm. Títulos de anticorpos foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE) como acima descrito e os soros com IE > 1,2 foram considerados positivos.

### **3.10. Análise estatística**

Foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) para os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade para avaliar o comportamento das variáveis analisadas utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como os dados não apresentaram distribuição normal ou Gaussiana foram utilizados testes não-paramétricos. Os níveis de anticorpos IgE sérica total, IgE sérica específica aos alérgenos (Dp, Df e Bt) e IgG anti-*T.gondii* foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças entre proporções foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $P < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características dos pacientes

As características demográficas e imunológicas dos indivíduos do estudo estão demonstradas na Tabela 1. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com os resultados sorológicos para *T. gondii*: TG+ (98 pacientes soropositivos) e TG- (119 pacientes soronegativos) e a porcentagem de indivíduos soropositivos (45%) foi menor que os soronegativos (55%) ( $P = 0.0438$ ). Por outro lado, os pacientes soropositivos TG+ apresentaram idade (mediana: 25%-75% = 30: 21,5 – 42,0 anos) significativamente maior que aquela do grupo TG- (22: 20 – 27 anos) ( $P = 0.0001$ ). Não houve diferença significativa quanto ao sexo entre os dois grupos de pacientes. Os resultados do TCP aos alérgenos de ácaros revelaram taxas de positividade ligeiramente maiores no grupo de pacientes TG- (55% a 60%) quando comparado ao grupo TG+ (42% a 50%), mas estas diferenças não foram estatisticamente significantes. De forma similar, houve uma tendência para maiores níveis de IgE sérica total no grupo de pacientes TG- (mediana: 25%-75% = 65,2: 14,3 – 241,6 UI/mL) em relação aos pacientes TG+ (43,0: 13,6 – 140,6 UI/mL) ( $P = 0,3570$ ).

### 4.2. IgE específica a alérgenos de ácaros em pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*

Na figura 1 estão demonstrados os níveis de anticorpos IgE anti-*D. pteronyssinus* (Fig. 1A), anti-*D. farinae* (Fig. 1B) e anti-*B. tropicalis* (Fig. 1C) em relação aos grupos de pacientes soropositivos (TG+) e soronegativos (TG-) a *T. gondii*. Os níveis de IgE anti-*D. pteronyssinus* e anti-*D. farinae* foram significativamente maiores no grupo TG- (mediana = 0,99 e 1,27, respectivamente) do que no grupo TG+ (mediana = 0,79;  $P = 0,0290$  e mediana = 0,87;  $P = 0,0046$ , respectivamente). Não houve diferença estatística entre os grupos para os níveis de IgE anti-*Blomia tropicalis* ( $P = 0,1026$ ).

**Tabela 1.** Características demográficas e imunológicas dos indivíduos do estudo.

Características	Grupos		Valor de P
	TG+	TG-	
Número de indivíduos (n.%)	98 (45%)	119 (55%)	0,0438*
Idade (anos)			0,0001*
Mediana (25%-75%)	30 (21.5 - 42,0)	22 (20 - 27)	
Sexo (Masculino/Feminino)	34/64	46/73	0,5472
TCP positivo a ácaros (n. %) <sup>§</sup>			
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	49 (50%)	70 (59%)	0,1937
<i>Dermatophagoides farinae</i>	47 (48%)	72 (60%)	0,0646
<i>Blomia tropicalis</i>	41 (42%)	65 (55%)	0,0608
IgE sérica total (UI/mL) <sup>#</sup>	43,0 (13,6 - 140,6)	65,2 (14,3 - 241,6)	0,3570

TG+: pacientes soropositivos a *Toxoplasma gondii*;

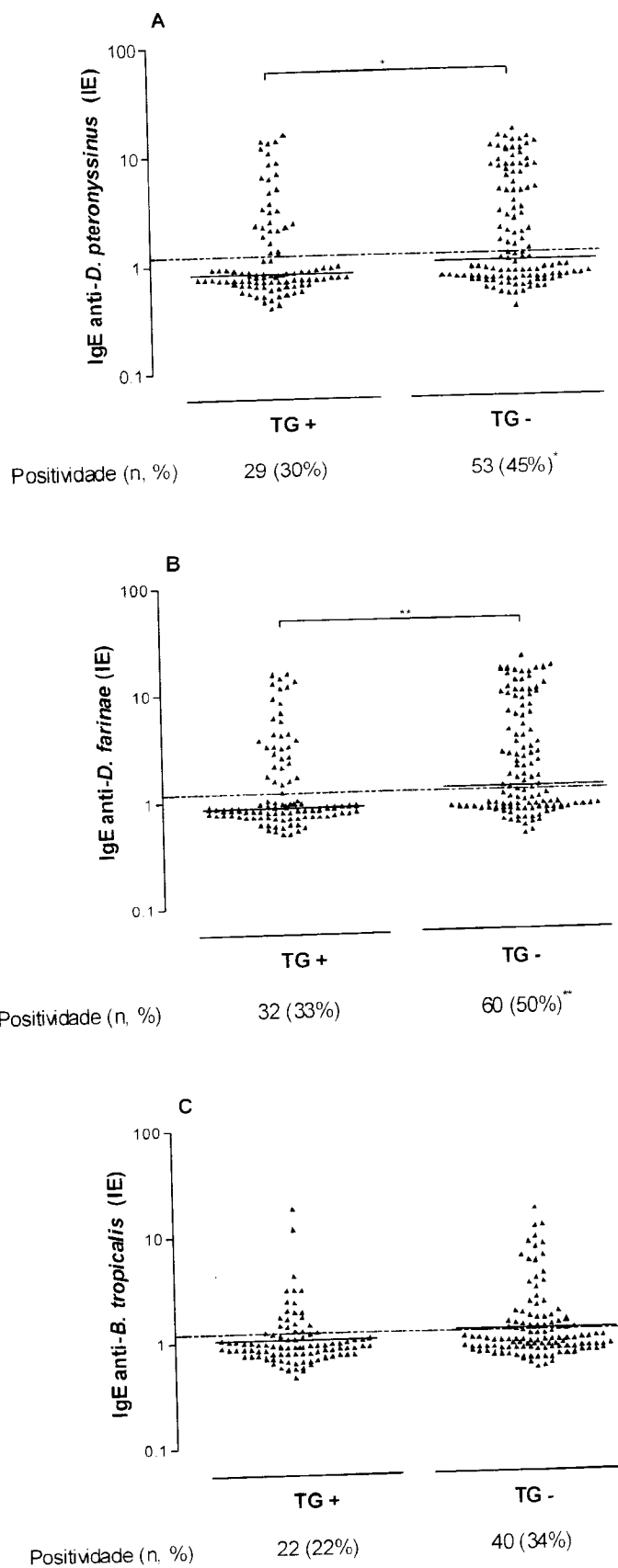
TG-: pacientes soronegativos a *Toxoplasma gondii*;

<sup>§</sup> Positividade ao teste cutâneo de puntura (TCP) foi determinada a partir do diâmetro médio da pápula e estabelecida como  $\geq 3$  mm em relação ao controle negativo da reação.

<sup>#</sup> Níveis de IgE sérica total expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) e valores representam a mediana (25%-75%).

\* Valores estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ) determinados pelo teste qui-quadrado ou Mann-Whitney, quando apropriado.

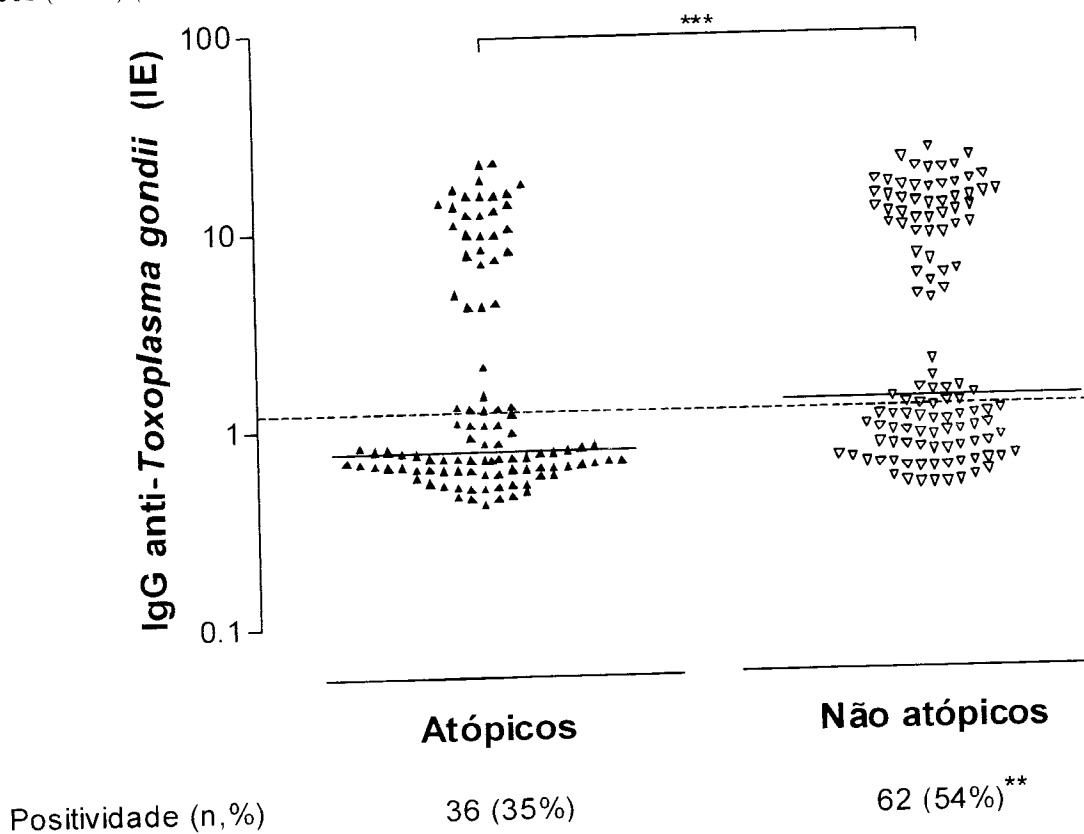
A positividade para IgE específica contra os alérgenos foi determinada como a porcentagem de amostras de soros com IE  $> 1,2$  para cada alérgeno. O grupo TG- apresentou maior positividade de IgE anti-*D. pteronyssinus* (45%) do que o grupo TG+ (30%) ( $P = 0,0238$ ). O mesmo foi verificado para IgE anti-*D. farinae*, com 50% de positividade no grupo TG- comparado a 33% no grupo TG+ ( $P = 0,0084$ ). A positividade de IgE anti-*B. tropicalis* foi ligeiramente maior no grupo TG- (34%) do que no grupo TG+ (22%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $P = 0,0700$ ).



**Figura 1.** Níveis de anticorpos IgE expressos em índice ELISA (IE) específicos a alérgenos de *D. pteronyssinus* (A), *D. farinae* (B) e *B. tropicalis* (C) em amostras de soros de pacientes soropositivos (TG+, n=98) e soronegativos (TG-, n=119) a *T. gondii*. As barras horizontais representam a mediana obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (IE > 1.2). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgE contra cada alérgeno também estão indicadas. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### 4.3. IgG anti-*T. gondii* em pacientes atópicos e não atópicos

Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre os 102 pacientes atópicos e 115 indivíduos não atópicos estão demonstrados na figura 2. Os níveis de IgG anti-*T. gondii* nos pacientes atópicos (mediana = 0,76) foram significativamente menores que nos indivíduos não atópicos (mediana = 1,32) ( $P = 0,0007$ ). Entre os pacientes atópicos, a soropositividade para *T. gondii* (35%) foi significativamente menor que aquela encontrada nos indivíduos não atópicos (54%) ( $P = 0,0059$ ).



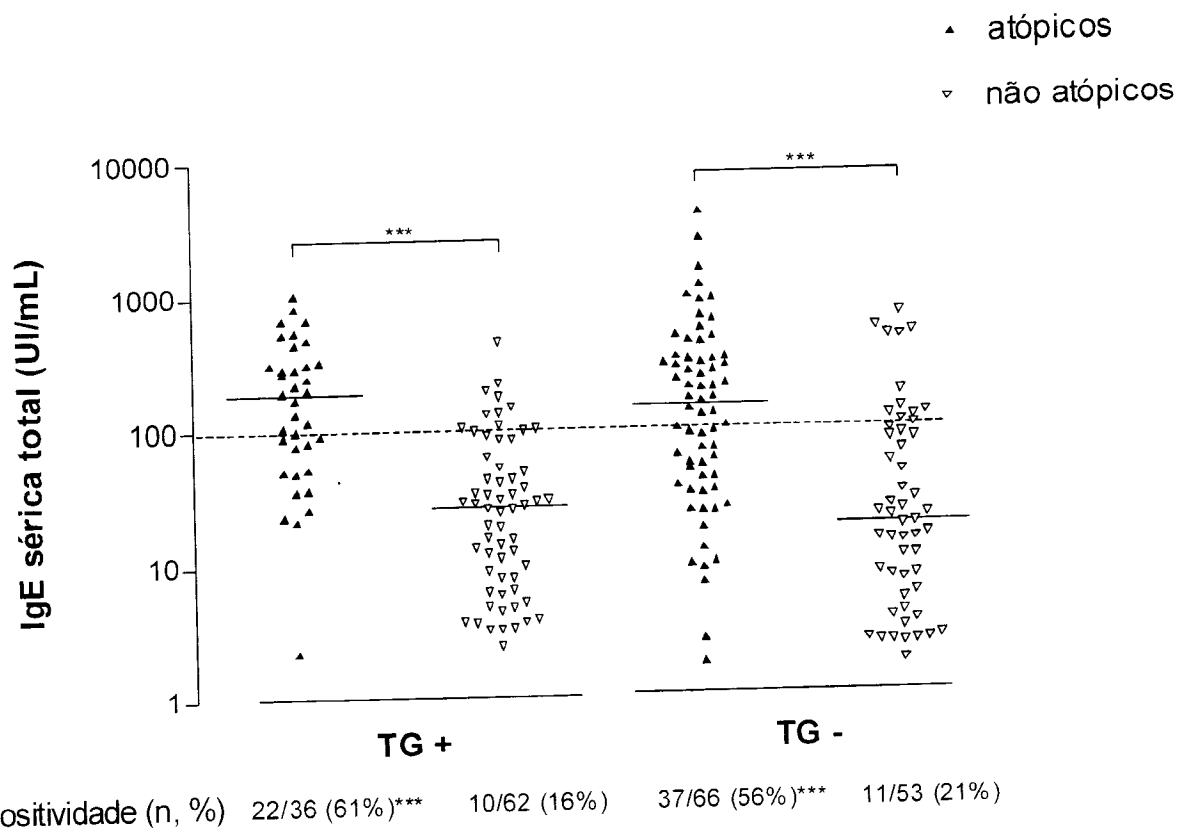
**Figura 2.** Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de soros de pacientes atópicos (n=102) e não-atópicos (n=115). As barras horizontais representam a mediana obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (IE > 1,2). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgG anti-*T. gondii* também estão indicadas. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 4.4. IgE sérica total em pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*

Como demonstrado na figura 3, no grupo soropositivo a *T. gondii*, os níveis e a positividade para IgE sérica total foram significativamente maiores entre os indivíduos atópicos (mediana = 184,3 UI/mL; 61%) em relação aos não atópicos (mediana = 26,7 UI/mL; 16%) ( $P < 0,001$ ). O mesmo foi observado no grupo TG-, onde os pacientes atópicos



apresentaram maiores níveis e positividade para IgE sérica total (mediana = 146.0 UI/mL: 56%) que os não-atópicos (mediana = 18.4 UI/mL; 21%) ( $P < 0.001$ ). Não houve diferença significativa nos níveis de IgE sérica total entre os indivíduos atópicos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, bem como entre os não atópicos soropositivos e soronegativos.



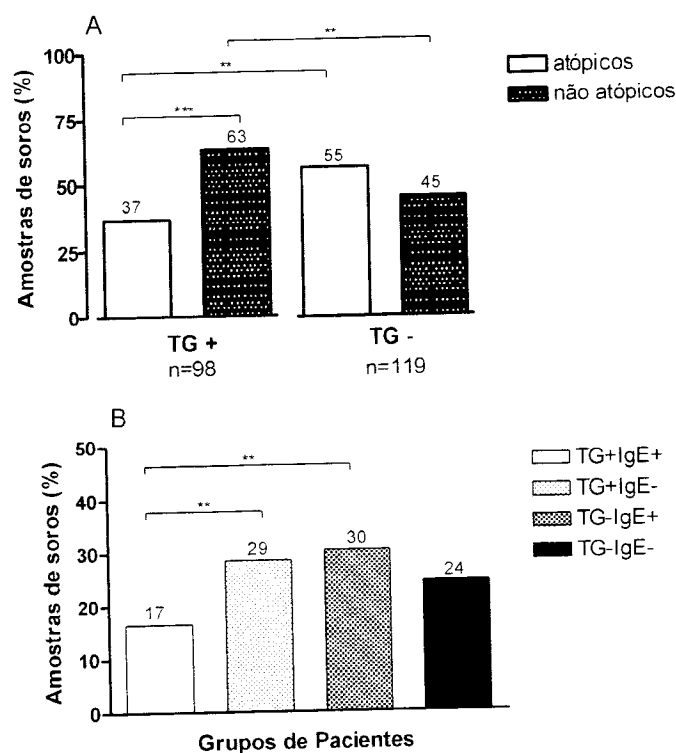
**Figura 3.** Níveis de IgE sérica total, expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL), em amostras de soros de pacientes soropositivos (TG+, n=98) e soronegativos (TG-, n=119) a *T. gondii*. As barras horizontais representam a mediana obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (> 100 UI/mL). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgE sérica total também estão indicadas. \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### 4.5. Associação entre atopia e infecção por *T. gondii*

Entre os pacientes soropositivos a *T. gondii* foi observada uma proporção significativamente maior de indivíduos não-atópicos (63%) em relação aos atópicos (37%) ( $P = 0.0002$ ) (Fig. 4A). Entre os pacientes atópicos, houve uma maior proporção de soronegativos a *T. gondii* (55%) em relação aos soropositivos (37%) ( $P = 0.0086$ ). O oposto foi verificado em relação aos indivíduos não atópicos, onde a proporção de pacientes soropositivos (63%) foi significativamente maior que a dos soronegativos a *T. gondii* (45%) ( $P$

= 0,0086). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre atópicos e não-atópicos em indivíduos soronegativos a *T. gondii* ( $P = 0.4369$ ) (Fig. 4A).

Analisando todos os grupos de pacientes (Fig. 4B), a proporção global das amostras de soros de pacientes soropositivos/atópicos (TG+IgE+; 17%) foi significativamente menor que a dos soropositivos/não-atópicos (TG+IgE-; 29%) ( $P = 0.0030$ ) como também em relação aos soronegativos/atópicos (TG-IgE+; 30%) ( $P = 0.0015$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada na proporção de pacientes soronegativos a *T. gondii* atópicos e não-atópicos ( $P = 0.1596$ ).



**Figura 4.** Associação entre atopia e infecção por *T. gondii*. (A) Proporção (%) de indivíduos atópicos e não atópicos entre os grupos soropositivos (TG+) e soronegativos (TG-) a *T. gondii*. (B) Proporção (%) global de pacientes soropositivos/atópicos (TG+IgE+), soropositivos/não atópicos (TG+IgE-), soronegativos/atópicos (TG-IgE+) e soronegativos/não atópicos (TG-IgE-).

## 5. DISCUSSÃO

Uma crescente prevalência de doenças alérgicas como asma, rinite alérgica e dermatite atópica, vem sendo demonstrada em todo o mundo (WOOLCOCK; PEAT; TREVILLON, 1995). Como alterações nesta prevalência têm ocorrido em um curto período de tempo, fatores ambientais têm sido relacionados a estas epidemias, embora a predisposição genética seja um pré-requisito para o desenvolvimento da alergia (ISAAC, 1998).

Inquéritos epidemiológicos têm relatado que a prevalência de doenças alérgicas é maior em países ocidentais desenvolvidos que em países em desenvolvimento ou na população rural (ISAAC, 1998; BRAUN-FAHRLANDER et al., 1999). Em um estudo realizado na cidade de São Paulo, foi observado que áreas urbanizadas apresentam maiores índices de sensibilização a ácaros da poeira domiciliar e fungos, comparadas a áreas tipicamente rurais, reforçando ainda mais a hipótese da influência da poluição urbana no aumento de patologias respiratórias (GALVAO, 2002). Portanto, fatores relacionados aos diferentes estilos de vida estão associados com a prevalência crescente de alergias.

Outro fator que tem merecido especial atenção enfoca o aumento do uso indiscriminado de antibióticos. A colonização do trato gastrointestinal por bactérias é pré-requisito para o desenvolvimento normal da resposta imune local e sistêmica. Diminuição da flora bacteriana está associada com resposta imune modificada e predominância de respostas anti-inflamatórias do tipo Th2 (GORE; CUSTOVIC, 2004; VERCELLI, 2006). Em camundongos, foi verificado que a flora gastrointestinal possui papel protetor no desenvolvimento de doenças alérgicas (SUDO et al., 1997).

Há uma crescente evidência, embora não conclusiva, a favor da hipótese da higiene. Os mais fortes argumentos relacionam a intensiva higiene e cuidados diários com um risco aumentado de alergia. É bem conhecido que doenças atópicas são dominadas por respostas Th2 enquanto a resposta imune a certos agentes infecciosos, particularmente *T. gondii*, é polarizada para um perfil Th1 (STRACHAN, 2000; LINNEBERG et al., 2003). Uma associação negativa entre a infecção por *T. gondii* e doenças atópicas tem sido encontrada em estudos epidemiológicos, sugerindo um papel para a infecção ou a falta de higiene como inibidores do desenvolvimento de respostas imunes alérgicas. Assim, estudos realizados nos Estados Unidos (MATRICARDI et al., 2002), Itália (MATRICARDI et al., 2000) e Dinamarca (LINNEBERG et al., 2003) têm indicado que infecções de origem alimentar ou transmitidas pela via orofecal, especialmente aquelas causadas por *T. gondii*, *Helicobacter pylori* e vírus da hepatite A, podem proteger de doenças alérgicas em seres humanos. Desta

forma, estes microorganismos têm sido considerados marcadores de “pobre” higiene e associados com uma menor prevalência de alergia.

No presente estudo, nós analisamos a resposta de anticorpos IgE específicos a alérgenos de ácaros em pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*. A soropositividade a *T. gondii* de 45% na população estudada, particularmente em grupos com maior faixa etária e independente do sexo, está em concordância com relatos anteriores (SILVEIRA-LACERDA et al., 2005), refletindo maior exposição ao parasito com o decorrer do tempo.

Analisando os resultados do TCP a ácaros e níveis séricos de IgE total entre os pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, foi observada uma tendência para menor positividade destes parâmetros no grupo de pacientes soropositivos, sugerindo uma associação negativa entre atopia e infecção por *T. gondii* na população em estudo. Adicionalmente, considerando os resultados de IgE sérica específica a alérgenos derivados de ácaros, uma evidente e significativa menor sensibilização para *D. pteronyssinus* e *D. farinae* foi encontrada no grupo de pacientes soropositivos a *T. gondii*, reforçando a associação negativa entre a infecção por este microrganismo e sensibilização alérgica. Esses dados indicam que a resposta imune de um perfil Th1 induzida por parasitos intracelulares como *T. gondii* possa estar influenciando na indução de uma resposta alérgica do tipo Th2. Além disso, nota-se claramente que os ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* mais do que *B. tropicalis* exercem papel relevante na sensibilização alérgica em indivíduos desta região, como anteriormente demonstrados em nossos estudos anteriores (SOPELETE et al., 2000; TERRA et al., 2004).

Analisando a resposta imune humoral contra *T. gondii* entre os indivíduos atópicos e não atópicos, foram verificados maiores níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* bem como maior soropositividade ao parasito entre os indivíduos não-atópicos, reforçando o fato de que a resposta imunológica a *T. gondii* possa exercer efeitos inibitórios na indução da resposta alérgica. Por outro lado, a resposta de IgE sérica total não mostrou diferenças significativas entre os indivíduos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, indicando que a infecção pelo parasito parece não exercer influência sobre os níveis de IgE sérica total, ao contrário do que foi observado com IgE sérica específica aos alérgenos de ácaros. Por outro lado, estudos têm demonstrado que indivíduos infectados por *T. gondii* podem também produzir anticorpos IgE específicos ao parasito, sem provocar alterações significativas nos níveis de IgE sérica total (VILLENA et al., 1999; FOUDRINIER et al., 2003).

Analisando a associação entre a resposta alérgica a ácaros e a resposta imune humoral a *T. gondii*, nossos resultados demonstraram que há uma maior proporção de indivíduos não-

atópicos entre os soropositivos para *T. gondii*, mas entre os soronegativos esta diferença não foi evidenciada, sugerindo que a infecção pelo parasito parece influenciar negativamente na sensibilização alérgica a ácaros.

No nosso estudo, a associação entre atopia e infecção por *T. gondii* foi investigada pela primeira vez na população de Uberlândia, MG, Brasil, demonstrando que a maioria dos pacientes soropositivos a *T. gondii* eram não-atópicos, reforçando assim o papel protetor desta infecção no desenvolvimento de doenças alérgicas.

## 6. CONCLUSÕES

- Indivíduos soropositivos a *T. gondii* apresentam menores níveis de anticorpos e taxas de soropositividade de IgE específicos a alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* do que os indivíduos soronegativos.
- Pacientes atópicos apresentam menores níveis de anticorpos e taxas de soropositividade de IgG anti-*T. gondii* do que os indivíduos não-atópicos.
- A presença da infecção por *T. gondii* parece exercer efeito inibitório na sensibilização alérgica aos ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.K. **Imunologia Celular e Molecular**, 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ALMEIDA, K. C.; SILVA, D. A. O; GENNARI-CARDOSO, M. L.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Responses of IgE, IgG1 and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, p. 1445-1454, Nov. 2006.

AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. Toxoplasmosis – Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitology Today**, Amsterdam v. 9, n. 2, p. 61-63, Fev. 1993.

ARLIAN, L.G., BERNSTEIN, D., FRIEDMAN, S., 1992. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 90, n. 3, p. 292-300, Set. 1992.

ARRUDA, L. K., CHAPMAN, M.D. A review of recent immunochemical studies of *Blomia tropicalis* and *Euroglyphus maynei* allergens. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 16, n. 1-2, p. 129-140, Nov. 1992.

ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, Jul. 1991.

BABU, K.S.; ARSHAD, S.H. The role of allergy in the development of airway inflammation in children. **Paediatric Respiratory Reviews**, London, v. 4, n. 1, p. 40-46, Mar. 2003.

BOQUETE, M.; IRAOLA, V.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; VILLAROEL, L. A.; CARBALLADA, F. J.; de la CUESTA, C. G.; LOPEZ-RICO, M. R.; ORJALES, R. N.; PARRA, A.; SOTO-MERA, M. T.; VARELA, S.; VIDAL, C. House Dust Mite Species and Allergen Levels in Galicia, Spain: a Cross-Sectional, Multicenter, Comparative Study. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**; Barcelona, v. 16, n. 3, p. 169-176, Mai/Jun. 2006.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 9, p. 841-855, Set. 2002.

BRAUN-FAHRLANDER, C.; GASSNER, M.; GRIZE, L.; NEU, U.; SENNHAUSER, F. H.; VARONIER H. S.; VUILLE, J. C.; WUTHRICH, B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 28-34, Jan. 1999.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 213-218, Mai/Jun. 1991.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, Washington, v. 21, n. 1, p. 55-58, Jul. 1978.

COLLOFF, M. J., AYRES, J., CARSWELL, F., HOWARTH, P. H., MERRETT, T. G., MITCHELL, E. B., WALSHAW, M. J., WARNER, J. O., WARNER, J. A., WOODCOCK, A. A. The control of allergens of dust mites and domestic pest: a position paper. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 22 n. 2, p. 1-28, Set. 1992

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London, v. 402, n. 25, p. 5-11, Nov. 1999.

CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A. B. **Allergy and allergic diseases**, Oxford, 1. ed., v. 2, p. 797-810, 1997.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, D. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN- $\gamma$  dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class 1-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 178, n. 5, p. 1465-1472, Nov. 1993.

DEVOS, S.; CORMONT, F.; VRTALA, S.; HOOGHE-PETERS, E.; PIRSON, F.; SNICK, J. Allergen-induced interleukin-9 production *in vitro*: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 174-182, Feb. 2006.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, Jul. 1998.



DUFF, A. L.; PLATTS-MILLS, T. A. E.. Allergens and asthma. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 39, n. 6, p. 1277-1291, Dec. 1992.

FARHAT, C. K.; CARVALHO, E. S.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. **Infectologia Pediátrica**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 612-618, 1998.

FOUDRINIER, F.; VILLENA, I.; JAUSSAUD, R.; AUBERT, D.; CHEMLA, C.; MARTINOT, F.; PINON, J. M. Clinical Value of Specific Immunoglobulin E Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Cases of Acquired and Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1681-1686, Abr. 2003.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**, 4.ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, p. 1127-1174, 1999.

GALVAO, C. E. S.; KALIL, J.; CASTRO, F. F. M. Sensibilização a aeroalérgenos em dois grupos escolares nas zonas rural e urbana de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 25, n.1, p. 02-09, Jan/Fev. 2002.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ cells and accompanied by over production of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 2, p. 798-805, Jul. 1996.

GORE, C.; CUSTOVIC, A. Protective parasites and medicinal microbes? The case for hygiene hypothesis. **Primary care respiratory journal**, Edgbaston, v.13, n. 1 p. 68-75, Mar. 2004.

HALLAS, T. E. The biology of mites. **Allergy**, Copenhagen, v. 46, n. s11, p. 6-9, Jan. 1991.

HART, B. J.; CROWTHER, D.; WILKINSON, T.; BIDDULPH, P.; UCCI, M.; PRETLOVE, S.; RIDLEY, I.; ORESZCZYN, T. Reproduction and Development of Laboratory and Wild House Dust Mites (Acari: Pyroglyphidae) and Their Relationship to the Natural Dust Ecosystem. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 4, p. 568-574, Jul. 2007.

HERZ, U.; LACY, P.; RENZ, H.; ERB, K. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 632-640, Dec. 2000.

HOLT, P. G. Environmental factors and primary T-cell sensitisation to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. **Pediatric Allergy and Immunology**, Copenhagen, v. 6, n. 1, p. 1-10, Fev. 1995.

ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) steering committee. **Lancet**, London, v. 351, n. 9111, p. 1225-1232, Apr. 1998.

JOHANSSON, S. G. O.; O'B-HOURUHANE, J.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 9, p. 813-824, Set. 2001.

KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* and Toxoplasmosis. In: Warren, K.S. (ed). **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. Cambridge: Blackwell, p. 269-295, 1993.

KHAN, I. A.; MATSSURA, T.; KASPER, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 185-195, Abr. 1995.

KIM, J.; AHN, M.; JUN, H.; JUNG, J.; RYU, J.; MIN, D. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspases inactivation and NF- $\kappa$ B activation. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 47, n. 6, p. 862-869, Dec. 2006.

LINNEBERG, A.; OSTERGAARD, C.; TVEDE, M.; ANDERSEN, L. P.; NIELSEN, N. H.; FROLUND, L.; DIRKSEN, A.; JORGENSEN, T. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 111, n. 4, p. 847-853, Abr. 2003.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, Jan. 1951.

MARONE, G. Asthma: recent advances. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 5-9, Jan. 1998.

MATRICARDI, P. M.; ROSMINI, F.; PANETTA, V.; FERRIGNO, L.; BONINI, S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St Louis, v. 110, n. 3, p. 381-387, Set. 2002.

MATRICARDI, P. M.; ROSMINI, F.; RIONDINO, S.; FORTINI, M.; FERRIGNO, L. RAPICETTA, M.; BONINI, S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. **British Medical Journal**. London, v. 320, n. 7232, p. 412-417, Fev. 2000.

MATRICARDI, P. M. Infections preventing atopy: facts and new questions. **Allergy**. Copenhagen, v. 52, n. 9, p. 879-882, Set. 1997.

McKAY, S. P.; MESLEMANI, D.; STACHLER, R. J.; KROUSE, J. H. Intradermal positivity after negative prick testing for inhalants. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, Chicago, v. 135, n. 2, p. 232-235, Ago. 2006.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 27, n. 2, p. 283-287, Fev. 1980.

MIRANDA, R. J.; QUINTERO, D.; ALMANZA, A. House dust mites from urban and rural houses on the lowland Pacific slopes of Panama. **Systematic and Applied Acarology**, London, v. 7, n. 1, p. 23-30, 2002.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. London, v. 363, n. 12, p. 1965-1975, Jun. 2004.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OWNBY, D. R. Allergy testing: in vitro *versus* in vivo. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 995-1009, Out. 1988.

PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, Mar. 2005.

PICCIRILLO, C. A.; LETTERIO, J. J.; THORNTON, A. M.; McHUGH, R. S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H.; SHEVACH, E. M. CD24+CD25+ regulatory T cells mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor 1 production and

responsiveness. **The Journal of Experimental Medicine**. New York, v. 196, n. 2, p. 237-245, Jul. 2002.

PLATTS-MILLS, T. A. E. How environment affects patients with allergic disease: Indoor allergens and asthma. **Annals of Allergy**, McLean, v. 72, n. 4, p. 381-384, Abr. 1994.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SOLOMON, W. R. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E. Jr.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F. Jr.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W. **Allergy: principles and practice**, 4. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, p. 469-528, 1993.

POLLART, S. M.; WARD G. W. Jr.; PLATTS-MILLS, T. A. E. House dust sensitivity and environmental control. **Immunology Allergy Clinical North America Philadelphia**, v. 14, n. 3, p. 591-603, Set. 1987.

RADON, K.; WINDSTETTER, D.; ECKART, J.; DRESSEL, H.; LEITRITZ, L.; REICHERT, J.; SCHMID, M.; PRAML, G. SCHOSSER, M.; Von MUTIUS, E.; NOWAK, D. Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1178-1183, Ago. 2004.

RIEDLER, J.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; EDER, W.; SCHREUER, M.; WASER, M.; MAISCH, S.; CARR, D.; SCHIERL, R.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. **The Lancet**. London, v. 358, n. 9288, p. 1129-1133, Out. 2001.

ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 77, n. 6, p. 371-377, Jun. 1993.

SELTZER, J. Biological contaminants. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 94, n. 2, p. 318-326, Aug. 1994.

SETTIPANE, R. J.; HAGY, G. W.; SETTIPANE, G. A. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. **Allergy proceedings**, Providence, v. 15, n. 1, p. 21-25, Jan./Feb. 1994.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG-SANG, J. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545-550, Mai. 2001.

SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; BURNIER, M.; NUSSENBLATT, R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 106, n. 3, p. 362-364, Set. 1988.

SILVEIRA-LACERDA, E. P.; MACHADO, E. R.; ARANTES, S. C. F.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. IgG and IgM antibody prevalence to *T. gondii* in blood donors of the Hemocentro Regional de Uberlândia, MG, Brazil. **Transfusion today**, Amsterdam, v. 63, p. 25, 2005.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**; St Louis, v. 108, n. 1, p. s2-s8, Jul. 2001.

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 82, n. 3, p. 233-248, Mar. 1999.

SOARES, F. A. A.; SEGUNDO, G. R. S.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 25-28, Fev. 2007.

SOLARZ, K. Risk of exposure to house dust Pyroglyphidae mites in Poland. **Annals of agricultural and environmental medicine**, Lublin, v. 8, n. 1, p. 11-24, Dec. 2001a.

SOLARZ, K. Pyroglyphidae (Acari: Astigmata) in Poland. Distribution, biology, population ecology and epidemiology. **Acta zoologica cracoviensia**, Kraków, v. 44, n. 4, p. 435-528, Jul. 2001b.

SOLE, D.; CAMELO-NUNES, I. C.; VANA, A. T.; YAMADA, E.; WERNECK, F.; DE FREITAS, L. S.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; STEIN, R. T.; NASPITZ, C. K. Prevalence of rhinitis and related-symptoms in schoolchildren from different cities in Brazil. **Allergologia et immunopathologia**, Madrid, v. 32, n. 1, p. 7-12, Jan./Feb. 2004.

SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; TAKETOMI, E. A. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 122, n. 4, p. 257-263, Aug. 2000.

STRACHAN, D. P. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". **Thorax**, London, v. 55, n. 1, p. 2-10, Ago. 2000.

SUDO, N.; SAWAMURA, S.; TANAKA, K.; AIBA, Y.; KUBO, C.; KOGA, Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 159, n. 4, p. 1739-1745, Ago. 1997

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, Nov. 2000.

TERRA, S. A.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; MENDES, J.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 14, n. 3, p. 232-237, Sep. 2004.

TOGIAS, A. Unique mechanistic features of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 105, n. 6, p. S599-S604, Jun. 2000.

VAN BRONSWIJK, J. E. M. H.; DE COCK, A. W. A. M.; OSHIMA, S. The genus *Blomia* Oudemans (Acari: Glycyphagidae). I. Description of *Blomia tropicalis* sp. n. from house dust in tropical and subtropical regions. **Acarologia**, Abbeville, v. 15, n. 3, p. 477-489, Mar. 1973.

VENTURA, M. T.; MUNNO, G.; GIANNOCCARO, F.; ACCETTURA, F.; CHIRONNA, M.; LAMA, R.; HOXHA, M.; PANETTA, V.; FERRIGNO, L.; ROSMINI, F.; MATRICARDI, P. M.; BARBUTI, S.; PRIFTANJLI, A.; BONINI, S.; TURSI, A. Allergy, asthma and markers of infections among Albanian migrants to Southern Italy. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, n. 6, p. 632-636, Jun. 2004.

VERCELLI, D. Mechanisms of the hygiene hypothesis – molecular and otherwise. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 18, n. 6, p. 733-737, Dec. 2006.

VILLENA, I.; AUBERT, D.; BRODARD, V.; QUEREUX, C.; LEROUX, B.; DUPOUY, D.; REMY, G.; FOUDRINIER, F.; CHEMLA, C.; GOMEZ-MARIN, J. E.; PINON, J. M. Detection of Specific Immunoglobulin E during Maternal, Fetal, and Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 11, p. 3487-3490, Nov. 1999.

VOORHORST, R. House dust mite and house dust allergy. **Annals of Allergy**, McLean, v. 38, n. 1, p. 71, Jan. 1977.

WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunology Today**, Amsterdam v. 18, n. 7, p. 335-343, Jul. 1997.

WELTER, A.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; LOURENÇO, E. V.; FERRO, E. A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, N. M. An opposite role is exerted by the acarian *Myocoptes musculus* in the outcome of *Toxoplasma gondii* infection according to the route of the protozoa inoculation. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 11, p. 2618-2628, Set. 2006.

WHITE, M. V., KALINER, M. A. Mediators of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 90, n. 4, p. 699-704, Oct. 1992.

WICKENS, K.; LANE, J. M.; FITZHARRIS, P.; SIEBERS, R.; RILEY, G.; DOUWES, J.; SMITH, T.; CRANE, J. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 12, p. 1171-1179, Dec. 2002.

WOOLCOCK, A. J.; PEAT, J. K.; TREVILLON, L. M. Changing prevalence of allergies worldwide. **Progress in Allergy and Clinical Immunology**, Stockholm: Hogrefe and Huber, v. 3, p. 167-171, Jul. 1995.

WORM, M.; HENZ, B. M. Molecular regulations of human IgE synthesis. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 75, n. 6, p. 440-447, Jun. 1997.

## ANEXO 1A

**Universidade Federal de Uberlândia****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP-38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078

Uberlândia, 02 de maio de 2002.

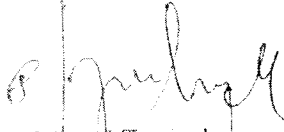
Processo nº 039/2002

**PROJETO DE PESQUISA: "Identificação de Frações Alergênicas e Avaliação da Resposta Imune Humoral a Dermatophagoides Pteronyssinus".**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ernesto Akio Taketomi**

**PARECER:**

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem



Prof. Miguel Tanús Jorge  
CEP/UFU



## ANEXO 1B



Universidade Federal de Uberlândia  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
 Av. João Naves de Ávila, nº 2.100 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
 CEP 35400-058 - FONE/FAX: (34) 3239-4531

**ANÁLISE FINAL Nº 111/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O  
 PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 056/07**

**Projeto Pesquisa** Análise do perfil anticórpico e de citocinas específicos e diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais

**Pesquisador Responsável:** Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação:** O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa;
- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto;
- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do **Relatório parcial:** janeiro/2009

Data para entrega do **Relatório final:** janeiro/2011

13 de abril de 2007

Prof.ª Dra. Sandra Teresinha de Farias Furtado  
 Coordenadora do CEP/UFU

Condições de pesquisa:

*Uma parte de aprovação em caráter de recomendação*

- \* O sujeito de pesquisa tem o direito de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem nenhuma obrigação, sem prejuízo de ser obrigado (Res. CNS 196/96 - item IV.1.1.1) e deve receber uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido, assinada por ele mesmo (item IV.2.4)
- \* O pesquisador deve desenvolver a pesquisa com uma delimitação no plano de trabalho e de objetivos, após a análise em todas as fases da documentação pelo CEP, após aprovação (Res. CNS item III.1.2), permitindo, nos parâmetros estabelecidos, pesquisar mais ou menos, desde que não prejudique o objeto partilhado, ou quando, comparado a superação de mesmo, oferecendo a um ou alguns de pesquisa (item 3.3.3) um benefício mais imediato.
- \* O CEP deve ser informado de todos os eventuais adversos ocorridos durante a execução normal do estudo (Res. CNS item III.1.1) e o responsável principal assegure medidas imediatas a respeito (item 3.3.2) e o evento adverso grave ocorrido, assim que tomar conhecimento, dentro de prazo estabelecido pelo CEP e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - item 3.3.2.1 - ser providenciado.
- \* Quando ocorrer qualquer situação de emergência decorrente da aprovação do protocolo de pesquisa, o responsável pelo projeto deve imediatamente e devidamente justificadamente, comunicar o CEP e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - responsável da regulamentação de pesquisa - sobre o evento adverso grave ocorrido, assim que tomar conhecimento, dentro de prazo estabelecido pelo CEP e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - item 3.3.2.1 - ser providenciado.

## ANEXO 2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica  
Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG  
Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Identificação das frações alergênicas e avaliação da resposta imune humoral a *Dermatophagoides pteronyssinus***”, cujo principal objetivo é fracionar proteínas alergênicas do ácaro *D. pteronyssinus* e avaliar a sua reatividade com os anticorpos de indivíduos alérgicos.

Estou ciente de todos os procedimentos abaixo relacionados aos quais serei submetido (a) e que serão realizados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica do Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Bloco 4C, a saber:

- realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inaláveis
- necessidade de coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos a aeroalérgenos

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar, sem a necessidade prévia de explicações.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA

\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA

## ANEXO 3


**Universidade Federal de Uberlândia**

Instituto de Ciências Biomédicas  
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica  
 Av. Pará, 1720, Campus Umuarama - Bloco 4C  
 Uberlândia, MG - Brasil - 38.400-902  
 Telefone: (34) 3218-2195 - TELEFAX: (34) 3218-2333

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Grau de escolaridade: ( ) Primeiro grau ( ) Segundo grau ( ) Faculdade

Nível sócio-econômico (renda familiar):

- ( ) até 1 salário mínimo ( ) de 5 a 10 salários mínimos  
 ( ) de 1 a 2 salários mínimos ( ) mais de 10 salários mínimos  
 ( ) de 2 a 5 salários mínimos

**Questionário 1 (Módulo Asma)**

1) Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?

( ) Sim ( ) Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6.

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)?

( ) Sim ( ) Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

- Nenhuma crise ( )  
 1 a 3 crises ( )  
 4 a 12 crises ( )  
 mais de 12 crises ( )

4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?

- Nunca acordou com chiado ( )  
 Menos de uma noite por semana ( )  
 Uma ou mais noites por semana ( )

5) Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?

( ) Sim ( ) Não

6) Alguma vez na vida você teve asma?

( ) Sim ( ) Não

7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

Sim       Não

8) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

Sim       Não

### Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você **não** estava gripado ou resfriado

1) Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?

Sim       Não

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?

Sim       Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

Sim       Não

4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu).

<input type="checkbox"/> Janeiro	<input type="checkbox"/> Maio	<input type="checkbox"/> Setembro
<input type="checkbox"/> Fevereiro	<input type="checkbox"/> Junho	<input type="checkbox"/> Outubro
<input type="checkbox"/> Março	<input type="checkbox"/> Julho	<input type="checkbox"/> Novembro
<input type="checkbox"/> Abril	<input type="checkbox"/> Agosto	<input type="checkbox"/> Dezembro

5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?

Nada	<input type="checkbox"/>
Pouco	<input type="checkbox"/>
Moderado	<input type="checkbox"/>
Muito	<input type="checkbox"/>

6) Alguma vez na vida você teve rinite?

Sim       Não

### Questionário 3 (Módulo Eczema)

1) Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?

Sim       Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?

Sim       Não

- 3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?

Sim       Não

- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?

Sim       Não

- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?

Nunca nos últimos 12 (doze) meses      ( )

Menos de uma noite por semana      ( )

Uma ou mais noites por semana      ( )

- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?

Sim       Não

## ANEXO 4



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica

Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG

Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

### TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (Ácaros de poeira domiciliar)

Nº	Extrato	Tamanho da pápula (mm)	Tamanho do eritema (mm)
1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
2	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
3	<i>Blomia tropicalis</i>		
4	Controle positivo		
5	Controle negativo		

*Valores de referência:*

Positivo – diâmetros ortogonais maiores ou iguais a 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Negativo – diâmetros ortogonais menores do que 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi  
*Responsável técnico*

