



Universidade Federal de Uberlândia

Mônica Camargo Sopelete

**Sensibilização e Exposição a Alérgenos
de Ácaros Domiciliares entre Pacientes
Asmáticos de Uberlândia, MG**

Uberlândia
2000

SISBI/UFU



1000193775



Universidade Federal de Uberlândia

MON
616 - 056.3
S712b
TESI MEM

Mônica Camargo Sopelete

Sensibilização e Exposição a Alérgenos de Ácaros Domiciliares entre Pacientes Asmáticos de Uberlândia, MG

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Ernesto Akio Taketomi
Co-orientador: Dra Deise A. de Oliveira Silva

Uberlândia
2000

Tente Mais uma Vez

Eis aqui o bom conselho:

Tente mais uma vez;

Se no início algo é difícil conseguir,

Tente mais uma vez,

E verá sua coragem aparecer:

Nunca trema, não há nada que temer;

Persevere e verá que vai vencer;

Tente mais uma vez.

“O livro das Virtudes para Crianças”.

William J. Bennett

Trabalho realizado no laboratório de Imunologia do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação do Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi e com auxílio financeiro da CAPES.

Aos três grandes
amores de minha vida,

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas e meu orientador, pela disponibilidade e confiança e ensinamentos, possibilitando assim ampliar meus conhecimentos técnicos

À **Dr^a Deise Aparecida de Oliveira Silva** pela dedicação e orientação incomensurável, e a grande amiga **Deise** pela onipresença.

A **todos os professores** do curso de Pós-Graduação, que imprescindivelmente contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos **meus pais e irmãs**, com muito amor.

Agradecimentos

A todas as pessoas que ajudaram-me, em qualquer momento, tanto no desenvolvimento desse estudo, como no curso de Pós-Graduação, entre elas:

Marias Aparecidas, Netos, Juninhos, Márcios, Fernandas,

Maxs, Juniões, Danielas, Rosas, Álvaros, Nilzas,

Betes, Terezinhas, Julianos, Rosineides, Joãos,

Dagmares, Hélicas, Hélios, Ronaldos, Denises,

Cidas, Gláucias, Julianas, Adalbertos, Jodis,

Fabianas, Ronans, Aurélias, Júniors, Cássios, Tânicas,

Marias Raquel, Marias da Graça, Patrícias,

Tracísios, Valeskas, Flávias, Alziros, Waldemares,

Arilmas, Chaves, Gabrielas,

Muito obrigada pela nossa amizade.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	<i>2'2-azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i>
Ac	Anticorpo
APC	Célula apresentadora de antígeno
AU/ml	Unidade alergênica por mililitro
Blo t	<i>Blomia tropicalis</i>
BSA	soroalbumina bovina
°C	Centígrados
cDNA	DNA complementar
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
DP	Desvio Padrão
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
EU/mL	Unidade ELISA por mililitro
Fc	<i>Fragment crystallizable</i> (Fragmento cristalizável)
Fc ϵ RI	Receptor de alta afinidade para porção Fc de IgE
g	grama
g	força da <i>gravidade</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i> (Antígeno leucocitário humano)
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina

kDa	kiloDaltons
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
mL	mililitro
mm	milímetros
µg	micrograma
µm	micrômetro
NA	Não atópico
ng	nanograma
nm	nanômetro
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de <i>Tween 20</i> (<i>Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate</i>)
RAST	<i>Radioallergosorbent test</i> (Radioimunoensaio)
RU/mL	Unidades RAST por mililitro
SPT	<i>Skin prick test</i> (Teste cutâneo de punctura)
SPT ⁺	Teste cutâneo de punctura positivo
SPT ⁻	Teste cutâneo de punctura negativo
STAT	<i>Signal Transducer and activator of transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor da célula T)
Th1	Linfócito T "helper" 1
Th2	Linfócito T "helper" 2
IU/mL	Unidade Internacional por mililitro

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alérgenos	1
1.2. Atopia	2
1.3. Asma	3
1.3.1. Epidemiologia	4
1.3.2. Classificação	5
1.3.3. Resposta imune alérgica	7
1.3.3.1. Fisiopatologia	10
1.3.3.2. Regulação da síntese de IgE	11
1.3.3.2.1. Fatores genéticos	11
1.3.3.2.2. História natural de exposição alérgica	12
1.3.3.2.3. Natureza do antígeno	13
1.3.3.2.4. Células T auxiliaadoras e sua citocinas	14
1.4. Alérgenos da poeira domiciliar	16
1.4.1. Ácaros da poeira domiciliar	16
1.4.1.1. Classificação	17
1.4.1.2. Classificação taxonômica	17
1.4.2. Caracterização imunoquímica e molecular dos alérgenos de ácaros	18
1.5. Exposição aos alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i> e <i>D. farinae</i>	19
1.6. Sensibilização aos alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i> e <i>D. farinae</i>	24
1.6.1. Avaliação da sensibilização aos alérgenos domiciliares	26

1.6.1.1. Testes <i>in vivo</i> (cutâneos)	26
1.6.1.2. Testes <i>in vitro</i> (ELISA e RAST)	28
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Aspectos éticos	33
3.2. Local do estudo	33
3.3. Casuística	34
3.4. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata	36
3.5. Colheita de sangue	37
3.6. Testes sorológicos	37
3.6.1. ELISA para detecção dos níveis de IgE sérica total	37
3.6.2. ELISA reverso para detecção dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos	39
3.7. Coleta da poeira domiciliar e extração dos alérgenos	41
3.8. ELISA para detecção de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar (Der p 1, Der p 2 e Der f 1)	42
3.9. Ensaios de reatividade cruzada na determinação dos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1	44
3.10. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	47
4.1. Características gerais das amostras	47
4.2. Reatividade aos testes cutâneos	47
4.3. Níveis séricos de IgE total	49

4.4. IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1	51
4.5. Níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 em amostras de poeira domiciliar	55
4.5.1. Níveis do alérgeno Der p 1 de <i>D. pteronyssinus</i>	56
4.5.2. Níveis do alérgeno Der p 2 de <i>D. pteronyssinus</i>	58
4.5.3. Níveis do alérgeno Der f 1 de <i>D. farinae</i>	60
4.6. Índice de exposição alergênica	62
4.7. Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 1 e Der p 2 com a reatividade cutânea ao extrato de <i>D. pteronyssinus</i>	63
4.8. Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 1, Der p 2 e Der f 1 com os níveis de exposição alergênica aos respectivos alérgenos	65
4.9. Reatividade cruzada dos testes ELISA na determinação dos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1	67
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	85
7. RESUMO	86
8. SUMMARY	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
10. ANEXOS	105
ANEXO 1	105

ANEXO 2

106

ANEXO 3

107

ANEXO 4

113

ANEXO 5

114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alérgenos

Qualquer substância capaz de induzir uma resposta imune e causar alergia é um alérgeno em potencial (TERR, 1997a). Um antígeno pode ser definido como qualquer substância capaz de interagir com anticorpos específicos ou com células envolvidas na resposta imunológica.

Complexos orgânicos naturais, geralmente, são causadores de alergia mediada por anticorpos, enquanto que compostos orgânicos simples, químicos inorgânicos e metais, mais frequentemente causam alergia mediada por células T. Exposição a um alérgeno pode ser através de inalação, ingestão, injeção ou contato com a pele ou mucosas (TERR, 1997a).

Sensibilização a um determinado alérgeno ambiental é o resultado de uma complexa inter-relação das propriedades físicas e químicas de um dado alérgeno, do modo e da quantidade de exposição, bem como dos fatores genéticos próprios do indivíduo exposto (TERR, 1997b).

Muitos alérgenos, por si só são fortes imunógenos, apresentando peso molecular acima de 10 kDa. Outros porém, de peso molecular entre 1 e 6 kDa podem ser ou não imunógenos e, os abaixo de 1kDa geralmente não são imunogênicos. Essas moléculas de baixo peso molecular são denominados de haptenos, os quais para tornarem-se imunogênicos necessitam de se ligarem com uma molécula maior chamada carreadora (BENJAMINI & LESKOWITZ, 1988).

Geralmente, de acordo com a natureza química, as proteínas são os melhores imunógenos, porém, variável conforme o peso molecular, configuração espacial da molécula, dose e via de entrada. Os polissacárides são bons imunógenos quando associados a moléculas mais complexas, como proteínas. Já os lípidos, quando purificados, são incapazes de ativar linfócitos, porém, podem atuar como haptenos (BENJAMINI & LESKOWITZ, 1988).

Mais importante, contudo, é a substância ser reconhecida como estranha. O sistema imune normalmente discrimina entre próprio e não próprio, tanto que somente moléculas estranhas ao organismo são imunogênicas (PARSLOW, 1997).

Alérgenos frequentemente são proteínas (geralmente glicoproteínas) ou químicos (haptenos) que podem ligar-se a proteínas. Essas substâncias são nomeadas de acordo com um guia publicado em 1994 pela "World Health Organization / International Union of Immunologic Sciences / Allergen Nomenclature Sub-committee" (KING *et al.*, 1995). O nome incorpora as três primeiras letras do gênero e a primeira letra (ou as duas primeiras, para evitar ambigüidade) da espécie a partir da qual o alérgeno é derivado, mais um numeral arábico (o qual pode ser usado para denotar alérgenos homólogos estruturalmente, porém, de espécies diferentes). Por exemplo, alérgenos estruturalmente similares (antígenos do grupo 1) oriundos de duas espécies de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*) são designados Der p 1 e Der f 1, respectivamente.

Aeroalérgenos, alérgenos transportados pelo ar, frequentemente estão associados a partículas (grãos de pólen, fezes de ácaros, secreções animais), sendo que são comumente subdivididos em "indoor" (domiciliares) e "outdoor" (ao ar livre). São proteínas, relativamente pequenas, altamente solúveis em meio aquoso, o que permite se dispersarem no muco e outros fluidos corporais. Geralmente, são derivados ou estão associados a partículas cujas propriedades favorecem a sobrevivência ou dispersão dos alérgenos mantendo-os intactos (GALLI & LANTZ, 1999).

1.2. Atopia

Atopia refere-se à predisposição genética a responder imunologicamente a vários alérgenos de ocorrência natural, quando inalados ou ingeridos, com uma contínua produção de imunoglobulina E (IgE) (TERR, 1997b). O estado atópico é reconhecido clinicamente por testes cutâneos, podendo ainda serem reconhecidos pela presença de IgE alérgeno-

específicas, pela elevação da IgE sérica total e pela presença de eosinófilos no sangue (COOKSON, 1999).

O termo alergia foi introduzido por Clemens von Pirquet em 1906 para descrever uma reatividade alterada do sistema imune. O seu mecanismo fisiopatológico compreende a presença, principalmente de anticorpos reagínicos, imunoglobulinas da classe E.

Mais tarde, o termo atopia foi empregado originalmente por Coca & Cooke em 1923, em um grupo de doenças que apresentavam, em comum, um mecanismo fisiopatológico envolvendo reações de hipersensibilidade do tipo I, onde os indivíduos apresentavam testes cutâneos positivos para aeroalérgenos e história familiar de asma e/ou rinite e/ou dermatite atópica (ROITT *et al.*, 1998).

Rinite alérgica e asma alérgica são as manifestações mais comuns de doença clínica após exposição a alérgenos do meio ambiente, enquanto dermatite atópica é menos frequente. Duas ou mais formas clínicas de atopia podem coexistir no mesmo paciente e ao mesmo tempo, ou em diferentes tempos no curso da doença. A atopia pode ser também assintomática (TERR, 1997b).

1.3. Asma

Asma é uma palavra derivada do grego e significa "dificuldade para respirar" (KALINER & MCFADEN, 1988).

A primeira referência à asma como uma doença é atribuída à Moses Maimonides em seu *Treatise on Asthma*, do século XII (MAIMONIDES *apud* KALINER & MCFADEN, 1988). Em 1662, Van Helmont reconheceu a sensibilidade das vias aéreas dos asmáticos a estímulos ambientais, como poeira e alimentos, a asma induzida emocionalmente e os efeitos do clima e do tempo (VAN HELMONT *apud* KALINER & MCFADEN, 1988). Porém, a asma como uma entidade clínica distinta, somente foi definida em 1868 por Henry Hyde Salter que também classificou a asma como intrínseca e extrínseca (SALTER *apud* KALINER & MCFADEN, 1988). Somente em

1910, Meltzer sugeriu que a asma poderia ser um fenômeno alérgico (MELTZER *apud* KALINER & MCFADEN, 1988).

Como uma síndrome clínica das vias aéreas, a asma é caracterizada por (GRAUNDENZ *et al.*, 1999):

- Obstrução reversível do fluxo aéreo (embora não completamente em alguns pacientes), espontaneamente ou com tratamento;
- Inflamação da mucosa, na qual muitas células têm um papel importante, em particular mastócitos e eosinófilos;
- Hiperreatividade brônquica a uma variedade de estímulos;
- Episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao acordar.

Como uma doença multifatorial, a asma está associada com fatores familiares, infecciosos, alergênicos, sócio-econômicos e ambientais (MANNINO *et al.*, 1998). Contudo, a maioria dos casos de asma alérgica ocorre em indivíduos que exibem resposta de hipersensibilidade a alérgenos ambientais definidos e, o desafio das vias respiratórias, mesmo com pequenas quantidades destes alérgenos, pode produzir obstrução aérea reversível (EVANS, 1993; GOLDSTEIN *et al.*, 1994).

1.3.1. Epidemiologia

Sendo a asma alérgica um problema mundial de considerável importância clínica, inúmeras investigações epidemiológicas realizadas em países desenvolvidos e em desenvolvimento relatam aumento na prevalência e mortalidade da asma e em outras doenças alérgicas nas últimas 3 décadas, apesar dos numerosos avanços no diagnóstico e tratamento da asma (MANNINO *et al.*, 1998).

Os índices de prevalência da asma nos EUA aumentaram aproximadamente 29% no período de 1980 a 1987, em todos os grupos

etários estudados, porém, o mais afetado foi o de indivíduos menores de 18 anos de idade (SKONER, 1996).

No Brasil, estudos epidemiológicos referentes à asma são poucos, dificultando assim, a execução de programas que visem sua prevenção. Em estudo multicêntrico, abrangendo três regiões do país, dentre 306 crianças atópicas com idade entre 3 e 16 anos, encontrou-se 15% de prevalência de asma brônquica (RIZZO *et al.*, 1995).

Dentre o custo da asma, devem ser incluídos gastos diretos com a doença, como os advindos com cuidados com o paciente, pronto-socorro, serviços médicos, drogas, exames laboratoriais e gastos com pesquisa e educação, bem como os indiretos, como a ausência escolar e no trabalho. No Brasil, somente com internações no ano de 1996, o gasto foi, aproximadamente, de 76 milhões de reais, o correspondente a 2,8% do gasto anual total, representando o terceiro maior valor de gastos do SUS em todo o país com uma doença (PEREIRA & NASPITZ, 1998).

O aumento da prevalência da asma tem uma mensagem importante: identificar os fatores responsáveis com o objetivo de prevenir a asma e a atopia (COOKSON, 1999).

1.3.2. Classificação

Para propósitos didáticos, a asma pode ser classificada de acordo com a presença ou ausência de atopia. Entretanto a asma atópica está frequentemente associada com outras formas de atopia, como eczema e rinite alérgica. Alternativamente, os termos extrínseca e intrínseca têm sido usados para referir-se à presença ou ausência da identificação de alérgenos específicos relacionados a doença alérgica. Contudo, o uso destes termos tende a ser abandonado por sugerirem que a asma é causada por fatores externos (asma extrínseca) ou por fatores inerentes aos pacientes (asma intrínseca) (DJUKANOVIC & HOLGATE, 1999).

De forma convencional, a asma extrínseca e intrínseca apresentam as seguintes características que apesar de ser uma divisão ampla, enquadram-se razoavelmente na maioria dos casos, ainda que existam muitos pacientes que apresentam formas intermediárias (COCHRANE & REES, 1995).

A asma extrínseca é também conhecida como asma alérgica, atópica ou imunológica. Geralmente, os pacientes com asma extrínseca apresentam história familiar de doença atópica e desenvolvem a doença nos primeiros anos de vida. Outras manifestações de atopia podem coexistir, como rinite alérgica ou eczema. Os ataques de asma ocorrem durante ou após a exposição a pólenes, à presença de animais, exposição à poeira ou a outros alérgenos dependendo da sensibilidade alérgica particular de cada paciente. Testes cutâneos positivos são caracterizados pela presença de pápula e eritema no local de introdução do alérgeno. A concentração de IgE sérica total está frequentemente elevada, mas em alguns casos apresenta-se normal (TERR, 1997b).

A asma intrínseca também é conhecida como asma não alérgica ou idiopática. Caracteristicamente, aparece ainda na infância, podendo em alguns casos ocorrer durante a vida adulta, usualmente após uma infecção respiratória (TERR, 1997b).

Na asma intrínseca, a obstrução brônquica recorrente ou crônica não está relacionada à exposição a pólenes ou a outros alérgenos mais comuns (TERR, 1997b). Geralmente é desencadeada por exercícios, infecções e outros fatores que não estão relacionados à presença de IgE específica a um determinado antígeno. Testes cutâneos são negativos para os alérgenos usuais. Não há história pessoal ou familiar de doença alérgica (COCHRANE & REES, 1995). A concentração sérica de IgE total é normal, contudo, eosinofilia sanguínea e no escarro pode ser encontrada (TERR, 1997b).

Os casos de asma intrínseca não são numerosos, geralmente menos que 2% dos asmáticos ou menos que 0,2% da população em geral pertencem a essa categoria, segundo PLATTS-MILLS *et al.* (1995b). Deve-se resaltar que muitos casos classificados como de asma intrínseca podem

ser devido a ausência de uma completa investigação dos alérgenos sensibilizantes e desencadeantes.

A asma pode ainda ser classificada de acordo com os estímulos indutores e provocativos do desenvolvimento da asma. Como estímulos indutores temos alérgenos, químicos ocupacionais, infecções virais e displasia broncopulmonar, entre outros. Nesta classificação, alérgenos, exercício, ar frio, fumaça, infecções virais, refluxo esofágico e fatores emocionais são considerados estímulos provocativos (DJUKANOVIC & HOLGATE, 1999).

A asma pode ser ainda classificada de acordo com as manifestações clínicas. Desta forma, de acordo com a severidade da asma ela poderia ser classificada, resumidamente em asma intermitente (sintomas geralmente ocorrem menos de 1 vez por semana), moderada persistente (sintomas ocorrem mais de uma vez por semana, porém menos de 1 vez ao dia), moderada persistente (sintomas diários) e severa persistente (sintomas contínuos) (DJUKANOVIC & HOLGATE, 1999).

Neste estudo, os pacientes asmáticos foram classificados quanto serem positivos (SPT⁺) ou não (SPT⁻) ao teste de punctura aos alérgenos estudados.

1.3.3. Resposta imune alérgica

É bem conhecido o fato que processos alérgicos possam originar várias doenças. Asma, rinite, dermatite, urticária e anafilaxia são algumas delas (HOWART, 1998). Os aspectos principais da inflamação alérgica que a diferencia de outros tipos de inflamação, incluem síntese de IgE, ativação de mastócitos dependente de IgE e infiltração da mucosa brônquica com linfócitos e eosinófilos (VARNEY *et al.*, 1992).

O desencadeamento de uma resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imunitária do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela célula apresentadora de

antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados ao receptor da célula T (TCR) $CD4^+$ em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (MARONE, 1998). O reconhecimento do conjunto peptídeo + MHC II, por parte de uma célula T ($CD4^+$) com receptor específico (TCR) para o alérgeno, reforçado pela ligação das moléculas co-estimulatórias B7-2 (CD86) e CD28, leva à ativação da célula Th (T *helper* ou T auxiliadora) primária. No caso de indivíduos atópicos, devido a uma predisposição genética, essa ativação se dá em um microambiente no qual provavelmente, já existe interleucina-4 (IL-4) presente. Dessa forma, a tendência será de que ocorra diferenciação preferencial de Th0 para Th2. A célula Th2 ativada expressa ligante de CD40 e produz citocinas indutoras da síntese de IgE pelas células B (IL-4 e IL-13), além de citocinas que ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos (IL-5) (GALLI & LANTZ, 1999). A IgE liga-se aos receptores de alta afinidade ($Fc\epsilon RI$) nos mastócitos e basófilos que degranulam, liberando mediadores da inflamação alérgica (MARONE, 1998). A IL-5 produzida pelas células Th2 é importante na diferenciação e sobrevivência de eosinófilos, os quais são responsáveis pela resposta de fase tardia (principalmente na asma alérgica) (VAN NEERVEN *et al.*, 1996). Finalmente, as citocinas produzidas por basófilos, mastócitos e eosinófilos contribuem para a manutenção da resposta alérgica (GALLI & LANTZ, 1999).

Para que células Th primárias convertam-se em um perfil Th2, existe a necessidade da presença não somente de IL-4, mas também de IL-13 que direcionam o isotipo da célula B para a síntese de IgE (HOWARTH, 1998). A IL-4 estimula a expressão de VCAM-1 (molécula-1 de adesão celular vascular) nas células endoteliais, resultando em aumento da ligação dos linfócitos, monócitos e especialmente eosinófilos (ABBAS *et al.*, 1998). Entretanto, a presença de $IFN-\gamma$, produzido por células Th1 inibe a síntese de IgE pelas células B (HOWARTH, 1998). Uma variedade de outras citocinas ou fatores têm sido implicados na modulação da síntese de IgE. $INF-\gamma$, $INF-\alpha$, $TGF-\beta$, IL-8, IL-10 têm sido mostrados inibir a síntese de IgE em algumas circunstâncias, enquanto que sua estimulação com IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, $TNF-\alpha$ têm sido observada (WORM & HENZ, 1997). Estas

citocinas podem atuar diretamente influenciando o *switch* para IgE ou proliferação das células B ou indiretamente através de sua atuação nas células T (GALLI & LANTZ, 1999).

Eotaxina é o fator quimiotático mais estreitamente associado com a inflamação alérgica (GALLI & LANTZ, 1999). Eotaxina é uma quimiocina (citocina quimiotática) consistindo de uma grande família de citocinas, estruturalmente homólogas, que compartilham a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimiocinese) e dirigido (quimiotaxia) (ABBAS *et al.*, 1998). MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein - 1*), -2 e -4, MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein - 1 α*) são indutoras da liberação de histamina de basófilos humanos. A eotaxina 2 induz a quimiotaxia de eosinófilos e basófilos e a liberação de histamina e leucotrieno C₄ (LTC₄) em basófilos primados com IL3. CCR3 é o receptor para eotaxina e outras quimiocinas do tipo CC (família de quimiocinas com 2 resíduos de cisteína adjacentes), presente em linfócitos Th2, eosinófilos e basófilos e está implicado na migração dessas células para o sítio inflamatório (MARONE, 1998). Atualmente, admite-se que parte das diferenças funcionais entre Th1 e Th2 decorra de diferentes receptores para quimiocinas, o que permite diferentes rotas e padrões de migração. Não se sabe ainda se CCR3 é o principal receptor de fatores quimiotáticos para células Th2, mas sua expressão permite diferenciar as células Th2 das outras células T (SALLUSTO *et al.*, 1998).

Existe ainda um mecanismo hipotético envolvendo células T $\gamma\delta$ no reconhecimento de alérgenos. Nesse caso, como consequência da grande expansão, macrófagos alveolares das vias aéreas de asmáticos, células dendríticas, células T equipadas com estruturas de superfície particulares (CD1, TCR $\gamma\delta$ e talvez antígenos NK1.1) e moléculas coestimulatórias (B7 e CD28), o sistema imune de indivíduos geneticamente predispostos (atópicos) reconheceria alérgenos inalados nativos. Dessa forma, as células T $\gamma\delta$ complementariam as células T $\alpha\beta$ promovendo uma rápida, porém mais fraca resposta, antes das células T $\alpha\beta$ desenvolverem uma completa resposta imune (SPINOZZI *et al.*, 1998).

1.3.3.1. Fisiopatologia

Mastócitos e basófilos expressam receptor de alta afinidade para o fragmento cristalizável das moléculas de IgE (Fc ϵ RI). Mais recentemente, descobriu-se que outros tipos celulares como monócitos (MAURER *et al.*, 1994), células dendríticas circulantes (MAURER *et al.*, 1996), células de Langerhans (WANG *et al.*, 1992) e eosinófilos (GOUNNI *et al.*, 1994) também expressam receptor Fc ϵ RI.

A ligação de um antígeno com moléculas de IgE acopladas à superfície de mastócitos/basófilos leva à despolarização da membrana celular, influxo de Ca⁺⁺ extracelular e posterior liberação de Ca⁺⁺ intracelular, culminando com a ativação de enzimas como a miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda nos níveis intracelulares de AMP cíclico (ROITT *et al.*, 1998).

Nos mastócitos, o resultado da ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D2 (PGD₂) ou leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTB₄) e a exocitose de grânulos secretores (ABBAS *et al.*, 1998). A exocitose de histamina e outros mediadores pré-formados promove aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema e contração de músculos lisos, fenômenos esses responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações de hipersensibilidade do tipo I ou imediata, ocorrendo nos primeiros 30 minutos seguidos à exposição alergênica (TERR, 1997a).

Nas 12 (doze) horas que se sucedem, ocorre uma progressiva infiltração tecidual de células inflamatórias, desde neutrófilos a eosinófilos e células mononucleares em resposta a mediadores químicos (TERR, 1997a). Os principais mediadores da resposta tardia são as citocinas, as interleucinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), os quimiotáticos celulares e as moléculas de adesão (GALLI & LANTZ, 1999).

1.3.3.2. Regulação da síntese de IgE

Ao entrar em contato com um determinado antígeno/alérgeno, indivíduos normais geralmente sintetizam IgM, IgG e apenas pequenas quantidades de IgE específica. Entretanto, indivíduos atópicos produzem altos níveis de IgE específica em resposta ao antígeno estranho (ROMAGNANI, 1990). Quanto à IgE total, ela encontra-se normalmente elevada em indivíduos com asma alérgica e normal em indivíduos com asma intrínseca. Contudo, muitos pacientes alérgicos apresentam níveis de IgE sérica total que não são significativamente diferentes daqueles da população normal (SIRAGANIAN, 1992).

Alguns fatores contribuem para a regulação da síntese de IgE específica em atópicos e não atópicos: a hereditariedade, a história natural de exposição alérgica, a natureza do antígeno e células T auxiliaadoras e suas citocinas.

Conseqüentemente, a compreensão dos fatores que controlam os níveis séricos de IgE tornam-se essenciais para dissecar a patogênese das doenças atópicas (CORRY & KHERADMAND, 1999).

1.3.3.2.1. Fatores genéticos

Vários estudos têm relatado que a história familiar de alergia é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma. Admite-se atualmente, que vários genes ou conjunto de genes poderiam exercer influência em diferentes pacientes. (BARNES & MARSH, 1998).

Como a produção de IgE resulta da combinação entre mecanismos cognitivos (antígeno-específicos) e não cognitivos, tanto genes relacionados a moléculas que atuam no reconhecimento e na apresentação de antígenos (HLA – *Human Leucocyte Antigens*, TCR – *T Cell Receptor*), como os genes que codificam moléculas que participam da regulação da síntese de IgE, são candidatos a influenciarem na produção de IgE (BARNES & MARSH, 1998).

Genes que predispõem à asma influenciariam: (1) a alta produção de citocinas relacionadas ao desenvolvimento da resposta imune alérgica (padrão Th2), como os genes presentes no cromossomo 5, numa região denominada "IL-4 gene cluster" (genes codificadores de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), sendo o gene para IL-4 o principal candidato (MARSH *et al.*, 1994); (2) a resposta específica a determinados antígenos/alérgenos pela diferente afinidade das moléculas HLA, especialmente genes HLA classe II, como Dw2 e DR2; (3) ativação do gene de IL-4 através do gene STAT6 que codifica um fator nuclear para sua ativação; (4) alteração do sinal gerado pelo Fc ϵ RI devido à mutação puntual no gene que codifica para a subunidade β do Fc ϵ RI, localizado no cromossoma 11 (BARNES & MARSH, 1998).

O desafio do novo século é compreender como fatores ambientais interagem com o genoma humano levando ao desenvolvimento da doença alérgica (HOLGATE, 1999).

1.3.3.2.2. História natural de exposição alérgica

Concomitantemente à constituição genética dos indivíduos predispostos a desenvolverem asma, outro fator fundamental ao desenvolvimento da doença é a exposição alérgica, fator que poderá influenciar no nível de IgE específica (ABBAS *et al.*, 1998).

Essa exposição geralmente se dá através do contato dos alérgenos com a mucosa do aparelho respiratório, de forma repetida a um mesmo antígeno, possibilitando assim o desenvolvimento de reação atópica no indivíduo geneticamente predisposto.

A exposição precoce aos ácaros domésticos, alérgenos de animais e fungos, entre outros, em quantidades elevadas, é considerada crucial para a sensibilização. Ao contrário, a interrupção do processo de sensibilização primária a agentes inaláveis pode protelar ou prevenir o aparecimento de doenças alérgicas como a asma (PRESCOTT *et al.*, 1999).

Alguns estudos relacionando os eventos ocorridos na vida intra-uterina têm, como questionamento básico, como esses eventos afetariam posteriormente a resposta imunológica destas crianças e adultos. Sabe-se que a placenta, no intuito de coibir uma reação de rejeição fetal, produz citocinas predominantemente do tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. No entanto, teoricamente, este meio também predispõe ao desenvolvimento de doenças alérgicas (HOWARTH, 1998). Porém, nem todos os indivíduos são alérgicos, indicando a existência de outros fatores na resposta alérgica.

Estudos epidemiológicos identificaram que o risco de doença atópica é mais comum no primeiro filho do que nas crianças subsequentes dentro de uma família (VON MUTIUS *et al.*, 1994). Uma das possíveis explicações deste fato, seria que a partir do segundo filho, estas crianças estariam expostas precocemente a infecções pelos seus irmãos mais velhos, o que promoveria uma resposta de Th1, regulando para menos a tendência para distúrbios alérgicos. Outra explicação alternativa é que o número crescente de gestações provocaria alterações relevantes na função placentária ou na nutrição materna (HOWARTH, 1998).

Alterações nos costumes bem como a existência de móveis e utensílios que promovam um aumento da poluição doméstica, possivelmente, têm contribuído para um maior número de indivíduos alérgicos. A maior permanência das pessoas no ambiente doméstico ou em ambientes fechados, contendo especialmente carpetes, cortinas, brinquedos felpudos e a presença constante ou não de animais domésticos, são fatores para o aumento desse tipo de poluição (PLATTS-MILLS, 1996).

1.3.3.2.3. Natureza do antígeno

Os alérgenos normalmente encontrados na natureza são constituídos predominantemente de proteínas. Dentre as fontes de alérgenos associadas à asma extrínseca, podemos citar: produtos de animais (cães, gatos, cavalos, bovinos, hamsters, coelhos, etc.); produtos de artrópodes (baratas, abelhas, ácaros, etc.); produtos de plantas (algodão, pólen de gramíneas e

plantas, etc.) e agentes microbianos (fungos) entre outros (PEREIRA & NASPITZ, 1998).

Entre os fatores não relacionados à presença de alérgeno bem como de IgE específica (asma intrínseca), os mais importantes são infecções respiratórias virais (vírus sincicial respiratório, adenovírus e rinovírus); fatores fisiológicos (exercício, hiperventilação, fatores psicológicos); fatores atmosféricos (ar frio, O₃, SO₂, NH₃); inalantes experimentais (histamina, metacolina, prostaglandina F_{2α}, ácido cítrico) e ingestão de drogas (propranolol, aspirina, drogas anti-inflamatórias não esteróides, sulfas) (TERR, 1997b).

1.3.3.2.4. Células T auxiliaadoras e suas citocinas

Fatores relacionados às células T auxiliaadoras e as citocinas produzidas por elas estão diretamente associados ao desenvolvimento da doença alérgica.

Os linfócitos T são considerados as células centrais na asma, por regerem a resposta inflamatória alérgica. Após a apresentação do antígeno pelas APC (células Apresentadoras de Antígenos) os linfócitos T tornam-se ativados e expressam moléculas na sua superfície que orquestraram a função de células efetoras como eosinófilos e mastócitos através de um número de citocinas e um grande número de moléculas envolvidas na sinalização entre células durante a resposta imune alérgica (DJUKANOVIC & HOLGATE, 1999).

Acúmulos de linfócitos T auxiliares da população Th2 têm sido demonstrados em locais de reações de hipersensibilidade imediata na pele e na mucosa brônquica. As citocinas presentes nestes locais, produzidas pelos tipos celulares aí encontrados, são predominantemente IL-4 e IL-5, importantes, respectivamente, entre outros fatores, para a mudança de isótipo ("switch") para IgE e maturação, recrutamento e ativação de eosinófilos (ABBAS *et al.*, 1998; KAPSENBERG *et al.*, 1998).

Os indivíduos atópicos apresentam maior número de linfócitos T alérgeno-específicos secretores de IL-4 em sua circulação que as pessoas não atópicas. Acrescentado a isto, estes linfócitos T alérgeno-específicos em pacientes atópicos produzem mais IL-4 por célula que em indivíduos normais (ABBAS *et al.*, 1998).

Embora IL-4 e IL-13 induzam a produção de IgE, essa é dependente dos sinais gerados pela interação física entre moléculas de CD40 (nas células B) e CD40L (nas células T ativadas ou em mastócitos, basófilos e eosinófilos) (GALLI & LANTZ, 1999).

Enquanto consideráveis avanços têm elucidado os efeitos das citocinas (particularmente IL-4 e IL-13) e das moléculas de superfície (CD40 e CD40L) na síntese de IgE, pouca atenção tem sido direcionada aos efeitos moduladores exercidos pelos alérgenos (SHAKIB *et al.*, 1998). Esses autores sugeriram que o efeito proteolítico de Der p 1 sobre CD23 e CD25 seria um potente indutor da síntese de IgE. Uma vez que a IgE esteja ligada ao receptor de baixa afinidade, conhecido como Fc ϵ RII ou CD23, presente principalmente nas células B, ocorre uma sinalização negativa regulatória para síntese de IgE. A clivagem de CD23, quando não ocupado pela IgE, pela atividade proteolítica de Der p 1 resulta na quebra deste sinal de *feedback* negativo (HEWITT *et al.*, 1995). Já a clivagem de CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) por Der p 1, parece levar a uma diminuição do crescimento da subpopulação Th1, uma vez que IL-2 é essencial para sua propagação e, conseqüentemente, há aumento de células Th2 (SHAKIB *et al.*, 1998). Dessa forma, não somente a atividade de protease de Der p 1 alteraria um importante mecanismo que controla a síntese de IgE (regulação por *feedback* negativo pelo CD23), mas o desequilíbrio entre as populações de células Th1/Th2 promoveriam condições favoráveis de citocinas para a síntese de IgE (SCHULZ *et al.*, 1998).

1.4. Alérgenos da poeira domiciliar

A poeira domiciliar consiste de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas. Segundo SELTZER (1994), a poeira domiciliar é uma mistura de fibras vegetais, fibras de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microorganismos (bactérias, vírus, fungos e algas) e macroorganismos (animais domésticos, insetos, aracnídeos).

1.4.1. Ácaros da poeira domiciliar

Bogdanov, em 1864, descreveu dois exemplares de ácaros, de ambos os sexos, isolados de peles curtidas, aos quais denominou *Dermatophagoides*, nomeando assim o gênero. Após essa primeira descrição, Trouessart, em 1897, descreveu a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*, com detalhes técnicos, consagrando assim a denominação final da espécie, que significa em grego “comedor de pele sem asas” (BAGGIO *et al.*, 1989).

Desde então, vários estudos, realizados em diversas partes do mundo têm comprovado a hipótese da exposição alérgica a ácaros como fator decisivo para a sensibilização de indivíduos susceptíveis (SPORIK *et al.*, 1990; ARRUDA *et al.*, 1991; TUNNICLIFFE *et al.*, 1999). Aproximadamente 10% da população e 80 a 90% dos asmáticos alérgicos são sensibilizados aos alérgenos de ácaros da poeira, através da observação por teste cutâneo (FIREMAN & JELKS, 1996).

Dentre os ácaros da poeira domiciliar, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae* são as espécies mais prevalentes e de maior importância associados à exposição alérgica na asma (GELLER *et al.*, 1993), embora *Blomia tropicalis*, em regiões de clima tropical e subtropical possa ser importante (ARRUDA *et al.*, 1991).

1.4.1.1. Classificação

De acordo com o "Second International Workshop on Dust Mite Allergens and Asthma", realizado em 1990, o termo ácaros da poeira doméstica aplica-se aos ácaros da família Pyroglyphidae, dos quais 10 espécies têm sido relatadas ocorrer na poeira domiciliar mais frequentemente. Quatro espécies dominam todas as outras e são mantidas correntemente em cultura: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897), *D. farinae* (Hughes, 1961), *D. microceras* e *Euroglyphus maynei* (Cooreman, 1950). Outros ácaros podem ocorrer no ambiente doméstico, dentre estes, várias espécies usualmente consideradas ácaros de estocagem: *Lepidoglyphus destructor* (Scrank, 1781), *Acarus siro* (Lineu, 1758) bem como *Blomia tropicalis* (Bronswijck, Cock & Oshima, 1973), além de espécies das famílias Tarsonemidae e Cheyletidae (PLATTS-MILLS *et al.*, 1992).

1.4.1.2. Classificação taxonômica

As duas espécies de ácaros mais prevalentes e que serão o foco deste trabalho, apresentam a seguinte classificação taxonômica, resumida, segundo BARNES & RUPPERT (1996), com modificações:

Reino: Metazoa

Filo: Artropode

Classe: Arachnida

Ordem: Acarina

Família: Pyroglyphidae (Cynliffe, 1958)

Gênero: *Dermatophagoides* (Bogdanov, 1864)

Espécie: *D. pteronyssinus* (Trouessart, 1897)

Espécie: *D. farinae* (Hughes, 1961)

1.4.2. Caracterização imunoquímica e molecular dos alérgenos de ácaros

Nos últimos anos, o aperfeiçoamento dos métodos de cultivo de ácaros e o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos sensíveis permitiram a obtenção, isolamento e purificação de muitos alérgenos de ácaros (HEYMANN *et al.*, 1989).

Através de estratégias envolvendo purificação de proteínas e análise de suas atividades alergênicas por teste cutâneo ou técnicas sorológicas foi possível a definição e classificação dos alérgenos da poeira domiciliar em grupos.

Conhece-se, atualmente, a existência de onze proteínas alergênicas no gênero *Dermatophagoides* (THOMAS & SMITH, 1998). Os alérgenos de ácaros são enzimas associadas ao seu trato digestivo e são encontradas em grande quantidade nas bolotas fecais (COLLOF *et al.*, 1992). Os alérgenos do grupo 1 (Der p 1 e Der f 1) estão localizados na membrana peritropical dessas bolotas (TOVET *et al.*, 1981).

A potente capacidade de sensibilização dos alérgenos de ácaros da poeira não é surpreendente porque Der p 1 e outros alérgenos exibem atividade proteolítica. Enquanto Der p 1 tem atividade de protease para cisteína e serina, Der p 2 apresenta atividade de protease para lisozima (HOWARTH, 1998). Adicionalmente, recentemente têm sido sugerido que Der p 1 é capaz de desregular o sistema imunológico lisando proteoliticamente o receptor Fc de IgE de baixa afinidade (CD23) na superfície de células B e também CD 25 (HEWITT *et al.*, 1995; SHAKIB *et al.*, 1998).

O Quadro 1 relaciona os vários alérgenos dos principais ácaros domésticos com suas propriedades estruturais e funcionais, cujas sequências de aminoácidos foram determinadas por meio de técnicas de biologia molecular.

Quadro 1. Propriedades estruturais e funcionais dos alérgenos de ácaros do ambiente domiciliar.

Ácaro	Alérgeno ¹	Peso Molecular (kDa)	Função	Sequência
<i>Dermatophagoides</i> spp.	Grupo 1	25	Protease de cisteína	cDNA
	Grupo 2	14	Desconhecida	cDNA
	Grupo 3	≅ 30	Protease de serina	Proteína
	Grupo 4	≅ 60	Amilase	Proteína
	Grupo 5	14	Desconhecida	cDNA
	Grupo 6	25	Quimiotripsina	Proteína
	Grupo 7	22-28	Desconhecida	cDNA
	Grupo 8	26	Glutathiona-transferase	cDNA
	Grupo 9	24	Protease de serina	cDNA
	Grupo 10	36	Tropomiosina	cDNA
<i>Euroglyphus maynei</i>	Eur m 1	25	Protease de cisteína	PCR
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 5	14	Desconhecida	cDNA
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Lep d 1	14	Proteína do epidídimo	Proteína e cDNA

Fonte: PLATTS-MILLS *et al.*, 1997, com modificações. Sequências obtidas por técnicas de Biologia Molecular.¹ Nova nomenclatura proposta pelo subcomite da WHO.

1.5. Exposição aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*

Desde 1970, a associação entre sensibilização a ácaros e asma já tinha sido bem documentada em diversas partes do mundo (PLATTS-MILLS & DE WECK, 1989; PLATTS-MILLS *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, com o advento de técnicas imunoenzimáticas (ELISA), tem se tornado possível realizar a quantificação específica dos

principais alérgenos domiciliares. O uso de um simples e sensível ELISA utilizando dois anticorpos monoclonais (*two-site* ELISA) para alérgenos domiciliares tem possibilitado, de forma rotineira, a determinação dos níveis bem como a avaliação dos aeroalérgenos em amostras de poeira (LUCZYNSKA *et al.*, 1989).

Três tipos diferentes de estudos podem ser desenvolvidos para analisar a relação entre exposição a alérgenos domiciliares e sintomas de asma entre indivíduos alérgicos: (1) comparação entre diferentes áreas geográficas, (2) comparação entre casas de uma comunidade e (3) experimentos onde evita-se a exposição (PLATTS-MILLS *et al.*, 1995b).

Existe dois métodos mais utilizados para coleta da poeira domiciliar. O primeiro é baseado na coleta de amostras de poeira de diferentes ambientes e execução dos ensaios utilizando extratos obtidos a partir de 100 mg de poeira, sendo os resultados expressos em μg de alérgenos/g de poeira. Uma segunda técnica consiste na coleta de toda a poeira de um determinado ambiente ou área e execução do ensaio, sendo os resultados expressos como a quantidade obtida neste local ou na unidade de área definida. Apesar das facilidades da segunda técnica, muitos problemas são possíveis, como redução da quantidade de poeira (e diretamente da quantidade de alérgeno) após uma limpeza imediatamente antes da coleta e dificuldade de padronização da performance do indivíduo encarregado de colher as amostras (PLATTS-MILLS, 1996).

Nos EUA (SMITH *et al.*, 1985), na Nova Zelândia (SEARS *et al.*, 1989) e no Brasil (ARRUDA *et al.*, 1991) a associação dominante com asma tem sido a sensibilização aos ácaros da poeira do gênero *Dermatophagoides*.

Diferentes espécies predominam em diferentes partes do mundo. Entre os ácaros da poeira domiciliar, os principais desencadeantes de crises asmáticas em países tropicais e subtropicais são *Blomia tropicalis* (Blo t) e sobretudo *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), importantes indutores da síntese de IgE em pacientes portadores de asma (ARRUDA *et al.*, 1991). Entretanto, em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, não

se detectou níveis mensuráveis do alérgeno Blo t 5 de *B. tropicalis*, que esteve presente em somente 1 das 130 amostras de poeira obtidas do sofá e cama.

Diferenças, não somente entre residências de uma mesma área, mas entre diferentes regiões foram relatadas. *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são as espécies de ácaros mais predominantes nos EUA, porém sua prevalência relativa é variável, com mais *D. pteronyssinus* nos estados do sul, continuamente quentes e úmidos e mais *D. farinae* nos estados centrais e do norte (ROSE *et al.*, 1996). Contudo, em diversos locais, outros alérgenos são considerados os mais relevantes. No Novo México, EUA, onde o ar seco não é favorável ao desenvolvimento de ácaros, a principal associação com asma é com a exposição a alérgenos de gatos (SPORIK *et al.*, 1995).

No Brasil, o primeiro registro de ácaros foi feito por Amaral que encontrou a espécie *D. pteronyssinus* em poeiras de residências na cidade de São Paulo (AMARAL, 1968). Alguns anos mais tarde, em outros estudos, ARRUDA *et al.* (1991) e RIZZO *et al.* (1993) detectaram níveis elevados de alérgenos de ácaros do gênero *Dermatophagoides* em casas tanto de crianças asmáticas como de não asmáticas, também na cidade de São Paulo.

Em 1987, em um encontro internacional foi proposto que a determinação de alérgenos de ácaros do grupo 1 em amostras de poeira, expressos em $\mu\text{g/g}$ de poeira, deveriam ser usados como forma primária de avaliação da exposição a alérgenos de ácaros da poeira (PLATTS-MILLS & DE WECK, 1989). Este ponto de vista foi reforçado no segundo encontro internacional de ácaros da poeira e asma, realizado na Inglaterra em 1990, onde considerou-se que exposição a níveis $\geq 2 \mu\text{g}$ de alérgenos de ácaros do grupo 1 por grama de poeira seria fator de risco para sensibilização e hiperreatividade brônquica, enquanto que exposição a níveis $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira de alérgenos do grupo 1, seria fator de risco para o aparecimento de ataques agudos de asma (PLATTS-MILLS *et al.*, 1992). Estudos epidemiológicos em vários países, inclusive no Reino Unido (SPORIK *et al.*, 1990) e Brasil (ARRUDA *et al.*, 1991), confirmaram que níveis de exposição

a ácaros de 2 $\mu\text{g/g}$ ou 10 $\mu\text{g/g}$ (o equivalente a 100 ou 500 ácaros/ grama, respectivamente) são relevantes para a asma.

Muitos autores estabeleceram que o grau de alergenicidade da poeira doméstica seria proporcional à concentração de Dpt nela existente, confirmando a relação entre o número de ácaros por grama de poeira e sintomas respiratórios.

Em estudo desenvolvido por TUNNICLIFFE *et al.* (1999), os indivíduos com asma severa estavam expostos a níveis maiores de alérgenos domésticos, aos quais eles estavam sensibilizados, quando comparado com indivíduos com asma moderada.

Alguns estudos, de forma contrária, não encontraram correlação entre o conteúdo antigênico e resultados de testes cutâneos, história clínica e sintomas quando da exposição alérgica para muitos alérgenos da poeira domiciliar. WOOD *et al.* (1988) relataram que não houve diferença significativa no conteúdo de ácaros nas residências de pacientes com teste cutâneo positivo a antígeno de *D. farinae*, daquelas residências de indivíduos alérgicos com teste cutâneo negativo.

Se a sensibilização a alérgenos domiciliares está fortemente associada com a asma e se a sensibilização está quantitativamente relacionada à exposição, é lógico pensar que a asma está diretamente relacionada à exposição. De fato, a teoria é que a exposição continuada de um paciente alérgico a um alérgeno, dará origem à inflamação brônquica e asma. Entretanto, muitos indivíduos sensibilizados não apresentam sintomas e possuem mínima ou nenhuma hiperreatividade brônquica, sob condições ambientais com níveis relativamente baixos de alérgenos. O fato é que a quantidade de alérgenos necessária para causar hiperreatividade brônquica é muito variável (CHAPMAN *et al.*, 1995).

A concentração dos alérgenos pode, ainda, variar extensamente em diferentes partes da casa ou mesmo em diferentes locais da mesma cidade. Porém, para muitos alérgenos domiciliares, há pouca ou nenhuma variação sazonal (GELBER *et al.*, 1993).

O crescimento e a proliferação dos ácaros depende de vários fatores ambientais, destacando-se a temperatura e a umidade relativa do ar, o que parece ser fator limitante e decisivo para seu desenvolvimento (DUFF & PLATTS-MILLS, 1992). GARRET *et al.* (1998) estudando associações entre alérgenos e fatores ambientais, em residências no sudeste da Austrália, local de temperatura moderada, obtiveram uma significativa correlação entre umidade do ar no ambiente amostrado e os níveis de alérgenos na cama.

Um fator influenciador no nível de exposição é a movimentação das partículas alergênicas, através de condições denominadas de distúrbios. O ato de "fazer a cama" e o uso de aspiradores de pó sem filtros, aumentam muito os níveis dos alérgenos aero-transportáveis. Ao contrário, níveis alergênicos em condições de não-distúrbio são muito baixos ou mesmo indetectáveis (SAKAGUCHI *et al.*, 1989).

Outras variantes podem contribuir para uma maior ou menor exposição, como a ventilação e atividade humana ou animal no ambiente (SAKAGUCHI *et al.*, 1993).

Em Baltimore, EUA, analisando a exposição alergênica de pacientes portadores de alergia clínica, como asma, rinite e eczema, WOOD *et al.* (1988) detectaram, através de ELISA, a presença de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* na grande maioria das residências. Somente em uma casa, os autores não encontraram antígenos de ácaros. Por outro lado, eles observaram que a maioria das amostras continham múltiplas espécies de ácaros.

Normalmente, na maioria das casas, o nível de alérgenos é consideravelmente alto. Amostras de poeira domiciliares contendo níveis considerados como fator de risco de sensibilização (níveis $\geq 2\mu\text{g/g}$ de poeira de ácaros do grupo 1) quando em contato com pacientes asmáticos atópicos, podem ser facilmente encontrados pelo menos em um local das residências (ROSE *et al.*, 1996). Isto demonstra que a grande maioria das pessoas pode estar convivendo com grande quantidade de alérgenos de ácaros em seus lares.

Todavia, se os níveis de alérgenos podem ser influenciados por inúmeros fatores, por que seria importante a quantificação da exposição alérgica? Em suma, uma melhor compreensão e quantificação dos mais importantes alérgenos domiciliares poderia: (a) esclarecer o papel da exposição alérgica na hiperreatividade brônquica não específica, (b) possivelmente, identificar aqueles casos particulares em que a redução da exposição poderia ser o tratamento primário para a asma e (c) ajudar a identificar, por exclusão, os casos de asma intrínseca ou não-alérgica, nos quais uma melhor investigação da etiologia se faz necessário (PLATTS-MILLS *et al.*, 1993).

Os fatores que podem obscurecer a relação entre os alérgenos determinados nas casas e os sintomas de asma podem ser considerados em três grupos: (a) a falta de um método relativamente preciso que determine a concentração de alérgeno que entra nos pulmões; (b) diferenças individuais no local da resposta inflamatória nos brônquios, os quais podem ser fracamente correlacionados com os resultados quantitativos dos testes cutâneos ou níveis de anticorpos IgE; (c) os múltiplos fatores, além dos alérgenos que podem desencadear ataque de asma em pacientes com "pulmões inflamados", incluindo ozônio, ar frio, fumaça de cigarro e rinovírus, principalmente em pacientes jovens (PLATTS-MILLS *et al.*, 1995a)

1.6. Sensibilização aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*

Entretanto, embora esteja claro que a maioria dos indivíduos sintomáticos sensibilizados estão expostos a alérgenos, segundo PLATTS-MILLS *et al.* (1995b), não existe uma boa correlação entre os níveis de alérgenos que um indivíduo está no momento exposto e os sintomas respiratórios.

Adicionalmente, o papel dos alérgenos inalantes na asma depende de dois eventos inter-relacionados: primeiro, da sensibilização e, segundo da produção de uma inflamação brônquica crônica (PLATTS-MILLS, 1996).

Vários grupos falharam em determinar uma inter-relação clara de dose-resposta entre sintomas de asma e exposição a alérgenos domiciliares (PLATTS-MILLS *et al.*, 1992; MARKS *et al.*, 1995). Existem boas razões para se acreditar que uma resposta inflamatória brônquica pode durar semanas ou meses, a qual poderia obscurecer uma simples relação dose-resposta (PLATTS-MILLS *et al.*, 1995a).

Quando se analisa a inter-relação dose-resposta entre exposição alérgica com sintomas na asma, geralmente acredita-se ser ela linear. Contudo, essa inter-relação é complexa e para cada indivíduo ela poderia ser linear, log linear ou mesmo sigmoidal (PLATTS-MILLS, 1996).

IgE específica a ácaros tem sido detectada em maior quantidade do que IgE específica a outros alérgenos da poeira domiciliar no soro de pacientes asmáticos (ROSE *et al.*, 1996; SARPONG & KARRISON, 1998).

Tem sido sugerido que aproximadamente 20% da população humana apresentam sintomas e achados laboratoriais consistentes com doença alérgica. Níveis elevados de IgE específica a *D. pteronyssinus* sem sintomas clínicos pode ser um reflexo dos altos níveis de exposição ou revelar uma futura tendência destes indivíduos a desenvolver doença clínica atópica (NELSON *et al.*, 1996).

KUEHR *et al.* (1994) têm mostrado que o nível de alérgenos de ácaros necessários para sensibilizar um indivíduo não atópico é alto, aproximadamente 60 µg de alérgenos de ácaros do grupo 1 por grama de poeira.

Outros investigadores reforçam a associação entre asma e atopia. Segundo TUNNICLIFFE *et al.* (1999), a grande maioria dos pacientes com asma severa apresentaram teste cutâneo positivo para Dpt.

No Brasil, de 540 pacientes portadores de asma e/ou rinite, aproximadamente 58%, 59% e 61% destes foram positivos pelo teste de punctura para *D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, respectivamente (GELLER *et al.*, 1993).

Como, em geral, a história clínica não é definitiva para a avaliação da sensibilidade a aeroalérgenos aos quais os indivíduos estão continuamente expostos, faz-se portanto, necessária a realização de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata bem como a mensuração de IgE sérica específica a alérgenos.

1.6.1. Avaliação da sensibilização aos alérgenos domiciliares

A sensibilização aos alérgenos domiciliares mais comuns pode ser avaliada através de testes cutâneos ou por ensaios que determinam os níveis séricos de IgE específicos aos alérgenos (PLATTS-MILLS, 1996).

1.6.1.1. Testes *in vivo* (cutâneos)

O diagnóstico de alergia, por meio de testes cutâneos, de punctura ou intradérmico, útil para a identificação de pacientes portadores de hipersensibilidade mediada por IgE, é um exame de alta especificidade e sensibilidade, de rápida e simples execução, e econômico comparado à determinação laboratorial da IgE sérica específica. Contudo, o teste alérgico não diagnostica a doença alérgica. Ele simplesmente determina a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, importantes na patogênese da doença alérgica. (OWNBY, 1988).

Testes cutâneos de leitura imediata podem ser divididos em epicutâneo (ou de punctura) e intradérmico, baseado no local de deposição do extrato alergênico na pele. Estas duas técnicas diferem primariamente na quantidade do extrato e na profundidade do local onde este é depositado (OWNBY, 1988).

Resumidamente, o teste de punctura consiste da deposição de uma pequena quantidade, que pode ser uma gota do extrato alergênico, sobre a pele. A introdução do alérgeno é feita através de punctura com uma agulha ou lanceta apropriada. O teste intradérmico é realizado injetando-se uma pequena quantidade, usualmente 0,02 a 0,1 mL, de extrato alergênico na

derme (OWNBY, 1988). Em ambos os testes, há um controle positivo, que consiste de histamina e, um controle negativo, o diluente utilizado nos extratos alergênicos.

Quando um indivíduo sensibilizado é estimulado pela administração através da pele (intraderme) de um antígeno apropriado, o local torna-se eritematoso por congestão hemática dos vasos sanguíneos localmente dilatados. Na segunda fase, uma pápula origina-se em decorrência do extravazamento de plasma das vênulas. Na terceira fase, os vasos sanguíneos nas margens da pápula se dilatam e ficam engurgitados com hemáceas, resultando em eritema (ABBAS *et al.*, 1998).

A reação edematosa-eritematosa completa pode aparecer em 5 a 10 minutos depois da administração do antígeno e geralmente desaparece em menos de uma hora. Uma reação de fase tardia, pode começar entre 2 e 4 horas, com pico por volta das 24 horas, após o desencadeamento da reação de hipersensibilidade imediata. Essa reação tardia consiste do acúmulo de leucócitos inflamatórios, inclusive neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos T CD4⁺ (ABBAS *et al.*, 1998).

Vários métodos são empregados para a mensuração da resposta cutânea ao teste de punctura. Tomando-se a medida da pápula, os métodos mais empregados são a média de dois diâmetros (ARRUDA *et al.*, 1991; RIZZO *et al.*, 1993; PENG *et al.*, 1998; SQUILLACE *et al.*, 1997) e a comparação dessa média com um controle negativo (SPORIK *et al.*, 1990; SPORIK *et al.*, 1995; SARPONG & KARRISON, 1998; TUNNICLIFFE *et al.*, 1999).

Os testes cutâneos podem ser determinados como negativos ou positivos a vários graus pré-definidos (nomeados com cruces ou numerais). A graduação do teste positivo é adequada para uso clínico, porém em estudos científicos, maior precisão pode ser obtida pela mensuração do tamanho da reação (OWNBY, 1988).

Os padrões de medição e interpretação dos resultados dos testes cutâneos variam muito, contudo, são importantes para determinar o valor

preditivo do teste (NIEMEIJER *et al.*, 1993). Para teste de punctura valores limites ≥ 3 mm de pápula são reportados (MALLING, 1985; VOHLONEN *et al.*, 1989).

Testes epicutâneos são mais fáceis, rápidos, menos dolorosos, mais baratos e com menor ocorrência de reações adversas do que testes intradérmicos. Estes por sua vez, são mais sensíveis, mas também produzem reações falso-positivas por causa da irritação local. Os testes *in vitro* ficam reservados a pacientes que não podem ser submetidos ao teste cutâneo em virtude da presença de lesões cutâneas, ingestão de medicamentos ou história de possível anafilaxia (OWNBY, 1988).

A magnitude da resposta cutânea é dependente de vários fatores, incluindo a quantidade de IgE alérgeno-específica e a quantidade e qualidade do alérgeno utilizado no teste (OWNBY, 1988).

Os testes cutâneos são ainda os mais sensíveis métodos para detecção da presença de imunoglobulina E (IgE) para um alérgeno específico. Quando corretamente realizados, são ainda o “*gold standard*” aos quais outros métodos diagnósticos podem ser comparados (SIRAGANIAN, 1992).

1.6.1.2. Testes *in vitro* (ELISA e RAST)

Os dois métodos *in vitro* para determinação de IgE específica mais utilizados, *Radioallergosorbent test* (RAST) e *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) têm o mesmo princípio básico.

O alérgeno é adsorvido a uma fase sólida (celulose, discos de papel, microplacas de titulação ou tubos plásticos) e exposto ao soro teste. Caso o soro contenha IgE, esta liga-se especificamente ao alérgeno, presente na fase sólida. A IgE não ligada é removida por lavagem, mas a que permanece unida à fase sólida, reage na fase seguinte, com uma anti-IgE humana marcada. A quantidade desta anti-IgE ligada ao suporte sólido é proporcional

à quantidade de IgE sérica, possibilitando assim, uma estimativa da IgE específica presente no soro testado (OWNBY, 1988).

O RAST tem como suporte sólido a celulose (celulose microcristalina, *Sepharose* ou discos de papel) , onde os alérgenos ligam-se covalentemente após serem ativados quimicamente por brometo de cianogênio e baseia-se numa anti-IgE humana marcada com moléculas radioativas, usualmente ^{125}I , detectadas por contador gama (HAMILTON & ADKINSON, 1992). No ELISA, o suporte sólido geralmente é de poliestireno, material que constitui as microplacas, ao qual o alérgeno liga-se covalentemente. Outra grande diferença, consiste na utilização de anti-IgE humana marcada com enzimas. Estas, por sua vez, são detectadas pela conversão de um substrato a um produto pela ação enzimática. Este produto geralmente é colorido e detectado por espectrofotômetro, podendo ser também luminescente ou fluorescente (OWNBY, 1988).

Estudos comparando os resultados dos testes *in vitro* com os testes cutâneos observaram que os testes *in vitro* (RAST modificado) apresentam sensibilidade entre 60-80% e especificidade de aproximadamente 90% (OWNBY, 1988).

ELISA tem sido preferido ao RAST devido à sua praticidade, uma vez que materiais radioativos são instáveis, caros e potencialmente perigosos, requerendo cuidados especiais (METZGER *et al*, 1981).

A determinação de anticorpos IgE séricos específicos a alérgenos, através de imunoensaio em fase sólida por técnica de *sandwich*, tem se mostrado como uma ferramenta útil para investigação e monitoramento do desenvolvimento de doenças alérgicas. No ELISA *sandwich* emprega-se anticorpo de captura específico ao alérgeno para recobrir a superfície da placa. Em seguida, adiciona-se o alérgeno específico e subsequentemente a amostra de soro a ser testada. Posteriormente, adiciona-se o anticorpo que deve ser específico à IgE conjugado a uma enzima. As fases seguintes, são semelhantes aos ELISA convencional, no qual o alérgeno (bruto ou purificado) está ligado diretamente às microplacas (KEMENY *et al.*, 1985).

KEMENY *et al.* (1986) desenvolveram um estudo utilizando anticorpos monoclonais alérgeno-específicos e anticorpos policlonais para análise de anticorpos IgE por ELISA. Eles relatam que ELISA "sandwich", utilizando anticorpos de coelho poliespecíficos foram mais sensíveis do que ELISA convencional e também levemente mais sensível do que RAST.

Um ELISA de captura, utilizando anticorpo monoclonal para capturar Der f 1 e posteriormente detectar IgE sérica específica a *D. farinae* (Der f 1), mostrou ser mais sensível e específico do que ELISA convencional para diagnóstico de alergia a Der f 1 e um pouco mais sensível do que RAST. (PENG *et al.*, 1998).

Recentemente, GERVÁSIO *et al.* (manuscrito em preparação) desenvolveram um método sensível para detecção de IgE sérica específica a Der p 2, o ELISA reverso (rELISA), onde na sensibilização das microplacas utilizou-se anticorpo monoclonal anti-Der p 2 para capturar o alérgeno específico a partir do extrato bruto (Dpt) e subsequentemente, detectar a IgE específica presente no soro.

O emprego de testes, *in vivo* e *in vitro*, para a determinação de IgE específica a alérgenos da poeira, têm contribuído para a avaliação da sensibilidade em pacientes atópicos e não atópicos.

Os níveis séricos de anticorpos IgE específicos podem ser determinados em unidades RAST (RU/mL) ou ELISA (EU/mL), conforme o teste utilizado. Uma unidade RAST ou unidade ELISA equivale a 0,1 ng de IgE (RIZZO *et al.*, 1993).

Desta forma, estes dados demonstram que a determinação dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos inalantes domiciliares pode ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico de pacientes asmáticos atópicos. Adicionalmente, a determinação dos níveis de alérgenos a que os indivíduos atópicos ou não, estão sujeitos, bem como os locais de maior exposição em suas residências, são fundamentais para a elaboração de medidas de controle ambiental, diagnósticas e terapêuticas.

Fundamentados na necessidade do conhecimento dos alérgenos de ácaros mais prevalentes e na ausência de dados referentes à sensibilização e exposição de pacientes asmáticos na cidade de Uberlândia, justifica-se a realização desse estudo.

2. OBJETIVOS

- 1) Avaliar a sensibilização alérgica dos pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA), por meio da determinação dos níveis de IgE sérica específica aos alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e *D. farinae* (Der f 1) .
- 2) Avaliar a exposição alérgica dos pacientes asmáticos com reatividade cutânea positiva a ácaros do gênero *Dermatophagoides*, bem como a dos indivíduos não atópicos (NA) frente aos ácaros da poeira domiciliar e seus respectivos alérgenos (Der p 1, Der p 2 e Der f 1).
- 3) Determinar o índice de exposição alérgica considerando os fatores de risco para sensibilização e exacerbação dos sintomas de asma em indivíduos predispostos, tanto nas residências de pacientes asmáticos como de indivíduos não atópicos (NA).
- 4) Correlacionar os índices de exposição alérgica e os níveis de IgE sérica específica da população em estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado sem restrições junto ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, UFU), órgão do Conselho Nacional de Saúde, subordinado ao Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos.

Os pacientes foram convocados por meio de correspondência ou telefonema, após o que lhes foram dadas todas as informações sobre os procedimentos da pesquisa que envolviam sua participação.

A concordância em participar da pesquisa era confirmada pela assinatura de um termo de consentimento (Anexo 1), estando pacientes e indivíduos não atópicos cientes de todas as etapas de seu desenvolvimento. Em seguida, o paciente era pesado, medido e respondia a uma breve ficha de identificação (Anexo 2). Posteriormente, respondia a um questionário (Anexo 3) para maior conhecimento da sua história clínica e a uma ficha quanto às características de suas casas (Anexo 4).

3.2. Local do estudo

Ambos os grupos de estudo, pacientes e indivíduos não atópicos, eram moradores da cidade de Uberlândia, Minas Gerais. A cidade com população estimada para o ano de 1999 de aproximadamente 491 mil habitantes, situa-se no sudeste do Brasil (longitude 48°W, latitude 18°S). O clima é do tipo tropical chuvoso, sendo que a vegetação característica é o cerrado. Quanto à umidade relativa do ar, a média do ano de 1997 foi de 64%, sendo que no mês mais crítico, o valor médio de 13% foi encontrado. Na proximidade da área urbana, o relevo se apresenta mais ondulado com altitudes que variam de 700 a 900 metros em relação ao nível do mar (Departamento de Geografia de Universidade Federal de Uberlândia).

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia, Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

3.3. Casuística

Foram selecionados 89 indivíduos, todos residentes na cidade de Uberlândia, consistindo de 20 homens e 69 mulheres, com idade variando de 18 a 60 anos.

Todos os convocados foram atendidos na Unidade de Pesquisa em Alergia e Doenças Infecciosas da Disciplina de Imunologia do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e relacionados para o estudo por meio de levantamento dos prontuários da Divisão de Arquivos Médicos (DIAME) do Hospital de Clínicas da UFU, no período de março de 1996 a março de 1997, obedecendo os critérios estabelecidos pelo *National Asthma Education Program* (SLY, 1997).

Para todos os convocados foram atendidas as seguintes características:

- ◆ História clínica de sintomas de asma (atual ou progressa);
- ◆ Relato de associação entre exposição a aeroalérgenos da poeira domiciliar e desencadeamento de sintomas relacionados à asma.

O grupo de indivíduos não atópicos, selecionados entre março de 1996 a março de 1999, denominado de não atópicos (NA), consistiu de 26 indivíduos, também residentes na cidade de Uberlândia, de ambos os sexos, sendo 8 homens e 18 mulheres. Os indivíduos não atópicos convidados a participar do estudo consistiram de alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia.

Os requisitos básicos para inclusão dos indivíduos nesse grupo foram:

- ◆ História clínica negativa para doenças alérgicas, como asma e rinite alérgica, atual ou pregressa (não atópicos);
- ◆ Relato de ausência de associação entre exposição a aeroalérgenos da poeira domiciliar e desencadeamento de sintomas alérgicos (rinite e/ou asma);
- ◆ Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata negativos (teste de punctura) para extratos brutos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e *D. farinae* (Df), alérgenos de fungos do ar, baratas e epitélios de cão e gato;
- ◆ Níveis de IgE sérica total < 100 IU/mL.

Para exclusão da pesquisa, todos os indivíduos foram submetidos aos seguintes critérios:

- a) Indivíduos com idade inferior a 18 anos e superior a 60 anos;
- b) Indivíduos em uso de drogas, por via oral ou tópica, anterior ao teste, conforme indicado abaixo:
 - ◆ Anti-histamínicos de primeira geração entre 24 a 72 horas antes do teste (BERNSTEIN & STORMS, 1995);
 - ◆ Corticosteróides sistêmicos por tempo prolongado (> 20mg/dia por mais de 7 dias) (SLOTT & ZWEIMAN, 1974);
 - ◆ Corticosteróides tópicos na 2^a a 3^a semanas anteriores ao teste (PIPKORN *et al.*, 1989);
- c) Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- d) Recusa em participar do estudo.

3.4. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata

Para a determinação da hipersensibilidade imediata optou-se pelo método de punctura. As concentrações dos extratos alergênicos para a sua realização foram as indicadas pelo fabricante, segundo normas internacionais (*Bayer Corporation*, Spokane, Washington, EUA).

Na execução do teste de punctura nos pacientes asmáticos foi utilizado o extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (30.000 AU/mL). Nos testes de punctura, nos indivíduos não atópicos, empregou-se os extratos alergênicos: *D. pteronyssinus* (Dpt) e *D. farinae* (Df) na concentração de 30.000 AU/mL, alérgenos de fungos do ar, barata e epitélios de cão e gato na diluição de 1:10 (P:V).

Depositou-se 10 μ l de cada extrato na face interna do antebraço, após antissepsia do mesmo com álcool a 70%, distanciando 3 cm um do outro. Sobre a gota depositada, foi feito uma punctura com uma lanceta de metal estéril (*Bayer Corporation*, Spokane, Washington, EUA).

Após 15 minutos, procedeu-se à leitura com auxílio de uma régua específica (*Morrow Brown Disposable/Skin Test Needle Aller Guard*®) graduada em mm (milímetros), adotando-se como critério de positividade, uma pápula $\geq 4,0$ mm, obtida pela média de dois diâmetros perpendiculares (SQUILLACE *et al.*, 1997). Graus de reatividade foram determinados conforme a seguir: (0) < 4 mm; (1) 4 a 6 mm; (2) 6 a 8 mm; (3) 8 a 10 mm; (4) ≥ 10 mm ou presença de pseudópodes (GERVÁSIO *et al.*, manuscrito em preparação).

Em todos os testes, o controle positivo foi realizado com cloridrato de histamina (1mg/mL) (*Bayer Corporation*, Spokane, EUA) diluído em solução salina fisiológica com glicerol a 50%, sendo que esta solução foi usada também como controle negativo da reação (SQUILLACE *et al.*, 1997).

3.5. Colheita de sangue

As amostras de sangue dos indivíduos dos dois grupos estudados, asmáticos e não atópicos, foram obtidas na mesma ocasião da realização dos testes cutâneos de punctura, utilizando-se tubos de 13 mL e agulhas 25 x 8 mm (VACUTAINER® - *Precision Glide/Becton Dickson Vacutainer Systems*, Franklin Lakes, NJ, EUA) para punção venosa na região do antebraço. Após a formação do coágulo, os tubos foram centrifugados a 350 g por 10 minutos. Os soros obtidos foram aliquotados e estocados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.6. Testes sorológicos

3.6.1. ELISA para detecção dos níveis de IgE sérica total

Testes imunoenzimáticos (ELISA) para detecção dos níveis de IgE total no soro de pacientes asmáticos e não atópicos foram realizados segundo técnica descrita por POLLART *et al.* (1989), modificada.

Microplacas de poliestireno com 96 poços (IMMULON 2®, *Dynatech Laboratories Inc.*, Chantilly, VA, EUA) foram sensibilizadas (50 µl/poço) com anticorpo monoclonal anti-IgE humana (clone GE-1, IgG2b de camundongo, SIGMA, *Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA, I-6510) na diluição recomendada pelo fabricante (1:5000) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS) adicionada de *Tween 20* (*Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate* - SIGMA, P-1379) a 0,05% (PBS-T) e, subsequentemente bloqueadas com 200 µl/poço de solução de PBS-T acrescido de soroalbumina bovina (BSA, SIGMA, A-8022) a 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente, as placas foram submetidas a três ciclos de lavagens com PBS-T e seguiu-se a adição (50 µl/poço) de soros dos pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA), em três diluições (1:5, 1:25 e 1:125) em PBS-T + BSA a 1%. Paralelamente, foram realizadas curvas padrões, em duplicata, em diluições duplas seriadas em PBS-T +

BSA a 1%, em cada placa e seus valores variaram de 300 a 0,3 IU/mL, utilizando soro de referência (indivíduo ARN) contendo 3.000 IU/mL de IgE sérica total.

Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente e lavagem por 5 vezes com PBS-T, seguiu-se a adição (50 μ l/poço) do anticorpo secundário consistindo de IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (*Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.*, MD, EUA, n° 16-10-04) na diluição de 1:4000 em PBS-T + BSA a 1%. As microplacas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

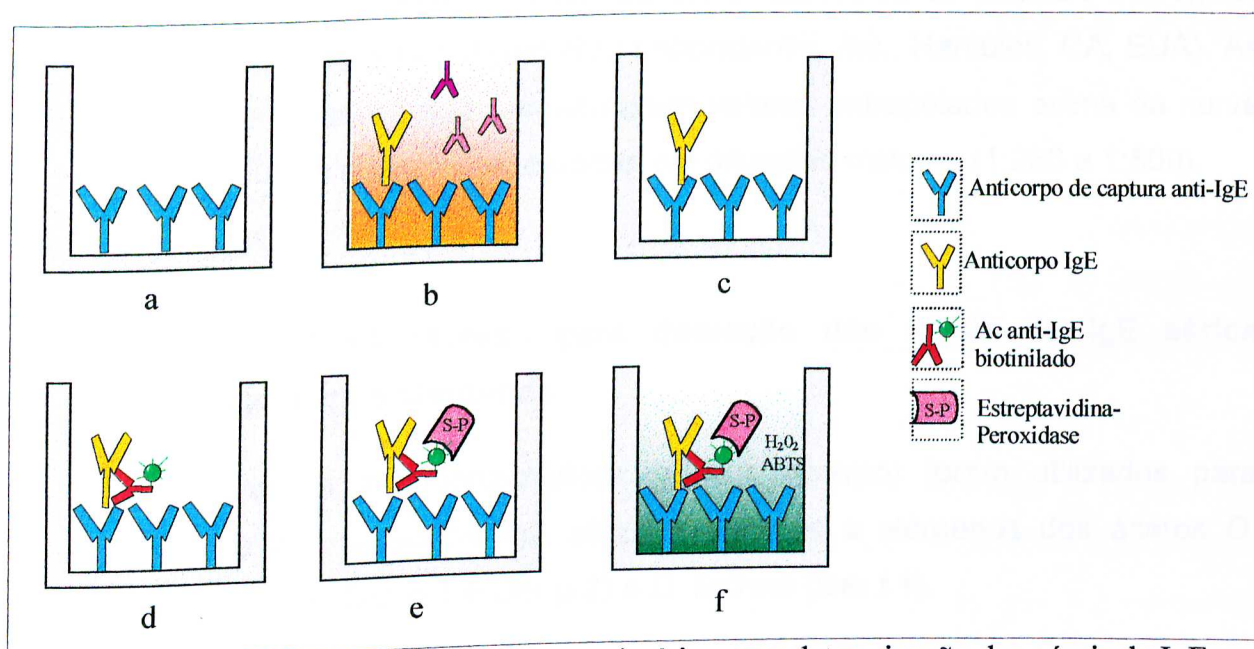


Figura 1 - Esquema do ensaio imunoenzimático para determinação dos níveis de IgE sérica total. (a): anticorpo monoclonal de captura anti-IgE humana; (b): adição da amostra de soro; (c): após o processo de lavagem, permanece o anticorpo IgE ligado ao anticorpo de captura; (d): adição do anticorpo de detecção biotinizado anti-IgE humana; (e): adição do conjugado estreptavidina-peroxidase (S-P); f: revelação da reação realizada pela adição do substrato enzimático (H_2O_2 e ABTS). Fonte: adaptado de ARAGÃO & RIBEIRO, 1998.

Procedeu-se a novas lavagens como anteriormente descrito e a adição (50 μ l/poço) do conjugado estreptavidina-peroxidase (SIGMA, S-5512) na diluição de 1:1000 em PBS-T + BSA a 1%. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a última lavagem das placas com PBS-T por 5 vezes, adicionou-se o substrato enzimático consistindo de solução de *2'2-azinobis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid* (ABTS - SIGMA, A-1888) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de água oxigenada (H₂O₂). A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA*) a 405nm, em tempos variáveis, tendo como referência os valores de absorbância da curva padrão.

Os valores de absorbância obtidos das amostras de soros foram convertidos em IU/mL (1 IU/mL = 2,4 ng IgE/mL) segundo RIZZO *et al.* (1993) de acordo com a curva padrão, utilizando-se do *software Microplate Manager PC* versão 4.0 (*Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA*). As amostras de soros que apresentaram valores extrapolados acima da curva padrão, foram novamente testadas em diluições maiores (1:250 e 1:500).

3.6.2. ELISA reverso para detecção dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos

Ensaio imunoenzimático (ELISA reverso) foram utilizados para detecção dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos dos ácaros *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e *D. farinae* (Der f 1).

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (*Corning Laboratories Inc, NY, EUA*) foram sensibilizadas (50µl/poço), separadamente, com anticorpos monoclonais de camundongo anti-Der p 1 (clone 5H8), anti-Der p 2 (clone 1D8) e anti-Der f 1 (clone 6A8), gentilmente cedidos pelo Dr. Chapman da Universidade de Virgínia, EUA), todos na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06M, pH 9,6. Paralelamente, em cada placa, foram sensibilizados poços com anticorpo monoclonal anti-Der f 1 (clone 6A8) na concentração de 10 µg/mL, para realização da curva padrão. As placas foram incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e os sítios ativos foram bloqueados (200 µl/poço) com PBS-T + BSA a 1% por 1 hora à

temperatura ambiente. Os passos subsequentes foram realizados utilizando-se PBS-T + BSA a 1% como diluente.

Após o bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e subsequentemente incubadas (50 μ l/poço) com os respectivos extratos brutos de Dpt e Df na concentração de 1500 AU/mL. Após incubação de 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e incubadas (50 μ l/poço) com amostras de soros diluídas a 1:2,5 e 1:5 em PBS-T + BSA a 1% e, mantidas por 2 horas à temperatura ambiente.

Novamente, após cinco ciclos de lavagens com PBS-T, anticorpo secundário de cabra anti-IgE humana biotinizada (*Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.*) diluição de 1:4000 em PBS-T + BSA a 1% foi adicionado e as placas foram então incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens com PBS-T, 50 μ l/poço do conjugado estreptavidina-peroxidase (SIGMA) foi adicionado na diluição de 1:1000 em PBS-T + BSA a 1 % e as placa foram então incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após novas lavagens, como anteriormente descrito, a reação foi desenvolvida pela adição (50 μ l/poço) do substrato enzimático, consistindo de ABTS a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07 M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA a 405 nm, em tempos variáveis, tendo como referência os valores de absorbância da curva padrão. Os valores de absorbância obtidos das amostras de soros foram convertidos em unidades ELISA por mililitro (EU/mL), utilizando-se do software *Microplate Manager PC* versão 4.0 através da comparação com a curva padrão. Esta foi obtida pela mensuração paralela dos níveis de IgE sérica específica a Der f 1, usando como padrão um *pool* de soros de indivíduos alérgicos a ácaros (UVA 89/01, Universidade de Virginia, EUA). Este *pool* de soros continha 1.000 unidades RAST (RU/mL) de IgE sérica específica a *Dermatophagoides farinae*, sendo que 1 RU é equivalente a 0,1 ng de IgE (POLLART *et al.*, 1989). A curva padrão foi incluída, em duplicata, em cada placa e seus valores variaram de 500 a 0,5 RU/mL, sendo

posteriormente as unidades RAST (RU) convertidas em unidades ELISA (EU).

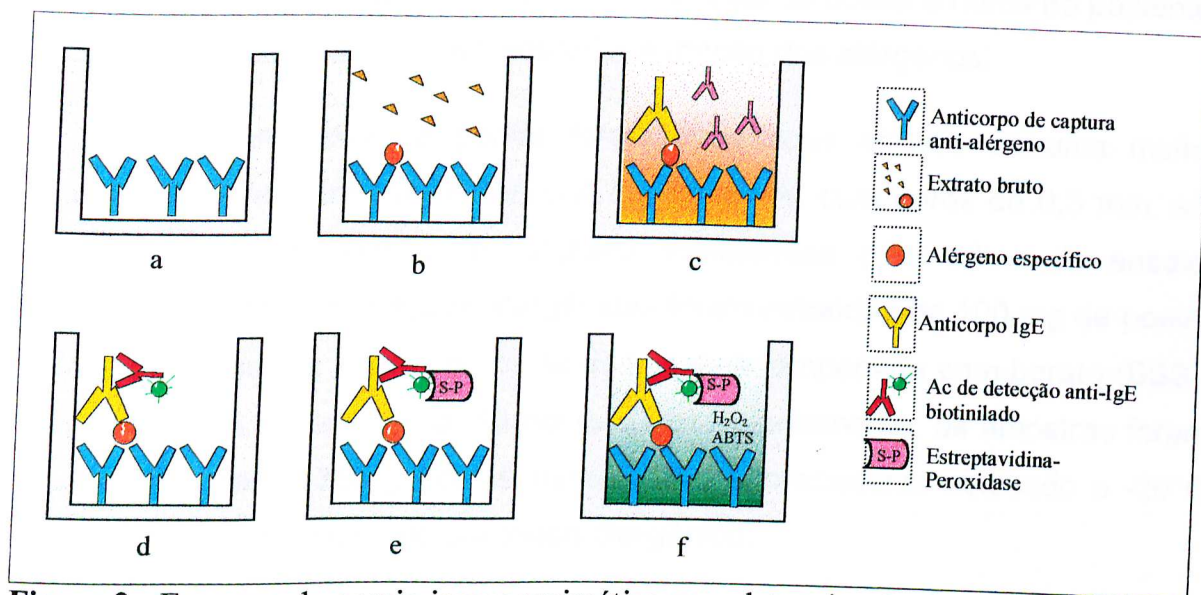


Figura 2 - Esquema do ensaio imunoenzimático para determinação dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 (ELISA reverso). (a): anticorpo monoclonal de captura específico aos alérgenos; (b): extrato bruto alergênico; (c): Amostra de soro. (d): adição do anticorpo de detecção biotilado anti-IgE humana; (e): adição do conjugado estreptavidina-peroxidase (S-P); f: revelação da reação realizada pela adição do substrato enzimático (H_2O_2 e ABTS). Fonte: adaptado de ARAGÃO & RIBEIRO, 1998.

3.7. Coleta da poeira domiciliar e extração dos alérgenos

Após identificação dos pacientes asmáticos positivos aos testes cutâneos, 24 pacientes asmáticos e 26 indivíduos não atópicos (NA), negativos aos testes de punctura ($n = 26$) foram convocados para realização de visita às suas residências para coleta da poeira domiciliar, segundo o protocolo adotado pelo Serviço de Alergia, Asma e Imunologia da Universidade de Virgínia, EUA (Anexo 5).

A poeira foi coletada em diferentes locais: (I) sofá; (II) chão da sala; (III) cama, incluindo o colchão e o travesseiro; (IV) chão do quarto e (V) chão da cozinha e gabinetes, com auxílio de aspirador portátil compacto (Papa-pó Arno, 220 V, 50-56 Hz e 700-800 W; Arno, S.A., São Paulo, Brasil), munido

de um adaptador onde foi colocado tecido de algodão, de aproximadamente 15 cm², para retenção da poeira (TOVEY *et al.*, 1981). O tecido foi retirado do adaptador, dobrado adequadamente e acondicionado em embalagem plástica, devidamente identificado com o local da coleta e nome do paciente, sendo estocado a 4°C para posterior extração dos alérgenos.

As amostras de poeira foram peneiradas através de uma malha especial (*Standard Sieve Series A.S.T.M.*, EUA) com poros de 0,3 mm, em placa de Petri, sendo em seguida transferidas para tubos de ensaio. Posteriormente, as frações alergênicas foram extraídas de 100 mg de poeira de cada amostra com 2 mL de solução salina tamponada com borato (BBS), a 5 mM, pH 8,0 a 4°C por 18 horas. Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas a 350 g por 10 minutos e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior análise do conteúdo alergênico.

3.8. ELISA para detecção de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar (Der p 1, Der p 2 e Der f 1)

Alérgenos de *Dermatophagoides* (Der p 1, Der p 2 e Der f 1) foram mensurados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo "sandwich", como descrito por LUCZYNSKA *et al.* (1989), com modificações.

Microplacas de poliestireno (IMMULON 2, *Dynatech Laboratories Inc.*) foram sensibilizadas (50 µl/poço) com os respectivos anticorpos monoclonais: anti-Der p 1 (5H8), anti-Der p 2 (1D8) e anti-Der f 1 (6A8), na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e subsequentemente bloqueadas (200 µl/poço) com PBS-T + BSA a 1% por 1 hora à temperatura ambiente.

Novamente, as placas foram submetidas a três ciclos de lavagens com PBS-T e seguiu-se a adição dos extratos de poeira dos diferentes ambientes domiciliares (50 µl/poço), em duas concentrações (não diluído e

1:5 em PBS-T + BSA a 1%). Paralelamente, foram realizadas, em duplicata, as respectivas curvas padrões, em diluições duplas seriadas em PBS-T + BSA a 1%, variando de 125 a 0,122 ng/mL, utilizando para cada alérgeno as seguintes amostras de referência, obtidas da Universidade de Virgínia, EUA: Der p 1 (UVA 93/03), Der p 2 (UVA 92/02), Der f 1 (UVA 93/02).

Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS-T e seguiu-se a adição (50 µl/poço) dos anticorpos monoclonais biotinizados: anti-Der p 1 e anti-Der f 1 (clone 4C1) na diluição 1:1000 e anti-Der p 2 (clone 7A1) diluído a 1:3000 em PBS-T + BSA a 1%. As microplacas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Procedeu-se a novas lavagens como anteriormente descrito e adicionou-se (50µl/poço) estreptavidina-peroxidase a 1:1000 em PBS-T + BSA a 1%. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a última lavagem das placas com PBS-T por 5 vezes, adicionou-se o substrato enzimático consistindo de solução de ABTS a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA a 405 nm, em tempos variáveis, tendo como referência os valores de absorbância da curva padrão.

A média dos valores de absorbância obtidos dos extratos de poeira foi convertida em ng/mL, utilizando-se do software *Microplate Manager 4.0* e posteriormente expressa em µg/g de poeira. Os extratos de poeira que apresentaram valores de absorbância extrapolados acima da curva padrão dos respectivos alérgenos, foram novamente testados em diluições maiores (1:25, 1:125, 1:250 e 1:500).

As curvas padrões para determinação dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 variaram de 125 a 0,2 ng/mL.

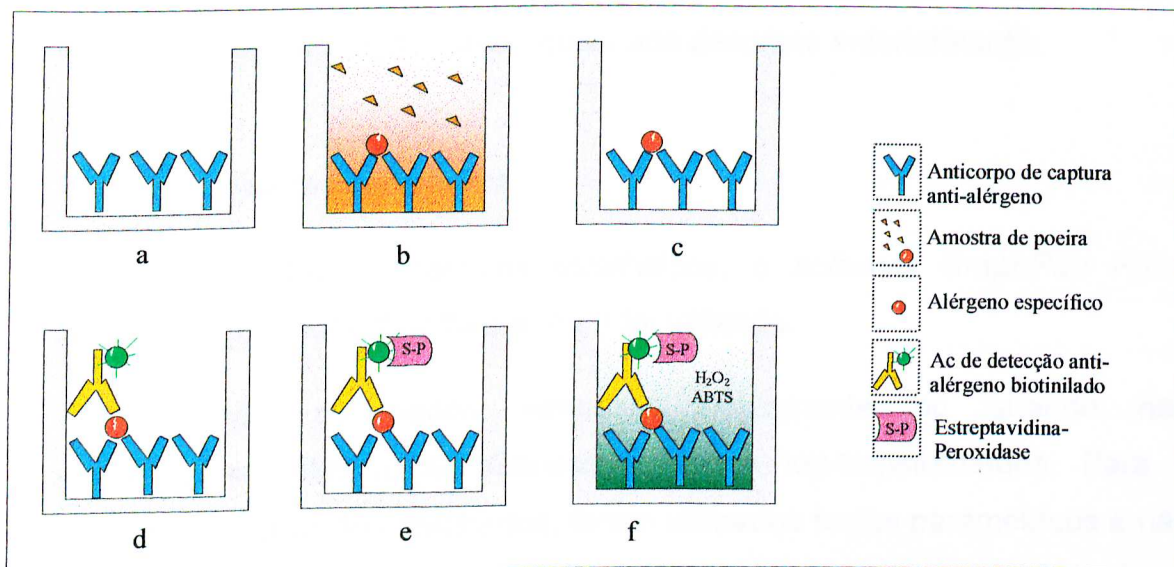


Figura 3 - Esquema do ensaio imunoenzimático para determinação dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1. (a): anticorpo monoclonal de captura específico ao alérgeno; (b): adição da amostra de poeira; (c): após a lavagem, permanece o alérgeno específico ligado ao Ac de captura; (d): adição do anticorpo de detecção biotínido anti-alérgeno específico; (e): adição do conjugado estreptavidina-peroxidase (S-P); f: revelação da reação realizada pela adição do substrato enzimático (H_2O_2 e ABTS). Fonte: adaptado de ARAGÃO & RIBEIRO, 1998.

3.9. Ensaios de reatividade na determinação dos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1

Para verificar a existência de reatividade entre os anticorpos de captura para os alérgenos de Der p 1, Der p 2 e Der f 1, ELISAs foram realizados como descrito acima, usando somente as amostras de referência. Resumidamente, microplacas foram sensibilizadas, separadamente, com anticorpos de captura anti-Der p 1 (clone 5H8), anti-Der p 2 (clone 1D8) e anti-Der f 1 (clone 6A8). Em seguida, cada placa foi incubada com as amostras de referência para os 3 alérgenos: Der p 1, Der p 2 e Der f 1, realizando curvas padrões, em duplicata, em diluições duplas seriadas, que variaram de 125 a 0,2 ng/mL. Na fase seguinte, anticorpo monoclonal biotínido anti-grupo 1 (clone 4C1) foi adicionado nas placas sensibilizadas com os anticorpos de captura anti-Der p 1 e anti-Der f 1 e o anticorpo monoclonal biotínido anti-grupo 2 (clone 7A1) foi utilizado nas placas

sensibilizadas com anticorpo de captura anti-Der p 2. Os passos subseqüentes da reação foram iguais aos descritos anteriormente.

3.10. Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos, o *software GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software, Inc.*) foi utilizado.

Quando os dados variavam amplamente ou quando não apresentavam distribuição Gaussiana, foram log-transformados. Para a análise estatística dos resultados, foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis (distribuição normal ou não, respectivamente).

Para a análise da reatividade cutânea ao teste de punctura a extrato bruto de Dpt, a comparação da média geométrica dos grupos estudados foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Para comparação entre as percentagens quanto aos graus de reatividade cutânea, níveis de IgE sérica específica e índice de exposição aos alérgenos empregou-se os testes Qui-Quadrado e Diferença entre duas proporções (estatística Z).

A média geométrica dos níveis séricos de IgE total dos grupos estudados foi comparada através do teste "t" de *Student*.

Utilizou-se o teste "t" de *Student* para comparação da média geométrica de IgE sérica específica ao alérgeno Der p 1 entre os 3 grupos estudados. Para Der p 2 e Der f 1, teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foi empregado.

Para a comparação entre as médias geométricas dos níveis dos alérgenos Der p 1 e Der f 1 dos grupos estudados, foi empregado o teste "t" de *Student*. Para Der p 2 essa comparação foi realizada através do teste de *Mann-Whitney*.

Correlação de *Spearman* avaliou a correlação entre as variáveis estudadas: níveis de IgE específica a Der p 1 e Der p 2 com o diâmetro

médio da pápula formada no teste de punctura a extrato de Dpt, níveis de IgE específica e níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 nas amostras de poeira domiciliar.

Para análise da reatividade entre os ELISAs na detecção dos alérgenos, procedeu-se aos testes de regressão linear, determinação e comparação (estatística Z) dos *slopes* (inclinação) das curvas padrões de cada ensaio, segundo HEYMANN *et al.* (1989). Diferenças não significantes ($p > 0,05$) entre os *slopes* das curvas de um mesmo experimento foram consideradas como reatividade

Todos os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05\%$).

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais das amostras

A Tabela 1 ilustra a distribuição dos pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA) quanto ao sexo e idade. Os pacientes asmáticos foram subdivididos em grupos SPT⁺ e SPT⁻ (testes cutâneos de punctura positivo e negativo ao extrato bruto de Dpt, respectivamente).

Tabela 1 – Distribuição por sexo e idade dos 89 pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 48) e SPT⁻ (n = 41) e 26 indivíduos não atópicos (NA).

	Grupo		
	SPT ⁺ (n = 48)	SPT ⁻ (n = 41)	NA (n = 26)
Sexo			
Masculino	09 (18,7%) ^a	11 (26,8%)	8 (30,8%)
Feminino	39 (81,3%)	30 (73,2%)	18 (69,2%)
Idade (anos)	37,8 ± 10,5 ^b	43,3 ± 10,4	31,2 ± 10,3

SPT⁺ = Pacientes asmáticos positivos no teste cutâneo de punctura (SPT) ao extrato bruto de Dpt.

SPT⁻ = Pacientes asmáticos negativos no teste cutâneo de punctura (SPT) ao extrato bruto de Dpt.

NA = Indivíduos não atópicos.

^a n (%)

^b média ± desvio padrão

4.2. Reatividade aos testes cutâneos

Dentre os 89 pacientes asmáticos, 54% foram positivos ao extrato bruto de Dpt pelo teste cutâneo de punctura. Adicionalmente, nenhum dos indivíduos não atópicos apresentou resultado positivo para o referido extrato.

Quanto ao diâmetro médio da pápula (Figura 4), a média aritmética do grupo SPT⁺ (8,1 ± 3,3 mm) foi superior às médias dos grupos SPT⁻ (0,8 ±

1,2 mm) e NA ($0,2 \pm 0,7$ mm). Não houve diferença entre as médias aritméticas dos grupos de asmáticos SPT⁻ e não atópicos (NA).

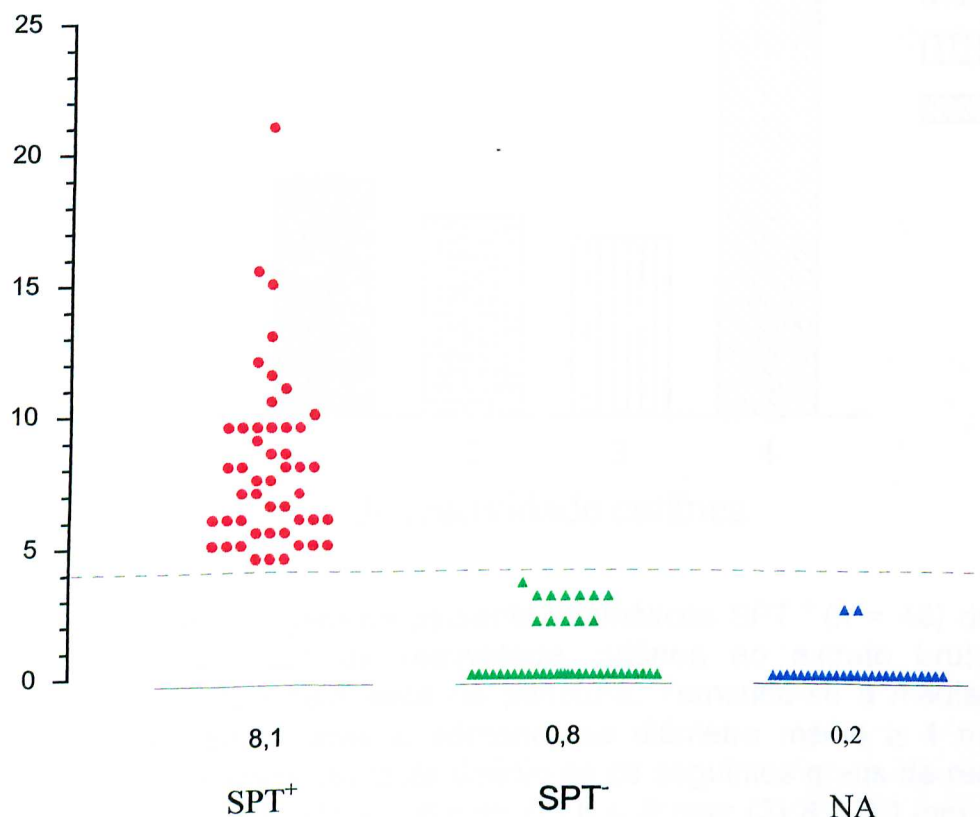


Figura 4 – Reatividade cutânea ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dpt) determinada pelo teste de punctura entre pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 48) e SPT⁻ (n = 41) e indivíduos não atópicos (NA) (n = 26). Um resultado positivo foi determinado a partir do diâmetro médio de duas medidas perpendiculares da pápula formada e definido como ≥ 4 mm. SPT⁺ = Pacientes asmáticos com teste de punctura positivo a Dpt; SPT⁻ = Pacientes asmáticos com teste de punctura negativo a Dpt. A linha tracejada indica o limiar de positividade. m.a = média aritmética, em mm, do diâmetro médio da pápula.

Todos os pacientes asmáticos SPT⁺ apresentaram grau de reatividade ≥ 1 (diâmetro médio da pápula ≥ 4 mm) enquanto que todos os pacientes asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA) tiveram grau de reatividade = 0. A maioria dos asmáticos SPT⁺ (42%) apresentou grau 4 de reatividade cutânea, valor significativamente superior aos obtidos para os graus 1 (23%; $p = 0,0041$), 2 (19%; $p = 0,0004$) e 3 (17%; $p < 0,0001$) (Figura 5).

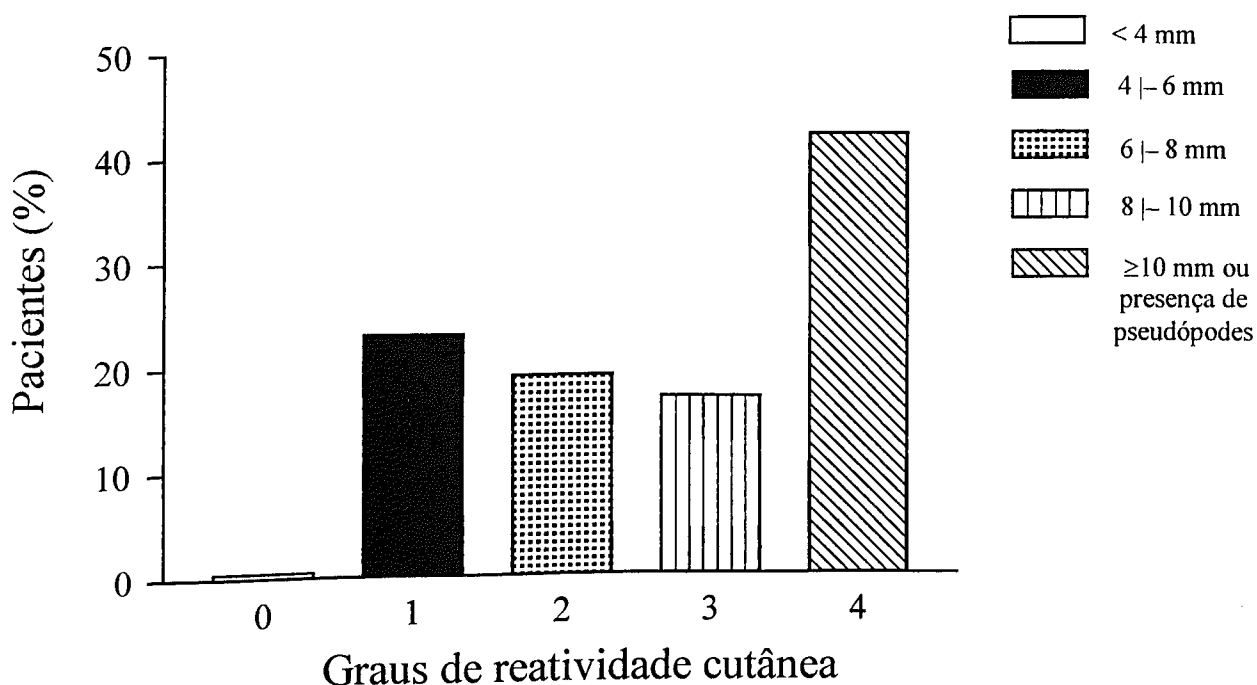


Figura 5 – Percentagem de pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 48) de acordo com diferentes graus de reatividade cutânea ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dpt) pelo teste de punctura. Tomando-se a média de dois diâmetros perpendiculares e adotando-se diâmetro médio ≥ 4 mm como critério de positividade ao teste definiu-se os seguintes graus de reatividade cutânea: (0) < 4 mm; (1) 4 – 6 mm; (2) 6 – 8 mm; (3) 8 – 10 mm; (4) ≥ 10 mm ou presença de pseudópodes

4.3. Níveis séricos de IgE total

As curvas padrões de ELISA para detecção de IgE sérica total foram analisadas para variações intra e inter-ensaios, obtendo-se coeficientes de variação de 7,0% e 16,7%, respectivamente.

Quanto aos níveis de IgE sérica total, o grupo de pacientes asmáticos SPT⁺ apresentou média geométrica de 375,2 IU/mL, valor significativamente maior que a dos grupos de asmáticos SPT⁻ (141,3 IU/mL; $p = 0,0088$) e não atópicos (NA) (23,1 IU/mL; $p < 0,0001$). A média geométrica do grupo SPT⁻ foi significativamente superior ao do grupo não atópicos (NA) ($p < 0,0001$) (Figura 6).

Como demonstrado na Figura 7, níveis elevados de IgE total (≥ 100 IU/mL) foram detectados em 36/48 (75%) pacientes asmáticos SPT⁺,

percentagem significativamente superior à encontrada em pacientes asmáticos SPT⁻ (22/41 [53,7%]; $p = 0,0167$). Por outro lado, valores considerados como limiar de normalidade para IgE sérica total (<100 UI/m) foram detectados em 12/48 (25%) pacientes asmáticos SPT⁺ e em 19/41 (46,3%) pacientes asmáticos SPT⁻.

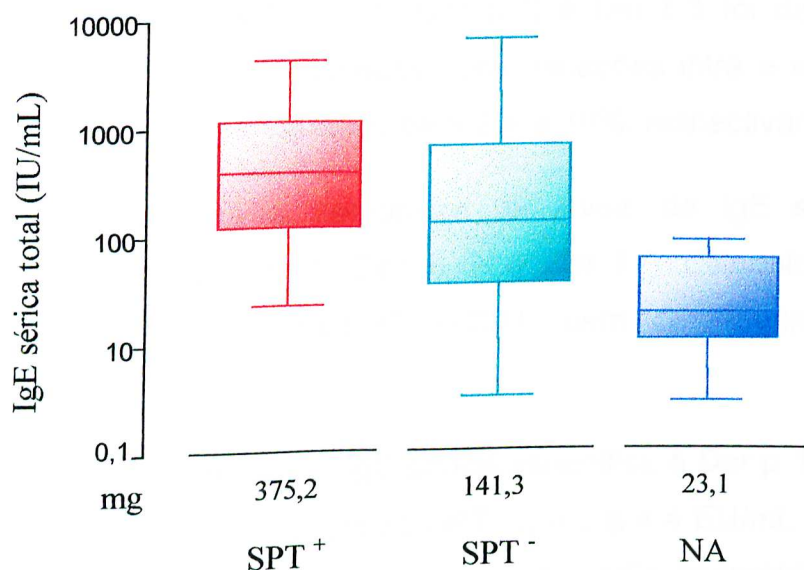


Figura 6. Níveis de IgE sérica total (IU/mL) mensurados por ELISA em pacientes asmáticos SPT⁺ ($n = 48$) e SPT⁻ ($n = 41$) e indivíduos não atópicos (NA) ($n = 26$). As caixas representam os quartis internos (25%-75%) enquanto que as linhas acima e abaixo das mesmas, os 25% restantes das amostras, encontrados em cada grupo. As caixas são divididas pela mediana. SPT⁺: asmáticos com teste de punctura positivo para Dpt. SPT⁻: asmáticos com teste de punctura negativo para Dpt. mg = média geométrica.

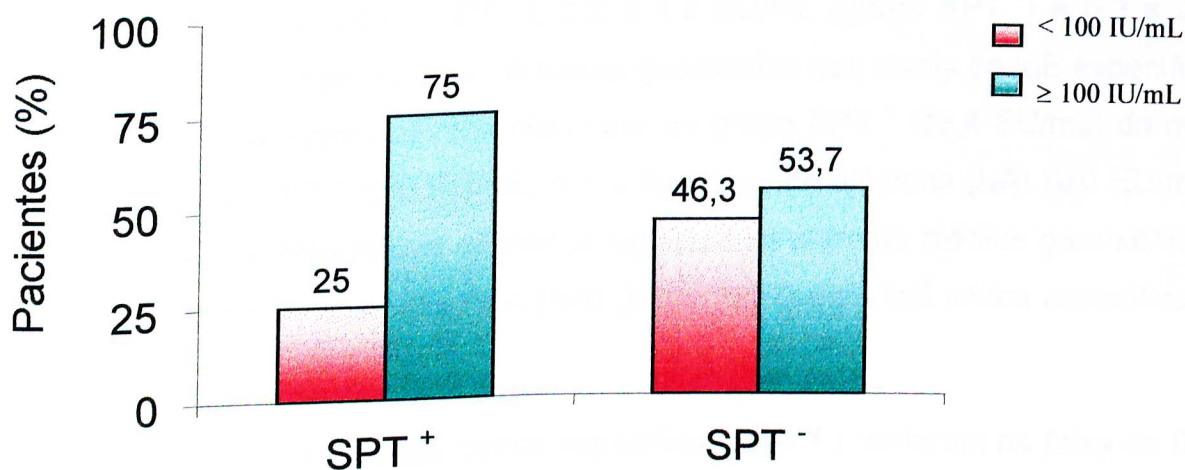


Figura 7. Percentagem de pacientes asmáticos SPT⁺ ($n = 48$), asmáticos SPT⁻ ($n = 41$) quanto aos níveis de IgE sérica total < 100 IU/mL (limiar de normalidade) e ≥ 100 IU/mL.

4.4. IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1

Ensaio imunoenzimático (ELISA reverso) foram utilizados para detecção dos níveis de IgE sérica específica a alérgenos dos ácaros *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e *D. farinae* (Der f 1). O limite de sensibilidade das curvas padrões de ELISA para detecção de IgE específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 foi de 3,9 EU/mL. As curvas padrões foram analisadas para variações intra e inter-ensaios, obtendo-se coeficientes de variação de 8,2% e 10%, respectivamente.

A Figura 8 demonstra os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 determinados por ELISA em pacientes asmáticos SPT⁺ e SPT⁻ bem como em indivíduos não atópicos (NA).

Os valores de IgE sérica específica a Der p 1 variaram na faixa de 0,5 a 3111 EU/mL (grupo SPT⁺), 0,3 a 4,4 EU/mL (grupo SPT⁻) e 0,3 a 5,4 EU/mL (grupo não atópico). A média geométrica dos níveis de IgE específica a Der p 1 foi significativamente maior no grupo SPT⁺ (24,7 EU/mL) do que nos grupos SPT⁻ (0,9 EU/mL; $p < 0,0001$) e não atópicos (NA) (0,8 EU/mL; $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa na média geométrica entre os grupos de pacientes asmáticos SPT⁻ e não atópicos (NA) ($p = 0,2877$).

Os valores de IgE sérica específica a Der p 2 variaram na faixa de 0,2 a 5318 EU/mL (grupo SPT⁺), 0,2 a 1,5 EU/mL (grupo SPT⁻) e 0,3 a 2,7 EU/mL (grupo não atópico). A média geométrica dos níveis de IgE específica a Der p 2 foi significativamente maior no grupo SPT⁺ (28,4 EU/mL) do que nos grupos SPT⁻ (0,6 EU/mL; $p < 0,0001$) e não atópicos (NA) (0,6 EU/mL; $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre as médias geométricas do grupo SPT⁻ e não atópicos (NA) ($p = 0,2627$) para IgE sérica específica a Der p 2.

Os valores de IgE sérica específica a Der f 1 variaram na faixa de 0,3 a 2059 EU/mL (grupo SPT⁺), 0,3 a 8,4 EU/mL (grupo SPT⁻) e 0,49 a 3,5 EU/mL (grupo não atópico). A média geométrica dos níveis de IgE específica

a Der f 1 foi significativamente maior no grupo SPT⁺ (19,7 EU/mL) do que nos grupos SPT⁻ (0,8 EU/mL; $p < 0,0001$) e não atópico (NA) (0,7 EU/mL; $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre as médias geométricas dos grupos SPT⁻ e não atópicos ($p = 0,1063$) para IgE específica a Der f 1.

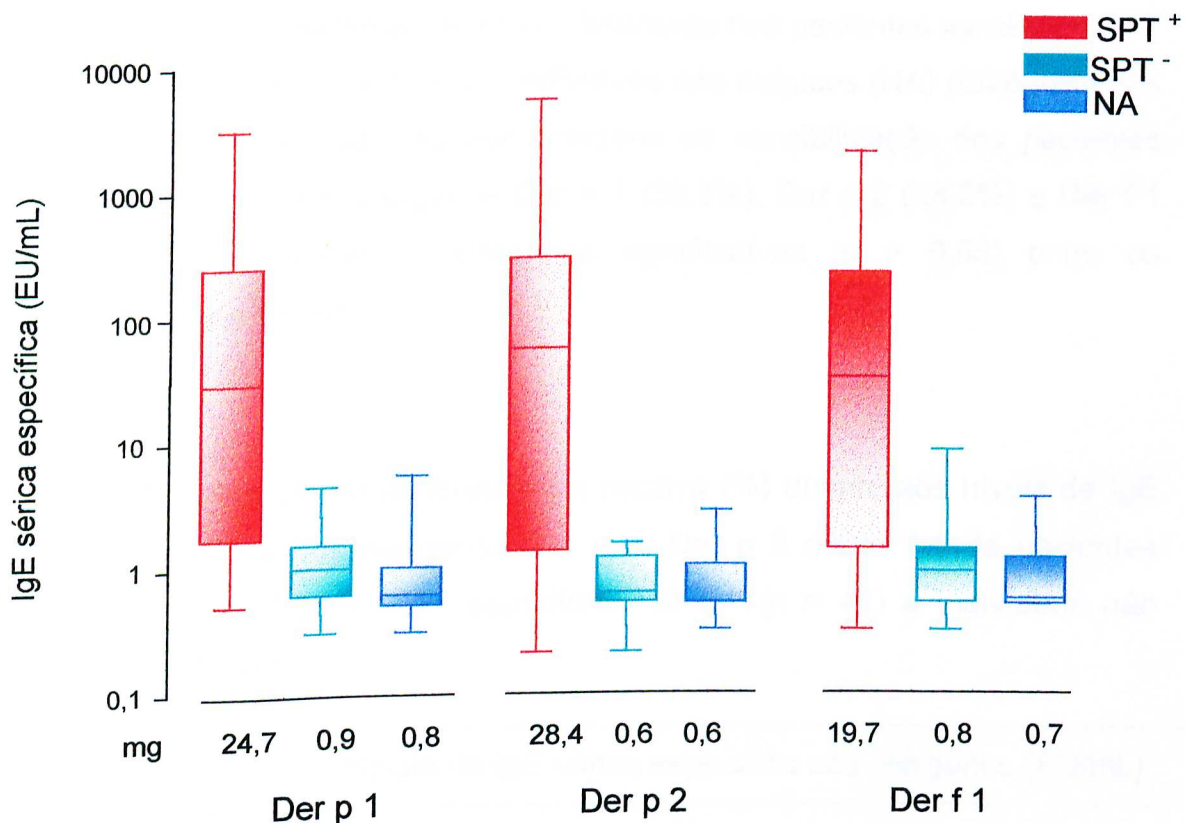


Figura 8 - Níveis de IgE sérica específica (EU/mL) a Der p 1, Der p 2 e Der f 1, mensurados por ELISA em pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 48) e SPT⁻ (n = 41), bem como em indivíduos não atópicos (NA) (n = 26). As caixas representam os quartis internos (25%-75%) e as linhas, acima e abaixo das mesmas, os 25% restantes das amostras, encontrados em cada grupo. As caixas são divididas pela mediana. SPT⁺: pacientes asmáticos positivos no teste de punctura para Dpt. SPT⁻: pacientes asmáticos negativos no teste de punctura para Dpt. NA: indivíduos não atópicos. mg = média geométrica.

Conforme observado na Tabela 2, a maioria dos pacientes asmáticos SPT⁺ (33/48; 68,8%) apresentou níveis de IgE específica a Der p 1 $\geq 3,9$ EU/mL, percentagem significativamente superior à apresentada pelos

pacientes asmáticos SPT⁻ (1/41 [2,4%]; $p < 0,0001$) e indivíduos não atópicos (NA) (1/26 [3,8%]; $p < 0,0001$). Níveis $\geq 3,9$ EU/mL de IgE específica a Der p 2 nos asmáticos SPT⁺ foram encontrados em 33/48 (68,8%) indivíduos, enquanto todos os pacientes asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA) apresentaram níveis de IgE $< 3,9$ EU/mL ($p < 0,0001$). De forma semelhante, níveis $\geq 3,9$ EU/mL de IgE sérica específica a Der f 1 foram encontrados em 29/48 (60,4%) pacientes asmáticos SPT⁺, valor significativamente superior ao observado nos pacientes asmáticos SPT⁻ (1/41 [2,4%]; $p < 0,0001$) e nos indivíduos não atópicos (NA) (0/26 [0%]; $p < 0,0001$). Por outro lado, as percentagens de sensibilização dos pacientes asmáticos SPT⁺ aos alérgenos Der p 1 (68,8%), Der p 2 (68,8%) e Der f 1 (60,4%), não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os respectivos alérgenos.

Tabela 2 – Frequência absoluta (n) e relativa (%) quanto aos níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 de pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 48), asmáticos SPT⁻ (n = 41) e indivíduos não atópicos (NA) (n = 26).

Grupo	Níveis de IgE sérica específica aos alérgenos (EU/mL)					
	Der p 1		Der p 2		Der f 1	
	$<3,9^*$	$\geq 3,9$	$<3,9$	$\geq 3,9$	$<3,9$	$\geq 3,9$
SPT ⁺	15 (31,2%)	33 (68,8 %)	15 (31,2%)	33 (68,8 %)	19 (39,6%)	29 (60,4%)
SPT ⁻	40 (97,6%)	1 (2,4%)	41 (100%)	0 (0%)	40 (97,6%)	1 (2,4%)
NA	25 (96,2%)	1 (3,8%)	26 (100%)	0 (0%)	26 (100%)	0 (0%)

SPT⁺ = Pacientes asmáticos positivos no teste de punctura ao extrato bruto de Dpt.

SPT⁻ = Pacientes asmáticos negativos no teste de punctura ao extrato bruto de Dpt.

NA = Indivíduos não atópicos

* Valor considerado como limite de sensibilidade da curva padrão para Der f 1.

A partir da determinação do limite de sensibilidade de 3,9 EU/mL nos ensaios para mensuração de IgE específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e

Der f 1, arbitrariamente definiu-se um fator multiplicador (5 vezes) para extratificação das classes de reatividade de IgE específica aos três alérgenos. Dessa forma, as seguintes classes foram definidas:

- Classe 1 = 3,9 a < 19,5 EU/mL (positivo fraco)
- Classe 2 = 19,5 a < 97,5 EU/mL (positivo moderado)
- Classe 3 = 97,5 a < 487,5 EU/mL (positivo forte)
- Classe 4 = $\geq 487,5$ EU/mL (positivo intenso)

Como demonstrado na Figura 9, nota-se que os asmáticos SPT⁺ apresentaram níveis de IgE sérica específica a Der p 1, Der p 2 e Der f 1 distribuídos nas classes 1, 2, 3, e 4 diferindo acentuadamente dos asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA), que apresentaram níveis de IgE específica somente na classe 1 (3,9 a < 19,5 EU/mL).

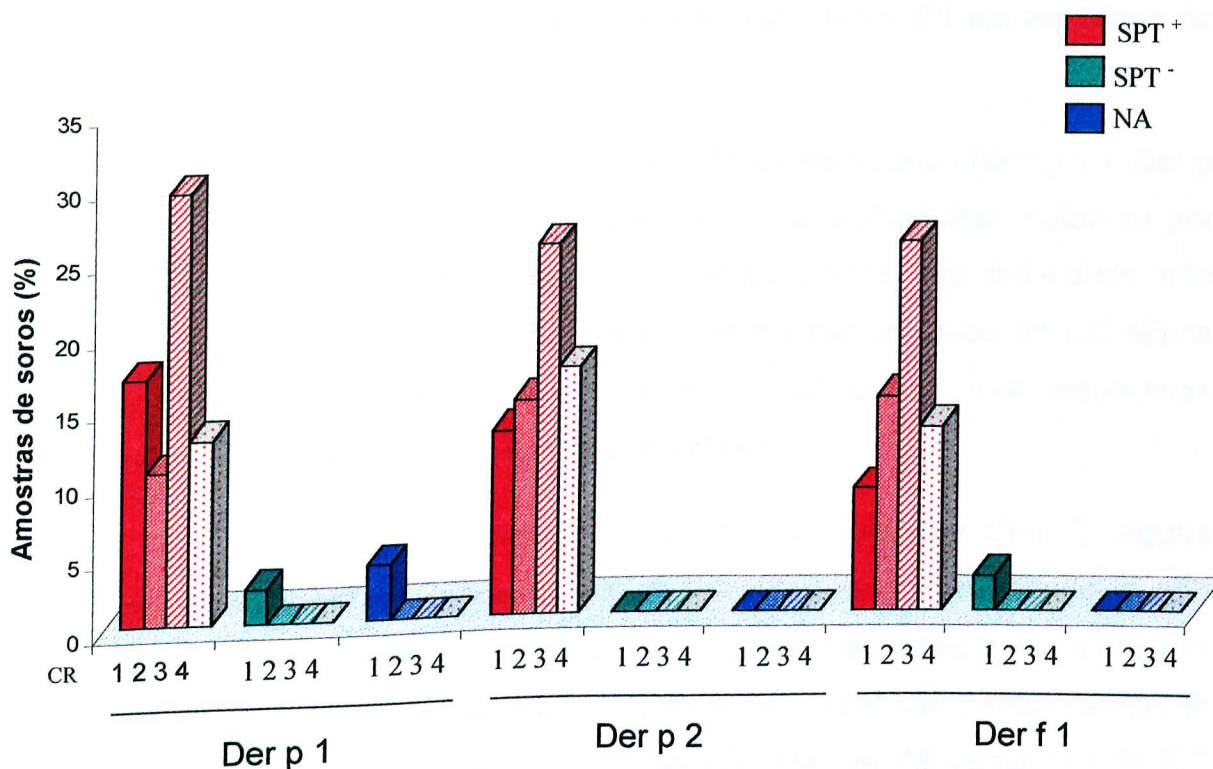


Figura 9 – Percentagem de indivíduos dos grupos SPT⁺, SPT⁻ e não atópico (NA), de acordo com as classes de reatividade (CR) de IgE sérica específica a alérgenos de Der p 1, Der p 2 e Der f 1:

- (1) 3,9 a < 19,5 EU/mL (positivo fraco)
- (2) 19,5 a < 97,5 EU/mL (positivo moderado)
- (3) 97,5 a < 487,5 EU/mL (positivo forte)
- (4) $\geq 487,5$ EU/mL (positivo intenso)

As percentagens de pacientes asmáticos SPT⁺ com níveis de IgE específica a Der p 1 nas classes 1, 2, 3 e 4 foram, respectivamente: 16,7%, 10,4%, 29,2% e 12,5%. Porém, nos pacientes asmáticos SPT⁻ (2,4% na classe 1 e 0% nas classes 2, 3 e 4) e nos indivíduos não atópicos (NA) (3,8% na classe 1 e 0% nas classes 2, 3 e 4), as percentagens foram menores. Níveis de IgE específica a Der p 2 nas classes 1, 2, 3 e 4 foram encontrados respectivamente, em 12,5%, 14,6%, 25% e 16,7% dos pacientes asmáticos SPT⁺, sendo que asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA) em todas as classes apresentaram 0%. Quanto à IgE específica a Der f 1, 8,3%, 14,6%, 25% e 12,5% dos pacientes asmáticos SPT⁺ apresentaram classes 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os pacientes asmáticos SPT⁻ apresentaram 2,4% na classe 1 e 0% nas classes 2, 3 e 4 e, os indivíduos não atópicos (NA) 0% em todas as classes.

4.5. Níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 em amostras de poeira domiciliar

Na determinação dos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e *D. farinae* (Der f 1) nas amostras de poeira domiciliar, optou-se por realizá-la nos grupos de pacientes asmáticos SPT⁺ e indivíduos não atópicos (NA), justamente, para poder correlacionar os níveis de IgE sérica específica com os níveis destes mesmos alérgenos nas respectivas residências dos indivíduos de ambos os grupos.

Contudo, na convocação dos pacientes asmáticos SPT⁺, alguns imprevistos ocorreram. Mudança de endereço e mesmo de cidade, a não localização da residência, foram os motivos principais pelos quais o número total de participantes nesta segunda fase tenha diminuído, sendo somente 24 as residências que foram estudadas do total de 48 asmáticos SPT⁺ iniciais.

Por ser o grupo de não atópicos (NA) constituído de membros da comunidade de Uberlândia, estudantes, professores e funcionários desta Universidade, em constante contato com nosso laboratório, não tivemos

problemas, e portanto, o número de não atópicos (NA) não foi alterado (n = 26).

Dentro de cada grupo, algumas amostras de poeira de determinados ambientes das residências foram consideradas perdidas, reduzindo o número de amostras por local.

Das 120 amostras de poeira obtidas das 24 residências de pacientes asmáticos SPT⁺, perderam-se amostras pelos seguintes motivos:

- Uma amostra referente ao sofá, devido ser o mesmo de material sintético (corino), o qual não reteve quantidade suficiente de poeira (100 mg) para ser extraída e analisada quanto aos níveis de Der p 1, Der p 2 e Der f 1.

- Duas amostras referentes ao chão da sala, devido à quantidade insuficiente de poeira, impossibilitando a determinação de Der p 2.

Das 130 amostras de poeira obtidas das 26 residências de indivíduos não atópicos (NA), perderam-se as seguintes amostras devido à pequena quantidade de poeira aspirada:

- Duas amostras de poeira do sofá (ambos de corino), uma da cama (colchão com menos de 3 meses de uso) e uma da cozinha (mesmo após 2 visitas, não foi possível coletar quantidade de poeira suficiente para a extração dos alérgenos).

4.5.1. Níveis do alérgeno Der p 1 de *D. pteronyssinus*

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios das curvas padrões na determinação dos níveis de Der p 1 foram, respectivamente, 6,8% e 7,1%.

Os níveis do alérgeno Der p 1 determinados nas residências dos indivíduos dos grupos asmático e não atópico variaram na faixa de 0,002 µg/g de poeira a 110,8 µg/g de poeira. A média geométrica dos níveis de Der

p 1, comparando-se o mesmo local nos dois grupos estudados, foi significativamente maior nas amostras de poeira da cama do grupo de pacientes asmáticos (3,0 $\mu\text{g/g}$ de poeira) que nos não atópicos (NA) (0,2 $\mu\text{g/g}$ de poeira; $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre as médias geométricas das amostras obtidas do sofá, chão da sala, chão do quarto e cozinha nas residências dos grupos asmáticos e não atópicos (NA) ($p > 0,05$) (Figura 10)

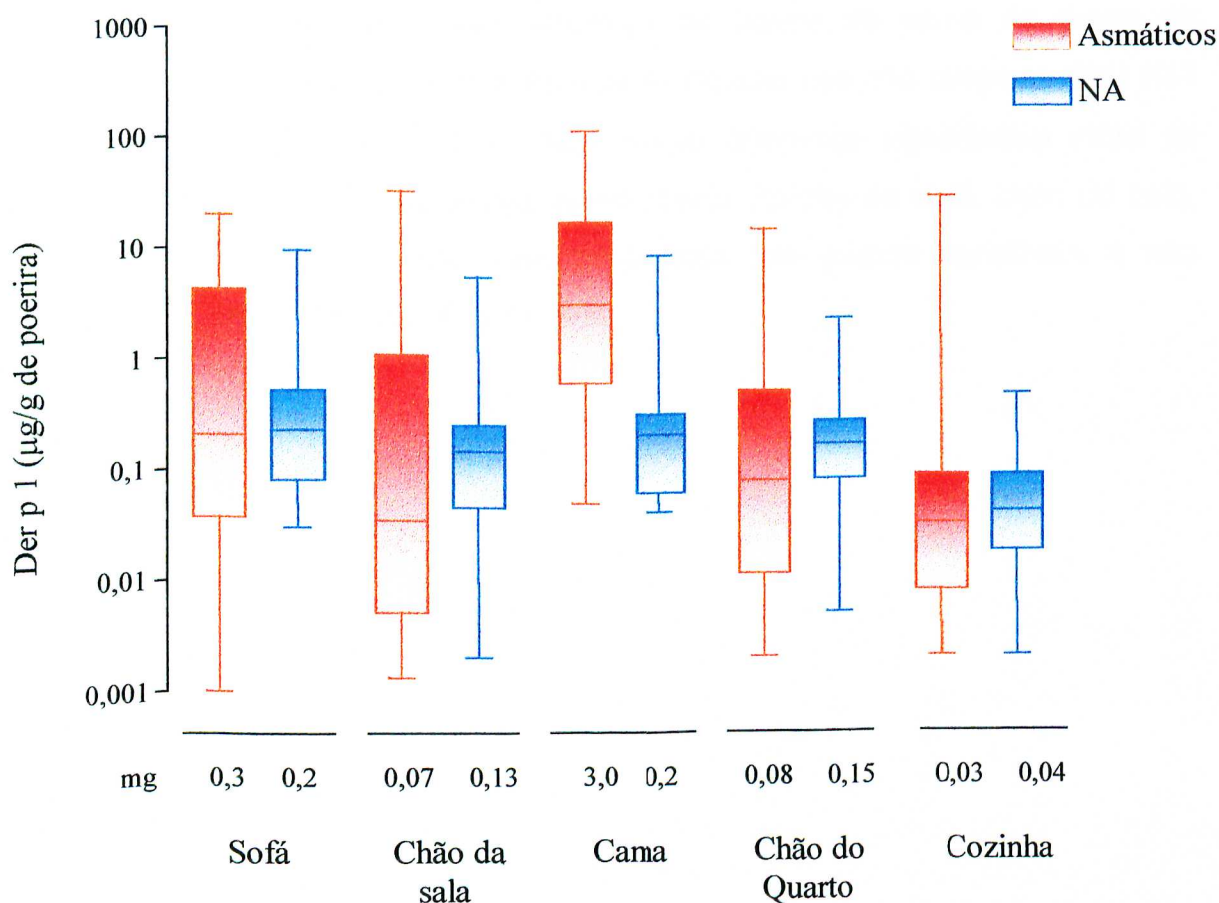


Figura 10. Níveis do alérgeno Der p 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, expressos em $\mu\text{g/g}$ de poeira, nas residências de pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 24) e de indivíduos não atópicos (NA) (n = 26), em amostras de poeira coletadas de cinco locais: sofá, chão da sala, cama, chão do quarto e cozinha. As caixas representam os quartis internos (25%-75%) e as linhas, acima e abaixo das mesmas, os 25% restantes das amostras, encontrados em cada grupo. As caixas são divididas pela mediana. mg = média geométrica.

4.5.2. Níveis do alérgeno Der p 2 de *D. pteronyssinus*

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios das curvas padrões na determinação dos níveis de Der p 2 foram, respectivamente, 6,2% e 10%.

Os níveis do alérgeno Der p 2 determinados nas residências dos indivíduos asmáticos e não atópicos (NA) variaram na faixa de 0,002 $\mu\text{g/g}$ a 85,2 $\mu\text{g/g}$ de poeira. A média geométrica dos níveis do alérgeno Der p 2, comparando-se o mesmo local nos dois grupos estudados, foi significativamente maior nas amostras de poeira da cama do grupo de pacientes asmáticos (3,6 $\mu\text{g/g}$ de poeira) do que nos não atópicos (NA) (0,1 $\mu\text{g/g}$ de poeira; $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre as médias geométricas das amostras de poeira obtidas do sofá, chão da sala, chão do quarto e cozinha nas residências dos grupos asmáticos e não atópicos (NA) ($p > 0,05$) (Figura 11).

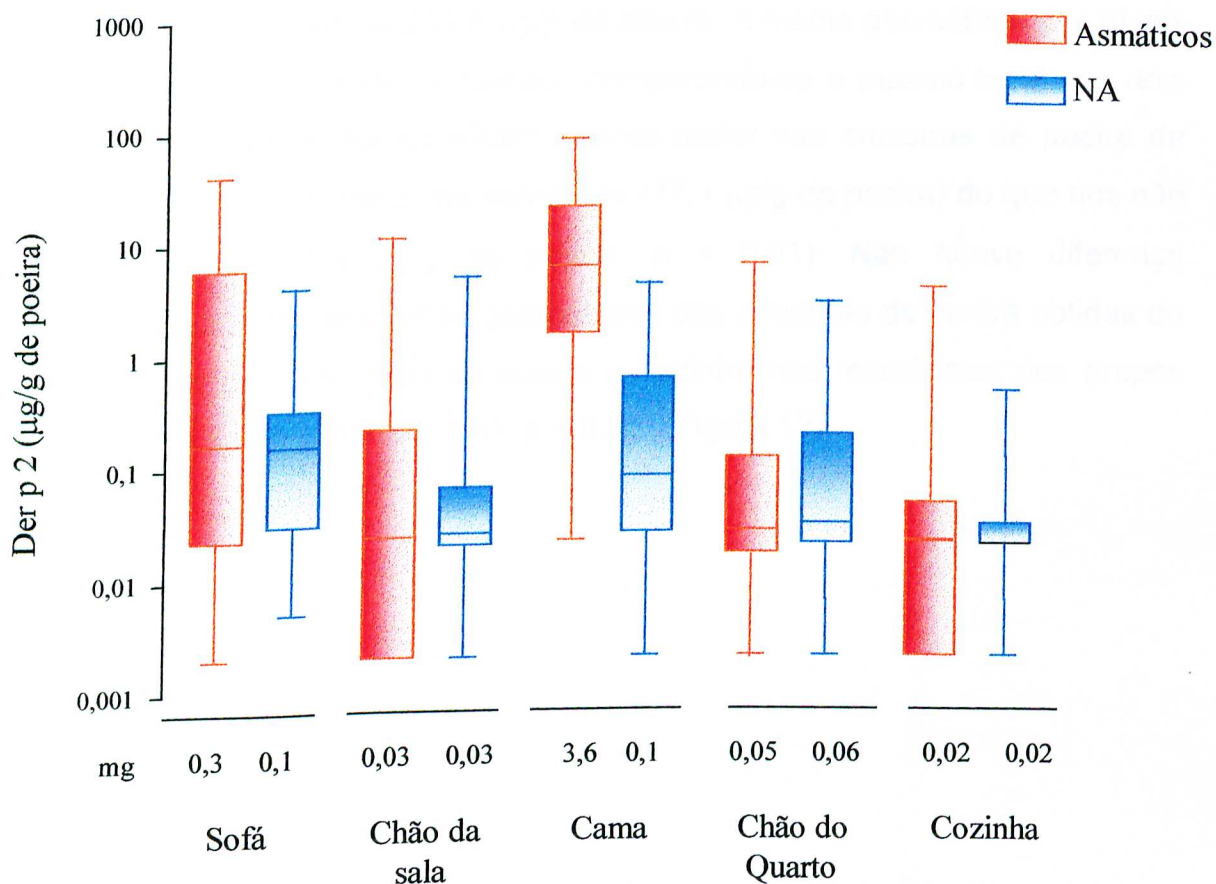


Figura 11. Níveis do alérgeno Der p 2 de *Dermatophagoides pteronyssinus*, expressos em $\mu\text{g/g}$ de poeira, nas residências de pacientes asmáticos SPT⁺ ($n = 24$) e de indivíduos não atópicos (NA) ($n = 26$), em amostras de poeira coletadas de cinco locais: sofá, chão da sala, cama, chão do quarto e cozinha. As caixas representam os quartis internos (25%-75%) e as linhas, acima e abaixo das mesmas, os 25% restantes das amostras, encontrados em cada grupo. As caixas são divididas pela mediana. mg = média geométrica.

4.5.3. Níveis do alérgeno Der f 1 de *D. farinae*

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios das curvas padrões na determinação de Der f 1 foram, respectivamente, 7,5% e 7,2%.

Os níveis do alérgeno Der f 1 determinados nas residências dos indivíduos dos grupos asmáticos e não atópicos (NA) variaram na faixa de 0,002 $\mu\text{g/g}$ de poeira a 239,4 $\mu\text{g/g}$ de poeira. A média geométrica dos níveis do alérgeno Der f 1 de *D. farinae*, comparando-se o mesmo local nos dois grupos estudados, foi significativamente maior nas amostras de poeira da cama do grupo de pacientes asmáticos (17,1 $\mu\text{g/g}$ de poeira) do que nos não atópicos (NA) (4,5 $\mu\text{g/g}$ de poeira; $p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre as médias geométricas das amostras de poeira obtidas do sofá, chão da sala, chão do quarto e cozinha nas residências dos grupos asmáticos e não atópicos (NA) ($p > 0,05$) (Figura 12).

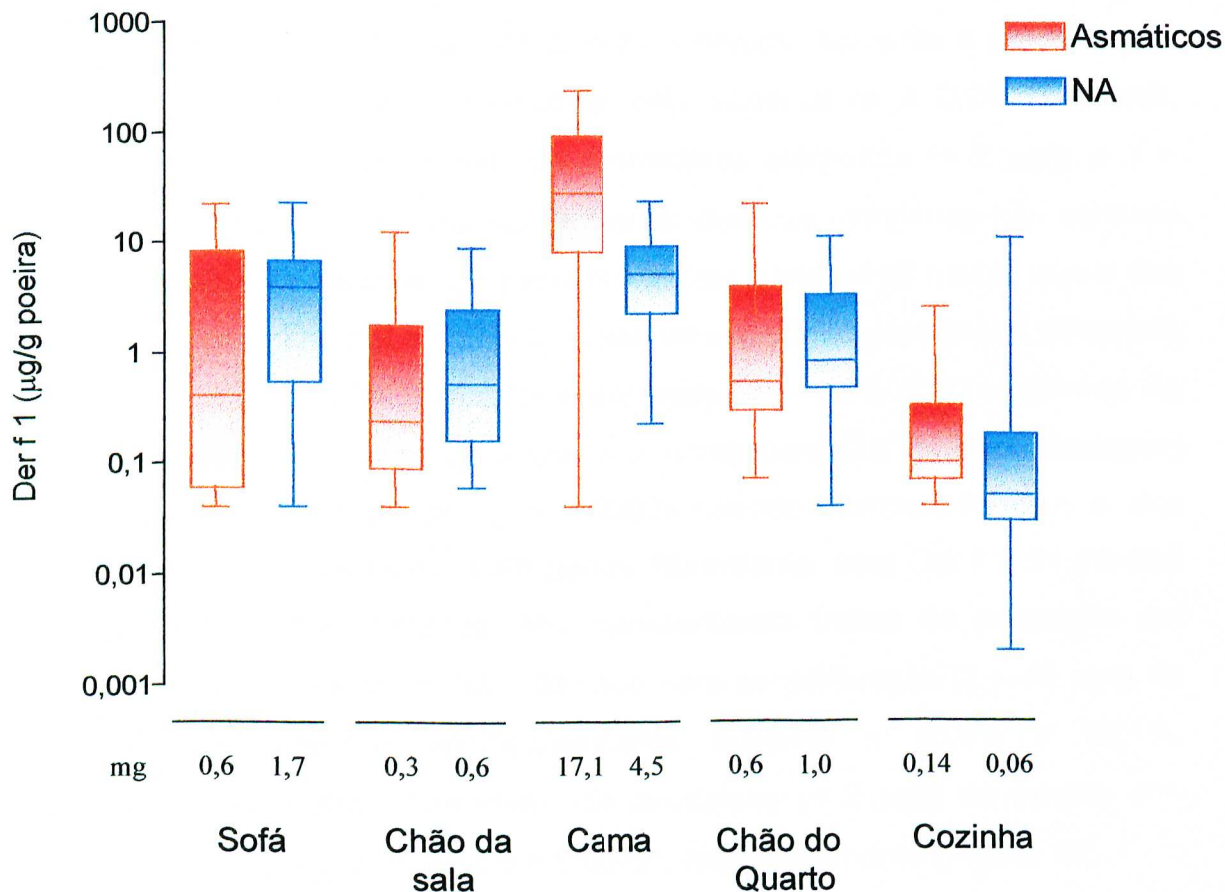


Figura 12. Níveis do alérgeno Der f 1 de *Dermatophagoides farinae*, expressos em $\mu\text{g/g}$ de poeira, nas residências de pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 24) e de indivíduos não atópicos (NA) (n = 26), em amostras de poeira coletadas de cinco locais: sofá, chão da sala, cama, chão do quarto e cozinha. As caixas representam os quartis internos (25%-75%) e as linhas, acima e abaixo das mesmas, os 25% restantes das amostras, encontrados em cada grupo. As caixas são divididas pela mediana. mg = média neométrica

4.6. Índice de exposição alergênica

A maior parte das residências de pacientes asmáticos apresentou índice de exposição alergênica para Der p 1 (50%), Der p 2 (45,8%) e Der f 1 (75%), em níveis considerados como fator de risco para exacerbação dos sintomas de asma ($\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira). Contudo, somente a percentagem referente a Der f 1 foi significativamente superior ($p < 0,0001$) quando comparado aos outros níveis dos respectivos alérgenos ($< 2 \mu\text{g/g}$ e $2 \text{--} 10 \mu\text{g/g}$ de poeira). Com relação às residências dos indivíduos não atópicos (NA), o índice de exposição esteve em baixos níveis e foi menor que o dos asmáticos para Der p 1 e Der p 2. Índice de exposição para esses alérgenos em níveis $< 2 \mu\text{g/g}$ de poeira foi encontrado em 76,9% das residências de não atópicos (NA), tanto para Der p 1 como para Der p 2, percentagem significativamente superior ($p < 0,0003$) quando comparado com a dos outros níveis dos respectivos alérgenos. No entanto, para Der f 1, 61,5% das residências de não atópicos (NA) apresentaram índice de exposição em níveis considerados como fator de risco para sensibilização ($2 \text{--} 10 \mu\text{g/g}$ de poeira), percentagem significativamente superior a 15,4% e 23,1%, referentes aos outros dois níveis de exposição ($< 2 \mu\text{g/g}$ de poeira; $p = 0,0013$ e $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira; $p = 0,0072$), respectivamente (Figura 13).

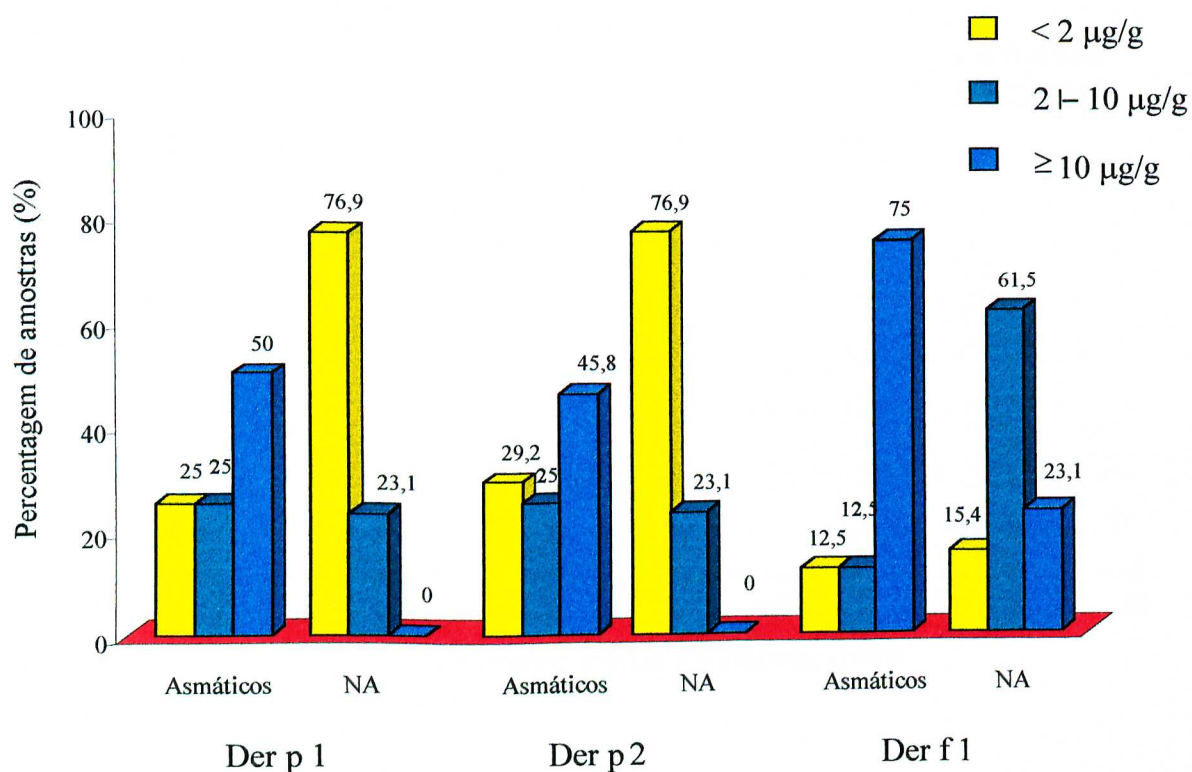


Figura 13 – Percentagem de residências de pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA) apresentando índice de exposição para os alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e *D. farinae* (Der f 1), segundo os níveis considerados como fatores de risco para sensibilização ($\geq 2 \mu\text{g}$ de alérgeno/g de poeira) e para exacerbação dos sintomas de asma ($\geq 10 \mu\text{g}$ de alérgeno/g de poeira).

4.7. Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 1 e Der p 2 com a reatividade cutânea ao extrato de *D. pteronyssinus*

Os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos estudados, nos pacientes asmáticos SPT⁺, correlacionaram-se positivamente com o diâmetro médio da pápula obtida no teste cutâneo ao extrato de *D. pteronyssinus* (Dpt), para as frações alergênicas de Der p 1 ($r = 0,4374$; $p = 0,0019$) e Der p 2 ($r = 0,5387$; $p < 0,0001$) (Figura 14 A e B, respectivamente). No grupo não atópico, não houve correlação entre os níveis de IgE específica aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 com a reatividade cutânea ao extrato de Dpt.

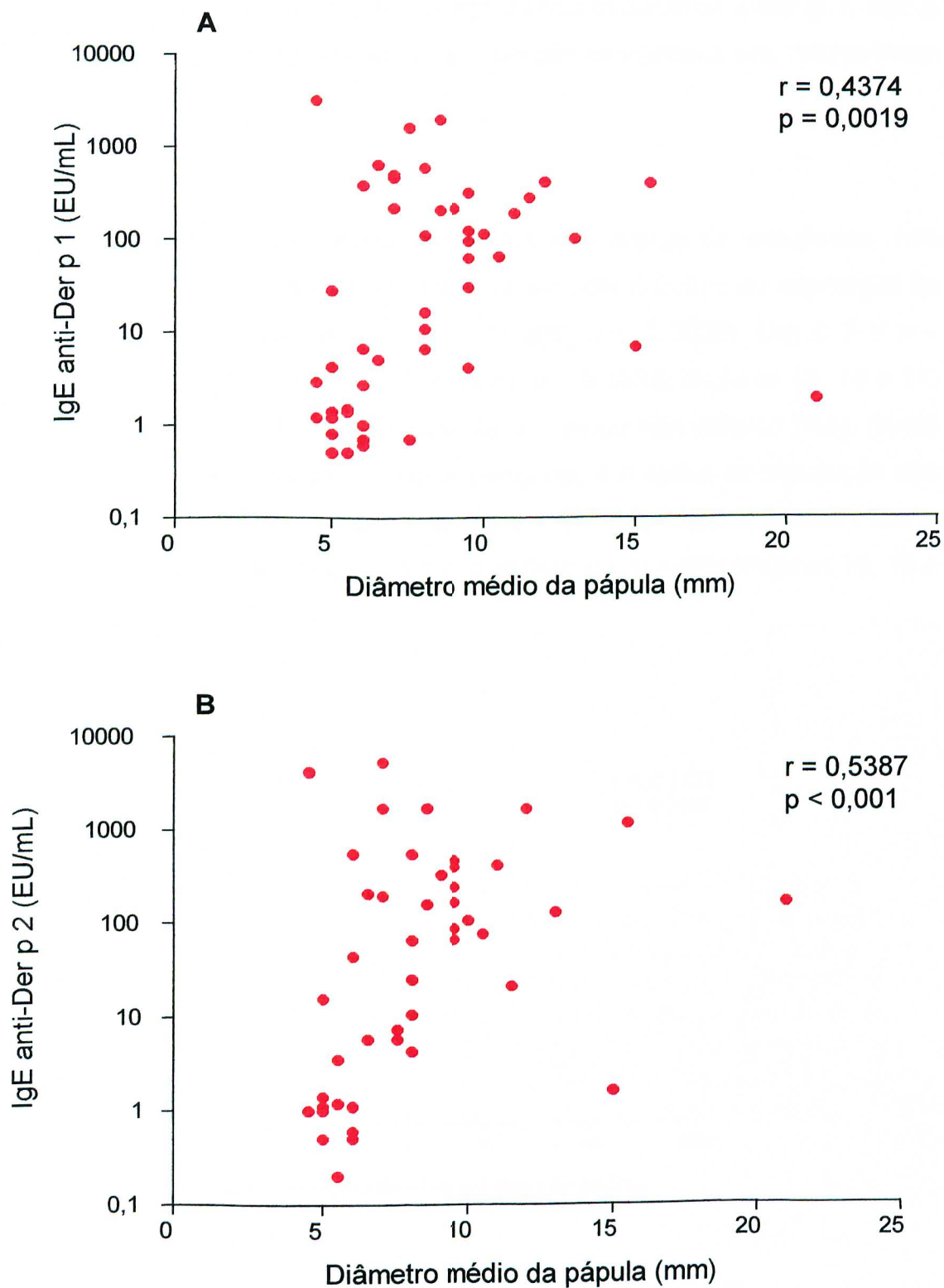


Figura 14 - Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 1 (A) e Der p 2 (B), expressos em EU/mL, determinados por ELISA com o diâmetro médio da pápula (mm) resultante do teste cutâneo de punctura ao extrato de *D. pteronyssinus* em pacientes asmáticos SPT⁺ (n = 48).

4.8. Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 1, Der p 2 e Der f 1 com os níveis de exposição alergênica aos respectivos alérgenos

Os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos estudados, nos pacientes asmáticos, não se correlacionaram com o índice de exposição às frações alergênicas de Der p 1 ($r = -0,1983$; $p = 0,3529$), Der p 2 ($r = -0,1074$; $p = 0,6173$) e Der f 1 ($r = -0,3229$; $p = 0,1238$) (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente). De forma semelhante, no grupo não atópico (NA), níveis de IgE sérica específica aos mesmos alérgenos e o índice de exposição não mostraram qualquer correlação para Der p 1 ($r = -0,0173$; $p = 0,9332$), Der p 2 ($r = 0,0349$; $p = 0,8654$) e Der f 1 ($r = -0,066$; $p = 0,7486$) (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente).

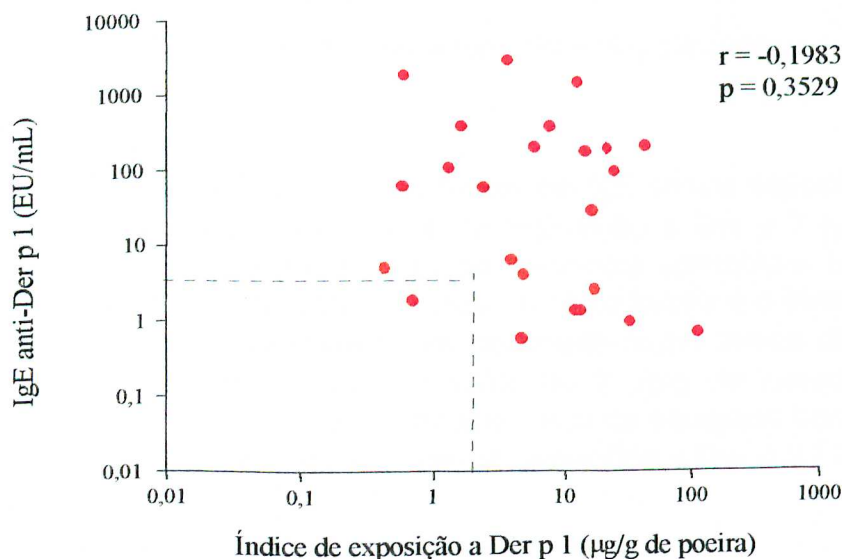


Figura 15 - Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 1, expressos em EU/mL, e o índice de exposição a Der p 1 ($\mu\text{g/g}$ de poeira) determinado em cada residência de pacientes asmáticos SPT⁺. Extratos de amostras de poeira foram obtidos de cinco locais e o maior valor de Der p 1 na poeira de cada casa foi determinado como índice de exposição. A linha tracejada vertical indica o valor de 2 $\mu\text{g/g}$ de poeira, considerado como fator de risco para sensibilização. A linha tracejada horizontal indica o limite de sensibilidade para IgE sérica específica a Der p 1 (3,9 EU/mL).

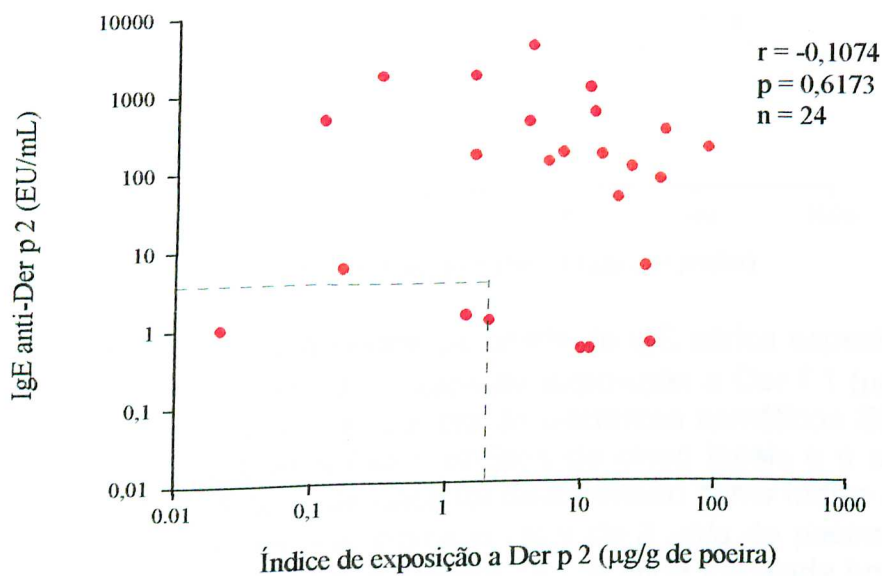


Figura 16 - Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der p 2, expressos em EU/mL, e o índice de exposição a Der p 2 ($\mu\text{g/g}$ de poeira) determinado em cada residência de pacientes asmáticos SPT⁺. Extratos de amostras de poeira foram obtidos de cinco locais e o maior valor de Der p 2 na poeira de cada casa foi determinado como índice de exposição. A linha tracejada vertical indica o valor de 2 $\mu\text{g/g}$ de poeira, considerado como fator de risco para sensibilização. A linha tracejada horizontal indica o limite de sensibilidade para IgE sérica específica a Der p 2 (3,9 EU/mL).

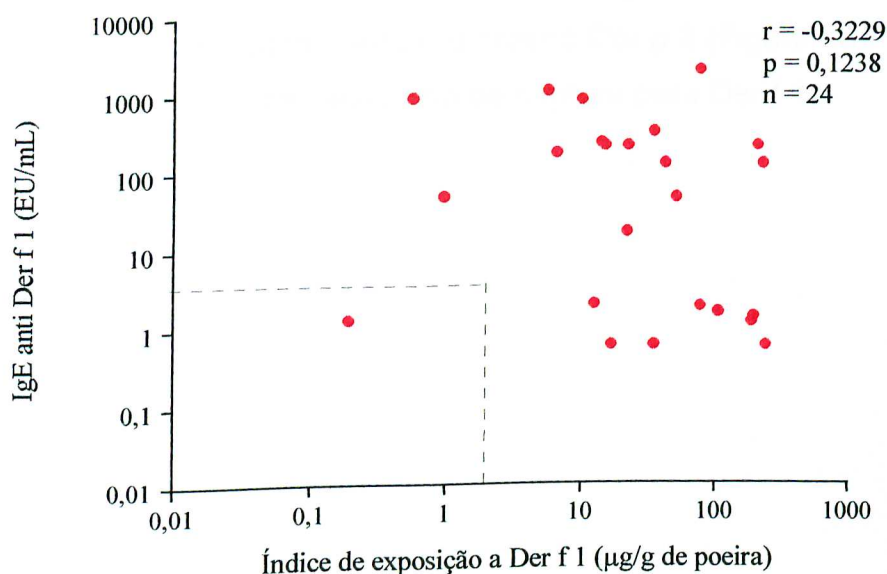


Figura 17 - Correlação entre os níveis de IgE sérica específica a Der f 1, expressos em EU/mL, e o índice de exposição a Der f 1 ($\mu\text{g/g}$ de poeira) determinado em cada residência de pacientes asmáticos SPT⁺. Extratos de amostras de poeira foram obtidos de cinco locais e o maior valor de Der f 1 na poeira de cada casa foi determinado como índice de exposição. A linha tracejada vertical indica o valor de 2 $\mu\text{g/g}$ de poeira, considerado como fator de risco para sensibilização. A linha tracejada horizontal indica o limite de sensibilidade para IgE sérica específica a Der f 1 (3,9 EU/mL).

4.9. Reatividade dos testes ELISA na determinação dos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1

Como demonstrado na Figura 18, observou-se que houve reatividade entre os ELISAs para determinação dos níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2. Nos ensaios para determinação de Der p 1, utilizando o clone 5H8 como anticorpo de captura para Der p 1, houve intensa reatividade com o alérgeno de referência padrão Der p 2 (Figura 18 A; $p > 0,05$), sendo que a curva padrão desse último foi ligeiramente superior à de Der p 1. Da mesma forma, no ensaio para determinação de Der p 2, utilizando o clone 1D8 como anticorpo de captura para Der p 2, reatividade foi observada com o alérgeno de referência padrão Der p 1 (Figura 18 C; $p > 0,05$) e discretamente com Der f 1 a partir da concentração de 62,5 ng/mL (Figura 18 D; $p > 0,05$).

Não houve reatividade entre os ensaios ELISAs na determinação dos alérgenos de Der f 1, tanto para o alérgeno de referência Der p 1 (Figura 18 E; $p < 0,05$) quanto para o alérgeno Der p 2 (Figura 18 F; $p < 0,05$) utilizando o clone 6A8 como anticorpo de captura para Der f 1.

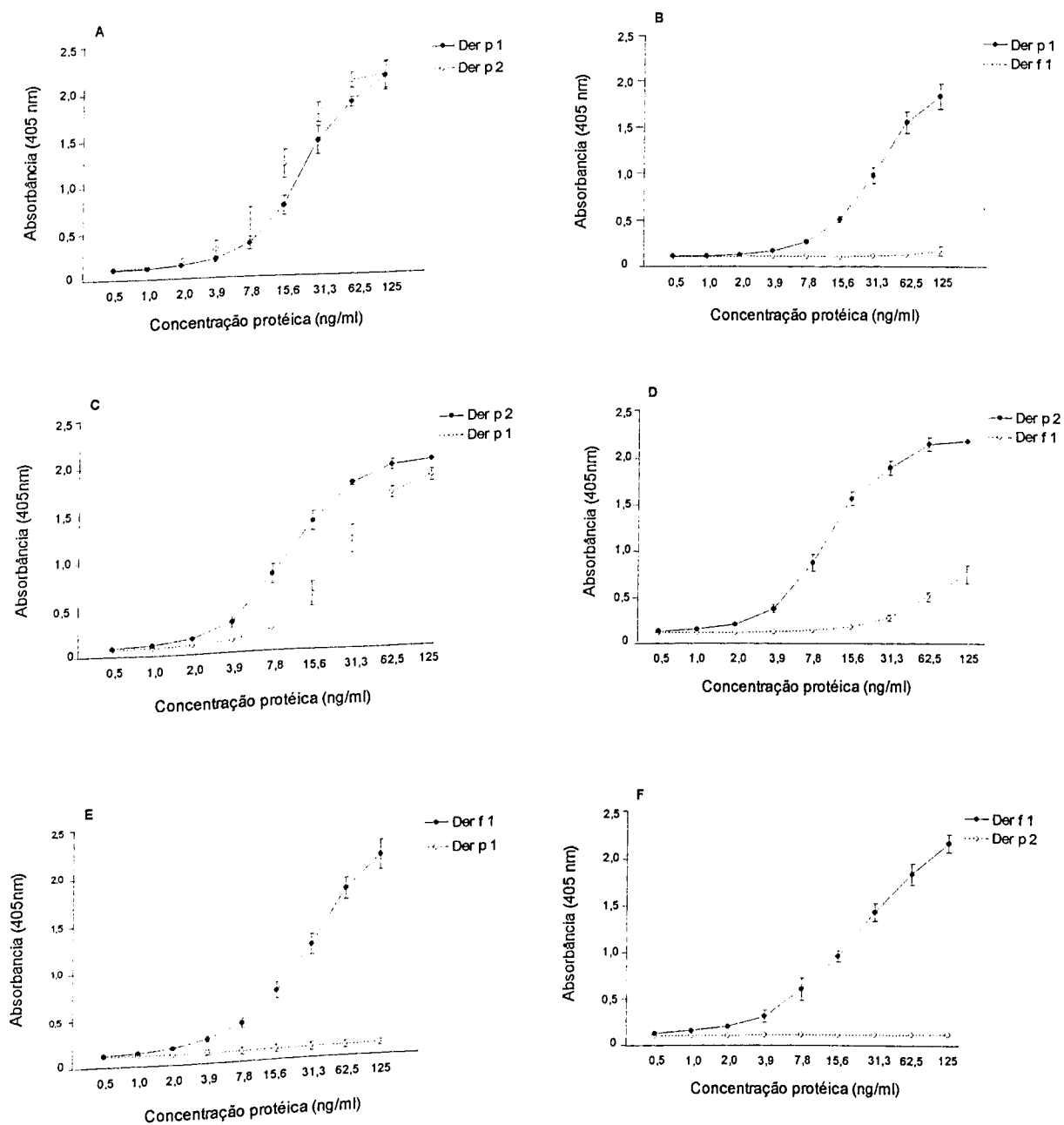


Figura 18 – Curvas padrões de ELISA para a determinação de reatividade entre os alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1. (●) curva dos alérgenos de referência específicos para cada teste; (○) curva dos alérgenos de referência de reatividade para cada teste. (A) e (B) Ac captura: anti-Der p 1 (clone 5H8) e Ac detecção: anti-grupo 1 (clone 4C1). (C) e (D) Ac captura: anti-Der p 2 (clone 1D8) e Ac detecção: anti-grupo 2 (clone 7A1). (E) e (F) Ac captura: anti-Der f 1 (clone 6A8) e Ac detecção: anti-grupo 1 (clone 4C1). As curvas representam três ensaios realizados independentemente. Regressão linear foi realizada para estimar os *slopes* das curvas. Diferenças entre os *slopes* foi determinada pelo teste estatístico Z. Diferenças não significativas ($p > 0,05$) entre os *slopes* das curvas foram consideradas como.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, optou-se por estudar os alérgenos de ácaros mais prevalentes na poeira domiciliar (SPORIK *et al.*, 1990), uma vez que constituem os mais importantes fatores de risco para pacientes asmáticos (POLLART *et al.*, 1989; SPORIK *et al.*, 1990). Conseqüentemente, determinou-se a sensibilização e exposição de pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA) aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 em nossa região.

Estudos semelhantes têm sido realizados em outras regiões de nosso país, como São Paulo (ARRUDA *et al.*, 1991), Recife (SARINHO *et al.*, 1996), Rio de Janeiro (GELLER *et al.*, 1993), Salvador (SERRAVALLE & MEDEIROS Jr., 1999) e Campinas (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Entretanto, os resultados obtidos quanto à prevalência da sensibilização e exposição aos diferentes alérgenos de ácaros na cidade de Uberlândia, proporcionam informações úteis para os participantes do estudo e possibilitam direcionar mais efetivamente medidas diagnósticas, terapêuticas e principalmente preventivas no manejo das doenças alérgicas.

Testes epicutâneos de punctura são fáceis, rápidos, pouco dolorosos e de baixo custo (OWNBY, 1988), sendo por esses motivos muito usados no diagnóstico de alergia na asma e outras doenças alérgicas.

Devido a relatos anteriores sobre a maior prevalência do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* na poeira domiciliar, adotou-se usar o extrato bruto de *D. pteronyssinus* para investigar a reatividade cutânea a este ácaro, com a finalidade de selecionar os pacientes asmáticos.

O critério de positividade adotado no teste de punctura é variável. Muitos estudos adotam como resultados positivos, valores de diâmetros médios de pápula ≥ 3 mm em relação ao controle negativo (dilúente dos extratos) (TUNNICLIFFE *et al.*, 1999; CHAN-YEUNG *et al.*, 1995). Valores ≥ 4 mm em relação ao controle negativo (SPORIK *et al.*, 1995) e $\geq 5 \times 5$ mm (ARRUDA *et al.*, 1991) também são relatados. Entretanto, adotou-se nesse

estudo como critério de positividade, uma pápula $\geq 4,0$ mm, obtida pela média de dois diâmetros perpendiculares semelhante à considerada por HEYMANN *et al.* (1989) e SQUILLACE *et al.* (1997).

Conseguiu-se assim, identificar entre os pacientes com diagnóstico clínico de asma ($n = 89$), dois grupos de acordo com a positividade ao teste de punctura ao extrato de Dpt. Um grupo composto de indivíduos que reagiram positivamente (grupo SPT⁺, $n = 48$) e outro que não reagiu (grupo SPT⁻, $n = 41$).

Obteve-se 54% de positividade no teste de punctura ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dpt) entre os 89 pacientes asmáticos iniciais. Esse valor foi próximo ao encontrado por GELLER *et al.* (1993) na cidade do Rio de Janeiro, RJ (59%) e ao obtido por MEDEIROS Jr. (1997) na cidade de Salvador, BA (62,7%), ambos estudando a sensibilização a aeroalérgenos em indivíduos portadores de asma e/ou rinite. De forma semelhante, estudos em indivíduos com alergia respiratória e asma desenvolvidos na Califórnia (GALANT *et al.*, 1998) e em Chicago (SARPONG & KARRISON, 1998), EUA, revelaram, respectivamente, 53% e 55% de indivíduos positivos no teste de punctura a Dpt. Deve-se ressaltar, entretanto, que os critérios de positividade (medida da pápula) adotados nestes estudos variaram de ≥ 3 mm (MEDEIROS Jr., 1997) a ≥ 5 mm (SARPONG & KARRISON, 1998).

Em relação aos resultados dos testes cutâneos, como a maioria dos asmáticos SPT⁺ (78%) apresentou grau de reatividade cutânea ≥ 2 (pápula ≥ 6 mm), pode-se afirmar que os pacientes asmáticos, quando eram positivos, apresentaram reações cutâneas que não deixavam dúvidas quanto a sua positividade.

A alta frequência de resultados negativos (46%) nos pacientes asmáticos, nesse estudo, pode ser devido principalmente à hiporreatividade cutânea ao extrato testado (verdadeiros negativos) ou mesmo pela seleção dos pacientes asmáticos ter sido realizada a partir de prontuários de um hospital geral de atendimento primário (Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia).

Estando os grupos de pacientes asmáticos (SPT⁺ e SPT⁻) e indivíduos não atópicos (NA) selecionados e definidos, os níveis de IgE sérica total foram determinados. Como esperado, a média do nível de IgE total no grupo de asmáticos SPT⁺ (375,2 IU/mL) foi maior do que as médias dos grupos SPT⁻ (141,3 IU/mL) e NA (23,1 IU/mL). A maioria dos indivíduos SPT⁺ (75%) e SPT⁻ (53,7%) apresentou níveis ≥ 100 IU/mL em contrapartida ao grupo NA, onde todos os indivíduos apresentaram níveis < 100 IU/mL, demonstrando que a média de IgE sérica total esteve alta nos grupos de asmáticos.

Valores elevados de IgE sérica total também foram determinados em grupos de atópicos em vários estudos. GELBER *et al.* (1993) obtiveram valores maiores de IgE sérica total em crianças, no grupo asmático (média geométrica 160 IU/mL) do que no grupo controle (44 IU/mL). ARRUDA *et al.* (1991) relataram que níveis de IgE sérica total > 400 IU/mL foram encontrados em 18 das 20 crianças asmáticas por eles estudadas.

Embora o mensuramento de IgE sérica total não seja um dado para o diagnóstico definitivo de atopia, pois muitos pacientes alérgicos podem apresentar níveis de IgE total dentro dos limites de normalidade, sua determinação no presente estudo foi realizada com o objetivo único de avaliar o perfil de alergia na população estudada. A IgE total, neste estudo, comportou-se como um marcador auxiliar no diagnóstico de alergia em pacientes asmáticos, uma vez que a média geométrica nos grupos SPT⁺ e SPT⁻ foi significativamente superior quando comparada ao grupo NA.

Numa fase seguinte, os indivíduos participantes foram avaliados quanto à sensibilização aos alérgenos de ácaros Der p 1, Der p 2 e Der f 1 do gênero *Dermatophagoides*.

Diferentes indicadores de sensibilização têm sido adotados. Segundo TUNNICLIFFE *et al.* (1999), sensibilidade a um determinado alérgeno pode ser definida como a presença de teste de punctura positivo para aquele alérgeno. A sensibilização aos alérgenos domiciliares mais comuns, segundo PLATTS-MILLS (1996), pode ser estabelecida por teste cutâneo (usando como critério de positividade no teste de punctura um diâmetro de

pápula ≥ 4 mm) ou por ensaios para a determinação de anticorpos séricos IgE usando teste RAST. DREBORG (1993) adotaram a positividade ao teste RAST como indicador de sensibilização. Por outro lado, MASTRANDREA *et al.* (1997) avaliaram a resposta de IgE sérica a *D. pteronyssinus* por ELISA bem como PENG *et al.* (1998) determinaram níveis de IgE específica a Der f 1 por ELISA de captura.

Nesse trabalho, a sensibilização aos alérgenos de ácaros foi avaliada pela determinação dos níveis de IgE sérica específica a Der p 1, Der p 2 e Der f 1 através do teste ELISA reverso.

Vários estudos, na detecção de IgE sérica específica a diversos alérgenos através de RAST, utilizaram como padrão um *pool* de soros com concentração conhecida de IgE específica a *D. farinae* (ARRUDA *et al.*, 1991; RIZZO *et al.*, 1993; ROSE *et al.*, 1996). No presente estudo, no teste ELISA reverso, também utilizou-se como padrão uma amostra de referência com concentração de IgE específica a Der f 1 sub-padronizada a partir do teste RAST.

O grupo de pacientes asmáticos SPT⁺ apresentou altos níveis de IgE específica a Der p 1, Der p 2 e Der f 1 (24,7 EU/mL, 28,4 EU/mL e 19,7 EU/mL, respectivamente) quando comparado aos grupos SPT⁻ (0,9 EU/mL, 0,6 EU/mL e 0,8 EU/mL, respectivamente) e NA (0,8 EU/mL, 0,6 EU/mL e 0,7 EU/mL, respectivamente). Níveis elevados de IgE sérica específica a *D. pteronyssinus* (1588 RU/mL) foram também encontrados por ARRUDA *et al.* (1991), sendo que 19 das 20 crianças asmáticas estudadas na cidade de São Paulo, apresentaram níveis > 200 RU/mL de IgE específica a *D. pteronyssinus*. Entretanto, níveis de IgE específica a *D. farinae* foram de 2 a 3 vezes inferiores. RIZZO *et al.* (1993), também na cidade de São Paulo, detectaram níveis elevados de IgE específica a *D. pteronyssinus* (1549 RU/mL) e a *D. farinae* (447 RU/mL), sendo que 19/20 e 16/20 das crianças asmáticas estudadas apresentaram níveis > 200 RU/mL, respectivamente a Dpt e a *D. farinae*.

A sensibilização ($\geq 3,9$ EU/mL de IgE sérica específica) dos pacientes asmáticos SPT⁺ aos alérgenos Der p 1 (68,8%), Der p 2 (68,8%) e Der f 1

(60,4%), mostrou ser semelhante entre os respectivos alérgenos. De forma contrária, a grande maioria dos asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA) não apresentou níveis de IgE sérica específica aos referidos alérgenos (< 3,9 EU/mL). Quando se analisa o perfil de sensibilização dos indivíduos dos três grupos, a maioria (52,1%, 56,3% e 52,1%) dos pacientes asmáticos SPT⁺ apresentou níveis de IgE respectivamente para Der p 1, Der p 2 e Der f 1 na classe ≥ 2 ($\geq 19,5$ EU/mL), considerados como positivos moderado a intenso. Por outro lado, os indivíduos dos outros dois grupos (SPT⁻ e NA), que apresentaram níveis de IgE aos respectivos alérgenos foram incluídos somente na classe 1 (3,9 a < 19,5 EU/mL), ou seja, positivos fracos. Similarmente, anticorpos IgE específicos a alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* não foram encontrados ou detectados em baixos níveis no grupo controle (RIZZO *et al.*, 1993).

PENG *et al.* (1998) encontraram somente 30% de sensibilização para Der f 1 no grupo de asmáticos SPT⁺ a *D. farinae*, utilizando ELISA de captura específico para Der f 1. Entretanto, 21% dos asmáticos SPT⁻ apresentaram IgE específica a este alérgeno. Em nosso estudo, a sensibilização a alérgenos de Der f 1 (60,4%) somente foi importante no grupo de pacientes asmáticos SPT⁺, sendo que asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA) não apresentaram-se sensibilizados a este alérgeno.

Ao contrário, ARRUDA *et al.* (1991), através do teste RAST, mostraram que a sensibilização a Der p 1 foi mais importante do que para Der f 1. Diferenças significantes entre grupo de pacientes asmáticos e não atópicos (NA) não atópicos para vários alérgenos, incluindo *D. pteronyssinus*, através de RAST, foram relatadas por NELSON *et al.* (1996).

A sensibilização a ácaros tem sido considerada a associação mais importante com a asma, aparentemente contribuindo entre 65 a 90% dos casos de crianças e adultos jovens (PLATTS-MILLS *et al.*, 1995a). Contudo, no presente estudo, observou-se sensibilização aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 de aproximadamente 38%, 37% e 34%, respectivamente, entre pacientes asmáticos pelo ELISA reverso.

Embora não seja possível provar que a relação entre sensibilização a alérgenos domiciliares e asma seja causal, grandes evidências sugerem que a exposição a estes alérgenos é a principal causa de asma (GELBER *et al.*, 1993).

Apesar de vários estudos terem relatado os ácaros *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* como os mais importantes agentes sensibilizantes e prevalentes no Brasil (ARRUDA *et al.*, 1991; GELLER *et al.*, 1993; GELLER *et al.*, 1995; SARINHO *et al.*, 1996), em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, não se detectou níveis mensuráveis do alérgeno Blo t 5 de *B. tropicalis*. Daí, optou-se por estudar os alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) e *D. farinae* (Der f 1).

Nesse estudo, o teste ELISA para detecção dos níveis dos alérgenos de ácaros possibilitou a análise de um grande número de amostras de poeira de uma forma simples, eficiente e padronizada. Com a metodologia empregada, conseguiu-se detectar, além dos alérgenos Der p 1 e Der p 2, surpreendentemente níveis importantes do alérgeno Der f 1 nas amostras de poeira, tanto da residência de pacientes asmáticos como de indivíduos não atópicos (NA).

Analisando a média geométrica dos valores de Der p 1, Der p 2 e Der f 1 obtidos nas residências estudadas, observou-se uma maior concentração de alérgenos na cama, tanto de pacientes asmáticos como de indivíduos não atópicos (NA), quando comparada às dos outros locais. Assim, níveis semelhantes de Der p 1 e Der p 2 (mg 3,0 $\mu\text{g/g}$ e 3,6 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) e níveis significativamente superiores de Der f 1 (mg 17,1 $\mu\text{g/g}$) foram encontrados. Contudo, em indivíduos não atópicos (NA), níveis ≥ 2 μg de alérgeno/g de poeira só foram detectados para o alérgeno Der f 1 (4,5 $\mu\text{g/g}$).

Similarmente, na cidade de São Paulo, os maiores níveis de Der p 1 e alérgenos do grupo 2 foram encontrados nas amostras de poeira obtidas da cama de crianças asmáticas (ARRUDA *et al.*, 1991), porém em níveis muito superiores (38,4 μg e 36,6 μg de poeira, respectivamente) aos obtidos nesse estudo (3,0 $\mu\text{g/g}$ e 3,6 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). Em um estudo

posterior, em São Paulo, RIZZO *et al.* (1993) também relataram os mais altos níveis de Der p 1 em amostras de poeira das camas de pacientes asmáticos (22 $\mu\text{g/g}$) e de indivíduos não atópicos (NA) (16,4 $\mu\text{g/g}$) quando comparado a outros ambientes. Entretanto, Der f 1 não foi encontrado por aqueles autores ou detectado em baixos níveis (< 0,5 $\mu\text{g/g}$ de poeira) contrariamente aos nossos achados (17,1 $\mu\text{g/g}$ de poeira).

A cama foi também constatada ser o local de maior nível de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar em estudos realizados no Reino Unido (SPORIK *et al.*, 1990), Charlottesville, EUA (POLLART *et al.*, 1991), Latrobe Valley, Austrália (GARRET *et al.*, 1998), Nova Zelândia (SIEBERS *et al.*, 1998), entre outros.

Na presente investigação, a cama mostrou ser o local com maior nível de alérgenos de Der p 1, Der p 2 e Der f 1, quando comparado aos outros ambientes e mobília das residências, como o sofá, chão da sala, chão do quarto e cozinha. O segundo local com maiores níveis de alérgenos de ácaros foi o sofá, porém esses valores, em média, não foram altos. O maior valor médio encontrado foi quanto ao alérgeno Der f 1 no sofá de indivíduos não atópicos (NA) (1,7 $\mu\text{g/g}$ de poeira).

Entretanto, diferentes locais das residências em outros estudos foram determinados como os mais importantes. Níveis consideráveis de alérgenos de ácaros foram encontrados também no chão do quarto por MARTIN *et al.* (1997). Os autores relataram que 80% das amostras do chão do quarto (14,68 $\mu\text{g/g}$) e 77% das amostras da cama (5,92 $\mu\text{g/g}$) apresentaram níveis > 2 μg de Der p 1/g de poeira. O sofá foi o local com maior concentração de Der p 1 em estudo desenvolvido na Flórida, EUA (NELSON *et al.*, 1996), tanto na casa de crianças asmáticas como na de indivíduos não atópicos (NA), superando os níveis desse alérgeno no carpete do quarto, sala de visitas e no colchão.

Enquanto que para Der f 1, aproximadamente 87% e 84% das residências de asmáticos e não atópicos (NA), respectivamente, apresentaram índice de exposição em níveis ≥ 2 $\mu\text{g/g}$ de poeira, cerca de

75% e 23% das residências de pacientes asmáticos e não atópicos (NA), respectivamente, apresentaram tais níveis para ambos, Der p 1 e Der p 2. Portanto, a alta prevalência de Der f 1, tanto nas casas de pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA), aliada ao fato de que a média geométrica dos níveis de Der f 1 foi superior as médias de Der p 1 e Der p 2, indica que Der f 1 seja o alérgeno mais amplamente distribuído nas amostras de poeira coletadas das residências de Uberlândia.

Contudo, estudos prévios demonstraram que *D. farinae* não era uma espécie prevalente (SARINHO *et al.*, 1996; SERRAVALLE & MEDEIROS Jr., 1999; OLIVEIRA *et al.*, 1999) quando comparado a *D. pteronyssinus* nas residências brasileiras. À semelhança de outras regiões brasileiras, a partir de observação microscópica, *D. pteronyssinus* foi o ácaro predominante no Recife (SARINHO *et al.*, 1996), cidade tropical com condições de umidade relativa ideais para a proliferação de ácaros domésticos. Recentemente, na cidade de Campinas (SP), OLIVEIRA *et al.* (1999) mostraram em amostras de poeira de colchões que *D. pteronyssinus* foi o ácaro mais prevalente (94% dos ácaros encontrados), sendo que a espécie *D. farinae* respondeu por somente 7,5% dos ácaros nessa região. Semelhantemente, SERRAVALLE & MEDEIROS Jr. (1999), também por identificação microscópica, demonstraram que *D. pteronyssinus* foi a espécie mais prevalente (70%) nas amostras de poeira de residências da cidade de Salvador (BA) e *D. farinae* esteve presente em apenas 8% das amostras analisadas.

No Rio de Janeiro, GELLER *et al.* (1995) a partir da contagem de ácaros, encontraram várias espécies, sendo *D. pteronyssinus* a mais prevalente (55%). Curiosamente, 25% das amostras do assoalho de quartos de pacientes portadores de asma ou rinite por eles analisadas apresentaram ausência de ácaros e, concentrações de Der p 1 e Der f 1 abaixo de 2 µg/g de poeira foram detectadas em mais de 90% das análises efetuadas. Segundo os autores, a reduzida carga antigênica acarina nas amostras testadas seria reflexo de que medidas preventivas de controle ambiental estariam sendo aplicadas. Contudo, em Uberlândia, alérgenos de *D. farinae* foram os mais prevalentes, sendo que o chão do quarto, em média, não

apresentou níveis de alérgenos de ácaros $\geq 2 \mu\text{g/g}$ de poeira nas residências de ambos os grupos, mostrando que o chão do quarto não é um local importante para a determinação da exposição alérgica pelo menos em nosso país.

D. pteronyssinus e *D. farinae* são as espécies de ácaros domiciliares mais predominantes nos EUA, sendo sua prevalência relativa. Nos estados do sul, quentes e úmidos, geralmente encontra-se mais *D. pteronyssinus*, e nos estados centrais e do nordeste dos EUA, mais *D. farinae* (ROSE *et al.*, 1996). Não só nos EUA mas também no Reino Unido, o ácaro predominante é *D. pteronyssinus* (SPORIK *et al.*, 1990).

Por outro lado, WOOD *et al.* (1988) relataram que *D. farinae* e *D. pteronyssinus* apresentaram uma ampla distribuição nos lares de Baltimore, EUA. Apesar dos níveis de Der f 1 e Der p 1 não terem sido altos (360 ng/g e 150 ng/g de poeira), estiveram presentes respectivamente, em 95% e 88% das amostras analisadas.

Ao contrário de ARRUDA *et al.* (1991) e RIZZO *et al.* (1993), Der f 1 mostrou ser mais importante, quanto à concentração, que os alérgenos de *D. pteronyssinus* investigados no presente estudo, na cidade de Uberlândia. Desta forma, a partir destas diferenças observadas entre a prevalência das duas espécies de ácaros da poeira entre diferentes cidades brasileiras, enfatiza-se a importância de estudos sobre exposição a ácaros não só em diferentes regiões mas também em diferentes épocas, uma vez que a fauna acarina poderá estar sujeita a mudanças.

É amplamente aceito que flutuações sazonais no clima podem estar associadas às variações nos níveis dos alérgenos e na estabilidade da concentração dos reservatórios de alérgenos de ácaros (MAHMIC & TOVEY, 1998). Os altos níveis de Der p 1 encontrados nos estudos anteriores, provavelmente, refletem o fato que a umidade relativa do ar em São Paulo (70-80% ao ano) e a temperatura (20-25°C) estabelecem condições favoráveis para o crescimento de ácaros. Comparada com a cidade de São Paulo, Uberlândia apresenta condições de umidade do ar menos propícias para o desenvolvimento, possivelmente, refletindo nos menores níveis dos

alérgenos observados. Aliado à isso, existe grande variação nos níveis dos alérgenos entre casas dentro de uma mesma região, provavelmente devido às características particulares de cada residência (GARRET *et al.*, 1998), afetando a umidade e conseqüentemente o crescimento dos ácaros.

As diferenças entre os níveis de alérgenos de ácaros determinados nas amostras de poeira das residências podem ser ainda explicadas pelos mesmos serem dependentes de vários fatores ambientais. Como já relatado, o destaque maior é para a temperatura e a umidade relativa do ar (DUFF & PLATTS-MILLS *et al.*, 1992). Porém, outros fatores ambientais são importantes como a movimentação das partículas alergênicas (SAKAGUCHI *et al.*, 1989), idade das casas (MAHMIC & TOVEY 1998), a ventilação e atividade humana ou animal na casa (SAKAGUCHI *et al.*, 1993), travesseiros sintéticos, bem como o tempo de uso deles e de colchões (RAINS *et al.*, 1999), entre outros.

Devido a esses fatores serem numerosos, e talvez alguns sejam ainda completamente desconhecidos, estudos avaliando seus papéis na asma são restritos pela dificuldade em padronização das amostras. Nesse estudo, avaliou-se a existência ou não de correlação entre os níveis de IgE sérica específica e os níveis dos alérgenos de ácaros na poeira das residências, não levando em consideração estes fatores responsáveis pela variação nos níveis dos alérgenos domiciliares.

Estimativas do comportamento humano nos EUA sugerem que a maioria da população permanece cerca de 23 horas por dia em ambientes fechados ou em meios de transporte (PLATTS-MILLS, 1996). Levando em consideração que a cama é um dos locais em que mais se permanece, aliado ao íntimo contato e por ser o local mais prevalente quanto a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, atenção especial deve ser direcionada às proteínas estranhas que nela se acumulam. Isso leva a crer que medidas que visem controlar ou reduzir os níveis de exposição a alérgenos de ácaros devam iniciar-se ou focalizar-se na cama. Entretanto, cada caso em particular deve ser avaliado.

Estudos têm mostrado que locais públicos como hospitais, escritórios, cinemas e escolas têm menores níveis de concentração de alérgeno do que nas casas. Isso se deve ao nível de ocupação, uso de ar condicionado e frequência de limpeza (GREEN *et al.*, 1992). Contudo, esses locais podem apresentar níveis de alérgenos suficientes para sensibilizar indivíduos geneticamente predispostos.

Uma vez que diferentes alérgenos são importantes em diversas comunidades, parece claro que deva existir um nível no qual a sensibilização seja improvável de ocorrer. PLATTS-MILLS & DE WECK (1989) propuseram níveis $\geq 2 \mu\text{g}$ e $\geq 10 \mu\text{g}$ de alérgenos do grupo 1 de *Dermatophagoides* / g de poeira, como fatores de risco para sensibilização e exacerbação dos sintomas de asma, respectivamente, em indivíduos predispostos e alérgicos a ácaros. A importância desses níveis foi reforçada em outros estudos (SPORIK *et al.*, 1990; ARRUDA *et al.*, 1991). Contudo, existe uma minoria de indivíduos alérgicos que requer menor ou maior exposição. Portanto, níveis de alérgenos $\geq 2\mu\text{g/g}$ de poeira e, principalmente, $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira devem ser melhor considerados como uma concentração acima da qual a "maioria" dos indivíduos alérgicos a ácaros desenvolverão sintomas (PLATTS-MILLS *et al.*, 1995b).

A grande maioria das residências de pacientes asmáticos SPT ⁺, apresentou índice de exposição alergênica para Der p 1 (75%), Der p 2 (70,8%) e Der f 1 (87,5%) em níveis $\geq 2 \mu\text{g/g}$ de poeira (fator de risco para sensibilização). Já as residências de indivíduos não atópicos (NA) apresentaram menores índices de exposição (23,1%) para Der p 1 e Der p 2, porém altos índices (84,6%) para Der f 1, considerando o mesmo fator de risco.

Entre as residências de pacientes asmáticos SPT ⁺, a maioria apresentou índice de exposição alergênica para Der p 1 (50%), Der p 2 (45,8%) e Der f 1 (75%) em níveis $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira (fator de risco para exacerbação dos sintomas de asma). Já as residências de indivíduos não atópicos (NA) apresentaram menores índices de exposição (0%, 0% e

23,1%) para Der p 1, Der p 2 e Der f 1, respectivamente, considerando o mesmo fator de risco.

Os indivíduos mais expostos foram justamente os pacientes asmáticos. Possivelmente, esses indivíduos ou não foram orientados quanto às medidas de controle de exposição ambiental ou não estavam aplicando-as. Fato intrigante é que os indivíduos não atópicos (NA) não foram orientados para essas medidas e, mesmo assim, apresentaram níveis menores dos alérgenos Der p 1 e Der p 2, principalmente na cama. Vale porém ressaltar que o grupo não atópico consistiu de indivíduos com índice de escolaridade e nível sócio-econômico superior ao grupo de asmáticos. Adicionalmente, as residências de pacientes asmáticos estavam localizadas predominantemente na periferia da cidade ao contrário das residências do grupo não atópico que estavam localizadas mais na zona central. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório comparando os níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 em amostras de poeira pareadas, isto é, coletadas de casas dos pacientes asmáticos deste estudo e de indivíduos não atópicos porém residentes num raio de 200 metros, mostraram nenhuma diferença significativa entre os níveis destes alérgenos (dados não publicados). Portanto, níveis de Der p 1 e Der p 2 mostraram variações em diferentes localizações (zona periférica e central) de Uberlândia.

Analisando a correlação positiva entre os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 e a reatividade cutânea ao extrato bruto de *D. pteronyssinus* (Dpt) no grupo SPT⁺, observou-se que o ELISA reverso pode ser um teste sensível e útil na determinação da sensibilização de pacientes asmáticos aos referidos alérgenos.

Por outro lado, nenhuma correlação foi observada entre os níveis de IgE sérica específica e índices de exposição alérgica para Der p 1, Der p 2 e Der f 1. RIZZO *et al.* (1993) também não encontraram correlação entre os níveis de IgE sérica específica e a quantidade de Der p 1; mas afirmaram que não somente a exposição a altos níveis de alérgenos de ácaros da poeira, como também a predisposição genética promoveriam produção de IgE essencial para a sensibilização.

Adicionalmente, segundo GELBER *et al.* (1993), a exposição não é o principal fator de risco para a asma. Outros fatores como poluição atmosférica, dieta, infecções virais agudas (SARPONG & KARRISON, 1998) teriam papel importante na asma.

Entretanto, efetivas técnicas de redução da exposição aos aeroalérgenos pode não somente reduzir a severidade da asma já estabelecida, mas também têm o potencial de prevenir o desenvolvimento da doença em indivíduos pela primeira vez expostos (SARPONG & KARRISON, 1998). Isso foi reforçado por PLATTS-MILLS *et al.* (1982) que mostraram que uma redução > 95% na exposição alérgica pode levar à redução de sintomas de hiperreatividade brônquica.

Dessa forma, estudos semelhantes objetivando a determinação dos alérgenos na residência de pacientes asmáticos podem contribuir para a indicação de medidas efetivas, visando a redução dos alérgenos de ácaros nas residências.

A especificidade da determinação dos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 foi avaliada por ensaios de reatividade. Surpreendentemente, ensaios para a detecção de Der p 1 reagiram com Der p 2, porém não com Der f 1. Similarmente, ensaios para a detecção de Der p 2 reagiram com Der p 1, mas discretamente com Der f 1. Entretanto, os ensaios para detecção de Der f 1 não reagiram nem com Der p 1 e nem com Der p 2, mostrando serem altamente específicos.

Relatos de 80% de identidade entre a sequência de aminoácidos de Der p 1 e Der f 1 já haviam sido documentados (DILWORTH *et al.*, 1991). Porém, segundo CHAPMAN *et al.* (1987) anticorpos monoclonais usados nos testes imunoenzimáticos para detecção de alérgenos do grupo 1 (Der f 1 ou Der p 1) são espécie-específicos.

Quanto aos ensaios para determinação de Der p 2, devido à reatividade com Der p 1 e em menor grau com Der f 1, os resultados obtidos poderiam ser melhor analisados para a pesquisa de alérgenos do gênero *Dermatophagoides* e não de suas frações alérgicas isoladas.

Similarmente, análises imunoquímicas de Der p 2 e Der f 2 realizadas por HEYMANN *et al.* (1989) estabeleceram que estes alérgenos são estrutural e antigênicamente semelhantes, podendo assim serem reconhecidos como o segundo grupo de alérgenos de ácaros (grupo 2). Segundo os autores, devido à completa reatividade entre os anticorpos anti-Der p 2 e anti-Der f 2, ensaios para a determinação de alérgenos do grupo 2 podem ser mais úteis para monitorar a exposição alérgica de ácaros do gênero *Dermatophagoides*. OVSYANNIKOVA *et al.* (1994) observaram 70% de inibição cruzada entre os anticorpos monoclonais (clones 7A1 e 1D8), ambos anti-grupo 2, o que sugere serem eles direcionados contra o mesmo epítipo.

No entanto, a comparação das sequências de aminoácidos nas porções N-terminais de Der f 1 e Der f 2 mostrou que eles são estruturalmente distintos (HAKKAART *et al.*, 1998). Desta forma, um teste para detecção de Der f 1 não detectaria Der f 2.

Apesar da reatividade entre os anticorpos dos grupos 1 e 2 (Der p 1 e Der p 2) verificada nesse estudo, testes imunoenzimáticos para a determinação de alérgenos de *Dermatophagoides* são preferidos à contagem microscópica dos ácaros que consomem muito tempo e necessitam de detalhado conhecimento da morfologia dos ácaros.

Desta forma, a avaliação da exposição ao grupo 1 de alérgenos de *D. pteronyssinus* poderia ser realizada através de ensaios para a determinação de Der p 1 e preferencialmente para Der f 1, nos locais onde esta espécie está presente. Casos individuais onde se deseja estudar isoladamente a exposição para Der p 1 empregando esse mesmo ensaio, devem ser realizados com ressalvas, já que a determinação de Der p 1 nessa investigação mostrou não ser específica.

Similarmente, testes imunoenzimáticos para a determinação dos alérgenos Der p 2, devido à sua reatividade (com Der f 2), devem ser avaliados como exposição a alérgenos preferencialmente do grupo 2, por que não são espécie e grupo-específicos.

Por outro lado, ensaio para detecção do alérgeno Der f 1 não reagiu com os alérgenos Der p 1 e Der p 2. Desta forma, este ensaio mostrou ser útil na determinação da real prevalência de *D. farinae* dentro da fauna acarina brasileira.

Apesar do conhecimento da existência de reatividade na ligação dos anticorpos IgE entre os alérgenos Der p 1 e Der f 1 (HEYMANN *et al.*, 1986), os altos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e particularmente Der f 1 nas amostras de poeira analisadas mostraram que os ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são importantes na sensibilização e exposição de pacientes asmáticos residentes na cidade de Uberlândia. Estes resultados permitem concluir que deve-se estabelecer a necessidade ou não de se incluir novos extratos de ácaros na bateria de testes cutâneos utilizados na avaliação do paciente com suspeita de alergia respiratória, conforme a fauna acarina regional. Consequentemente, medidas de controle ambiental para redução de ácaros devem ser instituídas, como parte importante da estratégia global de tratamento do paciente alérgico.

6. CONCLUSÕES

- 1) Os altos níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 nas amostras de soro analisadas mostraram que a sensibilização a estes alérgenos é importante entre os pacientes asmáticos de Uberlândia.
- 2) A cama foi o local de maior concentração dos alérgenos dentre os diferentes locais analisados para a exposição aos referidos alérgenos de ácaros.
- 3) Entre as residências de pacientes asmáticos SPT ⁺, a grande maioria apresentou índice de exposição alergênica para Der p 1, Der p 2 e Der f 1 em níveis $\geq 2 \mu\text{g/g}$ de poeira (fator de risco para sensibilização). Já as residências de indivíduos não atópicos (NA) apresentaram menores índices de exposição para Der p 1 e Der p 2, porém altos índices para Der f 1, considerando o mesmo nível de exposição.
- 4) Entre as residências de pacientes asmáticos SPT ⁺, a maioria apresentou índice de exposição alergênica para Der f 1 em níveis $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira (fator de risco para exacerbação dos sintomas de asma). Já as residências de indivíduos não atópicos (NA) apresentaram menores índices de exposição, considerando o mesmo fator de risco.
- 5) Não houve correlação significativa entre os índices de exposição alergênica e os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 entre pacientes asmáticos SPT ⁺.
- 6) Os altos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e particularmente Der f 1 nas amostras de poeira analisadas mostraram que os ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são importantes na sensibilização e exposição de pacientes asmáticos residentes na cidade de Uberlândia.

7. RESUMO

Ácaros da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides* spp.) são as principais fontes de alérgenos na poeira domiciliar. A associação entre exposição e sensibilização a alérgenos de ácaros no desenvolvimento de doenças alérgicas, particularmente a asma, tem sido reconhecida em várias partes do mundo. Estudos anteriores realizados no Brasil têm mostrado que *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* são as espécies de ácaros mais prevalentes enquanto que *D. farinae* é raramente encontrado. Os objetivos deste estudo foram avaliar a sensibilização e a exposição alérgica entre pacientes asmáticos e indivíduos não atópicos (NA) residentes em Uberlândia frente aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 bem como investigar a correlação entre os índices de exposição a estes alérgenos com a sensibilização. Um total de 89 pacientes asmáticos foi submetido ao teste cutâneo de punctura (SPT) para Dpt e dividido nos grupos SPT⁺ (n = 48) e SPT⁻ (n = 41). Adicionalmente, 26 indivíduos não atópicos (NA) não atópicos foram incluídos. A sensibilização foi avaliada pela determinação dos níveis de IgE sérica específica ($\geq 3,9$ EU/mL) aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 por ELISA reverso. A exposição alérgica foi avaliada pela determinação dos níveis dos respectivos alérgenos na poeira domiciliar por ELISA *sandwich*. A sensibilização de pacientes asmáticos (SPT⁺ e SPT⁻) aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 foi aproximadamente de 38%, 37% e 34%, respectivamente. Entre os pacientes asmáticos SPT⁺, a sensibilização aos alérgenos Der p 1, Der p 2 e Der f 1 foi respectivamente de 68,8%, 68,8% e 60,4%, apresentando níveis médios de IgE específica de 24,7, 28,4 e 19,7 EU/mL, respectivamente. Em contraste, a vasta maioria (96% a 100%) dos pacientes asmáticos SPT⁻ e indivíduos não atópicos (NA) não apresentou sensibilização a estes alérgenos. A cama foi o local de maior concentração dos alérgenos, apresentando níveis médios de 3,0, 3,6 e 17,1 $\mu\text{g/g}$ de poeira para Der p 1, Der p 2 e Der f 1, respectivamente, nas residências de pacientes asmáticos. Considerando níveis ≥ 2 $\mu\text{g/g}$ de poeira (fator de risco para sensibilização), os índices de exposição entre os pacientes asmáticos SPT⁺ foram de 75% (Der p 1), 70,8% (Der p 2) e 87,5% (Der f 1), enquanto 23,1% (Der p 1 e Der p 2) e 84,6% (Der f 1) foram

encontrados no grupo não atópicos (NA). Considerando níveis $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de poeira (fator de risco para exacerbação dos sintomas de asma), os maiores índices de exposição entre os pacientes asmáticos SPT⁺ foram de 50%, 45,8% e 75% para Der p 1, Der p 2 e Der f 1, respectivamente, ao contrário dos indivíduos não atópicos (NA) que apresentaram menores índices de exposição (0% para Der p 1 e Der p 2, e 23,1% para Der f 1). Não se observou correlação significativa entre os níveis de IgE sérica específica e o índice de exposição alergênica. Os altos níveis dos alérgenos Der p 1, Der p 2 e particularmente Der f 1 nas amostras de poeira analisadas mostraram que os ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* são importantes na sensibilização e exposição de pacientes asmáticos residentes na cidade de Uberlândia. Estes resultados permitem concluir que deve-se estabelecer a necessidade ou não de se incluir novos extratos de ácaros na bateria de testes cutâneos utilizados na avaliação do paciente com suspeita de alergia respiratória, conforme a fauna acarina regional. Consequentemente, medidas de controle ambiental para redução de ácaros devem ser instituídas, como parte importante da estratégia global de tratamento do paciente alérgico.

8. SUMMARY

Mites of the family Pyroglyphidae (*Dermatophagoides* spp.) are the major source of allergens in house dust. The association between exposure and sensitization to mite allergens in the development of allergic diseases, particularly asthma, has been recognized in several parts of the world. Previous studies performed in Brazil have shown that *D. pteronyssinus* (Dpt) and *B. tropicalis* are the most prevalent mite species while *D. farinae* is rarely found. The aims of this study were to evaluate the sensitization and the exposure to the Der p 1, Der p 2, and Der f 1 allergens among asthmatic patients and non atopic subjects living in Uberlândia as well as to investigate the correlation between exposure indexes to these allergens and sensitization. A total of 89 asthmatic patients was submitted to skin prick test (SPT) for Dpt and divided in the groups SPT⁺ (n = 48) and SPT⁻ (n = 41). In addition, 26 non-atopic subjects were included. Sensitization was evaluated by measuring the levels of serum specific IgE (≥ 3.9 EU/mL) to the Der p 1, Der p 2, and Der f 1 allergens by reverse ELISA. Allergen exposure was evaluated by measuring the levels of these allergens in the house dust by two-site monoclonal antibody ELISA. Sensitization among asthmatic patients (SPT⁺ and SPT⁻) to Der p 1, Der p 2, and Der f 1 allergens was about 38%, 37%, and 34%, respectively. Among SPT⁺ asthmatic patients, sensitization to Der p 1, Der p 2, and Der f 1 allergens was 68.8%, 68.8% and 60.4%, respectively, presenting specific IgE mean levels of 24.7, 28.4 and 19.7 EU/mL, respectively. In contrast, no sensitization to these allergens was found in the vast majority (96% to 100%) of the SPT⁻ asthmatic patients and non-atopic subjects. The highest levels of allergens were found in bedding samples, with mean levels of 3.0, 3.6, and 17.1 $\mu\text{g/g}$ of dust for Der p 1, Der p 2, and Der f 1, respectively, in the asthmatic patients' homes. Considering levels ≥ 2 $\mu\text{g/g}$ of dust (risk factor for sensitization), exposure indexes among SPT⁺ asthmatic patients were 75% (Der p 1), 70.8% (Der p 2), and 87.5% (Der f 1), while 23.1% (Der p 1 and Der p 2) and 84.6% (Der f 1) were found in the non asthmatic group. Considering levels ≥ 10 $\mu\text{g/g}$ of dust (risk factor for exacerbation of asthma symptoms), the highest exposure indexes among SPT⁺ asthmatic patients were 50%, 45.8% and 75% for Der p 1, Der p 2, and

1Der f 1, respectively, unlike the non-asthmatic subjects that presented lower exposure indexes (0% for Der p 1 and Der p 2, and 23.1% for Der f 1). No significant correlation was observed between the levels of serum specific IgE and the allergen exposure index. The high levels of the Der p 1, Der p 2, and particularly Der f 1 allergens in the analyzed house dust samples showed that the mites *D. pteronyssinus* and *D. farinae* are important in the sensitization and allergen exposure among asthmatic patients living in Uberlândia. These results allow to conclude that the knowledge of the regional mite fauna will certainly contribute to better investigate the association between allergen exposure and sensitization. This fact will allow that is established the necessity of including new mite extracts in inhalant skin test sets used for evaluating patients with suspicious respiratory allergy, and to elaborate indoor allergen avoidance in order to reduce exposure to mites as important part of the global therapeutic strategies for the management of the allergic patient.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 469 p.
- AMARAL, V. Sobre a ocorrência do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* no Brasil. *Rev. Med. Vet.*, v. 3, p. 296-300, 1968.
- ARAGÃO, F. J. L., RIBEIRO, S. G. Detecção de proteínas pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A. C. M., CARNEIRO, V. T. C. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Serviço de produção de informação - SPI., 1998. 309 p. p. 239-249.
- ARRUDA, L. K., RIZZO, M. C., CHAPMAN, M. D., FERNANDEZ-CALDAS, E., BAGGIO, D., PLATTS-MILLS, T. A. E., NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to house dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin. Exp. Allergy*, v. 21, p. 433-439, 1991.
- BAGGIO, D., AMBROZIO, J. L. C., ANTILA, M. Ácaros ambientais e as manifestações alérgicas. *Rev. Bras. Alergia e Imunopatol.*, v. 12, p. 56-68, 1989.
- BARNES, K. C., MARSH, D. G. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol. Today*, v. 19, n. 7, p. 325-332, 1998.
- BARNES, R. D., RUPPERT, E. E. *Zoologia dos Invertebrados*. Traduzido por Paulo Marcos Oliveira. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1026 p.
- BENJAMINI, E. , LESKOWITZ, S. Immunogens and antigens. In: *Immunology a short course*. New York: Alan R. Liss, 1988. 390 p. p. 31-42.
- BERNSTEIN, I. L., STORMS, W. W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, v. 75, n. 6, p. 543-570, 1995.

- CHAN-YEUNG, M., MANFREDA, J., DIMICH-WARD, H., LAM, J., FERGUSON, A., WARREN, P., SIMONS, E., BRODER, I., CHAPMAN, M., PLATTS-MILLS, T. A. E., BECER, A. Mite and cat allergen levels in homes and severity of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, v. 152, p. 1805-1811, 1995.
- CHAPMAN, M. D., HEYMANN, P. W., PLATTS-MILLS, T. A. E. Monoclonal immunoassays for the major dust mite (*Dermatophagoides*) allergens, Der p I and Der f I, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 80, p. 184-194, 1987.
- CHAPMAN, M. D., HEYMANN, P. W., SPORIK, R. B., PLATTS-MILLS, T. A. E. Monitoring allergen exposure in asthma: new treatment strategies. *Allergy*, v. 50, n. 25, p. 29-33, 1995. Supplement 25.
- COCHRANE, G. M., REES, P. J. *Atlas colorido da asma*. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1995. v. 1. 40 p.
- COLLOFF, M. J., AYRES, J., CARSWELL, F., HOWARTH, P. H., MERRETT, T. G., MITCHEL, E. B., WALSSHAW, M. J., WARNER, J. O., WARNER, J. A., WOODCOCK, A. A. The control of allergens of dust mites and domestic pets: a position paper. *Clin. Exp. Allergy*, v. 22, p. 1-28, Sept. 1992. Supplement 2.
- COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*, v. 402, p.5-11, 1999.
- CORRY, D.B, KHERADMAND, F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*, v. 402, p.18-23, 1999.
- DILWORTH, R. J., CHUA, K.Y., THOMAS, W. R., Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der f I. *Clin. Exp. Allergy*, v. 21, p. 25-32, 1991.

- DREBORG, S. Skin testing: The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentration of allergen. *Allergy*, v. 48, p. 473-475, 1993.
- DJUKANOVIC, R, HOLGATE, S.T. *An atlas of Asthma*. 1^a ed. New York: Parthenon Publishing, 1999. 99p.
- DUFF, A. L., PLATTS-MILLS, T. A. E. Allergens and asthma. *Pediatrics Clinics of North America*, v. 39, n. 6, p. 1277- 1291, 1992.
- EVANS III, R. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. In: MIDDLETON, E. J, REED, C. E., ELLIS, E. F., ADKINSON, N. F. J., YUNINGER, W., BUSSE, W. W. (Ed.). *Allergy: principles and practice*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1993. v. 1, p. 1109-1136.
- FIREMAN, P., JELKS, M. Allergens. In: FIREMAN, P., SLAVIN, R. (Ed.) *Atlas of allergies*. 2. ed. Barcelona: Mosby-Wolfe, 1996. 301 p. p. 27-40.
- GALANT, S., BERGER, W., GILMAN, S., GOLDSOBEL, A., INCAUDO, G., KANTER, L., MACHTINGER, S., McLEAN, A., PRENNER, B., SPECTOR, S., WELCH, M., ZIERING, W. Prevalence of sensitization to aeroallergens in California patients with respiratory allergy. Allergy skin test project team. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, v. 81, n. 3, 203-210, 1998.
- GALLI, S. J., LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. 4. Ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1999. 1589 p. p. 1127-1174.
- GARRET, M. H., HOOPER, B. M., HOOPER, M. A. Indoor environmental factors associated with house-dust-mite allergen (Der p 1) levels in south-eastern Australian houses. *Allergy*, v. 53, p. 1060-1065, 1998.

- GELBER, L. E., SELTZER, L. H., BOUZOUKIS, J. K., POLLART, S. M., CHAPMAN, M. D., PLATTS-MILLS, T. A. E. Sensitization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 147, n. 3, p. 573-578, 1993.
- GELLER, M., ESCH, R. E., FERNANDEZ-CALDAS, E. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro – considerações preliminares. *An. Acad. Nac. Med.*, v. 153, n. 4, p. 174-175, 1993.
- GELLER, M., ESCH, R. E., FERNANDEZ-CALDAS, E. Características imunológicas da sensibilização acarina respiratória no Rio de Janeiro. *An. Acad. Nac. Med.*, v. 155, n. 2, p. 76-78, 1995.
- GERVASIO, A. M., SILVA, D. A. O., SOPELETE, M. C., ARRUDA-CHAVES, E., ARRUDA, L. K., CHAPMAN, M. D., TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen, (manuscrito em preparação).
- GOLDSTEIN, R. A., PAUL, W. E., METCALFE, D. D., BUSSE, W. W., REECE, E. R. Asthma. *Ann Intern Med.*, v. 121, p. 698-708, 1994.
- GOUNNI, A. S., LAMKHLOUED, B., OCHIAI, K., TANAKA, Y., LAPORTE, E., CAPRON, A., KINET, J.P., CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature*, v. 367, n. 6459, p. 183-473, 1994.
- GRAUDENZ, G. S., SANO, F., CASTRO, F. F. M. Tratamento da asma. In: CASTRO, F. F. M., CASTRO, M. L. *Corticosteróides nas alérgias respiratórias*. São Paulo: Vivali, 1999. 148 p. p. 79-89.
- GREEN, W. F., MARKS, G. B., TOVEY, E. R., TOELLE, B. G., WOOLCOCK, A. J. House dust mites and mite allergens in public places. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, v. 89, p. 1196-1197, 1992.

HAKKAART, G. A. J., AALBERSE, R. C., VAN REE, R. Epitope mapping of the house-dust-mite allergen Der p 2 by means of site-directed mutagenesis. *Allergy*, v. 53, p. 165-172, 1998.

HAMILTON, R. G., ADKINSON, N. F. J. Measurement of total serum immunoglobulin E and allergen-specific immunoglobulin E antibody. In: ROSE, N. R., MACARIO, E. C., FAHEY, J. L., FRIEDMAN, H., PENN, G. M. *Manual of clinical laboratory immunology*. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992. 986 p. p.689-701.

HEYMANN, P. W., CHAPMAN, M. D., AALBERSE, R. C., FOX, J. W., PLATTS-MILLS, T. A. E. Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 83, n. 6, p.1055-1067, 1989.

HEYMANN, P. W., CHAPMAN, M. D., PLATTS-MILLS, T. A. E. Antigen Der f I from dust mite *Dermatophagoides farinae*: structural comparison with Der p I from *D. pteronyssinus* and epitope specific of murine IgE and human IgE antibodies. *J. Immunol.*, v. 137, p. 2841-2847, 1986.

HEWITT, C. R. A., BROWN, A. P., HART, B. J., PRITCHARD, D. I. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: Innate protection by antiproteases. *J. Exp. Med.*, v. 182, n. 5, p. 1537-1544, 1995.

HOLGATE, S.T. The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, v. 402, p. 2-4, 1999.

HOWARTH, P. H. A alergia esta aumentando? Influências das primeiras fases da vida. *Clin. Exp. Allergy*, v. 28, p. 5-10, 1998. Suplemento 6.

- KALINER, M. A., MCFADDEN, E. R. J. Bronchial asthma. In: *Immunological Diseases*. SAMTER, M., TALMAGE, M., FRANK, M. M., AUSTEN, K. F., CLAMAN, H. N. (Ed.). Boston: Little Brown and Company, 1988. v. 2, p. 1067-1118.
- KAPSENBERG, M. L., HILKENS, C. M. U., WIERENGA, E. A., KALINSKI, P. The role of antigen-presenting cells in the regulation of allergen-specific T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 10, n. 6, p. 607-613, 1998.
- KEMENY, D. M., URBANEK, R., SAMUEL, D., RICHARDS, D. Improved sensitivity and specificity of sandwich, competitive and capture enzyme-linked immunosorbent assays for allergen-specific antibodies. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.*, v. 77, p. 198-200, 1985.
- KEMENY, D. M., URBANEK, R., SAMUEL, D., RICHARDS, D., MAASCH, H. J. The use of monoclonal and polyspecific antibodies in the IgE sandwich ELISA. *J. Immunol. Methods*, v. 87, n. 1, p. 45-50, 1986.
- KING, T. P., HOFFMAN, D., LOWENSTEIN, H., MARSH, D. G., PLATTS-MILLS, T. A. E., THOMAS, W. Allergen nomenclature. *Clin Exp Allergy*, v. 25, p. 27-37, 1995.
- KUEHR, J., FRISCHER, T., MEINERT, R., BARTH, R., FORSTER, J., SCHRAUB, S., URBANEK, R., KARMAUS, W. Mite allergen exposure is a risk factor for the incidence of specific sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 94, n. 1, p. 44-52, 1994.
- LUCZYNSKA, C. M., ARRUDA, L. K., PLATTS-MILLS, T. A. E., MILLER, J. D., LOPEZ, M., CHAPMAN, M. D. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major dermatophagoides spp. Allergens, Der p I and Der f I. *J. Immunol Methods*, v. 118, p. 227-235, 1989.
- MAHMIC, A., TOVEY, E. R. House-dust-mite allergen (Der p 1) levels in university colleges. *Allergy*, v. 53, p. 976-980, 1998.

MALLING, H. J. Reproducibility of skin sensitivity using a quantitative skin prick test. *Allergy*, v. 40, p. 400-404, 1985.

MANNINO, D. M., HOMA, D. M., PERTOWSKI, C. A., ASHIZAWA, A., NIXON, L. L., JOHNSON, C. A., BALL, L. B., JACK, E., KANG, D. S. Surveillance for asthma – United States, 1960-1995. *M.M.W.R.*, v. 47, n. SS-1, p. 1-11, 1998.

MARKS, G. B., TOVEY, E. R., GREEN, W., SHEARER, M., SALOME, C. M., WOOLCOCK, A. J. The effect of changes in house dust mite allergen exposure on the severity of asthma. *Clin. Exp. Allergy*, v. 25, p. 114-118, 1995.

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

MARSH, D. G., NEELEY, J. D., BREAZEALE, D. R., GHOSH, B., FREIDHOFF, L. R., KAUTZKY, E. E., SCHOU, C., KRISHNASWAMY, G., BEATY, T. H. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*, v. 264, p. 1152-1156, 1994.

MARTIN, I. R., HENWOOD, J. L., WILSON, F., KONING, M. M., PIKE, A. J., SMITH, S., TOWN, G. I. House dust mite and cat allergen levels in domestic dwellings in christchurch. *NZ. Med. J.*, v. 110, p. 229-231, 1997.

MASTRANDREA, F., SERIO, G., MINARDI, A., CORADDUZZA, G., ROSSI, N., SCARCIA, G., MAIETTA, G., IACOBELLI, A., LAMANNA, C., TURSI, A. IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* native major allergens Der p 1 and Der p 2 during long-term specific immunotherapy. *Allergy*, v. 52, p. 1115-1119, 1997.

MAURER, D., FIEBIGER, E., EBNER, C., REININGER, B., FISCHER, G. F., WICHLAS, S., JOUVIN, M. H., SCHIMITT-EGENOLF, M., KRAFT, D., KINET, J. P., STINGL, G. Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as a complex composed of FcεRIα- and FcεRIβ-chains; and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J. Immunol.*, v. 157, n. 2, p. 607–616, 1996.

MAURER, D., FIEBIGER, E., REININGER, B., WOLFF-WINISKI, B., JOUVIN, M. H., KILGUS, O., KINET, J. P., STINGL, G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. *J. Exp. Med.*; v. 179, n. 2, p. 745–750, 1994.

MEDEIROS Jr., M. Sensibilização a aeroalérgenos em indivíduos portadores de asma brônquica e/ou rinite crônica em Salvador – Bahia. Salvador, 1997. 71 p. Tese (Mestrado Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, 1997.

METZGER, W. J., BUTLER, J. E., SWANSON, P., REIDERS, E., RICHERSON, H. B. Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay for measuring allergens-specific IgE and IgG antibodies. *Clin. Allergy*, v. 11, p. 523, 1981.

NELSON, R. P., DINICOLO, R., FERNANDEZ-CALDAS, E., SELEZNICK, M. J., LOCKEY, R.F., GOOD, R. A. Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in nonasthmatic control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 98, n. 2, p. 258-263, 1996.

NIEMEIJER, N. R., GOEDEWAAGEN, B., KAUFFMAN, H. F., MONCHY, J. G. R. Optimization of skin testing. *Allergy*, v. 48, p. 491-497, 1993.

OLIVEIRA, C. H., BINOTTI, R. S., MUNIZ, J. R. O., PINHO Jr., A. J., PRADO, A. P., LAZZARINI, S. Fauna acarina da poeira de colchões na cidade de Campinas – SP. *Rev. Bras. Allerg. Immunopatol.*, v. 22, n. 6, p. 188-197, 1999.

- OVSYANNIKOVA, I. G., VAILES, L. D., LI, Y., HEYMANN, P. W.,
CHAPMAN, M. D. Monoclonal antibodies to group II *Dermatophagoides*
spp. Allergens: Murine immune response, epitope analysis, and
development of a two-site ELISA. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 94, n. 3, p.
537-546, 1994.
- OWNBY, D. Allergy testing: *in vitro* versus *in vivo*. *Pediatric Allergic Disease.*,
v. 35, n. 5, p. 995-1009, 1988.
- PARSLOW, T. G. Immunogens, antigens, & vaccines. In: STITES, D. P.,
TERR, A. I., PARSLOW, T. G. *Medical Immunology*. 9.ed. Stamford:
Appleton & Lange, 1997. 900 p. p. 74-82.
- PENG, Z., XU, W., SIMONS, F. E. R. Highly sensitive and specific ELISA
with monoclonal antibodies capture to measure *Dermatophagoides*
farlane 1-specific IgE. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, v. 80, p. 274-278,
1998.
- PEREIRA, C. A. C., NASPITZ, C. II Consenso brasileiro no manejo da asma
(1998). Separata do *Jornal de Pneumologia*, v. 24, n. 4, p. 173-201.
- PIPKORN, U., HAMMERLUND, A., ENERBAECK, L. Prolonged treatment
with topical corticosteroids results in na inhibition of the allergen-induced
wheal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and
histamine content. *Clin. Exp. Allergy*, v. 19, p. 19-27, 1989.
- PLATTS-MILLS, T. A. E. Estimation of allergen concentration in indoor
environments: Prediction of health-related effects In: GAMMAGE, R. B.,
BERVEN, B. A. (Ed.) *Indoor air and human health*. 2.ed. Boca Raton:
CRC Press, 1996. p. 197-210.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., CHAPMAN, M. D., SQUILLACE, S. P., SPORIK, R.
B., CALL, R. S., HEYMANN, P. W. The role of allergens. In: *Asthma:
Physiology, Immunopharmacology and treatment, Fourth International
Symposium*. London: Academic Press, 1993.

- PLATTS-MILLS, T. A. E., DE WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma – a worldwide problem. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 83, p. 416-427, 1989.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., MITCHELL, E. B., NOCK, P., TOVEY, E. R., MOZORO, H., WILKINS, S. R. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet*, v. 2, p. 675-678, 1982.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., SPORIK, R. B., CHAPMAN, M. D., HEYMANN, P. W. The role of indoor allergens in asthma. *Allergy*, v. 50, n. 22, p. 5-12, 1995a.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., SPORIK, R. B., WHEATLEY, L. M., HEYMANN, P. W. Is there a dose-response relationship between exposure to indoor allergens and symptoms of asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 96, n. 4, p. 435-440, 1995b.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., THOMAS, W. R., AALBERSE, R. C., VERVLOET, D., CHAPMAN, M. D., Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 89, p. 1046-1060, 1992.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., VERVLOET, D., THOMAS, W. R. Indoor allergens and asthma; report of the Third International Workshop. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 100, n. 6, p. S1-S23, 1997.
- POLLART, S. M., CHAPMAN, M. D., FIOCCO, G. P., ROSE, G., PLATTS-MILLS, T. A. E. Epidemiology of acute asthma: IgE antibodies to common inhalant allergens as a risk factor for emergency room visits. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 83, p. 875-882, 1989.
- POLLART, S. M., SMITH, T. F., MORRIS, E. C., GELBER, L. E., PLATTS-MILLS, T. A. E., CHAPMAN, M. D. Environmental exposure to cockroach allergens: Analysis with monoclonal antibody – based enzyme immunoassays. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 87, p. 505-510, 1991.

PRESCOTT, S., MACAUBAS, C., SAMALLACOMBE, T., HOLT, B. J., SLY, P.D., HOLTP, G. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*, v. 353, n. 16, p. 196-200, 1999.

RAINS, N., SIEBERS, R., CRANE, J., FITZHARRIS, P. House dust mite allergen (Der p 1) accumulation on new synthetic and feather pillows. *Clin. Exp. Allergy*, v. 29, p. 182-185, 1999.

RIZZO, M. C., ARRUDA, L. K., CHAPMAN, M. D., FERNANDEZ-CALDAS, E., BAGGIO, D., PLATTS-MILLS, T. A. E., NASPITZ, C. K. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. *Ann. Allergy*, v. 71, n. 2, p.152-158, 1993.

RIZZO, M. C., SOLÉ, D., RIZZO, A. Etiologia da doença atópica em crianças brasileiras: estudo multicêntrico. *J. Pediatr.*, v. 71, n. 1, p. 31-35, 1995.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Immunology. 5.ed. London: Mosby International, 1998. 433 p.

ROMAGNANI, S. Regulation and desregulation of human IgE synthesis. *Immunol. Today*, v. 11, n. 9, p. 316-21, 1990.

ROSE, G., ARLIAN, L., BERSTEIN, D. GRANT, A., LOPEZ, M., METZGER, J., WASSERMAN, S., PLATTS-MILLS, T. A. E. Evaluation of household dust mite exposure and levels of specific IgE and IgG antibodies in asthmatic patients enrolled in a trial of immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 97, n. 5, p. 1071-1078, 1996.

SAKAGUCHI, M., INOUE, S., IRIE, T., MIYAZAWA, H., WATANABE, M., YASUEDA, H., SHIDA, T., NITTA, H., CHAPMAN, M. D., SCHOU, C., AALBERSE, R. C. Airborne cat (Fel d I), dog (Can f I), and mite (Der p I and Der p II) allergen levels in the homes of Japan. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 92, n. 6, p. 797-801, 1993.

- SAKAGUCHI, M., INOUE, S., YASUEDA, H., IRIE, T., YOSHIZAWA, S., SHIDA, T. Measurement of allergens associated dust mite allergy. II. Concentration of airborne mite allergens (Der I and Der II) in the houses. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 90, p.190-193, 1989.
- SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A., MACKAY, C.R. Chemokines and chemokine receptors in t-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today*, v. 19, n. 12, p. 568-574, 1998.
- SARINHO, E., FERNANDEZ-CALDAS, E., JUST, E., SOLE, D. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade do Recife – Pernambuco. *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.*, v. 19, n. 5, p. 228-230, 1996.
- SARPONG, S.B., KARRISON, T. Skin test reactivity to indoor allergens as a marker of asthma severity in children with asthma. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*, v. 80, p. 303-308, 1998.
- SCHULZ, O., SEWELL, H. F., SHAKIB, F. Proteolytic cleavage of CD25, the α subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.*, v. 2, n. 2, p. 271-275, 1998.
- SEARS, M. R., HERVISON, G. P., HOLDAWAY, M. D., HEWITT, C. J., FLANNERY, E. M., SILVA, P. A. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite, and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin. Exp. Allergy*, v. 19, p. 419-424, 1989.
- SELTZER, J. Biological contaminants. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 94, p. 318-326, 1994.
- SERRAVALLE, K., MEDEIROS Jr., M. Ácaros da poeira domiciliar na cidade de Salvador – BA. *Rev. Bras. alerg. Immunopatol.*, v. 22, n. 1, p. 19-24, 1999.

- SHAKIB, F., SCHULZ, O., SEWELL, H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD 25 by Der p I enhances allergenicity. *Immunol. Today*, v. 19, n. 7, p. 313-316, 1998.
- SIEBERS, R. W., GRADY, G. B., FITZHARRIS, P., CRANE, J. House dust mite allergen accumulation on sheepskins. *NZ. Med. J.*, v. 111, p. 408-409, 1998.
- SIRAGANIAN, R. P. Allergic diseases. In: ROSE, N. R., MACARIO, E. C., FAHEY, J. L., FRIEDMAN, H., PENN, G. M. *Manual of clinical laboratory immunology*. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1992. 986 p. p.689-701.
- SKONER, D. P. Asthma. In: FIREMAN, P., SLAVIN, R. G. *Atlas of allergies*, 1996, 2.ed. Barcelona: Mosby-Wolfe, 1996, 301p. p.75-108.
- SLOTT, I. R., ZWEIMAN, B. A. Controlled study of the effect of corticosteroids on immediate skin test reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 54, p. 229-235, 1974.
- SLY, R. M. New guidelines for diagnosis and management of asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, v. 78, p. 427-437, 1997.
- SMITH, T. F., KELLY, L. B., HEYMANN, P. W., WILKINS, S. R., PLATTS-MILLS, T. A. E. Natural exposure and serum antibodies to house dust mite of mite-allergic children with asthma in Atlanta. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 76, p. 782-788, 1985.
- SPINOZZI, F., AGEA, E., BISTONI, O., FORENZA, N., BERTOTTO, A. $\gamma\delta$ T cells, allergen recognition and airway inflammation. *Immunol. Today*, v. 19, n. 1, p. 22-26, 1998.
- SPORIK, R., HOLGATE, S. T., PLATTS-MILLS, T. A. E., COGSWELL, J. J. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development to asthma in childhood. *N. Engl. J. Med.*, v. 323, n. 8, p. 502-507, 1990.

- SPORIK, R., INGRAM, J. M., PRICE, W., SUSSMAN, J. H., HONSINGER, R. W., PLATTS-MILLS, T. A. E. Association of asthma with serum IgE and skin-test reactivity to allergens among children living at high altitude: Tickling the dragon's breath. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 151, p. 1388-1392, 1995.
- SQUILLACE, S. P., SPORIK, R. B., RAKES, G., COUTURE, N., LAWRENCE, A., MERRIAM, S., ZHANG, J., PLATTS-MILLS, T. A. E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 156, p. 1760-1764, 1997.
- TERR, A. I. Mechanisms of hypersensitivity. In: STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. *Medical Immunology*. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997a. 900 p. p.376-388.
- TERR, A. I. The atopic diseases. In: STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. *Medical Immunology*. 9.ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997b. 900 p. p.389-408.
- THOMAS, W. R., SMITH, W. An update on allergens: House-dust-mite allergens. *Allergy*. v. 53, p. 821-832, 1998.
- TOVEY, E. R., CHAPMAN, M. D., PLATTS-MILLS, T. A. E. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*, v. 289, p. 592-593, 1981.
- TUNNICLIFFE, W. S., FLETCHER, T. J., HAMMOND, K., ROBERTS, K., CUSTOVIC, A., SIMPSON, A., WOODCOCK, A., AYRES, J. G. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. *Eur. Respir. J.*, v. 13, p. 654-659, 1999.
- VAN NEERVEN, R. J., EBNER, C., YSSEL, H., KAPSENBERG, M. L., LAMB, J. R. T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. *Immunol. Today*, v. 17, n. 11, p. 526-532, 1996.

VARNEY, V. A., JACOBSON, M. R., SUDDERICK, R. M., ROBINSON, D. S., IRANI, A. M., SCHWARTZ, L. B., MACKAY, I. S., KAY, A. B., DURHAM, S. R. Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils and neutrophils. *Am. Respir. Dis.*, v.146, n. 1, p. 170-176, 1992.

VOHLONEN, I., TERHO, E. O., KOIVIKKO, A., VANTO, T., HOLMEN, A., HEINONEN, O. P. Preproducibility of the skin prick test. *Allergy*, v. 44, p. 525-531, 1989.

VON MUTIUS, E., MARTINEZ, F. D., FRITZSCH, C., NICHOLAI, T., REITMEIR, P., THIEMANN, H. H. Al. Skin test reactivity and number of siblings. *Br. Med. J.*, v. 308, n. 6930, p. 692-695, 1994.

WANG, B., RIEGER, A., KILGUS, O., OCHIAI, K., MAURER, D., FODINGER, D., KINET, J. P., STINGL, G. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via FcεRI. *J Exp Med.*, v. 175, p. 1353-1365, 1992.

WOOD, R. A., EGGLESTON, P. A., LIND, P., INGEMANN, L., SCHWARTZ, B., GRAVESON, S., TERRY, D., WHEELER, B., ADKINSON, F. J. R. Antigenic analysis of house dust samples. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 137, p. 358-363, 1988.

WORM, M., HENZ, B. M. Molecular regulation of IgE synthesis. *J. Mol. Med.*, v. 75, p. 440-447, 1997.

10. ANEXOS

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Disciplina de Imunologia - Departamento de Patologia
Unidade de Pesquisa em Alergia Clínica
Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: 034-218-2195 - TELEFAX: 034-218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado. "Exposição e Sensibilização a alérgenos inalantes domiciliares entre pacientes asmáticos de Uberlândia, MG.", que será realizado nesta unidade estando ciente dos seguintes aspectos:

- necessidade de coletas de amostras de poeira domiciliar;
- realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inalantes.
- necessidade de coleta de sangue.

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.

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

Uberlândia, ____ de _____ de 19 .

TESTEMUNHA

TESTEMUNHA

ANEXO 2



Universidade Federal de Uberlândia
Disciplina de Imunologia - Departamento de Patologia
Unidade de Pesquisa em Alergia Clínica
Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: 034-218-2195 - TELEFAX: 034-218-2333

Nome:

Número do Prontuário:

Data de Nascimento:

Sexo:

Endereço:

Fone:

Raça:

Altura:

Idade:

Peso:

Data da Consulta:

Observações:

ANEXO 3



Universidade Federal de Uberlândia
 Disciplina de Imunologia - Departamento de Patologia
 Unidade de Pesquisa em Alergia Clínica
 Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
 Telefone: 034-218-2195 - TELEFAX: 034-218-2333

IDENTIFICAÇÃO:

NOME:
IDADE:
SEXO:
PROFISSÃO:

QUESTIONÁRIO**A- ASMA**

1) Já teve chiado no peito ou crise de bronquite ou asma?

SIM

NÃO

2) Quando foi a primeira vez?

< 1 ano

1-5 anos

6-12 anos

> 12 anos

____ anos

3) Quantas vezes por ano tem crise?

1-3

4-12

> 12

4) Nos últimos 12 meses quantas crises teve ?

nenhuma

1-3

4-12

> 12

5) Qual a pior época do ano ?

ano todo

verão

inverno

6) Qual o período do dia que mais aparece?

durante o dia à noite ambos

7) Acorda à noite com tosse ou falta de ar?

SIM NÃO

8) Tem crise quando toma aspirina ou AAS?

SIM NÃO

9) Tem crise quando corre ou faz exercício?

SIM NÃO

10) Quais os sintomas que tem durante a crise?

chiado no peito falta de ar tosse outros _____

11) Tem crise após contato com:

poeira da casa mofo cão gato

bebida gelada cheiro forte fumaça de cigarro

gripe ou resfriado frio calor

alimentos (qual?) _____

outros : _____

12) Você fuma ?

SIM Não (pular para item 15)

13) Quantos cigarros por dia ?

< 10 10-20 > 20

14) Tem alguém próximo a você que fuma (em casa ou no trabalho) ?

SIM NÃO

15) Já precisou de pronto-socorro para melhorar a crise?

SIM (só inalação) SIM (inalação + "soro" na veia)?

16) Quantas vezes ao foi ao pronto-socorro?

1-3 4 -12 > 12

17) Já ficou internado pelo chiado ou por falta de ar?

SIM NÃO

18) Quantas vezes?

1-3 4 - 12 > 12

19) Qual o tempo máximo de internação que já teve?

1 dia até 3 dias até 1 semana > 7 dias

20) Já necessitou de UTI para tratar a crise?

SIM NÃO

21) Quantas vezes?

1 2- 5 > 5

22) Faz uso de medicação contínua?

NÃO SIM (quais) : _____

B- DERMATITE

1) Já teve manchas vermelhas com coceira na pele (eczema) em região de cotovelos, joelhos, tornozelos, abaixo das nádegas, pescoço, orelhas ou perto dos olhos?

SIM NÃO

2) Desde que idade?

 < 1 ano 1 -4 anos 5- 12 anos > 12 anos ____ anos

3) Alguma vez no último ano as lesões desapareceram completamente?

 SIM NÃO

4) A coceira prejudicou o seu sono?

 SIM NÃO

5) As lesões aparecem ou pioram com:

 poeira perfume talco desinfetante giz alimentos (quais)? _____ medicamentos (quais)? _____ outros : _____ nada

6) Já teve que tomar corticóide (oral ou tópico) para melhorar a pele?

 SIM NÃO**C- RINITE**

1) Já teve problema de rinite (espirros ou corrimento ou obstrução ou coceira no nariz) sem estar gripado ou resfriado ?

 SIM NÃO

2) Qual o sintoma que mais lhe afeta ?

espirros coceira coriza obstrução todos

3) Desde que idade?

<1 ano 1 - 4anos 5 -12 anos > 12 anos ____anos

4) Quantas vezes no último ano?

1-3 4 - 12 > 12

5) Em que época do ano ocorreu?

ano todo verão inverno

6) Qual o pior período do dia?

dia todo manhã noite

7) Esse problema nasal já foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos ?

SIM NÃO

8) Quantas vezes no último ano suas atividades diárias foram atrapalhadas pela rinite e /ou asma?

nenhuma poucas moderadamente muitas

9) Faz uso de medicação contínua?

NÃO SIM (quais) _____

D- INFECCÕES

1) Já teve sinusite?

SIM NÃO

2) Quantas vezes :

1 2 - 5 5 - 12 > 12

3) Tratou com antibiótico?

SIM

NÃO

4) Já teve otite ?

SIM

NÃO (pule para a questão 7)

5) Quantas vezes ?

1

2 - 5

5- 12

> 12

6) Tratou com antibióticos?

SIM

NÃO

7) Já teve pneumonia ?

SIM

NÃO (pule para questão 10)

8) Quantas vezes ?

1

2 -5

5 -12

> 12

9) Tratou com antibióticos?

SIM

NÃO

10) Teve outros tipos de infecção ? Quais ?

ANEXO 4



Universidade Federal de Uberlândia
Disciplina de Imunologia - Departamento de Patologia
Unidade de Pesquisa em Alergia Clínica
Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: 034-218-2195 - TELEFAX: 034-218-2333

FICHA DO PACIENTE ASMÁTICO

NOME:

CARACTERÍSTICAS DA CASA:

- ANIMAIS:** nenhum aves cão(interno) cão(externo)
 gato roedores outros _____
- PISO:** cimento liso cerâmica taco tábua corrida paviflex
 tapete(quarto) tapete(sala) carpete(quarto)
 carpete(sala) outros
- SOFÁ:** tecido couro sintético almofadas

FICHA DO INDIVÍDUO CONTROLE

NOME:

IDADE:

SEXO:

ENDEREÇO:

TELEFONE:

CARACTERÍSTICAS DA CASA:

- ANIMAIS:** nenhum aves cão(interno) cão(externo)
 gato roedores outros _____
- PISO:** cimento liso cerâmica taco tábua corrida
 paviflex
 tapete(quarto) tapete(sala) carpete(quarto)
 carpete(sala) outros
- SOFÁ:** tecido couro sintético almofadas

ANEXO 5



Universidade Federal de Uberlândia
Disciplina de Imunologia - Departamento de Patologia
Unidade de Pesquisa em Alergia Clínica
Campus Umuarama - Bloco 4C - Uberlândia - MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: 034-218-2195 - TELEFAX: 034-218-2333

INSTRUÇÕES PARA A COLETA DE POEIRA DOMICILIAR

PROCEDIMENTO:

Cinco amostras são colhidas na casa - duas na sala, duas no quarto e uma na cozinha.

PROTOCOLO:

- 1 - Aspire até obter uma quantidade suficiente da amostra (a amostra é suficiente quando a base do tecido não pode ser vista através da camada de poeira);
- 2 - Cuidadosamente remover a cabeça do adaptador e dobrar o pano várias vezes ao meio e colocar no interior de um saco plástico zipado;
- 3 - Entre cada local de coleta da casa as peças do aspirador que precedem o filtro devem ser limpas com compressa umedecida;
- 4 - As cinco amostras devem ser reunidas com elástico ou em um saco plástico zipado;
- 5 - Entre cada visita domiciliar as peças do aspirador que precedem o filtro devem ser limpas com compressa umedecida.

LOCAIS DE COLETA:

- 1 - Cozinha: chão, ao redor e em cima da geladeira, ao redor do lixo e no interior dos armários (normalmente serão encontrados muitos resquícios alimentares);
- 2 - Sala de espera:
 - A) sofá (encosto, por cima e por baixo), almofadas (tanto por cima quanto por baixo);
 - B) chão (se encarpetado, geralmente será obtida uma quantidade da amostra adequada);
- 3 - Quarto:
 - A) cama (colchão - em cima e abaixo do lençol e travesseiro - por fora e por dentro da fronha);
 - B) chão.

MATERIAIS UTILIZADOS:

- 1 - Aspirador de pó - Papa pó da Arno;
- 2 - Tecido de algodão e/ou poliéster de aproximadamente 15X15 cm.