**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

AMANDA DE SOUZA FREITAS

**Exposição à endotoxina no ambiente de trabalho e pesquisa de associação
com asma, alergia e sibilo.**

**Ribeirão Preto
2014**

AMANDA DE SOUZA FREITAS

**Exposição à endotoxina no ambiente de trabalho e pesquisa de associação
com asma, alergia e sibilo.**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Saúde na Comunidade

Orientador: Elcio dos Santos Oliveira Vianna

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Freitas, Amanda de Souza

Exposição à endotoxina no ambiente de trabalho e pesquisa de associação com asma, alergia e sibilo. Ribeirão Preto, 2014.

105 f. : il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde na Comunidade da FMRP, Universidade de São Paulo.

Orientador: Vianna, Elcio dos Santos Oliveira.

1. Endotoxina. 2. Asma. 3. Sibilo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FREITAS, A. S. Exposição à endotoxina no ambiente de trabalho e pesquisa de associação com asma, alergia e sibilo.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Saúde na Comunidade

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Elcio dos Santos Oliveira Vianna

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Ericson Bagatin

Instituição: Faculdade de Ciência Médica da Universidade Estadual de Campinas

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Osvaldo e Clarice, meus irmãos,
Cláudia, Rose e Gabriel pelo apoio e
companheirismo. Onde quer que eu vá, sei que
jamais estarei sozinha.*

*Ao meu noivo, Leonardo, que apesar das
dificuldades esteve sempre ao meu lado, sendo
compreensivo, me apoiando e incentivando a
seguir em frente.*

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por estar sempre presente em minha vida. Mesmo quando eu não acreditava mais em mim ELE continuou acreditando.

Agradeço ao Prof. Elcio Oliveira Vianna, que confiou a mim este trabalho. Pela paciência e dedicação em ensinar. Obrigada por estar sempre disposto a ajudar e pelos ensinamentos diários, mesmo quando o assunto não era da pós-graduação. Obrigada, por respeitar minhas opiniões, limitações e, sobretudo, por acreditar em mim.

Aos docentes Dr. João Terra, Dra Geruza e Dr. Baddini pelo incentivo, apoio, convívio e ensinamentos transmitidos.

À Bete, Luciana e Abadia pelo apoio sempre, amizade e momentos de descontração.

À Cassia, Rosa, Cristina, Romilda, Heloise e Aline por todo o suporte, apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

À Isa e o pessoal do laboratório do Prof. Célio pela ajuda e paciência.

Aos amigos da pós-graduação Christian, Luciano, Simeão e Vera que durante esse tempo dividiram comigo preocupações, dúvidas e alegrias.

À Érica e Andrea pelas muitas dicas úteis, pela amizade e auxílio.

À Gloria por quem tenho grande admiração, carinho e respeito. Obrigada pela ajuda.

À minha família, Osvaldo, Clarice, Rose, Cláudia, Gabriel, as minhas primas Vera e Bice pelo incentivo, amor, pela capacidade de acreditarem em mim e pelas boas horas de conversa e de risadas.

*As minhas amigas **Andressa**, **Fernanda**, **Flavia (Kaju)**, **Flavia (D2)**, **Larissa** e **Leticia** pelas palavras de conforto, apoio nas horas difíceis e por me proporcionarem momentos alegres e de descontração.*

*Ao **Leonardo** pela compreensão nas horas de ansiedade, pelo apoio e pelo carinho sempre.*

Enfim, agradeço esta conquista a todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a minha formação e realização. Que, de alguma forma, estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

“Só há duas maneiras de viver a vida. Uma é pensar que nada é um milagre. A outra é pensar que tudo é um milagre.”

Albert Einstein

RESUMO

FREITAS, A. S. **Exposição à endotoxina no ambiente de trabalho e pesquisa de associação com asma, alergia e sibilo.** 2014. 105f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2014.

INTRODUÇÃO: Em países industrializados, as doenças pulmonares são as que mais se destacam quando o assunto é doença ocupacional. Entre os técnicos, cuidadores de animais, médicos e cientistas, as doenças respiratórias e alérgicas a animais de laboratório representam a principal doença ocupacional. Entre os agentes presentes na sujeira orgânica, as endotoxinas são as mais relacionadas às respostas inflamatórias e causadoras de uma série de doenças respiratórias. As endotoxinas, componentes externos das bactérias gram-negativas, são encontradas em várias concentrações em suspensão no ar ou depositadas na poeira do chão, em materiais e equipamentos, no ambiente domiciliar, urbano, rural e em alguns estabelecimentos. É inevitável a exposição à endotoxina, no entanto, o nível de exposição das vias aéreas pode ser muito variado. Alguns estudos mostraram a correlação dos sintomas apresentados pelos trabalhadores de laboratórios ou biotérios com o nível de exposição às endotoxinas. **OBJETIVOS:** Avaliar a exposição às endotoxinas, presentes na poeira de laboratórios e biotérios e a sua relação com asma, rinite e atopia apresentadas pelos trabalhadores. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo transversal, realizado na Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (USP-RP) e na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram coletadas amostras de poeira do chão de laboratórios e biotérios que continham rato, camundongo, cobaia, coelho ou hamster; e em laboratórios e salas administrativas que não tinham contato algum com esses animais. As amostras de poeira foram analisadas e a quantidade de endotoxina foi dosada pelo método “*Limulus ameobocyte lysate*” (LAL). Esta quantidade foi relacionada com variáveis clínicas dos trabalhadores destes locais (sintomas, reatividade brônquica, espirometria e testes alérgicos). **RESULTADOS:** Foram coletadas amostras de poeira de 145 locais de trabalho. Destes, 74 (51%) da USP-RP e 71 (49%) da UNICAMP. Noventa e dois (63%) locais de trabalho continham animais de laboratório (57 da USP-RP e 35 da UNICAMP) e 53 não os continham (17 da USP-RP e 36 da UNICAMP). Foram utilizados os dados de 751 trabalhadores, 412 formaram o grupo exposto a animais de laboratório e 339 o grupo não exposto. O grupo exposto a animais de laboratório apresentou maior quantidade de endotoxina, 55 ± 79 UE por mg de poeira, quando comparado com o grupo não exposto, 19 ± 27 UE/mg ($p < 0,001$ pelo teste *t* de Student). Quando estratificada, a quantidade de endotoxina em elevada e baixa quantidade, a alta concentração (acima de 20,4 UE/mg) de endotoxina se associou ao relato de sibilos nos últimos 12 meses. Ou seja, 27% dos trabalhadores expostos a elevadas concentrações relataram sibilos ($p < 0,01$ pelo teste do qui-quadrado). Porém, a quantidade de endotoxina não se associou com sintomas de rinite, com atopia, com o teste de hiperreatividade brônquica positiva. **CONCLUSÃO:** A exposição à endotoxina apresenta efeito no sistema respiratório dos trabalhadores mesmo não tendo se associado à asma. A alta concentração de endotoxina se associou com a presença de sibilos, ou seja, os trabalhadores de biotérios e de laboratórios que tem contato direto com animais de laboratório estão mais susceptíveis a apresentarem sibilos ao longo do ano, sendo necessárias medidas de prevenção para estes trabalhadores.

Palavras-chave: Endotoxina. Asma. Sibilo. Doença ocupacional.

ABSTRACT

FREITAS, A. S. **Endotoxin exposition in workplaces and research association with asthma, allergy and wheezing.** 2014. 105f. Dissertation (Master) - Faculty of the Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2014.

INTRODUCTION: Respiratory diseases are the most common occupational illnesses in industrialized countries and, among them, asthma and allergies are highly prevalent. Respiratory diseases and laboratory animal allergies represent a major occupational illness among technicians, animal caretakers, doctors and scientists whose work requires such exposure. Among particles present on organic dust, endotoxin is the most related to the inflammation which cause a numerous respiratory diseases. Endotoxin from gram-negative bacterias are airborne and found in different concentrations in dust and on the ground of home and rural environment, indoor or outdoor living areas. Exposure to endotoxin is unpreventable, but the degree of exposure may vary. Some studies have shown correlation between workers symptoms with degree of exposure. **AIMS:** Our aim was to evaluate amount of endotoxin exposure in laboratories and animal facilities and to test its association with asthma, rhinitis, and atopy presented by workers. **METHODS:** This is a cross-sectional study performed in the University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto (USP-RP) and in the State University of Campinas (Unicamp). Dust samples were collected from laboratories and animal facilities with rat, mouse, guinea pig, rabbit or hamster. We also sampled workplaces without animals. These samples were analyzed by the method of “*Limulus amoebocyte lysate*” (LAL). The concentration of endotoxin detected in those workplaces were tested for association with symptoms, bronchial hyperresponsiveness, spirometry data and skin prick test results. **RESULTS:** One hundred, forty-five workplaces had their dust sampled: 74 (51%) in USP-RP and 71 (49%) in Unicamp. Among those, 92 (63%) workplaces had laboratory animals (57 in USP-RP and 35 in UNICAMP) and 53 (37%) did not have animals. These workplaces had 751 workers or students, 412 were animal handlers and 339 were non-handlers. Animal handlers workplaces were exposed to higher concentrations of endotoxin 55 ± 79 UE/mg as compared with the non-handlers group 19 ± 27 UE/mg ($p < 0.001$, Students’t test). We divided endotoxin concentration into two levels: high (> 20.4 UE/mg) and low concentration. The high concentration associated with wheezing prevalence, i.e. 27% of animal handlers exposed to high concentration reported wheezing in the last 12 months ($p < 0.001$, chi-squared test). The concentration of endotoxin was not associated with symptoms of rhinitis, atopy or bronchial hyperresponsiveness. **CONCLUSION:** Exposure to endotoxin has effect on workers’ respiratory system, although it is not associated with asthma. Higher endotoxin concentration is associated with wheezing. Therefore, animal handlers are prone to present wheezing and preventive measures are necessary for these workers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Asma – Definição e Epidemiologia.....	19
1.2. Fisiopatologia da asma.....	20
1.3. Asma relacionada ao trabalho.....	21
1.4. Doenças respiratórias e alérgicas relacionadas a animais de laboratório.....	22
1.5. Endotoxinas.....	23
1.6. Exposição a endotoxina.....	24
1.7. Efeitos fisiopatológicos do lipopolissacarídeo.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Desenho do estudo.....	37
4.2. Coleta da poeira e quantificação dos níveis de endotoxina nos ambientes de trabalho.....	38
4.2.1. Coleta de poeira para análise de endotoxinas.....	38
4.2.2. Extração de endotoxina da poeira.....	40
4.2.3. Determinação dos níveis de endotoxina.....	41
4.3. Organização do banco de dados.....	42
4.4. Variáveis do estudo.....	42
4.4.1. Asma de auto-relato.....	42
4.4.2. Asma confirmada.....	43
4.4.3. Sibilos.....	43
4.4.4. Eczema/alergia.....	43
4.4.5. Exposição no passado a animais de laboratório.....	43
4.4.6. Contato com animais de estimação.....	44
4.4.7. Asma Ocupacional.....	44
4.4.8. Rinite.....	44
4.4.9. Alergia ocupacional Respiratória.....	44

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6. RESULTADOS.....	49
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONCLUSÃO.....	75
9. BIBLIOGRAFIA.....	79
ANEXO 1.....	89
ANEXO 2.....	93
APÊNDICE.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do lipopolissacarídeo (LPS).....	23
Figura 2	Fluxograma contendo a distribuição dos locais de trabalho incluídos na pesquisa.....	38
Figura 3	Filtro de polycarbonato, adaptador e mangueira do aspirador de pó.....	39
Figura 4	Coleta de poeira do chão.....	40
Figura 5	Protocolo de extração da poeira de dentro dos filtros para dosagem da endotoxina.....	41
Figura 6	Prevalência de sibilos em ambos os grupos para cada quartil da concentração de endotoxina.....	62
Figura 7	Relação entre animais de laboratório e sibilos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos voluntários.....	52
Tabela 2	Descrição dos trabalhadores expostos e não expostos a animais de laboratórios.....	53
Tabela 3	Descrição dos locais de trabalho.....	54
Tabela 4	Avaliação de fatores de risco para relato de asma.....	55
Tabela 5	Avaliação dos fatores de risco para asma confirmada.....	55
Tabela 6	Avaliação dos fatores de risco para sibilos.....	56
Tabela 7	Avaliação dos fatores de risco para eczema e alergia.....	56
Tabela 8	Avaliação dos fatores de risco para relato de asma pela análise multivariada.....	57
Tabela 9	Avaliação dos fatores de risco para asma confirmada pela análise multivariada.....	58
Tabela 10	Avaliação dos fatores de risco para sibilo pela análise multivariada.....	59
Tabela 11	Avaliação dos fatores de risco para eczema e alergia pela análise multivariada.....	60
Tabela 12	Associação entre sibilo e asma.....	60
Tabela 13	Relação entre sibilo e concentração de endotoxina com e sem diagnóstico de asma associado.....	61
Tabela 14	Dados individuais dos locais de trabalho da Universidade São Paulo – Ribeirão Preto (USP/RP)	99
Tabela 15	Dados individuais dos locais de trabalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas e Técnicas
ART	Asma relacionada ao trabalho
CD14	Marcador de diferenciação celular
CVF	Capacidade vital forçada
ECRHS	“The European Community Respiratory Health Survey”
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPI	Equipamento de proteção individual
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GINA	“Global Initiative for Asthma”
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
KHz	Quilohertz
LAL	“Limulus ameobocyte lysate”
LBP	Proteína plasmática de ligação
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC4	Leucotrienos C4
NF-KB	Fator de Transcrição NF-kappa B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
OVA	Ovalbumina
Pg/ml	Picograma por mililitro
RP	Razão de prevalência
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1 ou Th2	Subgrupo de linfócitos T auxiliares (1 ou 2)
TLR4	Receptor <i>toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UE	Unidades de endotoxina

UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP-RP	Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
NHANES III	“National Health and Nutrition Examination Survey” Terceira fase

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma – Definição e Epidemiologia

Asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiperreatividade brônquica, limitação variável ao fluxo aéreo expiratório e inflamação das vias aéreas, de origem alérgica ou não. A limitação ao fluxo aéreo expiratório pode ser parcial ou completamente reversível, espontaneamente ou com tratamento medicamentoso (GINA, 2011; SCALAN; WILKINS; STOLLER, 2000). O diagnóstico da asma é clínico, mas sempre que possível deve-se fazer a prova de função pulmonar para a confirmação diagnóstica e para a classificação da gravidade da doença. As principais características clínicas são episódios de falta de ar e/ou opressão torácica, principalmente à noite, acompanhado de tosse e a presença de sibilos na ausculta pulmonar. Tais manifestações são facilmente controladas com o tratamento adequado da doença na maioria dos casos (GINA, 2011; SCALAN; WILKINS; STOLLER, 2000).

Os fatores que influenciam o risco de asma podem ser divididos em individuais, como os genéticos, e do meio em que o indivíduo está inserido, como os ambientais e ocupacionais (GINA, 2011).

No estudo realizado por Arif et al. (2003), que analisaram os dados contidos no “*National Health and Nutrition Examination Survey*” (NHANES III), encontrou-se 4,7% de prevalência de asma e 17,5% de prevalência de sibilos na população americana entre 20 e 44 anos. No sexo feminino, a prevalência de asma foi significativamente maior (5,4%, IC95% 4,6-6,2) do que nos homens (3,6%, IC95% 2,8-4,4). Esses dados mostram que a asma aparece mais nas mulheres, o que pode ser justificado, em parte, pelo menor calibre de suas vias aéreas.

A doença é considerada um problema de saúde pública mundial. Estima-se que 300 milhões de indivíduos sejam afetados no mundo pela asma e que sua prevalência mundial esteja entre 1% e 18%, dependendo da população e método diagnóstico empregado (GINA, 2011). Em 2010, o Brasil ocupava a oitava posição mundial em prevalência de asma (em torno de 20%) e, em 2007, foi responsável por uma média de 273 mil internações, gerando um gasto aproximado de R\$ 98,6 milhões para o Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2010).

1.2 Fisiopatologia da asma

A resposta Th2 (subgrupo de linfócitos T auxiliares 2) a aeroalérgenos é considerada ter papel principal no início e desenvolvimento da resposta inflamatória das vias aéreas de asmáticos (KIM et al., 2007). A sequência inflamatória da asma se inicia com as células dendríticas, que são potentes células apresentadoras de antígenos, com a capacidade de migrar rapidamente para linfonodos drenantes. As células dendríticas participam da sensibilização primária e secundária. Durante a resposta primária, as células dendríticas provenientes da medula óssea são atraídas por quimiocinas inflamatórias até os tecidos, onde capturam os antígenos. O reconhecimento do alérgeno constitui um sinal de alerta, que induz a maturação das células dendríticas. Estas atraem e interagem com células T *naive* para induzir uma resposta imunológica primária gerando células Th2 efectoras e células T reguladoras que controlam a síntese de IgE pelos linfócitos B (MURPHY; O'BYRNE, 2010).

A continuação da resposta inflamatória se dá pela ativação dos mastócitos e macrófagos em resposta à ligação dos alérgenos à IgE e pelos linfócitos Th2 que reagem aos alérgenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; BOUSQUET et al., 2000). As células ativadas liberam rapidamente mediadores pró-inflamatórios, tais como a histamina e as espécies reativas de oxigênio, que induzem contração do músculo liso das vias aéreas, secreção de muco e vasodilatação (BOUSQUET et al., 2000). Os mastócitos e linfócitos Th2 produzem diversas citocinas que levam ao recrutamento de eosinófilos, basófilos e mais linfócitos Th2 que produzem mediadores, principalmente leucotrienos C4 (LTC₄), causador da constrição da musculatura lisa das vias aéreas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). A presença de eosinófilos é tão marcante que a asma foi designada de “bronquite crônica descamativa eosinofílica” (MAUAD et al., 1999). O aumento de muco se dá pela ação das citocinas, principalmente interleucina 13 (IL-13) sobre as células epiteliais brônquicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que a asma é uma síndrome complexa e heterogênea, visto que também foram encontradas no soro e nos tecidos pulmonares de pacientes asmáticos, altas quantidades de citocinas Th1 (subgrupo de linfócitos T auxiliares 1) e Interferon gama (IFN- γ), mostrando que na asma não ocorrem somente respostas do tipo Th2, mas também do tipo Th1. Em modelos animais de asma alérgica, tanto a resposta eosinofílica Th2 quanto a não eosinofílica Th1 foram associadas com a hiperreatividade das vias aéreas. Além dessas duas respostas imunológicas, uma nova linhagem de células T-

helper, células Th17 também podem desempenhar importante papel no desenvolvimento de inflamação pulmonar e na hiperreatividade brônquica (ZHU et al., 2010).

1.3 Asma relacionada ao trabalho

Atualmente, as principais doenças ocupacionais são os transtornos mentais e as doenças por esforço repetitivo (Dort), em seguida as afecções respiratórias. Apesar de intensivas medidas preventivas, existem poucas evidências de que as doenças ocupacionais venham declinando em sua prevalência (RACHIOTIS et al., 2007; GOE et al., 2004). A atenção à saúde dos trabalhadores é um campo de múltiplos desafios a todos os indivíduos que se interessaram pelo atendimento ou assistência à população trabalhadora.

A asma relacionada ao trabalho (ART) é considerada a principal doença pulmonar ocupacional em países industrializados, sendo causa freqüente de morbidade e mortalidade (RACHIOTIS et al., 2007; GOE et al., 2004). Diferente das outras formas de asma, ART pode ser evitada, porém existem desafios na prevenção e diagnóstico precoce da doença (HOY, ABRAMSON, SIM, 2010).

A ART engloba a asma ocupacional e a asma agravada pelo trabalho. A primeira pode ser definida como uma obstrução reversível das vias aéreas que é induzida pela exposição ou inalação de um agente presente no ambiente de trabalho (RACHIOTIS et al., 2007); trata-se da asma causada por exposição a uma das muitas substâncias encontradas no ambiente de trabalho (RACHIOTIS et al., 2007). Já na asma agravada pelo trabalho existe a história prévia de asma e, quando o trabalhador é exposto a certos ambientes de trabalho, apresenta piora clínica e/ou funcional (RACHIOTIS et al., 2007; STOUGHTON, PREMATTA, CRAIG, 2008).

Os sensibilizadores da asma ocupacional são geralmente agentes de alto peso molecular (>10 KDa, geralmente uma proteína ou glicopeptídio), que podem causar a produção dos anticorpos IgE específicos, típicos de resposta alérgica. Quando uma pessoa está sensibilizada, uma exposição a baixíssimas quantidades do alérgeno pode desencadear a asma. Os exemplos de agentes de alto peso molecular são farinhas e cereais, proteínas animais, enzimas e proteínas de origem vegetal. Produtos químicos de baixo peso molecular, como por exemplo, poeira da madeira, anidridos ácidos, metais, clorofórmio, aminas, tintas,

corantes, entre outros, também podem causar a sensibilização ocupacional e subsequente asma (TARLO; LEMIERE, 2014).

A asma agravada pelo trabalho é um problema pulmonar ocupacional grave, mas muitas vezes pode ser completamente revertido quando a exposição é reconhecida precocemente e a pessoa se afasta dela. Porém, pode levar à piora da gravidade e irreversibilidade quando o seu reconhecimento é tardio e o tempo de exposição prolongado (GOE et al., 2004). Em uma revisão sistemática realizada por Rachiotis et al. sobre desfecho da asma ocupacional após a cessação da exposição, foi encontrado que um terço dos pacientes com asma ocupacional vai se recuperar plenamente da doença após se afastar completamente do agente sensibilizador (RACHIOTIS et al., 2007).

1.4 Doenças respiratórias e alérgicas relacionadas a animais de laboratório

Doenças respiratórias e alérgicas a animais de laboratório representam a principal doença ocupacional em milhares de técnicos, cuidadores de animais, médicos e cientistas, cujo trabalho exija tal exposição. Secretárias e pessoal da administração, que trabalham em ambientes no mesmo prédio dos laboratórios e/ou biotérios, também estão sujeitos ao contato com alérgenos carreados por diversos meios, tais como nas roupas, sapatos, transportados pelo ar, entre outros. (MAJEROWICZ, 2003). Alergia a ratos e camundongos é o problema clínico mais comum, principalmente porque estes animais são os mais utilizados em pesquisas experimentais na área biomédica. A produção constante de proteínas eliminadas pela urina, secreções e descamação da pele – que são encontradas em suspensão no ar ou depositadas nos materiais e equipamentos – torna os biotérios um ambiente propício para o desenvolvimento de alergias (BUSH, WOOD, EGGLESTON, 1998; TAYLOR, LONGBOTTOM, PEPYS, 1977). A prevalência estimada de alergia a animais de laboratório nos trabalhadores tem sido descrita em torno de 15 a 30% (RUOPPI et al., 2004).

Segundo Pacheco et al. (2003), cerca de 30% dos tratadores e pesquisadores desenvolvem sensibilização alérgica e doenças respiratórias ocupacionais, devido a manipulação de animais no laboratório. Entretanto, os riscos de sensibilização alérgica não são claramente proporcionais aos gradientes de exposição. Os trabalhadores sensibilizados não foram necessariamente aqueles que receberam a maior exposição. Alguns estudos mostraram que não existe uma relação linear entre o nível de exposição e os sintomas

apresentados pelos trabalhadores de laboratórios (PACHECO et al., 2006; LIU, 2002). De 38 a 67% dos trabalhadores sintomáticos não confirmaram alergia a animais de laboratório pelo teste cutâneo (PACHECO et al., 2003).

Adicionalmente, alguns trabalhadores podem desenvolver sintomas devido à exposição a outros alérgenos/irritantes não identificados ou não medidos, como endotoxina, poeira, produtos de limpeza, exposição não-ocupacional a animais domésticos, que podem confundir a exposição ocupacional a animais (ELLIOTT et al., 2005). Entre os agentes presentes na sujeira orgânica, as endotoxinas são as mais relacionadas às respostas inflamatórias (SPAAN et al., 2007).

1.5 Endotoxinas

Endotoxina é um constituinte da parede celular externa de bactérias gram-negativas. Seu principal componente é o lipopolissacarídeo (LPS), formado por uma porção fosforoglicolipídica (lipídio A) que possui uma ligação covalente a um heteropolissacarídeo hidrofílico, responsável por sua toxicidade (DORESWAMY, PEDEN, 2011; PACHECO et al., 2003; THORNE, 2001) (Figura 1). A porção polissacarídica é altamente variável e são os principais antígenos das bactérias gram-negativas reconhecidos pelo sistema imunológico adquirido (do tipo imunidade humoral) (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008) iniciando uma resposta inflamatória por meio de linfócitos do tipo Th1 com a produção de IFN- γ causando uma infiltração neutrofílica (DORESWAMY, PEDEN, 2011). Já a porção lipídica é altamente preservada e é reconhecida pelo sistema imunológico natural (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

Figura 1: Estrutura química do lipopolissacarídeo (LPS).

Acredita-se que o LPS de diferentes bactérias gram-negativas tenha atividades biológicas similares. O LPS da bactéria *Escherichia coli* é mais comumente estudado sendo que o número de estudos usando LPS de outras bactérias é muito limitado (ZHU, 2010).

1.6 Exposição a endotoxina

As endotoxinas são encontradas em várias concentrações na poeira doméstica rural e urbana, assim como em alguns estabelecimentos ocupacionais como fazendas de gado, laboratórios que trabalham com animais, agricultura de grãos e vegetais, moinhos de serragem e algodão, manufatura de fibra de vidro, entre outros. Trata-se de uma toxina presente em vários ambientes e capaz de afetar um grande número de pessoas (DUNGAN, 2011).

É inevitável a exposição humana à endotoxina, no entanto, o nível da exposição das vias aéreas pode ser muito variado e, presumidamente, correlacionado com a quantidade de endotoxina em partículas respiráveis como na poeira doméstica e na poeira do ar (ZHU, 2010).

A exposição à endotoxina tem sido relacionada à indução de uma série de doenças respiratórias. A exposição aguda a altos níveis de endotoxina desencadeia uma resposta inflamatória pulmonar envolvendo neutrófilos e macrófagos, resultando em sintomas como febre, calafrios e asma (LIAO et al., 2010). Thorne et al. (2005) mostraram que a exposição à endotoxina no ambiente doméstico aumenta significativamente a prevalência de asma em adultos. A endotoxina foi relacionada também com o surgimento da “asma da segunda-feira” dos trabalhadores de algodão, febre úmida, febre dos grãos, pneumonia tóxica e efeitos sistêmicos agudos como indisposição e febre (DUNGAN, 2011). Adultos expostos a elevados níveis de endotoxina na poeira domiciliar (superiores a 11,2 UE/mg de poeira) estão mais susceptíveis à piora na gravidade da asma alérgica e não alérgica e desenvolvimento de asma (MICHEL et al., 1991; 1996; RULLO et al., 2005). Exposições crônicas a baixos níveis de concentração podem causar doenças pulmonares obstrutivas como bronquite e asma (DUNGAN, 2011). Alguns autores mostraram que a exposição a altas concentrações de endotoxina está associada com um risco aumentado de sibilos no primeiro ano de vida (GEHRING et al., 2001; PARK et al., 2001).

Estima-se que apenas 30% da dose inalada de endotoxina cheguem efetivamente nas vias respiratórias inferiores e nas regiões intra-brônquicas, visto que quando o LPS presente

no ar é inalado, uma grande parte é rapidamente eliminada pelo nariz através da ação mucociliar (KIM et al., 2013).

Alguns estudos sugerem que a exposição precoce à endotoxina presente no meio ambiente apresente um efeito protetor no risco de sensibilização atópica em crianças e, possivelmente, também na população trabalhadora exposta a altos níveis de endotoxina (GEHRING et al., 2001; SPAAN et al., 2007; DUNGAN et al., 2011).

Em um estudo multicêntrico, Estudo Internacional de Asma e Alergias na Fase da Infância (ISAAC fase II), realizado com 840 crianças de idade entre 9 e 12 anos em cinco países (Albânia, Itália, Nova Zelândia, Suécia e Reino Unido), foi analisada a associação entre níveis de endotoxina presentes na poeira domiciliar e sintomas respiratórios e atopia nas crianças. Uma análise combinada entre os países mostrou que os níveis de endotoxina da poeira do chão da sala das casas das crianças foram inversamente associados com asma. Associação inversa também foi encontrada entre as concentrações de endotoxina e atopia na análise não ajustada, porém, essa associação não se manteve quando a análise foi ajustada para sexo, alergia nos pais, presença de alérgenos de gato e ácaro na poeira da casa (GEHRING et al., 2008). Outros estudos com resultados semelhantes serão apresentados na Discussão.

A inalação de endotoxina pode exacerbar a obstrução ao fluxo aéreo e a inflamação das vias aéreas em indivíduos com asma alérgica (SCHWARTZ et al., 2001). Vários estudos mostraram a correlação dos sintomas apresentados pelos trabalhadores de laboratórios ou biotérios com o nível de exposição à endotoxina (RUOPPI et al., 2005; PACHECO et al., 2006).

Pesquisadores e técnicos que trabalham com animais de laboratório estão expostos no ambiente de trabalho tanto a alérgenos de animais quanto a endotoxina. Mais de 30% dos trabalhadores e pesquisadores que tem contato com animais de laboratório desenvolvem sensibilização e doenças alérgicas a animais de laboratório (PACHECO et al., 2006). Essa porcentagem é maior nessa população do que as descritas para outras profissões com exposição a proteínas alergênicas como padeiros e técnicos de prótese dentária. (GAUTRIN et al., 2000). Esses dados, portanto, mostram a importância da endotoxina no ambiente de trabalho e na gênese de riscos para os trabalhadores. Concluímos que, apesar de se ter descrito diversos efeitos negativos, há também efeitos benéficos da exposição à endotoxina e mais estudos são necessários para seu esclarecimento.

1.7 Efeitos fisiopatológicos do lipopolissacarídeo

Endotoxina, presente na poeira orgânica em suspensão, foi identificada como uma das causas de doenças respiratórias humanas. Endotoxinas inaladas interagem primeiramente com macrófagos através de receptores CD14 e TLR-4 os quais iniciam resposta imune humoral (POMORSKA et al., 2007). Após serem inalados e caírem na circulação, o LPS se liga à proteína plasmática de ligação (LBP), através de sua porção lipídica A (RULLO et al., 2005; LAPA E SILVA et al., 2000) e o complexo (LBP/LPS) se liga ao marcador de diferenciação celular CD14 nos macrófagos e células dendríticas. Os macrófagos, os quais sintetizam e expressam CD14, podem responder a quantidades diminutas de LPS, tão pequenas quanto 10 pg/ml (0,001 UE/ml) e as células com deficiência do marcador de diferenciação celular CD14 não respondem ao LPS. A porção LPS é reconhecida pelo receptor *toll-like 4* (TLR4) e ao se ligarem ativam o fator de transcrição nuclear kappa beta (NF-kappa B), o qual estimula a produção de citocinas, enzimas e outras proteínas envolvidas nas funções antimicrobianas. As citocinas produzidas são: fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12 (IL-12) que ativam as células *Natural Killers* (NK), através da estimulação de interferon gama (IFN- γ), para destruírem os microorganismos que foram fagocitados (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008). Isso resulta em uma resposta do tipo Th1 e infiltração predominante de neutrófilos nas vias aéreas (DORESWAMY; PEDEN, 2011).

O estudo de Eisenbarth et al. (2002) testou se baixas doses de LPS (0,1 μ g) induziriam uma resposta imunológica do tipo Th2 e altas doses de LPS (100 μ g) induziriam uma resposta Th1. Para isso, um modelo animal de asma foi preparado pela sensibilização das vias aéreas com diferentes doses de LPS. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por exposição intranasal a ovalbumina (OVA) contendo quase inexistentes doses de LPS (<0,001 μ g), baixas doses de LPS (0,1 μ g) e altas doses de LPS (100 μ g). Os animais expostos a quantidades de LPS quase inexistentes não apresentaram resposta inflamatória nas vias aéreas e o lavado bronco alveolar foi semelhante ao do controle. Em contra ponto, os camundongos sensibilizados com OVA contendo baixas doses de LPS mostraram aumento significativo no número total de células do lavado bronco alveolar, bem como infiltração do tecido pulmonar e secreção de muco nas vias aéreas. Os infiltrados foram dominados por eosinófilos, mostrando uma inflamação do tipo Th2. O esvaziamento dos linfonodos se associou à produção de interleucinas IL-5 e IL-13, confirmando a natureza da resposta inflamatória do tipo Th2. A exposição intranasal a altas doses de LPS com OVA gerou uma resposta dominada por neutrófilos e ausência de muco nas vias aéreas. A produção de IFN- γ confirma a indução de uma resposta do tipo Th1.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Há estudos demonstrando o potencial tóxico das endotoxinas, ou seja, a capacidade de induzir sintomas em trabalhadores expostos a animais de laboratório. Há também dados que indicam o potencial das endotoxinas na proteção contra o desenvolvimento de sensibilização alérgica. São poucos os trabalhos nacionais que abordam tal tema com metodologia adequada para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle. Inicialmente, é fundamental esclarecer se a exposição à endotoxina é capaz de causar esses sintomas ou preveni-los. É necessário também adicionar conhecimentos sobre métodos de medida de endotoxina, por exemplo, testando a poeira depositada no chão em diferentes locais de trabalho.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral é compreender o papel das endotoxinas no desencadeamento de doenças alérgicas e respiratórias em trabalhadores de biotérios e de laboratórios de pesquisa com animais.

3.2 *Objetivos específicos*

Conhecer as concentrações de endotoxina presentes nos ambientes de trabalho de universidades do interior de São Paulo.

Determinar a correlação entre a quantidade de endotoxina encontrada no ambiente de trabalho e presença de asma, sibilo ou alergia.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional, analítico transversal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da Unicamp cuja metodologia e resultados gerais foram publicados na revista *Clinics* (FERRAZ et al., 2013) (Anexos 1 e 2). Essa dissertação relaciona-se aos dados inéditos (não publicados) sobre endotoxina e sua relação com as variáveis clínicas.

Os grupos foram compostos por voluntários que no trabalho eram expostos a animais de laboratório (grupo exposto) e por voluntários não expostos (grupo controle). Os dados foram coletados no local de trabalho de cada indivíduo no período de 16 de setembro de 2010 a 25 de setembro de 2012 em duas universidades: Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto (USP-RP) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Inicialmente foi feito um levantamento dos laboratórios que trabalham com animais e de seus funcionários ou alunos que tenham contato direto com esses animais, assim como dos laboratórios do grupo controle. Após esse levantamento, cada indivíduo foi abordado e foram oferecidas explicações sobre o estudo, seus riscos e benefícios. Para aqueles que concordaram em participar, foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Esses voluntários responderam ao questionário de sintomas respiratórios *The European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS), já traduzido e validado no Brasil por Ribeiro et al. (2007). Também forneceram informações sobre características pessoais (nome, data de nascimento, gênero), características do trabalho (data de início do trabalho, tipo de trabalho, número e espécies de animais que tem contato, tempo de exposição aos animais no trabalho), doenças já existentes e sintomas de doenças respiratórias relacionadas ao trabalho (aperto no peito, chiado, dificuldade de respirar, tosse, coceira nos olhos e nariz, coriza, nariz entupido, coceira na pele). Os voluntários se submeteram a espirometria, medida do pico de fluxo nasal, teste cutâneo de hipersensibilidade imediata por punção e teste de broncoprovocação com manitol. A aplicação dos questionários, assim como dos testes foi feito sempre pela mesma pessoa, devidamente treinada. Esses procedimentos foram realizados às quartas, quintas e sextas-feiras, permitindo

assim que os testes de função pulmonar atuassem como um possível indicador dos efeitos da exposição no trabalho ao longo da semana.

Foram coletadas amostras de poeira do chão de 92 laboratórios e/ou biotérios que tinham em sua rotina a presença de animais (rato, camundongo, cobaia, coelho ou hamster). Destes, 57 foram no campus USP-RP e 35 no campus da Unicamp. Outras 53 amostras de poeira foram coletadas de laboratórios e salas administrativas que não tinham contato algum com animais de laboratório e que também não se localizavam em proximidade a locais que possuíam estes animais. Destas, 17 foram colhidas no campus USP-RP e 36 no campus da Unicamp (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma contendo a distribuição dos locais de trabalho incluídos na pesquisa.

4.2 Coleta da poeira e quantificação dos níveis de endotoxina nos ambientes de trabalho

4.2.1 Coleta de poeira para análise de endotoxinas

As amostras de poeira do chão de laboratórios e biotérios foram coletadas em filtro especial (filtros de polycarbonato, 25 mm de diâmetro, com poros de 1 μ m, Whatman),

acoplado a um “*filter holder*” e adaptado na extremidade do tubo do aspirador de pó de uso doméstico (Arno Nitro, São Paulo, Brasil) (Figura 3). Seguindo os estudos de RULLO et al., (2005) e SCHRAM et al., (2005), uma área de 1 m² da superfície do chão foi aspirada durante 2 minutos e esse procedimento foi repetido, caso fosse necessário, para que se obtivesse o mínimo de ¼ do filtro preenchido por poeira. Para facilitar a coleta, foi criada uma moldura de área 0,25 m² e a utilizamos, realizando 4 coletas de uma área de 0,25 m² durante 30 segundos, totalizando 1 m² em 2 minutos (Figura 4). A área coletada foi preferencialmente o canto de 2 paredes e próxima ao rodapé de cada sala ou laboratório, caso o ambiente fosse dividido em duas áreas distintas, amostras de poeira foram coletadas de ambas as áreas para uma melhor representatividade do ambiente. A cada amostra, eram trocados os filtros e o “*filter holder*”. As amostras eram removidas do aspirados de pó e colocadas em sacos plásticos distintos.

Os filtros, contendo a poeira coletada, foram pesados e armazenados em geladeira à temperatura de 2 a 8°C até o momento da análise de endotoxinas, que foi realizada em até 30 dias da coleta.

A coleta de poeira não foi controlada pela data de limpeza dos laboratórios, que variava entre limpezas diárias e mensais. Ou seja, as coletas poderiam ser feitas no mesmo dia que foi realizada a limpeza ou em locais que a limpeza foi realizada há alguns dias antes a data da coleta.

Figura 3: Filtro de policarbonato, adaptador e mangueira do aspirador de pó.

Figura 4: Coleta de poeira do chão.

4.2.2 Extração de endotoxina da poeira

No dia da quantificação da endotoxina, os filtros foram alocados individualmente em tubos de polipropileno livre de pirogênio com capacidade de 50 ml (Falcon, Corning, SP, Brasil) contendo 35 ml de solução de água livre de pirogênio e 0,05% Tween 20 (v/v) para extração das endotoxinas (volume suficiente para cobrir toda a quantidade de poeira contida no filtro). Foram submetidos a banho de ultrassom (Ultra Sonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) por 20 minutos à temperatura ambiente e na frequência de 40 KHz (DUNGAN, 2011). Em seguida foram centrifugados por 10 minutos à temperatura ambiente a $991\times g$, pipetado 1 ml do extrato e novamente centrifugados à $1.000\times g$, por 10 minutos à temperatura ambiente, 5 μ l do sobrenadante foram aliquotados. Cada amostra de suspensão foi diluída em 1:50, 1:500, 1:5000 para a dosagem (Figura 5) (NOSS et al., 2008).

Figura 5: Protocolo de extração da poeira de dentro dos filtros para dosagem da endotoxina.

4.2.3 Determinação dos níveis de endotoxina

O método mais utilizado para a determinação quantitativa de endotoxinas em amostras ambientais é o ensaio cromogênico denominado “*Limulus* amebocyte lysate”, ou lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL test, QCL-1000, Bio Whittaker, CAMBREX, Walkersville, MD USA), devido ao seu relativo baixo custo e facilidade de utilização. Este ensaio baseia-se na ativação pela endotoxina de uma cascata enzimática, presente no lisado de amebócitos do caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*), que por sua vez efetua a clivagem de um substrato colorimétrico (DUNGAN, 2011; NOSS et al., 2008).

Todos os procedimentos para a análise propriamente dita foram realizados de acordo com instruções do próprio kit no laboratório de Bioquímica e Imunologia do Prof. Célio Lopes Silva. Foi empregada câmara de fluxo laminar. As amostras de poeira diluídas foram colocadas na placa de 96 poços, sendo que os cinco primeiros poços foram utilizados para se fazer uma curva padrão de endotoxina contendo em cada poço: 1 UE/mL, 0,5 UE/mL, 0,25 UE/mL, 0,1 UE/mL e 0 UE/mL. Em todos os poços da placa (amostras e curva) foram adicionados 50 µl do Lisado Amebócito *Limulus* (LAL) fornecido pelo Kit e a placa foi

incubada a 37°C por 10 minutos. Após esse período foram adicionados 100 µl do substrato cromogênico em todos os poços, homogeneizado e incubado por 6 minutos a 37 °C. A reação foi então interrompida com 100 µl de um reagente de parada.

As amostras contendo endotoxina ficaram com uma coloração amarelada. Foi feita a leitura da placa em espectrofotômetro a 405 nm.

Níveis de endotoxina foram expressos em unidade de endotoxina (UE) por m² do chão dos laboratórios e biotérios. As concentração de endotoxina foram expressas em unidades de endotoxina por grama de poeira (UE/mg) e também divididas na mediana: baixas concentrações de endotoxina ($\leq 20,4$ UE/mg) e altas concentrações de endotoxina ($>20,4$ UE/mg).

4.3 Organização do banco de dados

Os questionários foram codificados e as respostas digitadas em computador por pessoal treinado. Toda a informação digitada foi checada por outro pesquisador da equipe, ou seja, dupla checagem. Essa base de dados foi criada no programa Microsoft Office Excel 2007. Constou de 14 variáveis categóricas, que foram: instituição (USP e Unicamp), grupo (exposto e não exposto), endotoxina (dividida na mediana em baixa $\leq 20,4$ e elevada $>20,4$), função (técnicos/administradores, alunos e nível superior), endotoxina (alta e baixa), gênero (feminino e masculino), asma de auto relato (sim e não), asma confirmada (sim e não), sibilo (sim e não), eczema/alergia (sim e não), rinite (sim e não), exposição no passado a animais de laboratório (sim e não), animais de estimação (sim e não) e asma relacionada ao trabalho (sim e não). E uma variável contínua: idade.

4.4 Variáveis do estudo

4.4.1 Asma de auto-relato

Asma foi reportada por questionário, onde indivíduos responderam a seguinte pergunta:

Você tem ou teve asma?

Possíveis respostas: () Sim () Não () Não sabe () Perdida

4.4.2 Asma confirmada

Asma foi definida por dois componentes principais da doença: presença de hiperreatividade brônquica e de pelo menos um dos sintomas (sibilos, sensação de aperto no peito durante a noite, falta de ar durante o dia ou à noite nos últimos 12 meses).

4.4.3 Sibilo

Sibilo foi definido pela seguinte pergunta:

Você teve chiados ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses?

Possíveis respostas: () Sim () Não () Não sabe () Perdida

4.4.4 Eczema/alergia

Eczema/alergia foi definido pela seguinte pergunta:

Já teve alguma vez eczema ou outro tipo de alergia de pele

Possíveis respostas: () Sim () Não () Não sabe () Perdida

4.4.5 Exposição no passado a animais de laboratório

Exposição prévia a animais de laboratório foi detectada pela seguinte questão:

No passado, você trabalhou ou estudou em locais com animais (laboratórios ou biotérios)?

Possíveis respostas: ()Sim ()Não ()Não sabe ()Perdida

4.4.6 Contato com animais de estimação

Contato com animais de estimação foi definido pela seguinte questão:

Você tem ou teve no último ano animais de estimação em casa?

Possíveis respostas: ()Sim ()Não ()Não sabe ()Perdida

4.4.7 Asma Ocupacional

Sensibilização a pelo menos um alérgeno ocupacional e a presença de asma foi definida por dois componentes principais da doença: presença de hiperreatividade brônquica e de pelo menos um dos sintomas (sibilos, sensação de aperto no peito durante a noite, falta de ar durante o dia ou à noite nos últimos 12 meses).

4.4.8 Rinite

Resposta positiva a seguinte questão:

Você teve secreção nasal ou nariz entupido sem estar resfriado nos últimos 12 meses?

Possíveis respostas: ()Sim ()Não ()Não sabe ()Perdida

4.4.9 Alergia ocupacional Respiratória

Sensibilização a pelo menos 1 alérgeno ocupacional e um dos seguintes diagnósticos: asma e/ou rinite e/ou hiperreatividade brônquica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio da empresa estatística PROESTAT. Estatísticas descritivas foram usadas para os dados demográficos e individuais expostos em tabelas de distribuição de frequências. Testes univariados (teste de qui quadrado e de Fisher) e análise multivariada foram utilizados para determinar se os grupos são significativamente diferentes. Ênfase foi dada para a comparação dos níveis de endotoxina entre locais de trabalho dos grupos. Testes de correlação de Pearson foram empregados para pesquisa de correlação entre os níveis de endotoxina e os resultados das variáveis clínicas (reatividade brônquica, espirometria e testes alérgicos). Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo programa STATA (Stata Corp., 2008, Stata Statistical Software: Release 10.0, College Station, Texas, EUA). Para estimar a razão de prevalência foi utilizado o modelo de regressão log-binomial simples e múltiplo (SKOV et al., 1998), dado que a resposta era binária (Doença = Sim ou Não). O ajuste do modelo foi feito através do procedimento PROC GENMOD do software SAS versão 9.1.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Foram utilizados os dados de 751 trabalhadores, 412 do grupo exposto e 339 do grupo não exposto a animais de laboratório. Ambos os grupos foram semelhantes quanto a idade, escolaridade, tabagismo e exposição a animais domésticos (Tabela 1). Foi encontrado predomínio do sexo feminino em ambos os grupos: grupo exposto com 54% do sexo feminino e grupo não exposto com 66% ($p < 0,001$). A média de idades dos trabalhadores foi de 33 anos (desvio padrão de 10 anos) e foi semelhante entre os grupos ($p = 0,14$). Quanto ao teste de espirometria, 95% dos indivíduos apresentaram espirometria normal, 1% dos indivíduos apresentaram padrão obstrutivo e 3% apresentaram resultado compatível com padrão restritivo, porém este só poderia ser confirmado pela espirometria com medida de volumes, que não foi realizada no estudo.

Amostras de poeira foram coletadas de 145 locais de trabalho, dos quais 92 (63%) foram do grupo exposto e 53 (37%) do grupo não exposto a animais de laboratório. A quantidade de poeira coletada foi (média $\pm$ d.p.) de $0,234 \pm 0,345$ g/m² e a quantidade de endotoxina dosada foi 53 ± 132 UE/mg poeira (Tabelas 2 e 3). A média de endotoxina foi maior no grupo exposto a animais de laboratório 55 ± 79 UE/mg poeira do que no grupo não exposto 19 ± 27 UE/mg poeira ($p < 0,001$).

Foi testada a correlação entre as quantidades de poeira e os sintomas de asma, alergia e sibilo, porém não foi encontrada associação e por isso os resultados não foram expostos aqui.

No grupo exposto a animais de laboratório, 168 (70%) trabalhadores relataram ter tido exposição anterior a animais de laboratório enquanto que no grupo não exposto apenas 30% relataram a exposição ($p < 0,001$). Asma relacionada ao trabalho também foi mais encontrada no grupo exposto (12 versus 1) ($p = 0,008$).

Nos locais de trabalho do grupo exposto, altas dosagens de endotoxina ($> 20,4$ UE/mg poeira, ou seja, valores acima da mediana) foram encontradas no ambientes com ratos (79% dos locais), enquanto que nos ambientes com camundongos apenas 27% dos locais apresentaram altas dosagens de endotoxina ($p \leq 0,001$).

Tabela 1: Características dos voluntários.

Característica da amostra	N = Indivíduos
n/total (%)	751
Idade (anos), média $\pm$ d.p.	33 $\pm$ 10
Gênero - n (%)	
Masculino	305 (41%)
Feminino	446 (59%)
Teste cutâneo - n (% de positivos)	
Inalantes comuns (ácaros, baratas, fungos, gramas, epitélios de cachorro e gato) – para $\geq$ 1 positivo	333 (44%)
Inalantes ocupacionais (rato, coelho, cobaia, hamster e camundongo) – para $\geq$ 1 positivo	77 (10%)
Espirometria - n (%)	
Padrão normal	712 (95%)
Padrão obstrutivo	8 (1%)
Compatível com padrão restritivo	26 (3%)
Teste de broncoprovocação com manitol	
Testes positivos - n (%)	95 (13%)
Testes negativos - n (%)	640 (85%)

O total dos casos pode variar devido falta de dados (*missings*).

Tabela 2: Descrição dos trabalhadores expostos e não expostos a animais de laboratórios.

Variáveis	Total N = 751	Expostos N = 412	Não expostos N = 339	Valor de p
Locais de trabalho	145	92	53	
Trabalhadores	751	412	339	
Instituição				
USP-RP	376	235	141	
UNICAMP	375	177	198	
Idade (anos)	33 ± 10	32 ± 10	33 ± 10	0,14
Gênero – n (%)				
Feminino	446 (59%)	221 (54%)	225 (66%)	< 0,001*
Masculino	305 (41%)	191 (46%)	114 (34%)	
Poeira (g/m²)	0,228 ± 0,307	0,222 ± 0,352	0,233 ± 0,241	0,63
Endotoxina (UE/mg poeira)	38 ± 64	55 ± 79	19 ± 27	< 0,001*
Exposição no passado a animais de laboratório	240 (32%)	168 (70%)	72 (30%)	< 0,001*
Animais de estimação	485 (64,6%)	258 (53,2%)	227 (46,8%)	0,22
Função dos trabalhadores:				
Técnicos/ administrativos	326 (43,4%)	140 (34,0%)	186 (54,9%)	< 0,001*
Alunos	360 (48,0%)	240 (58,2%)	120 (35,4%)	
Nível superior	65 (8,6%)	32 (7,8%)	33 (9,7%)	
Diagnósticos ou sintomas:				
Relato de asma	88 (12,0%)	48 (11,6%)	40 (11,8%)	1,00
Asma confirmada	73 (10%)	42 (10%)	31 (9%)	0,71
Asma relacionada ao trabalho	13 (1,7%)	12 (3,0%)	1 (0,3%)	0,008*
Sibilo	163 (21,7%)	96 (23,3%)	67 (19,7%)	0,24
Rinite	429 (57,0%)	237 (57,5%)	192 (56,6%)	0,51
Eczema e alergia	242 (32,2%)	143 (34,7%)	99 (29,2%)	0,23
Alergia ocupacional Respiratório	23 (3%)	19 (5%)	4 (1%)	0,009*
Sensibilização comum	333 (44,3%)	176 (42,7%)	157 (46,3%)	0,30
Sensibilização ocupacional	77 (10,2%)	68 (16,5%)	9 (2,6%)	< 0,001*
Hiperreatividade brônquica	95 (12,6%)	57 (13,8%)	38 (11,2%)	0,37

Dados estão expressos como média ± d.p. ou número de casos (prevalência).

O total dos casos pode variar devido falta de dados (*missings*).

* $P \leq 0,05$ (teste qui-quadrado ou teste t de Student não pareado bicaudado).

UE: Unidades de endotoxina

Relato de asma: resposta positiva à pergunta se tem ou já teve asma.

Asma diagnosticada: hiperreatividade brônquica com sintomas de sibilos, ou aperto no peito a noite, ou dispnéia durante o dia, ou à noite nos últimos 12 meses.

Asma ocupacional: sensibilização a pelo menos 1 alérgeno ocupacional, asma como definida acima, sendo os sintomas no trabalho.

Sibilo: Resposta positiva se tem ou teve chiado ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses.

Rinite: secreção nasal ou nariz entupido sem estar resfriado nos últimos 12 meses.

Eczema e alergia: sintomas de vermelhidão e irritação de pele alguma vez na vida.

Alergia ocupacional Respiratória: sensibilização a pelo menos 1 alérgeno ocupacional e um dos seguintes diagnósticos: asma e/ou rinite e/ou hiperreatividade brônquica.

Alérgenos comuns: ácaros, gato, cachorro, insetos, fungos e gramíneas.

Alérgenos ocupacionais: rato, hamster, coelho, cobaia e camundongo.

Tabela 3: Descrição dos locais de trabalho.

Variáveis	Ambos os grupos N = 145	Contém animais de laboratório N = 92	Não os contém N = 53	Valor de p
Locais de trabalho	145	92 (63%)	53(37%)	
Instituição:				
USP-RP	74 (51%)	57 (77%)	17 (23%)	< 0,001*
UNICAMP	71 (49%)	35 (49%)	36 (51%)	
Quantidade de poeira (g/m²)	0,234 ± 0,345	0,237 ± 0,371	0,227 ± 0,296	0,86
Quantidade de endotoxina (UE/mg poeira)	45 ± 99	59 ± 120	20 ± 26	< 0,001*
Endotoxina por instituição (UE/mg poeira):				0,17
USP-RP	45 ± 125	71 ± 140	24 ± 27	0,13
UNICAMP	49 ± 57	39 ± 76	17 ± 25	

Dados estão expressos como média ± d.p. ou número de casos (prevalência).

* P ≤ 0,05 (teste qui-quadrado).

UE: Unidades de endotoxina

Nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 estão apresentados os fatores de risco para relato de asma, asma confirmada, sibilo e eczema/alergia. Os trabalhadores com nível superior foram os que menos apresentaram relato de asma no questionário. Não foram encontrados outros fatores de risco para relato de asma e para asma confirmada.

Noventa e cinco (27%) dos trabalhadores exposto a quantidades elevadas de endotoxina (> 20,4 UE/mg poeira) relataram sibilos (p < 0,01). Dos trabalhadores que tiveram contato com animais em emprego prévio, 63 (28%) também relataram sibilo (p = 0,05), assim como 117 (26%) dos que tinham animais de estimação (p = 0,02).

Dos trabalhadores que relataram ter eczema e alergia, 193 (58%) eram alunos (p < 0,01) e 230 (56%) eram do sexo feminino (p < 0,01).

Tabela 4: Avaliação de fatores de risco para relato de asma.

	Relato de asma		Valor de p
	Sim	Não	
Total de casos (751)	88 (12%)	634 (88%)	
Grupo exposto (n=396)	48 (12%)	348 (88%)	0,95
Trabalhadores com nível superior (n=63)	1 (2%)	62 (98%)	0,02*
Endotoxina elevada (n=355)	43 (12%)	312 (88%)	0,95
Gênero feminino (n=433)	55 (13%)	378 (87%)	0,61
Exposição no passado (n=230)	35 (15%)	195 (85%)	0,09
Animais de estimação (n=468)	61 (13%)	407 (87%)	0,35

O número de casos pode variar devido falta de dados (*missings*).

* $P \leq 0,05$ (teste qui-quadrado).

*Trabalhadores com nível superior comparado com as categorias alunos e técnicos/administrativo.

Endotoxina elevada: > 20,4 UE/mg poeira.

Relato de asma: resposta afirmativa à questão sobre “ter ou ter tido asma”.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Tabela 5: Avaliação dos fatores de risco para asma confirmada.

	Asma confirmada		P
	Sim	Não	
Total de casos (751)	73 (10%)	678 (90%)	
Grupo exposto (n=412)	42 (10%)	370 (90%)	0,63
Trabalhadores com nível superior (n=65)	4 (6%)	61 (94%)	0,46
Endotoxina elevada (n=371)	40 (11%)	331 (89%)	0,33
Gênero feminino (n=446)	49 (11%)	397 (89%)	0,16
Exposição no passado (n=240)	28 (12%)	212 (88%)	0,22
Animais de estimação (n=485)	50 (10%)	435 (90%)	0,46

O número de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $p \leq 0,05$ (teste qui-quadrado).

Trabalhadores com nível superior comparado com as categorias alunos e técnicos/administrativo.

Endotoxina elevada: > 20,4 UE/mg poeira.

Asma confirmada: hiperreatividade presente e associada a sintomas de asma.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Tabela 6: Avaliação de fatores de risco para sibilos.

	Sibilos		p
	Sim	Não	
Total de casos (701)	163 (23%)	538 (77%)	
Grupo exposto (n=384)	96 (25%)	288 (75%)	0,23
Trabalhadores com nível superior (n=64)	10 (16%)	54 (84%)	0,13
Endotoxina elevada (n=346)	95 (27%)	251 (73%)	< 0,01*
Gênero feminino (n=420)	100 (24%)	320 (76%)	0,67
Exposição no passado (n=227)	63 (28%)	164 (72%)	0,05*
Animais de estimação (n=451)	117 (26%)	334 (74%)	0,02*

O numero de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $p \leq 0,05$ (teste qui-quadrado).

Trabalhadores com nível superior comparado com as categorias alunos e técnicos/administrativo.

Endotoxina elevada: > 20,4 UE/mg poeira.

Sibilo: Resposta positiva se tem ou teve chiado ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Tabela 7: Avaliação de fatores de risco para eczema e alergia.

	Eczema e alergia		p
	Sim	Não	
Total de casos (689)	334 (49%)	355 (51%)	
Grupo exposto (n=383)	193 (50%)	190 (50%)	0,26
Alunos (n=334)	193 (58%)	141 (42%)	< 0,01*
Endotoxina elevada (n=341)	173 (51%)	168 (49%)	0,24
Gênero feminino (n=412)	230 (56%)	182 (44%)	< 0,01*
Exposição no passado (n=223)	117 (53%)	106 (47%)	0,14
Animais de estimação (n=442)	214 (48%)	228 (52%)	0,97

O numero de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $p \leq 0,05$ (teste qui-quadrado).

Trabalhadores com nível superior comparado com as categorias alunos e técnicos/administrativo.

Endotoxina elevada: > 20,4 UE/mg poeira.

Eczema e alergia: sintomas de vermelhidão e irritação de pele alguma vez na vida.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Estão apresentados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11 os resultados das análises univariada (modelo bruto) e multivariada (modelo ajustado) das variáveis independentes (grupo, quantidade de endotoxina, instituição, gênero, exposição no passado a animais, animais de

estimação, idade e função dos trabalhadores) e variáveis dependentes (relato de asma, asma confirmada, sibilo e eczema/alergia).

Os trabalhadores com nível superior têm menor chance de relatar asma quando comparados com os técnicos, pessoal do administrativo e com os alunos. Na análise para asma confirmada, conforme a idade aumenta, as chances de ter a doença diminuem. Já a exposição a elevadas concentrações de endotoxina e a presença de animais de estimação aumenta as chances de o trabalhador ter sibilos, mas o aumento da idade mostrou-se como fator de proteção contra o aparecimento de sibilos. Ser do sexo feminino também aumenta as chances do trabalhador ter eczema e alergia.

Tabela 8: Avaliação dos fatores de risco para relato de asma pela análise multivariada.

		Relato de asma							
Variáveis	Categorias (Referência: 2ª categoria)	Modelo Bruto				Modelo Ajustado			
		RP	IC 95%		P-valor	RP	IC 95%		P-valor
Grupo	Exposto vs controle	0,99	0,67	1,47	0,96	0,93	0,61	1,42	0,73
Quantidade de endotoxina	Elevada vs Baixa	0,99	0,67	1,47	0,96	0,93	0,62	1,41	0,74
Instituição	Unicamp vs USP	1,01	0,68	1,49	0,96	1,13	0,76	1,69	0,54
Gênero	Feminino vs Masculino	1,11	0,74	1,67	0,60	1,10	0,73	1,68	0,64
Exposição no passado	Sim vs Não	1,41	0,95	2,10	0,09	1,44	0,96	2,16	0,08
Animais de estimação	Sim vs Não	1,23	0,80	1,88	0,34	1,29	0,84	1,99	0,24
Idade	Contínua	0,99	0,97	1,01	0,25	1,00	0,98	1,02	0,98
Função dos trabalhadores	Técnico/administrativos vs Nível superior	7,65	1,07	54,69	0,04*	8,58	1,19	62,0	0,03*
	Alunos vs Nível superior	8,95	1,26	63,62	0,03*	9,88	1,34	72,8	0,02*

O número de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $P \leq 0,05$

RP: Razão de Prevalência

IC: Intervalo de Confiança

Endotoxina baixa: $\leq 20,4$ UE/mg poeira

Endotoxina elevada: $> 20,4$ UE/mg poeira.

Relato de asma: resposta positiva à pergunta se tem ou já teve asma.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Tabela 9: Avaliação dos fatores de risco para asma confirmada pela análise multivariada.

Asma confirmada									
Variáveis	Categorias (Referência: 2ª categoria)	Modelo Bruto				Modelo Ajustado			
		RP	IC 95%		P-valor	RP	IC 95%		P-valor
Grupo	Exposto vs controle	1,12	0,72	1,74	0,62	1,09	0,67	1,77	0,72
Quantidade de endotoxina	Elevada vs Baixa	1,24	0,80	1,93	0,33	1,19	0,75	1,89	0,46
Instituição	Unicamp vs USP	1,35	0,87	2,11	0,18	1,35	0,86	2,14	0,20
Gênero	Feminino vs Masculino	1,40	0,88	2,23	0,16	1,39	0,86	2,23	0,17
Exposição no passado	Sim vs Não	1,32	0,85	2,07	0,22	1,36	0,86	2,15	0,19
Animais de estimação	Sim vs Não	1,19	0,75	1,91	0,46	1,17	0,73	1,89	0,51
Idade	Contínua	0,97	0,94	0,99	<0,01*	0,97	0,94	1,00	0,03*
Função dos trabalhadores	Técnico/administrativos vs nível superior	1,50	0,55	4,10	0,43	1,58	0,56	4,49	0,39
	Alunos vs nível superior	1,77	0,65	4,77	0,26	1,29	0,45	3,75	0,64

O numero de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $P \leq 0,05$

RP: Razão de Prevalência

IC: Intervalo de Confiança

Endotoxina baixa: $\leq 20,4$ UE/mg poeira

Endotoxina elevada: $> 20,4$ UE/mg poeira.

Asma Confirmada: hiperreatividade brônquica com sintomas de sibilos, ou aperto no peito a noite, ou dispnéia durante o dia, ou à noite nos últimos 12 meses.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Tabela 10: Avaliação dos fatores de risco para sibilo pela análise multivariada.

		Sibilo							
Variáveis	Categorias (Referência: 2ª categoria)	Modelo Bruto				Modelo Ajustado			
		RP	IC 95%		P-valor	RP	IC 95%		P-valor
Grupo	Exposto vs controle	1,19	0,90	1,56	0,22	0,99	0,74	1,33	0,97
Quantidade de endotoxina	Elevada vs Baixa	1,44	1,09	1,89	<0,01*	1,40	1,06	1,86	0,02*
Instituição	Unicamp vs USP	0,95	0,73	1,25	0,73	0,92	0,70	1,21	0,57
Gênero	Feminino vs Masculino	1,06	0,81	1,40	0,66	1,05	0,80	1,39	0,71
Exposição no passado	Sim vs Não	1,31	1,00	1,72	0,05	1,31	0,99	1,73	0,05
Animais de estimação	Sim vs Não	1,41	1,04	1,92	0,03*	1,49	1,10	2,02	0,01*
Idade	Contínua	0,97	0,96	0,99	<0,01*	0,97	0,96	0,99	<0,01*
Função dos trabalhadores	Técnico/administrativos vs Nível superior	1,39	0,76	2,55	0,29	1,24	0,66	2,33	0,50
	Alunos vs nível superior	1,68	0,92	3,05	0,09	1,13	0,59	2,16	0,71

O numero de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $P \leq 0,05$

RP: Razão de Prevalência

IC: Intervalo de Confiança

Endotoxina baixa: $\leq 20,4$ UE/mg poeira

Endotoxina elevada: $> 20,4$ UE/mg poeira.

Sibilo: Resposta positiva se tem ou teve chiado ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Tabela 11: Avaliação dos fatores de risco para eczema e alergia pela análise multivariada.

Eczema e alergia									
Variáveis	Categorias (Referência: 2ª categoria)	Modelo Bruto				Modelo Ajustado			
		RP	IC 95%		P-valor	RP	IC 95%		P-valor
Grupo	Exposto vs controle	1,09	0,93	1,28	0,28	1,01	0,86	1,20	0,89
Quantidade de endotoxina	Elevada vs Baixa	1,09	0,94	1,28	0,26	1,01	0,87	1,18	0,87
Instituição	Unicamp vs USP	0,88	0,75	1,03	0,11	0,89	0,76	1,04	0,13
Gênero	Feminino vs Masculino	1,48	1,25	1,77	<0,01*	1,42	1,19	1,69	<0,01*
Exposição no passado	Sim vs Não	1,13	0,96	1,32	0,13	1,05	0,90	1,22	0,56
Animais de estimação	Sim vs Não	0,99	0,85	1,17	0,94	1,08	0,92	1,26	0,34
Idade	Contínua	1,00	0,99	1,00	0,29	1,01	1,00	1,02	0,11
Função dos trabalhadores	Técnico/administrativos vs Nível superior	0,87	0,64	1,19	0,38	0,90	0,66	1,24	0,53
	Alunos vs nível superior	1,30	0,97	1,74	0,08	1,38	1,00	1,91	0,05

O número de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

* $P \leq 0,05$

RP: Razão de Prevalência

IC: Intervalo de Confiança

Endotoxina baixa: $\leq 20,4$ UE/mg poeira

Endotoxina elevada: $> 20,4$ UE/mg poeira.

Eczema e alergia: sintomas de vermelhidão e irritação de pele alguma vez na vida.

Exposição no passado: exposição a animais de laboratório em empregos prévios.

Dos trabalhadores que relataram asma no questionário 62 (72%) também relataram sibilo ($p \leq 0,01$) e dos trabalhadores com asma confirmada 64 (91%) também relataram sibilo ($p \leq 0,01$), conforme Tabela 12.

Tabela 12: Associação entre sibilo e asma.

	Sibilo		
	Sim	Não	p
Relato de asma (n=86)	62 (72%)	24 (28%)	$\leq 0,01$
Asma Confirmada (n=70)	64 (91%)	6 (9%)	$\leq 0,01$

Relato de asma: resposta positiva à pergunta se tem ou já teve asma.

Asma diagnosticada: hiperreatividade brônquica com sintomas de sibilos, ou aperto no peito a noite, ou dispnéia durante o dia, ou à noite nos últimos 12 meses.

Sibilo: Resposta positiva se tem ou teve chiado ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses.

Na Tabela 13, selecionamos os indivíduos que relataram sibilo e que apresentaram ou não asma (relatada ou confirmada pela BHR). Podemos notar que somente os casos de sibilo excluindo auto relato de asma e excluindo asma confirmada se associaram às elevadas concentrações de endotoxina ($> 20,4$ UE/mg).

Tabela 13: Relação entre sibilo e concentração de endotoxina com e sem diagnostico de asma associado.

Sintomas respiratórios	Endotoxina		p
	Baixa ($\leq 20,4$ UE/mg poeira)	Elevada ($> 20,4$ UE/mg poeira)	
Relato de asma e sibilo (n=62/734)	32 (52%)	30 (48%)	0,914
Asma confirmada e sibilo (n=64/741)	28 (44%)	36 (56%)	0,145
Relato de asma e asma confirmada e sibilo (n=43/734)	19 (44%)	24 (56%)	0,250
Sibilo excluído relato de asma e asma confirmada (n= 80/734)	27 (34%)	53 (66%)	0,001

O número de casos pode variar devido a falta de dados (*missings*).

Relato de asma: resposta positiva à pergunta se tem ou já teve asma.

Asma diagnosticada: hiperreatividade brônquica com sintomas de sibilos, ou aperto no peito a noite, ou dispnéia durante o dia, ou à noite nos últimos 12 meses.

Sibilo: Resposta positiva se tem ou teve chiado ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses.

Encontramos associação entre altas concentrações de endotoxina (> 20.4 EU/mg) e prevalência de relato de sibilo. O relato de sibilo aumenta conforme a concentração de endotoxina no grupo exposto a animais de laboratório (Figura 6).

Figura 6: Prevalencia de sibilo em ambos os grupos para cada quartil da concentração de endotoxina.

* $p < 0.01$ para comparação da prevalência de sibilo entre as concentrações de endotoxina no grupo exposto a animais de laboratório.

Sibilo: Resposta positiva se tem ou teve chiado ou assobios no peito, alguma vez, nos últimos 12 meses.

Concentração de endotoxina: 1º quartil ($\leq 6,6$ UE/mg de poeira); 2º quartil (6,6 a 21,0 UE/mg); 3º quartil (21,0 a 46,0 UE/mg); 4º quartil ($\geq 46,0$ UE/mg).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A presença de endotoxina em vários ambientes (ocupacionais, domiciliares e de convivências) e o seu papel no desenvolvimento de doenças alérgicas e respiratórias em crianças e adultos tem sido alvo de diversos estudos (PACHECO et al., 2003, 2006; 2007; RULLO et al., 2005; LIU et al., 2002; DORESWAMY & PEDEN, 2011), incluindo o presente estudo.

Nossos resultados demonstraram a presença de endotoxina na poeira coletada de ambientes de trabalho que tinham animais de laboratório. Também nos ambientes de trabalho sem animais de laboratório, níveis detectáveis de endotoxina foram encontrados. No entanto, a quantidade de endotoxina foi maior nos locais de trabalho com animais de laboratório, ou seja, detectamos concentração de 59 unidades de endotoxina (UE) por mg de poeira nos ambientes com animais (correspondente ao grupo exposto) e de 20 UE/mg nos ambientes correspondentes ao grupo não exposto a animais de laboratório.

Dentre os locais de trabalho correspondentes ao grupo exposto a animais de laboratório, altas dosagens de endotoxina ($> 20,4$ UE/mg poeira, ou seja, valores acima da mediana) foram encontradas nos ambientes com ratos (79% dos locais). Esses locais demonstram maior frequência de altas concentrações do que em locais com camundongos (27% dos locais, $p \leq 0,001$). Nesse sentido, locais de trabalho do grupo não exposto tiveram baixas dosagens de endotoxina mais frequentemente (66% do grupo não exposto versus 36% do grupo exposto). Isso nos mostra que a presença de endotoxina, assim como a sua quantidade, pode estar associada com a presença de animais nos ambientes e, provavelmente, com a presença de alérgenos animais e outros produtos que podem trazer riscos aos trabalhadores.

Ao estudarmos a relação entre concentrações de endotoxina e a presença de sintomas e doenças respiratórias nos trabalhadores, não encontramos associação com relato de asma dado pelos trabalhadores ao questionário, com asma confirmada e nem com eczema e alergia. Porém, altas concentrações de endotoxina coletadas do chão de laboratórios e biotérios se associaram com relato de sibilo nos últimos 12 meses.

O sibilo é comumente encontrado em pacientes com broncoespasmos e obstrução das vias aéreas, ou seja, é um sintoma e um sinal comum da asma brônquica, assim como de diversas outras moléstias como estenose de traquéia, tumores de vias aéreas centrais, edema pulmonar, aspiração pulmonar, entre outros (BADDINI-MARTINEZ, 2013). Em nosso

estudo, apesar da concentração de endotoxina se associar aos sibilos, não se associou à asma. Isso nos leva a questionar se o sibilo é decorrente de asma ou de outro mecanismo fisiopatológico. A associação entre sibilo e asma, bem conhecida na literatura, foi reconhecida em nosso estudo. O sibilo pode ser uma manifestação inicial de uma asma dependente de endotoxina, mas ainda não diagnosticada como asma (portanto, não relatada) ou asma intermitente, ainda sem hiperreatividade constante. Ou seja, a asma (sibilo e hiperreatividade) seria uma manifestação esporádica e, portanto, a hiperreatividade não seria detectada no dia do exame. Além dessa explicação, o teste com manitol pode apresentar um falso negativo, por ser mais específico, nesses casos de asma leve intermitente, que tem sibilos esporádicos. Então, a asma não seria confirmada pelo exame.

Para ilustrar essa informação sobre a especificidade do teste com manitol, alguns estudos serão mencionados. O teste de broncoprovocação é aplicado para avaliar a reatividade brônquica frente a um estímulo broncoconstritor. Esses estímulos têm sido divididos em direto e indireto. O estímulo direto causa limitação ao fluxo aéreo por ação nas células efetoras envolvidas na limitação do fluxo aéreo, como as células da musculatura lisa. Os estímulos indiretos causam limitação ao fluxo aéreo pela ação em outras células (células inflamatórias e células neuronais) que por sua vez irão interagir com as células efetoras. Dentre os estímulos diretos estão a acetilcolina, metacolina, carbachol, histamina, prostaglandina e leucotrienos. Os estímulos indiretos podem ser farmacológicos (adenosina 5' monofosfato, bradicinina, dióxido de enxofre, metabisulfeto de sódio e propranolol) e físicos (exercícios, solução salina hipo ou hipertônica, manitol, água destilada e hiperventilação isocápnica) (SCHOOR, JOOS, PAUWELS, 2000; ANDERSON et al., 2009).

Os testes com metacolina são apropriados para exclusão de asma na prática clínica, pois possuem uma alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo. Entretanto, esses testes são menos usados para confirmar o diagnóstico em estudos epidemiológicos, devido à sua moderada especificidade e relativamente baixo valor preditivo positivo (FERRAZ et al., 2007; PORSEBJERG et al., 2007).

O teste de broncoprovocação com manitol utilizado em nosso estudo para se identificar hiperreatividade brônquica é um teste indireto que causa uma contração da musculatura lisa pela liberação endógena de leucotrienos, prostaglandinas e histamina. Esse teste tem melhor especificidade para a asma comparada com a metacolina. Segundo o estudo de Porsebjerg et al. (2007), essa diferença de especificidade com o teste de metacolina se deve à ação direta da metacolina em receptores no músculo liso das vias aéreas para causar a constrição (BRANNAN et al., 2005).

Nossos resultados mostraram o aumento no relato de sibilo conforme o aumento da concentração de endotoxina no grupo exposto a animais de laboratório, enquanto no grupo não exposto essa relação não se mostrou. No entanto, fica difícil entender se a endotoxina nos ambientes com a presença de animais de laboratório causa diretamente os sibilos, ou se há alguma interação com outras proteínas alergênicas presentes nestes ambientes (alérgenos de animais) que acarretam no aumento de sibilos. Ou ainda, se estas proteínas alergênicas ou outras são as responsáveis diretas pelo aumento de sibilo e a endotoxina foi apenas um marcador da presença de animais (epifenômeno) (Figura 7).

Figura 7: Relação entre animais de laboratório e sibilos.

Resultados semelhantes aos nossos, quanto à quantidade de endotoxina no ambiente ocupacional, também foram encontrados no estudo de Pacheco et al. (2006). Este estudo foi conduzido em uma instituição de pesquisa biomédica acadêmica, na qual o animal mais utilizado é o camundongo. Os animais são alojados em um biotério, mas podem ser transportados para laboratórios experimentais por todo o campus. Um total de 52 amostras de alérgenos de camundongo e endotoxina foram coletados do ar (aerotransportadas), sendo que 35 amostras foram coletadas próximo ao trabalhador durante a realização dos questionários e 17 amostras do ambiente em um período sem expediente de trabalho. Responderam ao questionário 269 (87%) de 310 técnicos e pesquisadores. No questionário, havia perguntas como: número de horas semanais de trabalho próximo a camundongo e em diferentes funções de trabalho; presença de sintomas quando em contato com os camundongos (coceira, coriza

ou entupimento nasal, espirros, tosse, aperto no peito ou sibilos, respiração curta e lesão cutânea). Os trabalhadores foram divididos de acordo com as tarefas realizadas: tratadores de animais e trabalhadores que auxiliam dentro das instalações dos animais; cientistas e técnicos de pesquisa que realizam pesquisa com camundongos no biotério e em seus laboratórios; pesquisadores que trabalham com camundongo apenas em seus próprios laboratórios e os pesquisadores que não tem contato com animais. Foram comparadas as diferenças de concentração no ar de alérgeno de rato e de endotoxina para diferentes tipos de trabalho.

Maiores quantidades de endotoxina foram encontradas no ar de laboratórios de pesquisa com animal, comparadas às quantidades encontradas em laboratórios que não realizavam pesquisas com animais e nas áreas fora dos biotérios, não utilizadas pelos trabalhadores. Isso sugere que a fonte de endotoxina pode ter sido os camundongos e as gaiolas mantidas nos laboratórios. Amostras de endotoxina aerotransportadas foram detectadas em 100% das amostras recolhidas, enquanto que alérgenos de camundongo foram detectáveis em apenas 70% das amostras, provavelmente porque há outras fontes de endotoxina além dos camundongos.

Dentre as diferenças metodológicas entre nosso estudo e este de Pacheco et al (2006), salienta-se o fato de que eles analisaram a endotoxina presente no ar e o nosso estudo analisou endotoxina presente na poeira depositada no chão dos laboratórios. As duas metodologias, coletas de poeira suspensa no ar e poeira depositada no chão, são eficazes para se detectar a quantidade de endotoxina presente nos ambientes.

Rullo et al. (2005) dosaram a quantidade de endotoxina presente no piso e nas roupas de cama de 104 recém-nascidos matriculados no Programa Einstein na Comunidade de Paraisópolis (PENC-P). Os pais responderam questionários com informações sobre: peso de nascimento, tempo de aleitamento, número de irmãos, ordem de nascimento, padrão alimentar, sintomas respiratórios (frequência, gravidade, tratamento e necessidade de hospitalização), antecedentes alérgicos, exposição ambiental (fumo e animais), intensidade do chiado (quando presente) e medicação empregada no tratamento. Após admissão no estudo, as crianças foram submetidas a exame físico completo e foram acompanhadas. Foram ainda colhidas amostras de poeira do colchão e das roupas de cama, do piso sob a cama, na casa das crianças e na creche. Teste cutâneo de hipersensibilidade imediata foi realizado após um ano de acompanhamento.

Foi colhido um total de 216 amostras de poeira. Por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), foram quantificados alérgenos de ácaros, barata, gato e cão. Pelo método LAL foram determinados os níveis de endotoxina. Participaram do estudo 104 crianças, as quais

foram classificadas como sibilantes recorrentes (acima de duas crises de broncoespasmo no período de 6 meses) e não sibilantes recorrentes.

Os resultados encontrados mostraram que níveis elevados de endotoxina (> 75 UE/mg de poeira) presentes nas roupas de cama foram inversamente proporcionais ao número de crianças que apresentaram sibilos recorrentes (18% sibilaram e 82% não). Pode ser que em recém nascidos expostos a elevados níveis de endotoxina haja um efeito protetor da endotoxina para o surgimento de sibilos.

Em um estudo caso controle realizado por Lawson et al. (2011; 2012), entre 2005 e 2007, foi analisada a relação entre a presença de endotoxina doméstica e asma ou sibilo nas crianças com idades entre 6 e 18 anos da zona rural de Humboldt, Canadá. O grupo casos ($n = 102$) era composto pelas crianças que relataram ter diagnóstico de asma ou sibilo no último ano e o grupo controle ($n = 208$) por crianças sem asma ou sibilo. As crianças foram alocadas nos grupos a partir das respostas ao questionário de triagem feito aos pais das crianças, com perguntas sobre saúde respiratória, questões sócio-demográficas, fatores de saúde geral, história familiar, características do nascimento, estilo de vida, características da habitação e exposição ambiental. Amostras de poeira foram coletadas do chão da sala onde as crianças passam a maior parte do tempo e do colchão da cama das crianças. Níveis mais elevados de endotoxina, na área onde as crianças brincavam, foram associados com a presença de ratos e com história familiar de alergia. Semelhante ao nosso estudo, onde, níveis mais elevados de endotoxina foram encontrados nos ambientes com a presença de rato. Endotoxina encontrada no colchão da cama das crianças com idade entre 6 e 12 anos foi associada com baixo risco de asma e sibilo. Já nas crianças com idade superior a 12 anos e com história pessoal de doenças alérgicas, houve aumento do risco para asma e sibilo associado com a presença de elevadas quantidades de endotoxina no colchão. Isso nos sugere que a exposição a altos níveis de endotoxina no início da vida possui um papel protetor no desenvolvimento de asma e sibilo, enquanto que essa exposição em crianças acima de 12 anos e em adultos pode estar associada com o relato de asma e sibilos.

Estudos semelhantes a esses que avaliaram a faixa etária pediátrica, também foram realizados em trabalhadores e nos seus locais de trabalho. Smit et al. (2010), demonstraram que a exposição à endotoxina no ambiente de trabalho, de fazendeiros e agricultores, se associa com a presença de sibilos ($OR = 1,3$ e $IC = 1,01-1,67$) e hiperreatividade brônquica ($OR = 1,55$ e $IC = 1,03-2,35$). Exposição à endotoxina mostrou ter relação dose-resposta inversa para sensibilização atópica ($OR = 0,67$ e $IC = 0,54-0,84$).

Em 2011, Smit et al., demonstraram que a associação entre a exposição a endotoxina e sibilos em fazendeiros é diferente dependendo do tipo de CD14 (marcador de diferenciação celular que serve de ligação entre o LPS e macrófagos). Os alelos G e T (polimorfismos 21.619 A/G e 2159 C/T, respectivamente) estão associados com níveis circulantes mais elevados de CD14. Enquanto que o alelo T (CD14/2550 T) se associa com níveis mais baixos de CD14 solúvel no plasma (MARTINEZ, 2007; LEVAN et al., 2008; PACHECO et al., 2010). Indivíduos que possuem o alelo CD14/-260 C são mais responsivos a endotoxina do que os que carregam o alelo homozigoto T, até mesmo em elevados níveis ocupacionais. A curva dose-resposta entre indivíduos com CD14/-260 CT e CC mostrou elevada prevalência de sibilos em altos níveis de endotoxina ocupacional. Neste mesmo ano, Pacheco publicou um estudo em concordância com os achados de Smit, porém, com uma população de trabalhadores expostos a animais de laboratório. Trabalhadores com alelo CD14/1619 G e expostos a altas concentrações de endotoxina (quarto quartil) tiveram função pulmonar significativamente menor do que os trabalhadores com a mesma exposição, porém com genótipo AA.

O estudo de Skogstad et al.(2012) analisou os efeitos da exposição à endotoxina bacteriana em 28 trabalhadores de uma fábrica que produzia essa endotoxina. O estudo durou 5 anos, dos quais 4 anos durante o período de exposição e 1 ano após a cessação da exposição. Os valores da capacidade vital forçada (CVF), obtidos pela espirometria, foram significativamente menores nos anos com exposição quando comparados com os valores do ano sem exposição, no grupo exposto a baixos níveis de endotoxina. Para o volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF₁), os valores após cessar exposição (2007) foram significativamente maiores do que durante a exposição (2003 e 2004) no grupo com baixa exposição. Houve também uma associação significativa entre exposição à altas concentrações de endotoxina e o número de leucócitos analisados em exames sanguíneos, sendo que a normalização dos valores de leucócitos foi vista após a cessação da exposição. Esses achados nos mostram uma melhora na função pulmonar de trabalhadores expostos a endotoxina quando essa exposição é interrompida. A inalação de endotoxinas pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica pela ativação de macrófagos e influxo de neutrófilos para o pulmão. Nesse estudo, verificou-se um aumento de IL-6 no ano de 2002 e o aumento associado a endotoxina de leucócitos no sangue e D-dímero foi revertido um ano depois que a fábrica foi fechada. A endotoxina mostrou estar presente no sangue dos trabalhadores e, assim, a estimulação direta de células do sistema imunológico circulatórias parece ser possível.

Consequentemente, ambos os mecanismos podem resultar em um aumento de proteínas de fase aguda.

Do ponto de vista metodológico, cabe mencionar peculiaridades do nosso trabalho como a coleta de poeira do chão dos ambientes. A amostragem de endotoxina da poeira depositada no chão quando comparada com a endotoxina do ar (aerotransportada) traz como vantagem a facilidade da coleta e a padronização da mesma, como descrita no estudo de Schram et al. (2005), ao passo que a amostragem de endotoxina aerotransportada é um procedimento complexo e não existe protocolo padronizado atualmente.

Além disso, um estudo recente de Barnig et al (2012) mostrou que amostras do chão tinham maiores quantidades de endotoxina do que as amostras coletadas do ar. Esse estudo comparou as concentrações de endotoxina coletadas da poeira do chão, do ar e do colchão no interior de casas e fazendas rurais e casas urbanas. As médias das concentrações de endotoxina foram significativamente menores em amostras de poeira do piso da área urbana em relação às fazendas rurais ($p < 0,001$). As concentrações de endotoxina do chão e do colchão na área rural foram maiores nas fazendas do que nas casas rurais, mas esses valores foram semelhantes com os encontrados na área urbana. Não foi encontrada associação entre a quantidade de endotoxina na poeira e no ar em amostras urbanas e rurais. Segundo Attwood et al., 1986¹ apud Barnig et al. (2012) as endotoxinas estão associadas com partículas de grandes dimensões em ambientes agrícolas e por isso não permanecem no ar na ausência de perturbações, o que justifica baixas concentrações de endotoxina encontradas no ar.

Durante o processo de extração da endotoxina dos filtros contendo a poeira, foi feita a adição de 0,05% Tween 20 (v/v) e água apirogênica à amostra de poeira, o que aumenta significativamente a atividade de endotoxina detectável, segundo os estudos de Spaan et al. (2007) e Liebers et al. (2007). Estes últimos autores mostraram que um volume de extração de 10 ml fornece metade da atividade de endotoxina em comparação com 2,5 ou 5 ml. No nosso estudo, utilizamos um volume de 35 ml, ou seja, as amostras de poeira foram mais diluídas antes de ser feita a dosagem de endotoxina, o que não afetou a sua detecção.

O estudo de Spaan et al. (2007) mostrou que ciclos de congelamento e descongelamento da amostra antes da dosagem de endotoxina promove a lise das bactérias e, portanto, mais LPS pode estar disponível para a detecção com o LAL. Uma falha do nosso estudo pode ter sido a de não congelar as amostras de poeira antes da análise e apenas estocá-

¹ ATTWOOD, P. et al. Assessment of dust and endotoxin levels in the working environment of Dutch pig farmers: a preliminary study. *Ann Occup Hyg.* v. 30, p. 201-208. 1986.

las em geladeira a -4°C . No entanto, a quantidade de endotoxina encontrada em nossas amostras não foi menor do que a descrita em estudos que empregaram congelamento e descongelamento.

Acreditamos que, pesquisando os componentes presentes no ambiente ocupacional, no nosso caso especificamente a endotoxina, e seu papel no desencadeamento de doenças alérgicas e respiratórias dos trabalhadores possa ser o primeiro passo para um programa de atenção a saúde desses trabalhadores. Sabendo que a exposição a altas quantidades de endotoxina está associada com maior relato de sibilo nos trabalhadores expostos a animais de laboratório, torna-se necessário pensar em medidas de intervenção para reduzir essa exposição.

Nosso estudo analisou a quantidade de endotoxina e sua relação com achados clínicos dos trabalhadores, não analisamos intervenções para diminuir essa exposição, sendo esta é uma das limitações do nosso estudo e uma das propostas para o futuro. No entanto, nosso grupo pesquisou, por questionários, o uso de medidas para diminuir essa exposição. As perguntas sobre a disponibilidade de máscaras respiratórias, óculos ou viseira de proteção, luvas e calçados apropriados para o local de trabalho, assim como o uso desses equipamentos de proteção individual (EPI) durante o contato com animais mostraram que os equipamentos de proteção individuais mais acessíveis foram luvas (99%) e os menos acessíveis foram sapatos específicos (36%). Dos tratadores de animais, 19% usavam máscaras respiratórias em todos os momentos durante o manuseio dos animais ou quando trabalhavam na sala de animais, somente 7% usavam óculos de proteção e 24% usavam sapatos específicos (FERRAZ et al., 2013).

Estudo realizado por Matsui et al. (2013) empregou coorte prospectiva com 146 crianças (entre 5 e 17 anos) da cidade de Baltimore avaliadas por um ano. Nas crianças, foi realizado teste cutâneo para 14 alérgenos, dosado IgE total, realizada espirometria e avaliada a concentração de óxido nítrico exalado. Os pais responderam a questionário com informações demográficas, história pulmonar e alérgica, uso de medicamentos, sintomas respiratórios e cuidados com a saúde relacionada à asma. Foi realizada coleta de poeira do ar do quarto das crianças e dosada a quantidade de alérgeno de camundongo, de endotoxina, de NO_2 e de nicotina. Os resultados mostraram que os efeitos respiratórios da exposição à endotoxina dentro de casa são modificados por co-exposição a poluentes internos comuns como nicotina e NO_2 , visto que nível elevado de nicotina no ar ($\geq 0,01 \text{ mcg/m}^3$) modifica a associação entre endotoxina e parâmetros de asma: exacerbação aguda de asma ou uso de corticóide oral. E,

em casas com baixa concentração de NO₂, alta dosagem de endotoxina foi associada com asma aguda.

Com esse estudo podemos verificar que outra forma de reduzir a quantidade de endotoxina dos ambientes é reduzindo a exposição ao fumo (passiva ou ativa) e assim reduzir os efeitos pulmonares adversos da endotoxina.

Enfim, as medidas ideais para diminuir a quantidade de endotoxina presente na poeira dos laboratórios seriam aumentar a limpeza dos ambientes, melhorar o local de armazenamento dos animais de laboratório, com a construção de biotérios com fluxo unidirecional e com os ratos agrupados em estantes ventiladas, intensificar o uso de equipamentos de proteção individual nos trabalhadores que possuem contato com animais de laboratório e medidas para evitar o tabagismo no ambiente de trabalho, sendo estes possíveis temas para trabalhos futuros.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados são de grande importância para a compreensão da presença das endotoxinas no ambiente ocupacional e a sua interação com sintomas dos trabalhadores, visto que ainda há muita dúvida no meio científico quanto ao papel das endotoxinas como fator de risco ou como fator de proteção para as doenças respiratórias. Concentrações elevadas foram encontradas em ambas as universidades e maiores nos locais de trabalho expostos a animais de laboratório.

Além disso, a exposição à endotoxina apresenta efeito no sistema respiratório dos trabalhadores mesmo não tendo se associado à asma. Elevadas concentração de endotoxina foram associadas com a presença de sibilos, principalmente no grupo exposto a animais de laboratório. Isso nos mostra que os trabalhadores de biotérios e de laboratório que tem contato direto com animais de laboratório estão mais susceptíveis a apresentarem sibilos ao longo do ano, sendo necessárias medidas de prevenção para estes trabalhadores.

BIBLIOGRAFIA²

² De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

9. BIBLIOGRAFIA

ABBAS A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução 6ª ed. São Paulo: **Elsevier**, 2008. 574p.

ANDERSON, S. D. et al. Comparison of mannitol and methacoline to predict exercise-induced bronchoconstriction and a clinical diagnosis of asthma. **Respiratory Research**. v. 10, p. 1-13. 2009.

ARIF, A. A. et al. Prevalence and risk factors of asthma and wheezing among US adults: an analysis of the NHANES III data. **European Respiratory Journal**. v. 21, p. 827-833. 2003.

BADDINI-MARTINEZ, J. Nem tudo que sibila é asma. Carta ao Editor. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 39, p. 518-520. 2013.

BARNIG, C. et al. Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments. **Letters in Applied Microbiology**. v. 56, p. 161-167. 2012.

BOUSQUET, J. et al. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 161, p. 1720-1745. 2000.

BRANNAN, J. D. et al. The safety and efficacy of inhaled dry powder mannitol as a bronchial provocation test for airway hyperresponsiveness: a phase 3 comparison study with hypertonic (4.5%) saline. **Respiratory Research**. v. 6, p. 144-156. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Atenção Básica. Doenças respiratórias Crônicas. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2010.

BUSH, R. K.; WOOD, R. A.; EGGLESTON, P. A. Laboratory animal allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.102, P. 99-112. 1998.

DORESWAMY, V.; PEDEN, D. B. Modulation of asthma by endotoxin. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 41, p. 9-19. 2011.

DUNGAN, R. S. Airborne Endotoxin from Indoor and Outdoor Environments: Effects of sample dilution on the Kinetic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**. v. 8, p. 147-153. 2011.

EISENBARTH, S. C. et al. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. **Journal Experimental Medicine**. v. 196, p. 1645-1651. 2002.

ELLIOTT, L. et al. Incidence of allergy and allergy symptoms among workers exposed to laboratory animals. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 62, p. 766-771. 2005.

FERRAZ, E. et al. Hiperreatividade brônquica nas diversas doenças. In: Mauro Gomes; Sônia Faresin (org.). *Pneumologia: Atualização e reciclagem*. 7ª ed. São Paulo: **Roca**. v. 7. 2007.

FERRAZ, E. et al. Laboratory animals and respiratory allergies: The prevalence of allergies among laboratory animal workers and the need for prophylaxis. **Clinics**. v. 68, p. 750-759. 2013.

GARY, P. A. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. **The Lancet**. v. 372, p. 1107-1119. 2008.

GAUTRIN, D. et al. Incidence and Determinants of IgE-Mediated Sensitization in Apprentices. A Prospective Study. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine**. v. 162, p. 1222-1228. 2000.

GEHRING, U. et al. Asthma and allergic symptoms in relation to house dust endotoxin: Phase Two of the International Study on Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II). **Clinical and Experimental Allergy**. v. 38, p. 1911-1920. 2008.

GEHRING, U. et al. Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: A cohort study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 108, p. 847-854. 2001.

GINA - GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2011. Disponível em: www.ginasthma.com. Acesso em 07 fev. 2012.

GOE, S. et al. A descriptive study of work aggravated asthma. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 61, p. 512-517. 2004.

HOY, R. F.; ABRAMSON, M. J.; SIM, M. R. Work related asthma – diagnosis and management. **Australian Family Physician**. v. 39, p. 39-42. 2010.

KIM, Y. et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. **The Journal of Immunology**. v. 178, p. 5375-5382. 2007.

KIM, Y. et al. Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the Th2 hypothesis. Review. **Allergy Asthma Immunology**. v. 5, p. 189-196. 2013.

LAPA E SILVA, J. R. et al. Endotoxins, asthma and allergic immune responses. **Toxicology**. v. 152, p. 31-35. 2000.

LAWSON, J. et al. Endotoxin as a determinant of asthma and wheeze among rural dwelling children and adolescents: A case-control study. **BMC. Pulmonary Medicine**. v. 12, p. 56-66. 2012.

LAWSON, J. et al. The association between endotoxin and lung function among children and adolescents living in a rural area. **Canadian Respiratory Journal**. v. 16, p. e-89-94. 2011.

LEVAN, T. D. et al. Association between CD14 polymorphisms and serum soluble CD14 levels: effect of atopy and endotoxin inhalation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 121, p. 434-40. 2008.

LIAO, V. H. et al. A probabilistic approach to quantitatively assess the inhalation risk for airborne endotoxin in cotton textile workers. **Journal of Hazardous Materials**. v. 177, p. 103-108. 2010.

LIEBERS, V.; RAULF-HEIMSOTH, M. Evaluation of quantification methods of occupational endotoxin exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 70, p. 1798-1805. 2007.

LIU, A. H. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 109, p. 379-392. 2002.

MAJEROWICZ, J. Biossegurança em Biotérios. Alergia: um risco sempre presente. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v.30, p. 105-108. 2003.

MARTINEZ, F. D. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v. 2, p. 221-5. 2007.

MATSUI, E. C. et al. Indoor Pollutant Exposures Modify the Effect of Airborne Endotoxin on Asthma in Urban Children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 188, p.2-39. 2013.

MAUAD, T. et al. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 160, p. 968-975. 1999.

MICHAEL, O. et al. Severity of Asthma is Related to Endotoxin in House Dust. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 154, p. 1641-6. 1996.

MICHEL, O. et al. Domestic Endotoxin Exposure and Clinical Severity of Asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 21, p. 441-8. 1991.

MURPHY, D. M.; O'BYRNE, P. M. Recent Advances in the Pathophysiology of Asthma. **Chest**. v. 137, p. 1417-1426. 2010.

NOSS, I. et al. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, p. 5621-5627. 2008.

PACHECO, K. A. et al. Airborne endotoxin predicts symptoms in non-mouse-sensitized technicians and research scientists exposed to laboratory mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 167, p. 83-90. 2003.

PACHECO, K. A. et al. Characterization of endotoxin and mouse allergen exposures in mouse facilities and research laboratories. **The Annals of Occupational Hygiene**. v.50, p. 563-572. 2006.

PACHECO, K. A. et al. Gene-environment interactions influence airways function in laboratory animal workers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 126, p. 232-240. 2010.

PACHECO, K. A. New insights into laboratory animal exposures and allergic responses. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. v. 7, p. 156-161. 2007.

PARK, J. H. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 163, p. 322-328. 2001.

POMORSKA, D. et al. Levels of bacterial endotoxin in air of animal houses determined with the use of gas chromatography-mass spectrometry and Limulus test. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 14, p. 291-298. 2007.

PORSBJERG, C. et al. Response to mannitol in asymptomatic subjects with airway hyper-responsiveness methacholine. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 37, p. 22-28. 2007.

RACHIOTIS, G. et al. Outcomes of occupational asthma after cessation of exposure: a systematic review. **Thorax**. v. 62, p. 147-152. 2007.

RIBEIRO, M. et al. Validation of the Brazilian-Portuguese version of the European Community Respiratory Health Survey in asthma patients. **Journal of Asthma**. v. 44, p. 371-375. 2007.

RULLO, V. E. V. et al. Exposição a Alérgenos e a Endotoxina, Sensibilização e Expressão Clínica da Doença Alérgica: Estudo de Coorte. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 28, p. 292-297. 2005.

RUOPPI, P. et al. Frequency of allergic rhinitis to laboratory animals in university employees as confirmed by chamber challenges. **Journal of Allergy**. v. 59, p. 195-301. 2004.

RUOPPI, P. et al. Sensitisation to mites in laboratory animal workers with rhinitis. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 62, p. 612-615. 2005.

SCALAN C. L.; WILKINS R. L., STOLLER J. N. F. Fundamentos da Terapia Respiratória de Egan. Tradução 7^a ed. [Rio de Janeiro.]: **Manole**, 2000. 1291p.

SCHOOR, J. V.; JOOS, G. F.; PAUWELS, R. A. Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology and implications for clinical research. **European Respiratory Journal**. v. 16, p. 514-533. 2000.

SCHRAM, D. et al. Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children – the PARSIFAL Study. **Journal of Allergy**. v. 60, p. 611-618. 2005.

SCHWARTZ, D. A. Does inhalation of endotoxin cause asthma? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 163, p. 305-6. 2001.

SKOGSTAD, M. et al. Lon-term occupational outcomes of endotoxin exposure and the effects of exposure cessation. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 69, p. 107-112. 2012.

SKOV, T. et al. Prevalence proportion ratios: estimation and hypothesis testing. **International Journal of Epidemiology**. v. 27, p. 91-95. 1998.

SMIT, L. A. M. et al. Endotoxin exposure, CD 14 and wheeze among farmers: a gene-environment interaction. **Occupational and Environmental Medicine**. v. 68, p. 826-831. 2011.

SMIT, L. A. M. et al. Occupational endotoxin exposure reduces the risk of atopic sensitization but increases the risk of bronchial hyperresponsiveness. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 152, p. 151-158. 2010.

SPAAN, S. et al. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport conditions, extraction solutions, and storage of samples and extracts. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 6134-6143. 2007.

STOUGHTON, T.; PREMATTA, M.; CRAIG T. Assessing and Treating Work-Related Asthma. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**. v.4, p. 164-171. 2008.

TARLO, S. M.; LEMIERE C. Occupational asthma. **The New England Journal of Medicine**. v. 370, p. 640-649. 2014.

TAYLOR, A. N.; LONGBOTTOM, J. L.; PEPYS, J. Respiratory allergy to urine proteins of rats and mice. **The Lancet**. v.2, p.847-849. 1977.

THORN, J. The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review. **Inflammation Research**. v. 50, p. 254-261. 2001.

THORNE, P. S. et al. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in U.S. housing. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 172, p. 1371-1377. 2005.

ZHU, Z. et al. Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma. **Clinical Et Experimental Allergy**. v. 40, p. 536-546, 2010.

ANEXO 1

Comitê de Ética e Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 05 de outubro de 2009

Ofício nº 3353/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“ASMA, RINITE E ALERGIA ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO A ANIMAIS DE LABORATÓRIO: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E DA NECESSIDADE DE PROFILAXIA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 296ª Reunião Ordinária realizada em 28/09/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9428/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

ÉRICA FERRAZ

PROF. DR. ELCIO DOS SANTOS OLIVEIRA VIANNA (Orientador)

Depto. de Clínica Médica

ANEXO 2

Resumo do artigo publicado

Laboratory Animal and Respiratory Allergies (LARA) Study: prevalence of allergies among laboratory animal workers and need for prophylaxis

ABSTRACT

Subjects exposed to laboratory animals are at high risk of developing respiratory and allergic diseases. These diseases can be prevented by simple measures such as the use of personal protective equipment. We report here the primary findings of the Laboratory Animal and Respiratory Allergies (LARA) Study regarding the prevalence of diseases among laboratory animal workers, the routine use of preventive measures in laboratories and in animal facilities, and the need for prevention programs. Animal handlers and non-animal handlers from two Brazilian universities (University of São Paulo and State University of Campinas) answered specific questionnaires to assess work conditions and symptoms; they underwent spirometry, a bronchial challenge test with mannitol, and skin prick tests for 11 common allergens and 5 occupational allergens (rat, mouse, guinea pig, hamster, and rabbit). Four hundred fifty-five animal handlers (32 ± 10 years old [mean $\pm$ SD], 209 men) and 387 non-animal handlers (33 ± 11 years old, 121 men) were evaluated. Sensitization to occupational allergens was higher among animal handlers (16%) than among non-animal handlers (3%, P value < 0.01). Accessibility to personal protective equipment was 85% (median, considering 73 workplaces of the animal handler group). Nineteen percent of the animal handlers answered yes to the question about wearing a respirator all the time while handling animals or while working in the animal room; and, only 25% had received orientation about animal-induced allergy, asthma or rhinitis. In conclusion, our data indicate that preventive programs are necessary. We suggest giving individual advice to the workers, associated with institutional programs for a safer work environment.

APÊNDICE

Tabela 14: Dados individuais dos locais de trabalho da Universidade São Paulo – Ribeirão Preto (USP/RP).

	Prédio	Laboratório	Animal	Data coleta	Quantidade de poeira (g/m²)	Quantidade de endotoxina (UE/mg poeira)	Trabalhadores
1	FORP	Prof. ^a Maria Jose	Rato	05/10/2011	0,01149	108,8	12
2	FORP	Prof. ^a Majo	Ausente	05/10/2011	0,01783	2,99	
3	FORP	Prof. ^a Elaine	Rato e camundongo	05/10/2011	0,05878	17,93	9
4	FORP	Prof. ^a Elaine	Ausente	05/10/2011	0,002266	12,79	
5	FORP	Prof. Guilherme	Rato e camundongo	05/10/2011	0,10551	107,70	1
6	FORP	Prof. ^a Christie	Rato e cobaia	05/10/2011	0,01175	10,23	7
7	FORP	Prof. ^a Janete	Rato	06/10/2011	0,01139	3,82	12
8	FORP	Biotério	Rato	12/03/2012	0,022	47,73	2
9	FORP	Biotério	Camundongo	12/03/2012	0,16155	672,70	
10	FORP	Biotério	Coelhos	12/03/2012	0,05464	115,00	
11	FORP	Biotério	Ausente	12/03/2012	0,95507	192,40	
12	FMRP	Assistência técnica acadêmica	Ausente	10/10/2011	0,007955	28,13	11
13	FMRP	Seção de alunos	Ausente	10/10/2011	0,00517	446,30	
14	FMRP	Seção de comunicações	Ausente	10/10/2011	0,03016	823,90	4
15	FMRP	S. Pessoal e Administrativa	Ausente	17/10/2011	0,02116	324,30	8
16	FMRP	Diretoria	Ausente	17/10/2011	0,001545	61,65	3
17	FMRP	Almoxarifado	Ausente	17/10/2011	0,08622	393,70	2
18	FMRP	Comissão Pesquisa	Ausente	17/10/2011	0,00058	12,63	25
19	FMRP	Assist. Técnica e financeira	Ausente	17/10/2011	0,000516	39,40	
20	FMRP	Seção de veículos	Ausente	16/11/2011	0,00675	44,85	6
21	FMRP	Informática	Ausente	16/11/2011	0,0102	69,20	6
22	FMRP	Apoio	Ausente	16/11/2011	0,007125	2,10	10

		acadêmico					
23	FMRP	CAP	Ausente	22/06/2012	0,9425	180,30	2
24	FMRP	Prof. Célio	Camundongo	27/01/2012	0,0029173	8,44	6
25	FMRP	Prof. ^a Isis	Rato e camundongo	27/01/2012	0,004847	4,51	16
26	FMRP	Prof. ^a Isis	Ausente	08/05/2012	0,00116	72,90	
27	FMRP	Prof. ^a Arlete	Camundongo	27/01/2012	0,000381	11,20	7
28	FMRP	Prof. ^a Vânia	Ausente	14/03/2012	0,00154	58,93	7
29	FMRP	Prof. ^a Vânia	Rato e camundongo	14/03/2012	0,002372	17,53	
30	FMRP	Prof. ^a Isabel	Ausente	09/11/2011	0,0005	30,67	3
31	FMRP	Prof. João Santana	Ausente	09/11/2011	0,00233	24,33	25
32	FMRP	Biotério bioquímica	Camundongo	09/11/2011	0,0041	31,27	3
33	FMRP	Prof. F. Cunha	Ausente	14/03/2012	0,002308	50,60	25
34	FMRP	Prof. F. cunha	Ausente	23/03/2012	0,0687	188,50	
35	FMRP	Prof. Sérgio	Ausente	23/03/2012	0,01997	368,80	5
36	FMRP	Biotério Farmacologia	Rato	08/05/2012	0,53841	341,30	2
37	FMRP	Biotério Farmacologia	Camundongo	08/05/2012	0,11924	113,30	
38	Biotério Central	Secretaria	Ausente	18/10/2011	0,01689	37,43	4
39	Biotério Central	Sala camundongos	Ausente	18/11/2011	0,00705	73,90	7
40	Biotério Central	Sala camundongos	Camundongo	18/11/2011	0,0017	747,50	
41	Biotério Central	Sala coelhos	Coelhos	18/11/2011	0,1293	7,33	1
42	Biotério Central	Sala coelhos	Ausente	08/12/2011	0,372	654,50	
43	Biotério Central	Sala cobaia	Ausente	18/11/2011	0,0239	80,45	3
44	Biotério Central	Sala cobaia	Cobaia	24/11/2011	0,1293	887,90	
45	Biotério Central	Sala rato	Rato	08/12/2011	0,2336	21,47	11

46	Biotério Central	Sala rato	Ausente	08/12/2011	0,0022	1158,30	
47	FFCLRP	Abuso de Drogas/biotério	Rato	12/04/2012	0,12595	197,30	11
48	FFCLRP	Abuso de Drogas/sala de estudos	Ausente	12/04/2012	0,40361	116,20	
49	FFCLRP	Abuso de Drogas/ Prof. Brandão	Rato	12/04/2012	0,05145	176,00	
50	FFCLRP	Psicobiologia e comportamento exploratório	Rato	12/04/2012	0,002535	174,85	6
51	FFCLRP	Estresse e depressão	Rato	12/04/2012	0,01493	161,70	8
52	FFCLRP	Ecofisiologia	Ausente	18/04/2012	0,00441	69,67	2
53	FFCLRP	Biologia tecidual	Ausente	18/04/2012	0,01053	20,45	4
54	FFCLRP	Nutrição e metabolismo	Ausente	18/04/2012	0,01064	54,25	6
55	EERP	Lab. Fisiologia/biotério	Rato e camundongo	07/05/2012	0,27796	210,30	3
56	EERP	Lab. Fisiologia/sala experimento	Rato e camundongo	07/05/2012	0,03423	42,43	
57	EERP	Lab. Fisiologia	Ausente	07/05/2012	0,01867	41,67	
58	EERP	Lab. Tuberculose	Ausente	23/03/2012	0,005119	23,80	8
59	FCFRP	Biotério	Coelhos	09/05/2012	0,02224	112,90	8
60	Genética	Biotério Criação	Ausente	25/06/2012	0,04324	785,10	5
61	Genética	Imuno molecular	Camundongo	25/06/2012	0,16263	1129,90	5
62	Genética	Imuno	Ausente	25/06/2012	0,046	149,90	

		molecular					
63	Genética	Mutagênese	Ausente	13/09/2012	0,0137	192,10	11
64	Genética	Genética	Ausente	13/09/2012	0,1999	276,60	4
65	Genética	Fungos	Ausente	13/09/2012	0,0478	285,70	7
66	Genética	Bioquímica	Ausente	13/09/2012	0,36200	6,3	6
67	Virologia	Prof. Benedito	Ausente	15/08/2012	0,01489	67,00	2
68	Virologia	Prof. Tadeu	Ausente	15/08/2012	0,01586	128,20	9
69	Virologia	Biotério	Camundongo	15/08/2012	0,00636	379,60	1
70	HC - Lab. Pediatria	Biologia molecular	Ausente	30/08/2012	0,03249	241,30	15
71	HC - Lab. Pediatria	Metais	Ausente	30/08/2012	0,03115	185,40	3
72	HC - Lab. Pediatria	Secretaria	Ausente	30/08/2012	0,00254	633,00	2
73	Lab. Química de Proteínas	Secretaria	Ausente	07/05/2012	0,01037	14,90	10
74	Lab. Química de Proteínas	Sala experimentos	Ausente	07/05/2012	0,01637	77,30	

Tabela 15: Dados individuais dos locais de trabalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

	Prédio	Laboratório	Animal	Data coleta	Quantidade de poeira (g/m²)	Quantidade de endotoxina (UE/mg poeira)	Trabalhadores
1	Núcleo	Hidrosalino	Ausente	05/03/2012	0,001917	16,57	13
2	Núcleo	Hidrosalino	Rato	05/03/2012	0,21411	107,25	
3	Núcleo	Técnica cirúrgica	Rato e camundongo	05/03/2012	0,0102	30,30	4
4	Núcleo	Técnica cirúrgica	Ausente	05/03/2012	0,001762	30,07	
5	Núcleo	Técnica cirúrgica (biotério)	Rato	05/03/2012	0,01259	361,20	
6	Núcleo	Nefrologia experimental	Rato	05/03/2012	0,0652	207,20	1
7	Núcleo	Fisiopatologia Renal	Rato	18/06/2012	0,03967	122,20	7
8	Núcleo	Fisiopatologia Renal	Ausente	18/06/2012	0,01329	114,80	
9	Núcleo	Lípides e aterosclerose	Rato	05/03/2012	0,02275	45,48	1
10	Núcleo	Vascular	Rato	05/03/2012	0,00549	193,80	1
11	Núcleo	Transplante Fígado	Rato	05/03/2012	0,011985	69,18	2
12	Núcleo	Sinalização celular	Ausente	05/03/2012	0,006095	29,78	21
13	Núcleo	Sinalização celular	Rato e camundongo	05/03/2012	0,06041	227,40	
14	Núcleo	Pediatria geral	Rato	19/03/2012	0,015156	938,70	1
15	Núcleo	Biomateriais ortopedia	Rato	19/03/2012	0,07706	18,03	3
16	Núcleo	Metabolismo energético	Ausente	24/04/2012	0,03868	432,00	17
17	Núcleo	Container 1	Camundongo	24/04/2012	0,13248	95,90	5
18	Núcleo	Container 4	Rato	24/04/2012	0,06015	192,30	
19	FCM	CCD	Ausente	19/03/2012	0,000981	55,30	4
20	FCM	Área projetos	Ausente	19/03/2012	0,003725	110,40	2
21	FCM	Recursos Humanos	Ausente	19/03/2012	0,0014509	76,00	4

22	FCM	Relação Publica	Ausente	19/03/2012	0,001185 3	28,43	5
23	FCM	Patrimônio	Ausente	20/03/2012	0,15909	24,48	5
24	FCM	Finanças	Ausente	20/03/2012	0,004087	27,73	2
25	FCM	Protocolo	Ausente	20/03/2012	0,004334	280,20	4
26	FCM	Dep. Preventiva	Ausente	20/03/2012	0,03524	48,63	4
27	FCM	Planejamento	Ausente	20/03/2012	0,008529	83,10	3
28	FCM	Estatística	Ausente	20/03/2012	0,04809	15,65	1
29	FCM	AME	Ausente	20/03/2012	0,06992	92,80	5
30	FCM	Câmara Pesquisa	Ausente	20/03/2012	0,000264	23,20	7
31	FCM	Genética Médica	Ausente	24/04/2012	0,00221	225,00	1
32	FCM	Diretoria	Ausente	24/04/2012	0,01173	136,10	4
33	FCM	Informática	Ausente	24/04/2012	0,00235	361,40	7
34	FCM	Comitê de ética	Ausente	18/06/2012	0,00265	104,90	2
35	FCM	Compras	Ausente	18/06/2012	0,00331	101,65	4
36	FCM	Câmara Graduação	Ausente	18/06/2012	0,05209	41,00	5
37	FCM	Residência Médica	Ausente	18/06/2012	0,00294	130,00	2
38	FCM	Centro de memória-arquivo	Ausente	20/09/2012	0,0024	117,10	8
39	FCM	Lab. Nefrologia	Ausente	24/04/2012	0,00891	68,70	2
40	FCM	Lab. GEMOCA	Ausente	23/08/2012	0,0095	65,20	14
41	FCM	Lab. Estudos em Hepatite	Ausente	23/08/2012	0,00148	149,50	2
42	FCM	Lab. Genética molecular	Ausente	23/08/2012	0,22206	595,00	26
43	FCM	Lab. Citogenética Humana	Ausente	20/09/2012	0,0626	111,00	11
44	LICRI	Sala DNA/RNA	Rato e camundong o	24/04/2012	0,00646	98,50	32
45	LICRI	Sala DNA/RNA	Rato e camundong o	24/04/2012	0,00303	47,80	
46	LICRI	Sala de estudos	Ausente	24/04/2012	0,03268	90,90	
47	CIPED	Imunologia	Ausente	18/06/2012	0,00269	307,50	7
48	CIPED	Patologia	Ausente	23/08/2012	0,06228	1003,20	1
49	CIPED	Translacional	Ausente	23/08/2012	0,00038	1003,20	2

50	CIPED	Fisiologia pulmonar	Ausente	24/08/2012	0,00757	224,20	2
51	CIPED	Endócrino	Ausente	20/09/2012	0,0018	1427,00	3
52	Hemocentro	Hemostasia	Rato e camunongo	19/09/2012	0,0204	103,50	9
53	Hemocentro	Hemostasia	Ausente	19/09/2012	0,0065	112,60	
54	Hemocentro	Biologia molecular	Ausente	19/09/2012	0,0046	312,10	23
55	Hemocentro	Genoma	Ausente	19/09/2012	0,027	77,80	9
56	Hemocentro	Exames Complementares	Ausente	19/09/2012	0,00007	53,40	2
57	Hemocentro	Citogenética	Ausente	19/09/2012	0,0025	187,80	3
58	Hemocentro	Oncohemato	Ausente	19/09/2012	0,0037	103,50	5
59	HC	Doenças infecciosas	Ausente	23/08/2012	0,00197	706,20	9
60	CEMIB	Controle Genético	Ausente	20/09/2012	0,0254	337,00	6
61	CEMIB	Barracão maravalha	Ausente	20/09/2012	0,0074	1556,80	2
62	CEMIB	Quarentena	Rato e camundongo	20/09/2012	0,0061	112,55	11
64	CEMIB	Criação e Produção	Ausente	20/09/2012	0,0409	714,80	
63	CEMIB	Controle Sanitário	Ausente	20/09/2012	0,0073	142,70	8
65	CEMIB	Lipax	Ausente	20/09/2012	0,0033	41,35	1
66	CEMIB	Expedição	Rato e camundongo	20/09/2012	0,0084	275,90	1
67	CEMIB	Controle Ambiente	Ausente	20/09/2012	0,000069	2460,30	5
68	CEMIB	Informática	Ausente	20/09/2012	0,0163	244,10	1
69	CEMIB	Secretaria	Ausente	25/09/2012	0,0019	187,70	7
70	CEMIB	Gnoto	Ausente	25/09/2012	0,0012	113,30	7
71	CEMIB	Expansão Matrizes	Camundongo	25/09/2012	0,0066	618,00	9