CARLA BISACCIONI

**Reatividade clínica em pacientes
com asma sensibilizados aos ácaros
Dermatophagoides pteronyssinus
e *Blomia tropicalis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bisaccioni, Carla

Reatividade clínica em pacientes com asma sensibilizados aos ácaros

Dermatophagoides pteronyssinus e *Blomia tropicalis* / Carla Bisaccioni. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Pedro Francisco Giavina-Bianchi Junior.

Descritores: 1. Asma/fisiopatologia 2.Alérgenos/uso diagnóstico 3.Antígenos de
dermatophagoides/uso diagnóstico 4.Testes cutâneos 5.Testes de provocação brônquica
6.Immunoblotting

USP/FM/DBD-126/13

Esta dissertação de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

Aos meus pais, Maria Neusa e Luiz, pela dedicação e apoio.

À minha irmã, Paola, pela amizade.

Ao meu marido, André, pelo companheirismo e amor.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof Dr Pedro Giavina-Bianchi pelo constante estímulo em despertar o interesse científico de seus alunos e pelo apoio nesse e em todos os trabalhos.

Ao Sr. Serafim Fidalgo, que com paciência esteve ao meu lado em cada provocação.

À Rosana, pela orientação e presença nas etapas do meu aprendizado.

Aos funcionários do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia, especialmente à Rosana Coutinho, pelo auxílio durante todo o trabalho.

Aos amigos residentes e estagiários do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia, que acompanharam meu progresso e auxiliaram na seleção dos pacientes.

À equipe do Dr Mario Palma, especialmente Annaly, da UNESP Rio Claro, pela colaboração na análise laboratorial.

A todos os pacientes que participaram desse estudo.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1- INTRODUÇÃO	1
1-1-Asma alérgica	6
1-2- Ácaros	12
2- OBJETIVOS	18
3- MATERIAL E MÉTODOS	19
3-1- Casuística	19
3-2- Grupos de estudo e pesquisa de IgE específica	20
3-3- Medicamentos em uso	21
3-4- Teste de punctura seriado	22
3-5- Broncoprovocação específica	23
3-6- Eletroforese de proteínas e <i>immunoblotting</i>	25
3-7-Análise de resultados	26
4- RESULTADOS	27
4-1- Características dos pacientes	27
4-2- História clínica	29
4-3- Perfil de sensibilização	32
4-4- Teste de punctura seriado	33
4-5 -Broncoprovocação específica	35
4-6- Análise laboratorial	38

5- DISCUSSÃO	45
6- CONCLUSÃO	49
7- REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Bisaccioni C. Reatividade clínica em pacientes com asma sensibilizados aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A asma é uma doença crônica inflamatória das vias aéreas, de importância mundial pela sua elevada prevalência, com considerável impacto na qualidade de vida dos pacientes. Dentre os diferentes fenótipos de asma, a asma alérgica constitui a maioria dos casos. Dentre os diferentes desencadeantes de exacerbações na asma, os aeroalérgenos têm papel de destaque, sendo os ácaros o grupo mais importante e prevalente. Entre os ácaros, os mais relevantes para estudo são o *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) e a *Blomia tropicalis* (*Blo t*), com importância significativa nos países tropicais. Pacientes podem ser sensibilizados a esses dois ácaros ou a um deles somente, mas a positividade do teste *in vivo* ou *in vitro* não significa reatividade clínica e que haja concordância com o alérgeno relevante para o desencadeamento dos sintomas. A reatividade cruzada entre esses dois ácaros vem sendo estudada. *In vivo*, há poucos trabalhos demonstrando a reatividade cruzada entre *Der p* e *Blo t* e analisando a correlação entre os testes cutâneos e os de provocação brônquica. O objetivo desse estudo é avaliar a reatividade clínica em pacientes com asma sensibilizados a ambos os ácaros, *Der p* e *Blo t*. Para isso, pacientes com asma do Ambulatório do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP foram selecionados. Broncoprovocações específicas foram realizadas com os dois ácaros, em diferentes momentos. Dezoito pacientes com asma foram selecionados, e trinta e seis provocações foram realizadas. Todas as provocações com o ácaro *Der p* foram positivas. Em relação à *Blo t*, o resultado foi positivo em 93% dos testes. No presente estudo, houve concordância na maioria dos casos entre a presença de sensibilização aos ácaros estudados e a positividade na broncoprovocação. Portanto, as sensibilizações aos ácaros identificados no teste cutâneo são relevantes para o desencadeamento dos sintomas de asma nesses pacientes.

Descritores: Asma/fisiopatologia; Alérgenos/uso diagnóstico; Antígenos de dermatophagoides/uso diagnóstico; Testes cutâneos; Testes de provocação brônquica; Immunoblotting; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Blomia tropicalis*

ABSTRACT

Bisaccioni C. Clinical reactivity in patients with asthma sensitized to dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways of global importance due to its high prevalence, with considerable impact on quality of life of patients. Among the different phenotypes of asthma, allergic asthma constitutes the majority of cases. Among the different triggers of asthma exacerbations, aeroallergens have the leading role, being mites group more important and prevalent. Among the mites, the most relevant to the study are *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) and *Blomia tropicalis* (*Blo t*), with significant importance in tropical countries. Patients can be sensitive to these two mites or only one of them, but the positivity of test in vivo or in vitro clinical reactivity and does not mean that there is agreement with the relevant allergen for the triggering of symptoms. The cross-reactivity between these two mites has been studied. In vivo, there are few studies demonstrating the cross-reactivity between *Der p* and *Blo t* analyzing the correlation between skin tests and bronchial provocation. The aim of this study is to evaluate the clinical reactivity in patients with asthma sensitized to both house dust mites, *Der p* and *Blo t*. For this reason, patients with asthma, Ambulatory Service of Clinical Immunology and Allergy HCFMUSP were selected. Specific bronchial provocation tests were performed with both mites at different times. Eighteen patients with asthma were selected, and thirty-six provocations were performed. All provocations with the mite *Der p* were positive. Regarding *Blo t*, the result was positive in 93% of tests. In the present study, there was agreement in most cases between the presence of sensitization to mites and positivity in bronchial provocation test. Therefore, sensitization to mites in skin test identified is relevant to the triggering of asthma symptoms in these patients.

Descriptors: Asthma/physiopathology; Allergens/diagnostic use; Antigens, dermatophagoides/diagnostic use; Skin tests; Bronchial provocation tests; Immunoblotting; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Blomia tropicalis*

1- INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica inflamatória das vias aéreas, de importância mundial pela sua elevada prevalência, com considerável impacto na qualidade de vida dos pacientes.

Estima-se que 300 milhões de indivíduos sejam afetados por essa doença em todo o mundo. Atualmente, há um aumento da prevalência dos sintomas de asma em locais como África, América Latina e Ásia, e diminuição em países da América do Norte e Europa, resultando ainda em aumento global da doença, mas com diminuição da diferença de prevalência entre os países¹.

Também há repercussão da importância da asma na morbidade e mortalidade da população. No Brasil, dados do Sistema Único de Saúde revelavam internações em torno de 250 mil por ano, número que vem decrescendo a partir de 2000, graças à introdução e distribuição de medicamentos inalatórios para controle da doença de forma gratuita no sistema público². Em relação à mortalidade, observou-se queda das taxas entre 1996 e 2004, de 1,6 para 1,4 por 100.000 habitantes³.

O Internacional Study of Asthma and Allergies in Chidhood (ISAAC) avaliou a prevalência de asma e doenças alérgicas em crianças em idade escolar e adolescentes em diferentes regiões do mundo. Na América Latina, a prevalência de asma foi de 8,6 a 32,1% em crianças e de 6,6 a 27% em

adolescentes. No Brasil, a prevalência foi semelhante, 24,3% em crianças e 19% em adolescentes⁴.

Por essas características epidemiológicas, e pela diversidade de possíveis fenótipos que compõe essa doença, a asma é assunto cada vez mais estudado, e sempre desperta interesse quanto à sua fisiopatologia, à compreensão dos desencadeantes do processo inflamatório e ao seu tratamento.

Dentre os fatores que são relacionados ao aparecimento da asma, Os aspectos genéticos estão em estudos, mas ainda não há um padrão para a asma, havendo uma variação polimórfica, assim como observado em algumas doenças crônicas. Alguns segmentos cromossômicos ou regiões cromossomais foram descritas como associadas à asma, como exemplos, 5q31 (Imunoglobulina E (IgE) total, eosinófilos, Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-13 (IL-13), CD14), 6 (complexo de histocompatibilidade e fator de necrose tumoral), 11q13 (receptor de IgE de alta afinidade), 12q (asma), 13q (atopia e asma). Recentemente, o gene ADAM33, que codifica a enzima metaloprotease, foi descrito como relacionado à asma, apesar de ainda haver controvérsias⁵.

Atualmente a asma é considerada uma síndrome, ou ao menos uma doença com diversos fenótipos. Os pacientes devem ser fenotipados antes de serem incluídos em estudos, pois uma associação entre um fator de risco genético e um determinado fenótipo da doença pode ser mascarada quando se analisa toda a população de pacientes com asma⁶. A contribuição hereditária vem sendo descrita como fator importante de causa de doenças alérgicas. De

fato, a atopia, definida como tendência pessoal ou familiar para o desenvolvimento de uma resposta mediada por anticorpos IgE, consiste no fator predisponente conhecido mais importante para o desenvolvimento da asma, especificamente a asma alérgica⁷.

Em relação à história clínica do paciente, são importantes aspectos como idade do aparecimento dos sintomas, antecedentes pessoais de outras doenças atópicas (dermatite atópica, rinite, conjuntivite), antecedentes familiares, possíveis fatores desencadeantes ou de piora⁸. Diversos fatores desencadeiam a inflamação na asma e são responsáveis pelas exacerbações dessa doença. Os principais são: alérgenos, agentes infecciosos, exercício, medicamentos, refluxo gastroesofágico, tabagismo, agentes ocupacionais, obesidade^{1, 5}.

Clinicamente, os sintomas característicos da asma são dispnéia, principalmente à noite e pela manhã, tosse, sibilos e opressão torácica. Os sintomas característicos são episódicos, acarretados por inflamação e obstrução das vias aéreas, com limitação do fluxo de ar, principalmente na expiração. Portanto, a asma caracteriza-se por crises de broncoespasmo episódicos e recorrentes que revertem espontaneamente ou com uso de medicação, como broncodilatadores¹.

Em alguns casos pode haver heterogeneidade em relação à apresentação clássica da asma, podendo existir sintomas persistentes e até progressivos, além da possibilidade de não haver reversibilidade da obstrução, seja parcialmente ou totalmente⁵.

No exame físico do paciente com asma, a observação da frequência respiratória e a ausculta pulmonar podem evidenciar os sinais e sintomas descritos, mas, quando se avalia o paciente no momento entre as crises, os mesmos podem não estar presentes. Por isso, a anamnese detalhada sobre os sintomas característicos, sobre a intermitência do quadro e a resposta terapêutica aos broncodilatadores são muito importantes para o diagnóstico da asma¹. Os pacientes com asma também devem ser classificados quanto ao controle da doença, em controlados, parcialmente controlados e não controlados, avaliando os seguintes aspectos: sintomas diários, limitação das atividades, sintomas noturnos, uso de medicação de resgate, função pulmonar¹.

Os testes de função pulmonar são utilizados para complementar o diagnóstico da asma e monitorar o tratamento. A espirometria é um exame muito utilizado e não invasivo. É o método para determinar a limitação ao fluxo de ar e ajudar a estabelecer o diagnóstico da doença. São indicadores de asma: obstrução de vias aéreas por diminuição do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), diminuição da sua relação com a capacidade vital forçada e a presença de responsividade ao uso de broncodilatadores⁹.

O pico de fluxo expiratório (PFE) também pode ser usado. É importante para diagnóstico, monitorização e controle da asma. Tem baixo custo, é portátil e de fácil manejo. Indicadores sugestivos de asma são: aumento de pelo menos 15% do PFE após inalação de broncodilatador ou variação diurna maior que 20%⁹.

Outro exame que pode ser utilizado é a broncoprovocação inespecífica (BPI), que avalia a hiper-responsividade da via aérea em pacientes com dispnéia quando o diagnóstico de asma é incerto¹⁰. A BPI envolve medidas de função pulmonar relacionadas ao calibre da via aérea antes e após exposição inalatória a um estímulo, que pode ter ação direta ou indireta. São exemplos de estímulo direto o uso de metacolina e histamina, e de estímulo indireto o uso de solução hipertônica, manitol e exercício¹¹.

Nos anos 40, Robert Tiffeneau foi o primeiro a desenvolver a tecnologia para medida de taxas fluxos expiratórios máximos. Ele propôs que alterações nas taxas dos fluxos expiratórios após administração de broncodilatador e broncoconstritor poderiam ser válidas para avaliar pacientes com doença das vias aéreas, e que a queda de 20% no VEF1 após a administração de broncoconstritor demonstra hiper-reatividade da via aérea¹². Na BPI, doses crescentes do estímulo, como a metacolina, são administradas em intervalos constantes, e esse procedimento é repetido até que haja queda de pelo menos 20% do valor basal do VEF1 ou até que a concentração mais alta da substância seja atingida. Se ocorrer queda do VEF1, o valor da concentração que foi necessária para ocasionar a queda de 20% do valor do VEF1 é calculada^{10, 12}. Em estudos clínicos com pacientes com asma, o valor referente a essa queda do VEF1 é frequentemente usado como medida de desfecho, para avaliar a reatividade da via aérea ou resposta a tratamento específico¹⁰.

Os aspectos clínicos da asma, incluindo gravidade e atividade, correlacionam-se melhor com a BPI do que com a espirometria¹². Pacientes com asma usualmente apresentam diminuição dos parâmetros espirométricos

quando expostos a estímulo inespecífico, o que não ocorre em pacientes sem a doença¹⁰.

Na BPI, a necessidade de medidas maiores do que 16mg/ml para queda de 20% do VEF1 em condições clínicas apropriadas podem ser utilizadas para excluir asma, lembrando que medicamentos para o tratamento da asma, como corticosteroides inalados, podem diminuir a inflamação e alterar a reatividade brônquica¹⁰. A presença de hiper-responsividade não é diagnóstico de asma, pois é necessário a correlação clínica, mas a sua ausência é forte indicador da exclusão da doença¹³.

1.1 - Asma Alérgica

Dentre os diferentes fenótipos da asma, a asma alérgica constitui a maioria dos casos, sendo cerca de 80% dos quadros da infância e mais de 50% dos adultos¹⁴.

Para desenvolvimento de doença alérgica são necessárias diversas condições favoráveis: habilidade de iniciar a sensibilização após exposição ao alérgeno, padrão genético suscetível, resposta imune do hospedeiro e, também, dose e tamanho das partículas alergênicas inaladas¹⁵.

O algoritmo no diagnóstico de asma alérgica começa através da história clínica. Quando a história clínica sugere associação entre sintomas e exposição ao alérgeno suspeito, testes *in vivo* ou *in vitro* são recomendados para demonstrar sensibilização¹⁶.

A asma alérgica é uma reação de hipersensibilidade tipo I, que pode ser dividida em fase de sensibilização e de provocação, ou reexposição. Primeiramente ocorre a sensibilização, quando o alérgeno ao qual o indivíduo foi exposto é capturado e processado pelas células apresentadoras de antígenos, destacando-se os linfócitos B e macrófagos. Os peptídeos gerados no processamento antigênico se ligam a sítios de apresentação localizados em moléculas do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) e são apresentados aos linfócitos T auxiliares que se ativam. O contato e a troca de sinais entre os linfócitos T e B promove a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, com síntese de IgE específica. Os linfócitos T auxiliares, dependendo de fatores genéticos e locais, polarizam-se em T auxiliares tipo 2 (Th2), com síntese das citocinas interleucina(IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-19¹⁷.

As interleucinas 4, 5, 6, 13 promovem a mudança de isotipo do anticorpo Imunoglobulina M para IgE. A IL-4 aumenta a expressão de receptores de alta e baixa afinidade para IgE, a expressão de MHC II e de molécula de adesão leucocitária (VCAM-1), que permite migração transendotelial de linfócitos e eosinófilos. As IL-5 e IL-6 atuam no crescimento, diferenciação, quimiotaxia e ativação de eosinófilos, esta ação também promovida pela IL-10^{17, 18}.

A IL-13 estimula células epiteliais, aumentando a produção de muco e também está relacionada ao remodelamento da mucosa brônquica, juntamente com fator transformador de crescimento (TGF)-B, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-9. Essas interleucinas, juntamente com IL-10, estimulam a polarização para o próprio perfil Th2, perpetuando o processo¹⁷.

Na reexposição, o alérgeno se liga a duas moléculas de IgE específica, próximas e ancoradas na superfície celular dos mastócitos e basófilos previamente sensibilizados, com ativação e desgranulação celular, acarretando a liberação de mediadores inflamatórios pré-formados e neoformados, como leucotrienos e citocinas inflamatórias, que ajudam a perpetuar a inflamação na asma. Esses mediadores acarretam contração da musculatura lisa, edema da parede brônquica e aumento da secreção de muco, ocasionando obstrução da via aérea. Além de atuar na liberação de mediadores, a IgE também age em outras células inflamatórias que são recrutadas ao local da reação¹⁹.

Na resposta alérgica ocorrem duas fases de resposta, uma fase imediata, em decorrência da ação de mediadores liberados na desgranulação de mastócitos e basófilos, e uma fase tardia, que ocorre de quatro a oito horas após a fase imediata, devido ao recrutamento por quimiotaxia de outras células, como os eosinófilos, neutrófilos e células T, que migram para o sítio inflamatório. Nessa fase pode haver reaparecimento dos sintomas e, no paciente com asma, pode haver diminuição do fluxo aéreo. A responsividade brônquica aumenta após duas a três horas do estímulo e pode persistir por vários dias²⁰. Como muitas vezes o processo é crônico, há sobreposição dessas fases e a cronicidade desse processo está relacionada com constante lesão e reparo da parede brônquica, que pode resultar em alterações estruturais e funcionais que caracterizam o remodelamento brônquico¹⁸.

O eosinófilo é célula efetora primordial nesse processo e está presente no infiltrado inflamatório pulmonar. São recrutados para a via aérea dos pacientes com asma por citocinas e quimiocinas (IL-5, RANTES, eotaxina) e liberam

substâncias altamente inflamatórias que lesam a via aérea e causam inflamação persistente^{5, 15}. Em alguns pacientes, infiltrado neutrofílico é observado, sendo relacionado com gravidade da doença, ou com uso de medicação anti-inflamatória, como os corticosteroides.

Nos pacientes atópicos, a concomitância de outras doenças alérgicas é comum e deve ser pesquisada. Nos pacientes com asma, a rinite é muito prevalente, chegando a estar presente em mais de 90% dos indivíduos e está intimamente associada à asma, por similaridades histológicas, imunológicas, e funcionais^{21, 22,23}.

Os pacientes podem ser sensibilizados a um ou mais alérgenos. A exposição a múltiplos alérgenos pode estar associada com aumento de prevalência e gravidade da asma¹⁶. Entre os principais aeroalérgenos destacam-se os ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*), os fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Penicilium notatum*, *Cladosporium herbarum*), as proteínas derivadas de animais (cão, gato, cavalo e camundongo), as baratas (*Blatella germanica*, *Periplaneta americana*) e os pólenes (*Lolium perene*)¹⁸.

Para comprovar a sensibilização a esses possíveis alérgenos, a presença de IgE específica deve ser pesquisada, através de teste cutâneo de leitura imediata (*in vivo*), ou de dosagem sérica (*in vitro*). A IgE específica pode ser demonstrada pela introdução de alérgenos pelas vias inalatória, cutânea ou parenteral²⁴.

O teste cutâneo de punctura foi inicialmente descrito em 1924 por Lewis e Grant, e modificado em 1970 por Pepys²⁴. Apresenta alta sensibilidade, menor custo, maior facilidade de execução e boa reprodutibilidade²⁵. Entretanto, dependem de condições favoráveis da pele, podem ter interferentes, como o uso de algumas medicações, e, mais raramente, podem causar reações alérgicas²⁶. A dosagem in vitro é menos sensível, mas é mais segura e não há impedimento para sua realização, mesmo que haja alterações na pele, ou uso de medicamentos, como anti-histamínicos²⁵.

O importante no diagnóstico da alergia, além da identificação e da caracterização do alérgeno ao qual o paciente é sensibilizado, é saber qual alérgeno verdadeiramente desencadeia os sintomas da doença. A relevância clínica da sensibilização deve ser determinada.

A provocação inalatória com alérgeno específico (broncoprovocação específica – BPE) é ferramenta que pode ser utilizada para comprovar a etiologia alérgica da asma. A exposição ao alérgeno ao qual o paciente é sensibilizado desencadeia toda a cascata da inflamação alérgica, causando hiper-reatividade das vias aéreas. Isso ocorre se o alérgeno estudado for o responsável pelo desencadeamento dos sintomas pulmonares. Esse teste tem, então, um importante papel no diagnóstico da asma alérgica, na identificação de fator causal específico e na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na inflamação e na hiper-reatividade brônquica, além de poder ser utilizado na avaliação do tratamento da asma²⁷.

Várias alterações ocorrem nas vias aéreas do paciente após provocação. Há aumento do óxido nítrico exalado, aumento da expressão de

Foxp3 e aumento de IL-5 e de eosinófilos no lavado broncoalveolar. A indução de eosinófilos pela provocação com alérgeno é importante comprovação da inflamação alérgica com desencadeamento de reação tardia²⁸.

Na BPE a resposta imediata ocorre rapidamente, com início em minutos, e geralmente há melhora dos sintomas em 1 a 2 horas. A intensidade dos sintomas é variável e muitas vezes o uso de broncodilatadores de ação rápida se faz necessário. A reação tardia pode ocorrer de 5 a 10 horas após o estímulo, mas está ausente em alguns pacientes expostos aos alérgenos, dependendo da gravidade da asma e do uso de tratamentos antiinflamatórios^{11, 29}.

Amplas evidências na literatura suportam a validade dos testes de provocação brônquica e sua técnica e reprodutibilidade vem sendo estudadas desde os anos 50. Isso assegura que o exame seja confiável e de extrema importância para confirmar o desencadeante dos sintomas pulmonares e para monitorar mudanças na reatividade brônquica resultante de intervenção farmacológica, ou de tratamento específico, como imunoterapia^{29, 30,31}.

Várias técnicas e uso de inaladores foram testados ao longo dos anos, o que permitiu certo grau de padronização dos testes de broncoprovocação. O extrato a ser utilizado também deve ser padronizado e sem a presença de irritantes. A provocação brônquica deve ser realizada por profissional experiente, com condição de dar suporte ao paciente em caso de reação ao teste. O ambiente deve ser adequado, com cabine separada por vidro e porta, evitando o risco de sensibilização do executor, e deve ter sistema de ventilação com pressão positiva, sem contaminação com o meio externo.

Em relação às técnicas para inalação do alérgeno, duas são padronizadas e recomendadas: método de inalação contínua por dois minutos e cinco inspirações profundas com dosímetro. Em ambas, doses crescentes do extrato do alérgeno são administrados por via inalatória ao paciente, em intervalos, e seguindo protocolo já padronizado, até que haja queda de 15% do VEF1 (considerando o teste positivo) ou que a dose máxima da concentração do alérgeno seja atingida^{12, 18,30}. Sintomas respiratórios decorrentes da queda do VEF1 podem ocorrer, como tosse, broncoespasmo, além de sintomas nasais, conjuntivais e cutâneos, fortalecendo a relação causal entre a exposição ao alérgeno e o desencadeamento dos sintomas³⁰. A BPE simula a condição natural de exposição ao alérgeno, mas com limitação na intensidade e duração da exposição²⁹.

1-2- Ácaros

Dentre os alérgenos relacionados à asma, os ácaros, conjuntamente com os pólenes dependendo da região, são os grupos mais importantes. Os ácaros são aracnídeos microscópicos medindo 100um a 300um e são os principais alérgenos encontrados na poeira doméstica. Sua principal fonte de alimentação são escamas de pele, fungos e restos orgânicos³². Entre os ácaros, os mais relevantes para estudo são o *Dermatophagoides spp*, mundialmente o mais prevalente, e a *Blomia tropicalis*, com importância significativa nos países tropicais³³. O *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) pertence à família dos ácaros *Pyroglyphidae*, subgrupo *Dermatophagoidinae*, juntamente com *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microcera* e *Euroglyphus*

maynei. No *Der p*, encontrado em regiões temperadas e tropicais, já foram identificados dezessete grupos de alérgenos: *Der p* 1 ao 11, 14, 15, 18, 20 a 23²⁵, conforme descrito na tabela 1. O grupo alergênico mais importante em termos de ligação à IgE é o grupo 1, seguido do grupo 2, que induzem altos títulos de IgE em cerca de 80% dos pacientes alérgicos^{33, 34}. Os genes para *Der p* 1, 2 e 3 estão presentes no mesmo locus no genoma do ácaro e seus alelos mostram alto grau de polimorfismo. *Der p* 1 e *Der f* 1 podem induzir tanto anticorpos responsáveis por reatividade cruzada, como anticorpos espécie-específicos. Reatividade cruzada pode ocorrer mesmo entre *Der p* e outros invertebrados, como parasitas, conforme observado com o *Der p* 10, a tropomiosina, que é um antígeno evolutivamente preservado³⁵.

A *Blomia tropicalis* (*Blo t*), por sua vez, pertence à classe *Glycyphagidae*, juntamente com *Blomia kulagini*, *Glycyphagus domesticus*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor* e *Tyrophagus putrescentiae*. Estudos mostram que a *Blo t* está presente em 16 a 96% das amostras de poeira das casas dos países tropicais e subtropicais²⁶. Seu principal alérgeno pesquisado até hoje é o *Blo t* 5, que induz a produção de IgE em 70% dos indivíduos alérgicos e apresenta pouca reatividade cruzada ao *Der p* 5, sugerindo ser espécie-específico. Outros alérgenos estudados são: *Blo t* 1 a 4, 6, 10, 11 a 13, 19 e 21, conforme descrito na tabela 2. A presença de IgE específica para mais de um alérgeno é frequente e pode ocorrer por sensibilização paralela a ácaros de diferentes espécies ou por importante reatividade cruzada entre seus alérgenos³⁵.

Tabela 1 - Alérgenos descritos do *Dermatophagoides pteronyssinus*

Alérgenos	Nome bioquímico	Peso Molecular (KDa)
Der p 1	Protease de Cisteína	24
Der p 2	Família NPC2	15
Der p 3	Tripsina	31
Der p 4	Alfa Amilase	60
Der p 5		14
Der p 6	Quimiotripsina	25
Der p 7		26, 30 e 31
Der p 8	Glutathione S-transferase	27
Der p 9	Protease de Serina Colagenolítica	29
Der p 10	Tropomiosina	36
Der p 11	Paramiosina	103
Der p 14	Apolipoforina	177
Der p 15	Proteína quitinase-símile	
Der p 18	Proteína vinculada a quitina	
Der p 20	Arginina quinase	
Der p 21		
Der p 23	Homologia com domínio peritrofina –A	14

FONTE: www.allergen.org

Tabela 2 – Alérgenos identificados *Blomia Tropicalis*

Alérgenos	Nome bioquímico	Peso Molecular (KDa)
<i>Blo t 1</i>	Cisteína protease	39
<i>Blo t 2</i>		
<i>Blo t 3</i>	Tripsina	
<i>Blo t 4</i>	Alfa Amilase	56
<i>Blo t 5</i>		14
<i>Blo t 6</i>	Quimiotripsina	25
<i>Blo t 10</i>	Tropomiosina	33
<i>Blo t 11</i>	Paramiosina	110
<i>Blo t 12</i>		14
<i>Blo t 13</i>		
<i>Blo t 19</i>	Peptídeo antimicrobiano homólogo	7
<i>Blo t 21</i>		

FONTE: www.allergen.org

A reatividade cruzada entre *Der p* e *Blo t* vem sendo estudada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Trabalhos realizados em países europeus, onde não há a presença de *Blo t*, demonstraram que pacientes apresentavam teste cutâneo positivo ao extrato de *Blo t*, mesmo sem exposição documentada, com até 86% de positividade³⁵. Entretanto, quando realizados testes cutâneos com *Blo t 5* recombinante, ou quando era dosado a IgE específica para *Blo t 5*, os resultados eram negativos, reforçando que esse alérgeno seria espécie específica³⁶.

Outro estudo que tentou demonstrar a reatividade cruzada entre *Der p* e *Blo t* *in vitro*, por testes de inibição (FAST) e por imunoelektroforese enzimática, mostrou baixa a moderada reatividade cruzada entre os extratos dos dois ácaros na inibição do FAST. Na imunoelektroforese, ao menos quatro antígenos de reatividade cruzada ligados à IgE foram identificados. A inibição *dot blot* que usou os alérgenos *Der p1*, *Der p2* e *Der p5* mostrou pouca reatividade cruzada com os componentes do extrato da *Blo t*. Portanto, a principal conclusão foi que os alérgenos da *Blo t* são distintos, e têm baixa a moderada reatividade cruzada com alérgenos de *Der p*³⁷.

Na Colômbia demonstrou-se que 85% dos pacientes com teste positivo para *Der p* ou *Der f* apresentavam radioimunoensaio positivo para *Blo t*³⁸. Em outro estudo, realizado em São Paulo, a positividade foi de 65%³⁹.

In vivo, poucos trabalhos estudaram pacientes sensibilizados a *Der p* e *Blo t*, e que foram submetidos às provocações específicas com esses dois ácaros.

Provocação nasal específica com *Der p* e *Blo t* foi realizada em estudo brasileiro. Os pacientes eram crianças com rinite sensibilizadas aos dois ácaros. As provocações foram positivas em 90% e 60% para *Der p* e *Blo t*, respectivamente⁴⁰.

Em relação à provocação brônquica, só há um trabalho descrito na literatura que realizou provocações com os extratos dos dois ácaros, *Der p* e *Blo t*, em pacientes com asma⁴¹. Nesse estudo, realizado nas Ilhas Canárias, provocações conjuntivais e brônquicas com os dois ácaros foram realizadas em

pacientes com rinoconjuntivite e/ou asma sensibilizados a *Der p* e/ou *Blo t*. Nas provocações conjuntivais, a maioria dos casos apresentou concordância entre os resultados do teste cutâneo e das provocações. Dois pacientes tiveram resultados discordantes, um deles com teste cutâneo positivo para os dois ácaros, mas com provocação positiva somente para *Der p* e outro com teste cutâneo positivo somente para *Der p* e com as duas provocações positivas. Em relação às broncoprovocações, 15 pacientes realizaram os procedimentos. Dos pacientes sensibilizados aos dois ácaros (n=7), seis pacientes apresentaram as duas provocações positivas. Um paciente desse grupo apresentou somente positividade na provocação com *Blo t*. Dentre os oito pacientes dessa amostra que tinham teste cutâneo positivo somente para *Der p*, dois apresentaram provocação positiva para os dois ácaros. Nenhum paciente sensibilizado somente a *Blo t* foi testado. Apesar das taxas de resultados discrepantes serem pequenas, o estudo advoga que a determinação do alérgeno relevante *in vivo* é importante⁴¹.

Relevando todos esses dados, é importante a melhor compreensão do significado clínico da sensibilização a esses ácaros nos pacientes com asma, determinando qual a repercussão da exposição ao ácaro no desencadeamento dos sintomas pulmonares, além da análise laboratorial da possível reatividade cruzada entre eles. Tudo isso para melhor compreender a asma e para melhor direcionar um tratamento específico, como a imunoterapia, abordando somente o ácaro que for relevante para o desencadeamento da doença. Na asma alérgica o diagnóstico preciso é imprescindível para o tratamento específico³⁰.

2- OBJETIVO

O objetivo primário desse estudo é:

- Avaliar o significado clínico da sensibilização dupla aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* nos pacientes com asma.

E o objetivo secundário é:

- Avaliação laboratorial através da técnica de *Immunobloting* da reatividade cruzada entre esses dois ácaros.

3- MATERIAL e MÉTODOS

3.1- Casuística

Esse estudo selecionou pacientes com asma alérgica do Ambulatório de Asma do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, respeitando os critérios de inclusão e exclusão.

O diagnóstico de asma foi estabelecido segundo os critérios do consenso GINA (história clínica e espirometria determinando distúrbio ventilatório obstrutivo com reversibilidade ao broncodilatador, ou broncoprovocação demonstrando hiper-reatividade brônquica)¹.

Critérios de Inclusão:

- Idade entre 18 e 50 anos
- Asma alérgica, no mínimo, parcialmente controlada pelos critérios GINA¹
- Espirometria com VEF1 > 70%
- Presença de teste cutâneo de leitura imediata positivo para *Dermatophagoides pteronyssinus* e/ou *Blomia tropicalis*.

Critérios de Exclusão:

- Asma grave pelos critérios GINA
- Uso crônico de corticosteróide sistêmico

- Utilização de corticosteróide inalatório (budesonida ou equivalente) maior do que 1600mcg/dia
- Infecções de vias aéreas a menos de seis semanas
- Gravidez ou amamentação
- Tabagismo prévio maior que 10 maço/ano
- Imunoterapia prévia
- Doenças sistêmicas mal controladas

Todos os pacientes foram informados sobre o estudo e concordaram em participar, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que foi aprovado, em conjunto com esse projeto, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, CAPPesp, do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo nº. 0610/09.

3.2- Grupos de estudo e pesquisa de IgE específica

Os pacientes selecionados foram classificados em três grupos, conforme o perfil de sensibilização:

- Grupo 1: pacientes sensibilizados concomitantemente aos ácaros *Der p* e *Blo t*
- Grupo 2: pacientes sensibilizados somente a *Der p*
- Grupo 3: pacientes sensibilizados somente a *Blo t*

A presença de IgE específica foi pesquisada por teste cutâneo de resposta punção utilizando extratos padronizados dos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) e *Blomia tropicalis* (*Blo t*), além de um

controle positivo (histamina 10mg/mL) e um negativo (veículo do extrato ou solução salina). O local utilizado para o teste foi a face volar do antebraço. Nela, foi colocada uma gota de cada alérgeno e, com auxílio de lanceta padronizada, perfurou-se a pele. Para não haver resultados falsos positivos, distância de aproximadamente dois centímetros foi mantida entre os pontos de aplicação, e para cada solução usou-se um puntor diferente. Após quinze a trinta minutos foi realizada a leitura. Considerou-se positiva a pápula com medida maior ou igual a três milímetros de diâmetro em relação à resposta do controle negativo²⁵.

Para determinação da IgE sérica específica, utilizou-se o método imunofluorenzimático (*ImmunoCap*, PHADIA), que atualmente substitui o RAST (*radio-imuno absorvent test*)⁴², no qual polímeros carreadores hidrofílicos encapsulados acoplam o alérgeno covalentemente. As amostras séricas foram coletadas previamente aos testes de provocação.

Todos os pacientes dos três grupos foram submetidos a duas broncoprovocações, uma com *Der p* e outra com *Blo t*, em diferentes momentos, com intervalo mínimo de seis semanas entre elas.

3.3- Medicções em uso

Como os pacientes selecionados já faziam acompanhamento no Ambulatório referido, e já faziam uso de medicações inalatórias anti-inflamatória de manutenção, optou-se por manter o tratamento, e só suspender as medicações em momento próximo à data dos testes de provocação.

Segundo critérios de exclusão, nenhum paciente fazia uso de corticosteróides sistêmicos.

As medicações inaladas de uso contínuo, como corticóides inalatórios e broncodilatadores de longa ação, foram suspensas na noite anterior ao dia do exame e prescritas novamente após o término do mesmo. O uso de anti-histamínico foi suspenso sete dias antes dos testes, e o uso de medicação para alívio, como broncodilatadores de curta ação, vinte e quatro horas antes.

3.4- Testes de punctura seriado

Imediatamente antes da realização da broncoprovocação, todos os pacientes repetiram o teste cutâneo de leitura imediata com o ácaro a ser utilizado na provocação (*Der p* ou *Blo t*).

O extrato utilizado era comercialmente padronizado, liofilizado, sem conservantes, adquirido na empresa *IPI-ASAC Brasil*. Foi diluído com solução salina em concentrações decrescentes (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048). As diluições foram então usadas para punctura, em duplicata, na face volar dos braços, mantendo distância entre os pontos. A leitura foi realizada 20 minutos após, e foi aferido o tamanho das pápulas, a fim de verificar qual seria a concentração inicial a ser usada na provocação. A concentração inicial selecionada equivaleu a duas abaixo à que desencadeou pápula de tamanho 2x2 mm.

3.5- Broncoprovocação específica

Para as realizações das broncoprovocações específicas (BPE) com os ácaros em estudo, a técnica utilizada foi baseada na descrita anteriormente por Sterk e colaboradores, com modificações⁴³.

As BPE foram realizadas na Cabine de Investigação Alergo-Respiratória, na Enfermaria do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas-FMUSP. A cabine é específica para provocações e foi projetada a fim de que seja possível a visualização do paciente durante o teste. Também é equipada com filtros HEPA e de carvão ativado, para evitar exposição externa de partículas inaláveis durante os testes de provocação ali realizados.

Inicialmente, em todos os procedimentos, foi realizada a calibragem do aparelho, e, a seguir, conferido os dados dos pacientes e o material a ser usado.

Os extratos que foram utilizados são comercialmente padronizados, liofilizados, sem conservantes, diluídos em solução salina no mesmo dia da realização das BPE. São os mesmos extratos que foram utilizados nos testes cutâneos seriados descritos anteriormente, que determinaram as diluições iniciais das provocações.

A técnica utilizada para nebulização dos extratos foi a do dosímetro, que é padronizada e libera quantidades conhecidas de cada alérgeno em estudo¹³. Para esse método, o nebulizador utilizado foi o do modelo DeVilbiss 646, que é comandado pelo programa usado para realizar provocações, o KoKo Digidoser System.

Antes de iniciar as inalações com as doses diluídas do extrato alergênico, uma medida de VEF1 basal foi obtida. Após, foram iniciadas as inalações, sendo que a primeira foi com solução salina, a fim de conferir a técnica do paciente e avaliar se não havia queda inespecífica do VEF1. Não havendo queda superior a dez por cento do VEF1 basal e comprovando-se a reprodutibilidade da técnica, deu-se seqüência ao teste.

Cada inalação liberou quantidade já especificada do extrato alergênico em suas diversas diluições. Foram colocados 2 mL no nebulizador em cada etapa, e foram liberados 0,009 mL a cada 0,6 segundos durante a inalação.

Em cada etapa, realizaram-se os seguintes passos: após expiração normal, no início da inspiração, foi dado o comando para o dosímetro; o paciente inalou a substância vagarosa e profundamente por cinco segundos, segurou a respiração por cinco segundos e depois expirou vagarosamente por cinco segundos. O procedimento foi repetido por quatro vezes, totalizando cinco ciclos de inalação para cada concentração. Foram aferidas medidas de VEF1 noventa segundos e quinze minutos após cada etapa de inalações. Doses de extrato sequencialmente maiores foram utilizadas, conforme diluições já citadas.

O término do teste foi determinado por: queda do VEF1 maior que 15% do valor basal, quando o teste é considerado positivo, ou pela ausência de queda do VEF1 mesmo com uso da concentração máxima de alérgeno, equivalente a do teste cutâneo. Nos testes positivos, houve monitorização com novo VEF1 após uma hora do término das inalações e medidas seriadas de pico de fluxo expiratório.

Após a BPE, os pacientes permaneceram internados por 24h para supervisão dos sintomas. Medicação inalatória de alívio, broncodilatadores de curta ação, foi administrada somente quando necessário, baseando-se na anamnese clínica e pico de fluxo expiratório.

3.6- Eletroforese de proteínas e *Immunoblotting*

A partir das amostras coletadas dos pacientes do estudo foi realizada a análise laboratorial, que consistiu em eletroforese bidimensional dos extratos de ácaros, para análise de reatividade das proteínas em contato com a amostra sérica dos pacientes sensibilizados.

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas em duas dimensões, por ponto isoelétrico e por massa (peso molecular).

Nessa análise foi realizado primeiramente a quantificação de proteínas do extrato. Após, solubilizou-se a alíquota da amostra com SDS 0,1%, adicionou-se *2D-Clean Up* para limpar a amostra, realizou-se reidratação nas fitas de eletroforese bidimensional, focalizou-se as proteínas e finalizou-se com a detecção colorimétrica.

Antes da realização dos experimentos foram feitos testes da eficácia da biotina, dos métodos de eletrotransferência e revelação com a utilização do veneno da vespa *Polybia paulista* e o respectivo soro sensível que pode ser visualizado na figura 1. Observou-se que os reagentes e procedimentos realizados estavam de acordo e eram eficientes.

Figura 1: *Immunoblotting* da amostra da vespa social *Polybia paulista*, por meio de eletrotransferência de gel unidimensional. Cinco bandas revelaram-se imunorreativas.

3.7- Análise dos Resultados

Considerando-se a broncoprovocação específica associada à história clínica o padrão ouro para o diagnóstico de asma alérgica, o estudo analisará a sensibilidade e a especificidade do teste cutâneo associado à história clínica, a forma tradicional de diagnóstico. O estudo descreverá, em porcentagem, os alérgenos reconhecidos pelas IgE específicas dos pacientes.

4- RESULTADOS

4.1 - Caracterização dos pacientes

Dentre os pacientes do Ambulatório de Asma do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia HC-FM-USP foram selecionados 18 pacientes com asma para o estudo.

O diagnóstico de asma foi realizado utilizando-se os critérios definidos pelo GINA¹.

A maioria dos pacientes era do gênero feminino (n=12) e a média de idade era de 39,2 anos.

Tabela 3 – Caracterização dos pacientes

Pacientes	Idade	Gênero	Fase início dos sintomas de asma	AF atopia
1	46	F	Adulta	Negativo
2	34	F	Adolescência	Positivo
3	52	F	Adulta	Positivo
4	40	F	Infância	Positivo
5	53	F	Adolescência	Positivo
6	46	F	Infância	Positivo
7	40	F	Adolescência	Positivo
8	44	M	Infância	Positivo
9	42	F	Infância	Positivo
10	26	M	Infância	Positivo
11	33	M	Adulta	Positivo
12	49	F	Adulta	Positivo
13	57	F	Adulta	Positivo
14	20	M	Infância	Positivo
15	34	M	Adulta	Negativo
16	39	F	Adulta	Positivo
17	19	M	Infância	Positivo
18	32	F	Infância	Positivo

AF: antecedente familiar

4-2 – História clínica

Em relação ao início dos sintomas, oito pacientes relataram início dos sintomas na infância, três na adolescência, e sete na idade adulta.

Todos os pacientes referiam piora ou desencadeamento dos sintomas à exposição à poeira doméstica.

Quase todos os pacientes (n=16) referiam antecedente familiar de doença atópica em pais, irmãos e/ou filhos.

Em relação à classificação da gravidade da asma, dois pacientes apresentavam asma intermitente, três asma persistente leve e treze asma persistente moderada. Apenas os dois pacientes com asma intermitente não faziam uso de medicação inalada contínua. Treze pacientes faziam uso de budesonida inalada, dois na dose diária de 400mcg, seis na dose diária de 600mcg, e cinco na dose de 800mcg/dia. Um paciente usava a associação de budesonida com formoterol, na dose diária de 800mcg budesonida e 24mcg de formoterol. Dois pacientes utilizavam beclometasona, na dose diária de 750mcg.

Tabela 4 – Classificação da asma e medicamentos em uso

Pacientes	Classificação da asma	Medicação inalada (mcg/dia)
1	APM	Budesonida 800
2	AI	--

Pacientes	Classificação da asma	Medicação inalada (mcg/dia)
3	APM	Beclometasona 750
4	APL	Budesonida 600
5	APM	Budesonida 800
6	APM	Beclometasona 750
7	APM	Budesonida 800
8	APM	Budesonida 400
9	APM	Formoterol 24/ Budesonida 800
10	APM	Budesonida 800
11	AI	--
12	APM	Budesonida 800
13	APM	Budesonida 600
14	APL	Budesonida 600
15	APL	Budesonida 600
16	APM	Budesonida 600
17	APM	Budesonida 600
18	APM	Budesonida 400

APL: asma persistente leve APM: asma persistente moderada AI: asma intermitente

Tabela 5 – Valores IgE total

Pacientes	IgE (UI/mL)
1	793
2	834
3	73
4	372
5	219
6	85
7	139
8	129
9	102
10	143
11	353
12	2172
13	562
14	132
15	2180
16	504
17	1640
18	333

4.3 – Perfil de sensibilização

Em relação à sensibilização, todos os pacientes tinham teste cutâneo de leitura imediata positivo, e foram divididos em grupos:

Grupo 01 (*Der p* + *Blo t*): 14 pacientes

Grupo 02 (*Der p*): 02 pacientes

Grupo 03 (*Blo t*): 02 pacientes

Tabela 6 – Sensibilização pelo teste cutâneo inicial e dosagem de IgE específica

Pacientes	<i>Der p</i>	<i>Blo t</i>	IgE específica	
			<i>Der p</i> (kUA/l)	<i>Blo t</i> (kUA/l)
1	Positivo	Positivo	3,49	1,18
2	Positivo	Positivo	NR	NR
3	Positivo	Positivo	1,26	0,84
4	Positivo	Positivo	1,35	0,41
5	Positivo	Positivo	14,70	4,27
6	Positivo	Positivo	5,47	27,70
7	Positivo	Positivo	1,52	0,81
8	Positivo	Positivo	1,35	1,24
9	Positivo	Positivo	NR	NR
10	Positivo	Positivo	NR	NR
11	Positivo	Positivo	6,52	3,41
12	Positivo	Positivo	2,32	1,40

Pacientes	<i>Der p</i>	<i>Blo t</i>	IgE específica	IgE específica
			<i>Der p</i> (kUAl)	<i>Blo t</i> (kUAl)
13	Positivo	Positivo	NR	NR
14	Positivo	Positivo	3,15	1,86
15	Negativo	Positivo	0,78	19,30
16	Negativo	Positivo	3,54	5,52
17	Positivo	Negativo	7,58	2,12
18	Positivo	Negativo	3,19	0,98

Der p: Dermatophagoides pteronyssinus Blo t: Blomia tropicalis

4.4 – Teste de punctura seriado

Imediatamente antes das provocações brônquicas, os testes cutâneos foram repetidos e feitos de forma seriada, conforme o ácaro a ser testado. Em relação aos pacientes 15 e 16, primeiramente monossensibilizados ao ácaro *Blomia tropicalis*, as repetições dos testes indicaram sensibilização também ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*. O mesmo foi observado com os pacientes 17 e 18, primeiramente com testes positivos para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* e posteriormente com testes positivos para ambos os ácaros.

Para descartar possível ação irritante dos extratos utilizados, testes cutâneos foram realizados em dois pacientes com asma não alérgica, não sensibilizados aos ácaros testados, e os resultados foram negativos, condizente com o fenótipo de asma apresentado pelos pacientes. Esses

paciente com asma, sem sensibilização aos ácaros em estudo, também realizaram broncoprovocação específica com os dois ácaros, e ambas foram negativas.

Tabela 7 – Sensibilização pelo teste cutâneo pré-provocação

Pacientes	<i>Der p</i>	<i>Blo t</i>
1	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo
9	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo
12	Positivo	Positivo
13	Positivo	Positivo
14	Positivo	Positivo
15	Positivo	Positivo
16	Positivo	Positivo
17	Positivo	Positivo
18	Positivo	Positivo

Der p: Dermatophagoides pteronyssinus Blo t: Blomia tropicalis

4.5 – Broncoprovocação específica

Todos os pacientes realizaram duas provocações, uma com cada ácaro em estudo, conforme tabela abaixo. Das 36 provocações realizadas, 35 foram positivas, e somente uma negativa.

O paciente três, sensibilizado aos dois ácaros, apresentou broncoprovocação positiva ao *Der p*, mas negativa para o ácaro *Blo t*. Os demais pacientes apresentaram provocação positiva para os dois ácaros. Não houve nenhum caso de broncoespasmo grave, nem de anafilaxia.

Tabela 8 – Resultados das broncoprovocações específicas com ácaros

Pacientes	<i>Der p</i>	<i>Blo t</i>
1	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo
3	Positivo	Negativo
4	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo
9	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo
12	Positivo	Positivo

Pacientes	<i>Der p</i>	<i>Blo t</i>
13	Positivo	Positivo
14	Positivo	Positivo
15	Positivo	Positivo
16	Positivo	Positivo
17	Positivo	Positivo
18	Positivo	Positivo

Der p: Dermatophagoides pteronyssinus Blo t: Blomia tropicalis

Tabela 9 - Concentrações iniciais e finais dos alérgenos utilizados nas broncoprovocações específicas

Pacientes	Concentração inicial <i>Der p</i>	Concentração final <i>Der p</i>	Concentração inicial <i>Blo t</i>	Concentração final <i>Blo t</i>
1	1:16	1:8	1:16	1:16
2	1:256	1:4	1:512	1:16
3	1:256	1:16	1:16	1:1
4	1:8	1:4	1:16	1:4
5	1:512	1:64	1:128	1:16
6	1:32	1:16	1:16	1:4
7	1:64	1:8	1:128	1:16
8	1:128	1:8	1:256	1:4
9	1:256	1:8	1:512	1:2
10	1:2048	1:8	1:512	1:2
11	1:32	1:1	1:8	1:2

Pacientes	Concentração inicial <i>Der p</i>	Concentração final <i>Der p</i>	Concentração inicial <i>Blo t</i>	Concentração final <i>Blo t</i>
12	1:256	1:8	1:126	1:8
13	1:128	1:8	1:32	1:4
14	1:16	1:16	1:16	1:8
15	1:256	1:16	1:256	1:256
16	1:16	1:4	1:8	1:8
17	1:32	1:16	1:32	1:8
18	1:8	1:8	1:16	1:8

Der p: Dermatophagoides pteronyssinus Blo t: Blomia tropicalis

A presença de sintomas na fase tardia foi pouco referida entre os pacientes estudados.

O paciente dois apresentou sintomas tardios nas duas provocações, tanto com *Der p*, quanto *Blo t*. No primeiro teste, apresentou coriza e tosse após 10h do termino do teste. No segundo, dispnéia e tosse 24h após. O uso de broncodilatador de curta duração foi indicado, com controle do quadro.

O paciente seis referiu tosse durante a broncoprovocação com ambos os ácaros. Na provocação com *Der p*, apresentou tosse e sibilos expiratórios esparsos na ausculta pulmonar imediatamente após o exame e 8 horas após, prontamente revertidos com broncodilatador de curta duração inalatório. Na provocação com *Blo t*, queixou-se de dispnéia e sibilos nos dois dias posteriores ao exame, sendo medicada com broncodilatador inalatório e corticosteroide oral. Evoluiu favoravelmente.

4.6 – Análise laboratorial

Foi realizada eletroforese unidimensional a partir de amostras dos extratos dos ácaros estudados *Der p* e *Blo t*.

A visualização da imagem de gel da amostra dos extratos de *Blo t* e *Der p* foi possível com a coloração por *Coomassie*, sem a utilização de *kit* de limpeza.

Figura 2: Gel de eletroforese unidimensional SDS-PAGE 12,5% (m/v) contendo 300 µg das amostras *Blo t* e *Der p* (sem a utilização de 2D Clean-Up). Coloração por *Coomassie Blue R-250*.

Foram realizados ensaios de *immunoblotting* a partir de amostras de soro dos pacientes 2, 7, 11, 14, 15, 18. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras de 3 a 8.

Na amostra referente ao paciente dois, que é sensibilizado aos dois ácaros e teve as duas broncoprovocações positivas, quatro bandas do extrato de *Der p* revelaram-se imunorreativas com o soro. Não houve imunorreatividade a *Blo t*.

Figura 3: *Immunoblotting* dos extratos *Blo t* e *Der p* (300 µg de cada um dos extratos) por meio de eletrotransferência de gel unidimensional e incubação com soro do paciente 2. Quatro bandas revelaram-se imunorreativas para *Der p*. Não houve imunorreatividade para *Blo t*.

Em relação ao paciente sete, sensibilizado aos dois ácaros e com positividade para as duas broncoprovocações, dez bandas revelaram-se imunorreativas para o extrato *Blo t* e oito para o extrato *Der p*.

Figura 4: *Immunoblotting* dos extratos *Blo t* e *Der p* (300 µg de cada uma dos extratos) por meio de eletrotransferência de gel unidimensional e incubação com soro do paciente 7. Dez bandas revelaram-se imunorreativas para *Blo t* e oito bandas para *Der p*.

Na amostra referente ao paciente 11, também sensibilizado aos dois ácaros e com as duas broncoprovocações positivas, sete bandas revelaram-se imunorreativas no extrato de *Der p*, e três com imunorreatividade a *Blo t*

Figura 5: *Immunoblotting* dos extratos de *Blo t* e *Der p* (300 µg de cada um dos extratos) por meio de eletrotransferência de gel unidimensional e incubação com soro do paciente 11. Três bandas revelaram-se imunorreativas para *Blo t* e sete bandas revelaram-se imunorreativas para *Der p*.

O paciente 14, sensibilizado aos dois ácaros e com as duas broncoprovocações positivas, mostrou-se com quatro bandas imunorreativas no extrato de *Der p*, e nenhuma com imunorreatividade no de *Blo t*.

Figura 6: *Immunoblotting* dos extratos *Blo t* e *Der p* (300 µg de cada um dos extratos) por meio de eletrotransferência de gel unidimensional e incubação com soro do paciente 14. Três bandas revelaram-se imunorreativas para *Der p* e não houve imunorreatividade com o extrato de *Blo t*.

Na amostra referente ao paciente 15, que inicialmente era sensibilizado a *Blo t*, mas com comprovação posterior de sensibilização aos dois ácaros, e que apresentou as duas broncoprovocações positivas, não foi observada imunorreatividade.

Figura 7: *Immunoblotting* dos extratos *Blo t* e *Der p* (300 µg de cada extrato) por meio de eletrotransferência de gel unidimensional e incubação com soro do paciente 15. Nenhuma dos extratos apresentou imunorreatividade.

Em relação ao paciente 18, inicialmente sensibilizado ao *Der p*, e depois com sensibilização comprovada também a *Blo t*, nenhum extrato mostrou-se imunorreativo.

Figura 8: *Immunoblotting* dos extratos *Blo t* e *Der p* (300 µg de cada extrato), por meio de eletrotransferência de gel unidimensional e incubação com soro do paciente 18. Nenhuma dos extratos apresentou imunorreatividade.

5- DISCUSSÃO

O significado clínico da sensibilização aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* pôde ser comprovada com a concordância entre os resultados de testes cutâneos e dos testes de provocação nos pacientes com asma estudados. Dos pacientes sensibilizados ao *Der p*, todos apresentaram resposta positiva à inalação desse ácaro, enquanto os sensibilizados à *Blo t*, 94 % apresentaram provocação positiva.

Os ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* estão entre os mais prevalentes aeroalérgenos do Brasil e os níveis de alérgenos encontrados nas residências brasileiras são tão alto quanto os que são associados com sensibilização e exacerbação aguda da asma em outras partes do mundo³⁹. O *Der p* já é bastante estudado, por ser o ácaro mais prevalente no mundo, mas há poucos estudos com a *Blo t*, que predomina em países tropicais, como Brasil, Singapura, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Ilhas Canárias e em algumas partes do sul dos Estados Unidos da América^{39, 44, 45}. A alta porcentagem de positividade na broncoprovocação com a *Blo t* comprova a relevância de sua presença no nosso meio e a importância do estudo desse ácaro na nossa população.

Em trabalho realizado nas Ilhas Canárias, quinze pacientes realizaram broncoprovocação com os ácaros *Der p* e *Blo t*. Desses pacientes, sete eram sensibilizados aos dois ácaros, e oito somente a *Der p*. Dos sensibilizados à *Blo t*, todos tiveram provocação positiva para este ácaro e dos sensibilizados a *Der p*, somente um teve provocação negativa⁴¹. Em estudo brasileiro com provocação nasal utilizando extratos dos dois ácaros e envolvendo dez crianças sensibilizadas a ambos os ácaros, nove tiveram provocação positiva para *Der p* e seis para *Blo t*⁴⁰.

No presente estudo, houve relação entre a presença de sensibilização aos ácaros estudados e a positividade na broncoprovocação, confirmando a

relevância clínica da presença de IgE específica. Diversos estudos já demonstraram a importância dos ácaros no desencadeamento de doenças alérgicas como asma e rinite. Testes de provocação nasal e brônquica já foram realizados estabelecendo relação causal entre a exposição ao alérgeno e o início dos sintomas, ou com o aumento da reatividade das vias aéreas^{31, 32,34}.

Em pacientes polissensibilizados pode haver a dúvida quanto a qual seria o alérgeno mais relevante, ou melhor, qual desencadearia sintomas de asma. Com a realização da broncoprovocação, essa relação é esclarecida. Na grande maioria dos pacientes que tiveram teste cutâneo positivo, os mesmos ácaros também determinaram broncoespasmo com queda do VEF1.

Não houve relação entre a gravidade da asma ou o uso de medicação inalada ou a dose utilizada na provocação para causar queda de 15% no VEF1. Dois pacientes tinham asma intermitente e não usavam medicações de modo contínuo, mas chegaram a doses finais semelhantes às de outros pacientes com asma persistente leve e moderada. Portanto, a gravidade da asma e o uso de medicações não teve correlação com a dose máxima de ácaro utilizada nos testes.

A maioria dos pacientes, apesar da queda do VEF1 durante o teste, não tiveram sintomas de fase tardia, 6 a 8 horas após o exame. Dois pacientes apresentaram sintomas tardios após as duas provocações. O paciente dois tinha asma intermitente e não fazia uso de medicação contínua. O paciente seis tinha asma persistente moderada e fazia uso contínuo de corticoide inalado. Os demais pacientes não tiveram sintomas respiratórios relevantes após o teste. Isso pode ter ocorrido pelo fato destes estarem em tratamento de manutenção da asma com medicação inalada anti-inflamatória. Tentando esclarecer a possível interferência do uso de corticosteróides inalados na hiperresponsividade brônquica, um estudo analisou as fases imediata e tardia de pacientes submetidos à broncoprovocação brônquica e observou redução da fase tardia nos pacientes tratados, concluindo que nesses pacientes não se pode prever a magnitude dessa fase posterior ao término do teste⁴⁶.

Quatro pacientes foram classificados como monossensibilizados no início do estudo, mas ao refazer o teste imediatamente antes da broncoprovocação, comprovou-se a sensibilização aos dois ácaros em estudo. Isso pode ter ocorrido por possível nova sensibilização perante a exposição ao ácaro no ambiente, pelo efeito “booster” do primeiro teste, ou ainda, pelo aumento da sensibilidade do teste cutâneo, seja pela utilização de extratos de melhor qualidade, seja pela realização dos testes de maneira mais acurada. A difícil seleção de pacientes monossensibilizados a ácaros só reforça a importância da presença de cada um desses no meio ambiente.

Na tentativa de compreender melhor o perfil de sensibilização aos ácaros, testes de *immunoblotting* foram realizados. Inicialmente seis pacientes foram selecionados. Dois pacientes apresentaram bandas imunorreativas para os dois ácaros, dois pacientes só para *Der p* e dois pacientes não apresentaram nenhuma banda imunorreativas para nenhum dos ácaros. Como todos esses pacientes apresentavam teste cutâneo positivo e broncoprovocação positiva, pode-se concluir que o teste laboratorial foi menos sensível do que os testes cutâneos e de provocação para identificar a sensibilização aos ácaros em estudos.

Vários estudos na literatura já descrevem reatividade cruzada entre os ácaros. Alguns demonstram alta reatividade e homologia bem semelhante, como no caso de *Der p* e *Der f*^{35, 47}. Em relação ao *Der p* e *Blo t*, evidências mostram baixa a moderada reatividade cruzada, tanto *in vivo* quanto *in vitro*⁴⁸.

In vivo, dois trabalhos que expuseram seus pacientes com rinite ou asma aos ácaros que eram sensibilizados, nem sempre tiveram resultados concordantes^{40, 41}. Alguns pacientes apresentaram teste cutâneo positivo para *Der p* e *Blo t* e a positividade na broncoprovocação só para um deles. Nesses casos, o alérgeno que seria realmente relevante pra a asma daquele paciente foi identificado através da broncoprovocação.

In vitro, diversos ensaios laboratoriais demonstraram pouca reatividade entre os alérgeno das duas espécies de ácaros⁴⁸. Aparentemente, os alérgenos da *Blo t* parecem ser espécie específicos e isso acarretaria menor chance de

um paciente sensibilizado a *Blo t* ter reação cruzada ao estímulo com *Der p*⁴¹. Por outro lado, em pesquisa com população que não teve contato com a *Blo t*, observou-se positividade, embora pequena, nos testes cutâneos, provavelmente indicando reatividade cruzada entre os ácaros³⁶.

O estudo da interação entre os ácaros permite melhor conhecimento sobre a doença respiratória e individualização do tratamento, principalmente em relação à imunoterapia. Imunoterapia é um tratamento proposto para doenças IgE mediadas no qual dose progressivas do alérgeno são administradas e seu uso está bem estabelecido na asma⁴⁹. Saber qual alérgeno é o alérgeno relevante para se usar na terapêutica reduz custos de tratamento, diminui possíveis efeitos adversos e aumenta a possibilidade de sucesso terapêutico.

Ressaltando os resultados encontrados nesse trabalho, pode-se inferir que na prática clínica o teste cutâneo é uma ferramenta diagnóstica importante e válida para comprovar a sensibilização aos ácaros com relevância clínica para os pacientes com asma. A presença da sensibilização à *Blo t* deve ser sempre pesquisada e relevada, visto sua importância no desencadeamento dos sintomas em nosso meio.

A importância de saber quais ácaros é relevante clinicamente para o desencadeamento da inflamação alérgica e das exacerbações nos pacientes leva a melhor compreensão dessa síndrome chamada asma.

6- CONCLUSÃO

Há concordância entre a presença de IgE específica demonstrada pelo teste cutâneo e a positividade na broncoprovocação em relação aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* na grande maioria dos pacientes com asma desse estudo.

A reatividade das vias aéreas pode ser comprovada perante a exposição inalatória aos ácaros, ressaltando a alta positividade da provocação com a *Blot*, traduzindo a importância clínica da sua exposição no nosso meio.

Portanto, os ácaros presentes no teste cutâneo são relevantes para o desencadeamento dos sintomas de asma nos pacientes sensibilizados

7- REFERÊNCIAS

1. GINA. *The Global Initiative for asthma*. Disponível em <<http://www.ginasthma.org>>. Acesso em 02 de fevereiro de 2012.
2. Giavina-Bianchi P, Aun MV, Bisaccioni C, Agondi RC, Kalil J. Difficult-to-control asthma management through the use of a specific protocol. *Clinics* (São Paulo) 2010;65(9):905-18.
3. DATASUS. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2012.
4. Sole D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and atopic eczema among brazilian children and adolescents identified by de International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *J Pediatr* 2006;82(5):341-6.
5. Lemanske RF, Busse WW. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111 (Supl 2);S502-19.
6. Giavina-Bianchi P, Agondi RC, Kalil J. Asthma studies should be phenotype specific. *J Allergy Clin Immunol* 2013;Feb 26 (Epub Ahead of print).
7. Campos RA, Cruz AA. Asma. In: *Diagnóstico e tratamento das doenças imunológicas: para clínicos, pediatras e residentes*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

8. Reed, CE. The natural history of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:543-8.
9. V Diretriz brasileira para o manejo da asma. *J Bras Pneumol* 2006;32(Suppl 7):S447-74.
10. Sumino K, Sugar EA, Irvin CG, Kaminsky DA, Shade D, Weis CY, Hobbrook JT, Wise RA, Castro M. Methacoline Challenge Test: Diagnostic characteristic in asthmatics patients receiving controller medication. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:69-75.
11. Benson MR. Bronchial Provocation Tests. *Br J Clin Pharmacol*. 1979;8:417-424.
12. Cockcroft, DW. Direct Challenge Tests: Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *Chest* 2010;138 (2) (suppl):18S-24S.
13. American Thoracic Society. Guidelines for methacoline and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med* 200;161:309-329.
14. Giavina-Bianchi P, Fidalgo S, Duarte AJS. Hipersensibilidade dos pacientes com asma e rinite na cidade de São Paulo. *Arch Argent Alergia Immunol Clin* 1996;27(1):12-6.
15. Busse WW. The role of allergy in disease. *Immunol Rev* 2011;242:5-9.
16. Patelis A, Gunnbjörnsdóttir M, Malinovschi A, Matsson P, Onell A, Högman M, Alving K, Janson C. Population-based study of multiplexed IgE sensitization in relation to asthma, exhaled nitric oxide, and bronchial responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(2):397-402.

17. Forte, WCN. *Imunologia: do básico ao aplicado*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed 2007.
18. Giavina-Bianchi P, Agondi RC, Fonseca LAM. Asma: abordagem alérgica. In: *Clínica Médica*, volume 7: alergia e imunologia clínica, doenças da pele, doenças infecciosas. Barueri, SP: Manole, 2009
19. Aun WT, Pereira VAR. Fisiopatologia da atopia. In: *Diagnóstico e tratamento das doenças imunológicas: para clínicos, pediatras e residentes*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.
20. Witteman AM, Mulder M, Alberse RC, Jansen HM, Van Der Zee JS. Bronchial allergen challenge in subjects with low levels of allergic sensitization to indoor allergens. *Allergy* 1999;54:366-74.
21. Bisaccioni C, Aun MV, Cajuela E, Kalil J, Agondi RC, Giavina-Bianchi P. Comorbidities in severe asthma: frequency of rhinitis, nasal polyposis, gastroesophageal reflux disease, vocal cord dysfunction and bronchiectasis. ***Clinics*** (São Paulo) 2009;64(8):769-73.
22. ARIA. *Allergic Rhinitis and its impact on asthma*. Disponível em <<http://www.wheall.org/docs/ARIA-Report-2008.pdf>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2012.
23. Bourdin A, Gras D, Vacher I, Chanez P. Allergic rhinitis and asthma: united disease through epithelial cells. *Thorax* 2009;64:999-1004.
24. Chong Neto HJ, Rosario NA. Studying specific IgE: in vivo or in vitro. *Allergol et Immunopathol.* 2009;37(1):31-5.

25. Motta, AA, Kalil J, Barros MT. Testes cutâneos. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 2005;28(2):73-83.
26. Giavina-Bianchi, P, Bisaccioni C, Aun MV, Agondi, R, Kalil J. Rhinoconjunctivitis elicited by skin prick test. *Allergol Immunopathol* 2010;38(6):345-6.
27. Brannan JD, Loughheed. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Front Physio* 2012;3:1-11.
28. Schulze J, Voss S, Zissler U, Rose MA, Zielen S, Schubert R. Airway responses and inflammation in subjects with asthma after four days of repeated high-single-dose allergen challenge. *Respiratory research* 2012;13:78.
29. Warnwe JO. Significance of late reactions after bronchial challenge with house dust mite. *Archives of Disease in Childhood* 1975;51:905-11.
30. Aas, K. Bronchial Provocation Tests in Asthma. *Archives of Disease in Childhood*. 1970;45:221.
31. Melillo G, Aas K, Davies R, Debelic M, Dreborg S, Kerrebijn KF, Lasen A, Pinto Mendes J, Rizzo A, Rosenthal RR., Tateishi S, Corsico R. Guidelines for the standardization of bronchial provocation tests with allergens. *Allergy* 119:46:321-328.
32. PEREIRA, Veridiana Aun Rufino. *Variação sazonal nas concentrações de aeroalérgenos em diferentes níveis de poluição ambiental*. 2007. Tese (Doutorado em Alergia e Imunopatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5146/tde-11032008-113917/>>. Acesso em: 2013-02-14.

33. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ. The Allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J* 2004;27:563-9.
34. Arias-Irigoye J, Lombardero M, Arteaga C, Carpizo JÁ, Barber D. Limited cross-reactivity between *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Glycyphagus domesticus* in patient naturally exposed to both mite species. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:98-104.
35. Sidenius KE, Hallas TE, Poulsen LK, Mosbech H. Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. *Allergy* 2001;56:723-33.
36. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin Test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides spp.* Allergens among mite allergic patients in the UK. *Allergy* 2003;58:53-56.
37. Chew FT, Yif C, Chua KY, Fernández-Caldas E, Arruda LK, Chapman MD, Lee BW. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 1999;29:982-88.
38. Puerta L, Fernández-Caldas E, Lockey RF, Caraballo LR. Mite allergy in the tropics: sensitization to six domestic mite species in Cartagena, Colombia. *J Investigational Allergol Clin Immunol* 1993;3:198-204.

39. Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy* 1991;21:433-9.
40. Barreto B, Daher S, Naspitz CK, Sole D. Specific and non-specific nasal provocation tests in children with perennial allergic rhinitis. *Allergol et Immunopathol* 2001;29(6):255-63).
41. Robaina JCG, Machín IA, Fernández-Caldas E, Calvo VI, Moncholi CV, Moreno CB, Morín FT. Skin tests and conjunctival and bronchial challenges with extracts of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma and/or rhinoconjunctivitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:182-188.
42. Cohon A, Agondi RC. Abordagem do paciente alérgico. In: *Clínica Médica*, volume 7: alergia e imunologia clínica, doenças da pele, doenças infecciosas. Barueri, SP: Manole, 2009.
43. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Andersen SD, et al. Airway responsiveness, standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Resp J* 1993;6(Suppl 16):53-83s
44. Stanaland BE, Fernández-Caldas E, Jacinto CM, Trudeau BA, Lockey RF. Positive nasal challenge response to *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1045-9.

45. Fernández-Caldas E, Baena-Cagnani CE, López M, ET AL. Cutaneous sensitivity to 6 mite species in asthmatic patients from 5 Latin America countries. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1993;3:245-9.
46. Haugaard L, Iversen M, Dahl R. Predictors of early- and late-phase reactions to bronchial allergen challenge. *Allergy* 1997;52:999-1004
47. Njålgeman B, Kleinau I, Schou C, Hansen GN, Wahn U. Discrepancies between in vitro and in vivo tests for house dust mite allergy: is domestic exposure a better predictor than sensitization? *Clin Exp Allergy* 1994;24:946-48.
48. Kuo IC, Cheong N, Trakultivakom MD, Lee BW, Chua KY. An extensive study of human IgE cross-reactivity of Blo t 5 and Der p 5. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:603-9.
49. Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S306-13.