ARIANA CAMPOS YANG

**Efeito da imunoterapia com
Dermatophagoides pteronyssinus na
resposta clínica e imunológica ao camarão**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Luisa Karla de Paula Arruda

São Paulo

2009

Dedicatória

Aos meus pais, Ari e Maria Nilda, pelo carinho e dedicação.
Por me ensinarem lutar por meus objetivos.
Por não me darem tudo de “mão beijada”,
Por me ensinarem dar valor à conquista.
Por me ensinarem a pescar.

Hoje, me vejo navegando em mares distantes,
Pescando meus peixes com a varinha que um dia recebi de vocês.
Quem dera um dia eu possa ensinar a meus filhos,
O valor dessa varinha de pescar.
Obrigada por me amarem!
Amo vocês!

Ao meu marido, Hyun, por estar ao meu lado,
Por aceitar minhas ausências nesta difícil jornada que escolhi,
Por ser meu primeiro incentivador nesta estrada.
Por me ajudar na confecção dos belos gráficos desta tese.
Obrigada por acreditar em mim,
Por me amar.

Aos meus amados filhos, Lucas e Isabela:

Antes de vocês nascerem,
Eu não compreendia o que é graça.
Não entendia o vício,
Até ver vocês sorrirem.
Não conhecia a verdade,
Até pegá-los no colo.
Também não conhecia, é verdade,
O que é ter medo,
O que é sofrer,
Até vê-los adoecer.
Antes de vocês nascerem,
Eu não sabia quanta alegria,
Vocês me fariam ter,
Quantas coisas me fariam ver.

Hoje entendo minha natureza.
Hoje conheço o que é graça,
Não é à toa que filhos são:
O presente de Deus.
Hoje entendo o Amor.

Agradecimentos

Antes de expressar minha gratidão quero compartilhar um pouco da minha história nestes quatro anos de doutorado.

A tese de doutoramento foi uma etapa marcante para minha vida. No início, tudo parecia mais um sonho, onde os limites do real são imprecisos. Nesta fase, as expectativas, os sentimentos, a empolgação eram incontidos. Hoje quando lembro, me compadeço de meus amigos, eles não tiveram escolha, precisaram me ouvir falar, e falar, e falar: eu tinha um PROJETO. Depois, o sonho foi tomando forma, foi se misturando à realidade. Nesse processo, inevitavelmente, começaram surgir dificuldades: o extrato que não chegava; a necessidade de conciliar a pós-graduação com tantas outras atividades que foram só aumentando; a necessidade de resguardar o precioso tempo para me dedicar à minha família. Felizmente todas as dificuldades foram acompanhadas de compensação maior: o extrato não chegou, mas tive a oportunidade de conhecer o cultivo de ácaros e visitar a linda cidade de Alicante, na Espanha, ao ir buscá-lo; as muitas atividades de trabalho me mostraram que eu podia mais do que inicialmente eu pensava, e que organização é fundamental; a escassez de tempo me ensinou valorizar cada minuto com minha família e a usufruí-lo com qualidade. Passada a fase de adaptação, sonho e realidade se entendendo, o projeto começou a andar, então, a rotina, os formulários, as fichas e mais fichas para preencher de cada paciente incluído, tudo isso era uma ameaça de enfado. Neste momento, surgiu o desejo de concluir logo o trabalho, como seria bom dormir e acordar doutora naqueles dias; ou melhor, não seria bom. Afinal, creio que foi naquele momento que comecei a crescer de verdade; naquele momento pude sentir que eu tinha amigos me ajudando, que nada se faz sozinho, que crescemos juntos; aprendi que nossos erros nos ensinam; que planejamento é essencial para a pesquisa; comecei acreditar que os problemas, as dúvidas eram a minha oportunidade de exercitar meu raciocínio e minha capacidade de solucioná-los. Percebi que o sonho é doce enquanto sonho, porém, quando vai se tornando realidade perde muito de sua doçura; mas em compensação, ganha muitos outros sabores. Assim, consegui manter firme minha meta, meu ideal, e hoje estou aqui, acho que tenho uma TESE, acho que sou DOUTORA.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, minha rocha firme.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Fábio F. Morato Castro por me contagiar com seu espírito empreendedor e sonhador. Agradeço por acreditar e apostar em mim, antes que eu mesma o fizesse. Agradeço pela paciência nos meus momentos de impaciência. Nos momentos de estresse, por me ajudar manter o equilíbrio e resolver os problemas que surgiam. E claro, não poderia deixar de agradecer os elogios ao meu trabalho, sempre motivadores. Espero deixá-lo orgulhoso por ter sido o catalisador da importante “reação” de crescimento profissional e acadêmico de sua aluna.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Luisa Karla Arruda primeiramente por ser um exemplo de profissional para mim. A sua competência e sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos me despertam grande admiração. Ressalto ainda que suas orientações e os ensaios que pude realizar em seu laboratório deram um brilho especial, e originalidade a esta tese.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pela insistente e incansável disposição de me ensinar a pensar como um cientista, e buscar sempre a excelência na pesquisa. Obrigada pelos plantões de orientação as quintas-feiras, suas contribuições foram sempre muito valiosas. Obrigada por me ensinar que, em pesquisa, dinheiro não é problema.

Às Dra. Ana Beatriz Rossetti Santos e Michelle Christiane Rodrigues Barbosa por me auxiliarem na realização dos ensaios de ELISA para tropomiosina; por não medirem esforços e ficarem comigo do início da manhã até noite adentro para conseguirmos terminar os experimentos.

Ao Dr. Francisco Marco (IPI-ASAC Espanha), e ao Dr. João Carlos Mori (IPI-ASAC Brasil), pela colaboração nesta pesquisa, na avaliação de

tropomiosina no extrato, e por fornecerem gentilmente os extratos para imunoterapia.

À Dra. Maria Cândida Rizzo, ao Dr. Carlos Roberto Medeiros e ao meu amigo Dr. Clóvis Eduardo Santos Galvão, membros da minha banca de qualificação, pelas críticas e sugestões que me permitiram aprimorar a dissertação desta tese; especificamente, à Dra. Maria Cândida por me ajudar enxergar a necessidade de valorizar os aspectos clínicos da tese; ao Dr. Carlos por me auxiliar no tratamento estatístico dos meus resultados; e ao Dr. Clóvis pela sugestão de uma idéia para dar continuidade às novas perguntas científicas que surgiram a partir desta tese, bem como, por ser meu companheiro de trabalho, com quem sempre aprendo muito.

À minha mais antiga companheira do Serviço, minha querida amiga e mestre Alexandra Sayuri, por sua agradável companhia, por dividir a sala de imunoterapia comigo, pelos palpites para a escolha da capa da tese, e porque com seu jeito discreto e elegante sempre me mostrou que estava pronta a me ajudar.

À minha parceira de residência e grande amiga, Arlete Daltro pelas palavras de incentivo e pelo carinho sempre demonstrado. Nossa cumplicidade facilitou superar as crises e dificuldades dos primeiros anos na especialidade.

À Dra. Elaine Gagete, por quem também fui agraciada pela amizade, por ser um exemplo de pós-graduanda, determinada, especialmente por sua disposição de ouvir críticas e usá-las para seu crescimento.

À minha primeira aluna não oficial e grande amiga, Fabiane Pomiecinski por permitir que eu aprendesse com você, que eu sou capaz de orientar; e por me orgulhar ao vê-la crescendo tanto na profissão.

Ao meu novo amigo, Diogenes Ferreira por mostrar que seriedade pode andar junto de bom humor.

À minha nova, mas grande amiga Cynthia Mafra, pelo seu jeito peculiar de demonstrar carinho e exaltar minhas qualidades; por sua presença alegre e expansiva, por sua generosidade, e claro, pelos seus emails quilométricos, fossem eles de incentivo, desabafo ou para sugestões.

À nutricionista e amiga Vanessa Penterich, minha companheira no ambulatório de alergia alimentar, por quem tenho especial carinho, por ser sempre prestativa e atenciosa.

Às minhas novas alunas não oficiais, Paula Meireles e Daniela Varalda, por acreditarem que posso ajudá-las no caminho que escolheram, essa confiança me traz grande motivação.

Às atuais residentes e estagiárias, Denise, Briana, Juliana, Priscila, Fernanda Gaia, Fernanda Montenegro e Ana Priscia, por demonstrarem carinho e compreensão, principalmente nas últimas semanas que antecederam a entrega da tese.

Às Dra. Rosana Agondi e Ana Karolina, e ao preceptor Marcelo Aun, aos ex-residentes Carla e Edcarlos pelo encaminhamento de pacientes para seleção e inclusão no estudo.

À Dra. Cristina Kokron pelo interesse e apoio, em especial na realização dos ImmunoCAPs.

Aos assistentes do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia: Dr. Antonio Abílio Motta, Dra. Andrea Cohon, Dra. Myrthes Toledo de Barros, Dr. Pedro Giavina-Bianchi, Dr. Luiz Augusto Fonseca, Dr. Luiz Vicente Rizzo por participarem da minha formação na especialidade, certamente hoje eu guardo um pouco de cada um de vocês.

Aos funcionários do ambulatório de Alergia e Imunologia: Maurício, Leoni, Junior pela receptividade aos pacientes, o que certamente contribuiu para a assiduidade deles; Rosana pela coleta de sangue; Serafim pela eficiente realização das espirometrias; Andréa por atender meus telefonemas, e me ajudar com as questões burocráticas relacionadas à tese.

Ao funcionário do LIM 60, Carlos Palma pelo auxílio na realização dos ImmunoCAPs.

Aos pacientes que, apesar das dificuldades, do longo tempo de seguimento, compareceram fielmente às consultas; e porque nitidamente a razão para isso não era o benefício pessoal simplesmente, percebia-se o interesse em contribuir com o trabalho.

Aos meus irmãos e familiares, aos amigos de fora do trabalho por influenciarem minha vida e por se alegrarem comigo nesta conquista.

Por fim, mas não menos importante, pelo contrário, meu agradecimento à secretária e amiga Tânia, por ter participado de todas as fases desse trabalho; por ter me ouvido quando eu estava feliz com os resultados, e também quando eu estava estressada, por rir e chorar comigo; por me lembrar dos prazos, por tirar minhas dúvidas sobre as mais diversas regras da pós-graduação. E mais do que isso, por me fazer sentir que, ao fazer seu trabalho, sempre havia um ingrediente especial: o amor.

...De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre recomeçando;
a certeza de que precisamos continuar;
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.
Portanto, devemos fazer:
da interrupção, um caminho novo;
da queda, um passo de dança;
do medo, uma escada;
do sonho, uma ponte;
da procura, um encontro...

Fernando Pessoa

Esta tese está 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. Serviço 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de figuras.....	xix
Lista de tabelas.....	xx
Lista de gráficos.....	xxiii
Lista de quadros	xxiv
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xxv
Lista de Símbolos	xxix
Resumo	xxx
<i>Summary</i>	xxxii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Imunoterapia.....	2
1.2 Atopia e alergia respiratória.....	7
1.3 Alergia a camarão	11
1.4 Tropomiosina e reatividade cruzada.....	14
1.5 Justificativa	17
2. OBJETIVOS	19
3. MÉTODOS.....	22
3.1 Seleção de pacientes	23
3.2 Casuística.....	24
3.3 Modelo de estudo	25
3.4 Testes cutâneos de leitura imediata	27
3.5 Quantificação da IgE sérica específica para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Periplaneta americana</i> e camarão.....	28
3.6 Prova de provocação oral.....	31
3.7 Dieta restritiva.....	33
3.8 Imunoterapia.....	33
3.9 Avaliação clínica dos pacientes.....	37
3.10 Prova de Função Pulmonar	38
3.11 Outros exames	39
3.12 Análise estatística.....	39

4. RESULTADOS	42
4.1 Diagnóstico de alergia a camarão	43
4.1.1 Sensibilização IgE para camarão e tropomiosina de camarão.....	44
4.1.2 Desfecho das provocações orais com camarão	46
4.1.3 Valor diagnóstico do teste cutâneo de leitura imediata, da dosagem de IgE sérica específica para camarão, e da dosagem de IgE para tropomiosina de camarão	49
4.2 Evolução da reatividade IgE nos testes cutâneos de leitura imediata	52
4.3 Evolução dos níveis de IgE sérica específica para ácaro, barata e camarão	61
4.4 Evolução dos níveis de IgE específica para tropomiosina	67
4.5 Reatividade clínica ao camarão após a imunoterapia específica	70
4.6 Evolução clínica dos pacientes.....	72
4.7 Avaliação de parâmetros da função pulmonar	76
4.8 Reações adversas à ITE	78
5. DISCUSSÃO.....	81
5.1	
5.2	
5.3	
5.4	
6. CONCLUSÕES.....	93
7. ANEXOS.....	98
8. REFERÊNCIAS	118

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Grupos de estudo	26
Figura 2 -	Desfecho das provocações orais em relação à sensibilização IgE a camarão pelo TCLI e/ou IgE sérica específica, e a história anterior de reação ao camarão	47
Figura 3 -	Desfecho das provocações orais em relação à detecção de IgE para tropomiosina de camarão, e a história anterior de reação ao camarão	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Esquema da fase de indução da imunoterapia.....	37
Tabela 2-	Sensibilização ao camarão pelo TCLI e ImmunoCAP N=35.....	44
Tabela 3-	Distribuição dos pacientes nos grupos segundo a sensibilização a camarão	45
Tabela 4-	Distribuição dos resultados da dosagem de IgE para tropomiosina de camarão segundo a sensibilização para camarão N=35.....	45
Tabela 5-	Frequência de sintomas relatados na história pessoal dos sete pacientes alérgicos a camarão e frequência de sintomas elicitados pela prova de desencadeamento oral	48
Tabela 6-	Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata para camarão segundo o desfecho nas provocações orais (alergia a camarão) N=35	49
Tabela 7-	Resultados dos testes para IgE sérica específica para camarão (ImmunoCAP) segundo o desfecho nas provocações orais (alergia a camarão) N=35.....	50
Tabela 8-	Resultados dos testes para IgE sérica específica para tropomiosina de camarão (ELISA) segundo o desfecho nas provocações orais (alergia a camarão) N=35	50
Tabela 9-	Valor do teste cutâneo de leitura imediata (TCLI), da determinação da IgE específica para camarão (ImmunoCAP), e da determinação específica para tropomiosina de camarão, em termos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência diagnóstica para alergia a camarão	52
Tabela 10-	Valores das medianas das pápulas de Der p 1/1 e 1/10, camarão e tropomiosina recombinante de barata (Per a 7), nos grupos imunoterapia e controle, obtidos no início do estudo e após um ano de tratamento N pré-ITE= 35, N pós-ITE= 33	55
Tabela 11-	Distribuição dos resultados dos TCLI para Der p titulado 1/10, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23.....	56

Tabela 12-	Distribuição dos resultados dos TCLI para camarão, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23	57
Tabela 13-	Distribuição dos resultados dos TCLI para <i>Periplaneta americana</i> , segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23.....	58
Tabela 14-	Distribuição dos resultados dos TCLI para tropomiosina recombinante de <i>Periplaneta americana</i> (Per a 7), segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23	59
Tabela 15-	Distribuição dos resultados do ImmunoCAP para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Der p) segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23	62
Tabela 16-	Distribuição dos resultados do ImmunoCAP para camarão, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23.....	64
Tabela 17-	Distribuição da frequência de resultados do ImmunoCAP para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Der p), camarão e <i>Periplaneta americana</i> (Per a) segundo as classes do teste, nos instantes de tempo pré-ITE e pós-ITE, no grupo imunoterapia (n =25 pré-ITE, e n= 23 pós-ITE).....	65
Tabela 18-	Distribuição da frequência de resultados do ImmunoCAP para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (Der p), camarão e <i>Periplaneta americana</i> (Per a) segundo as classes do teste, nos instantes de tempo pré e pós-tratamento, no grupo controle (n=10)	66
Tabela 19-	Distribuição dos resultados do ELISA para detecção de IgE anti-tropomiosina de Der p, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23	67
Tabela 20-	Distribuição dos resultados do ELISA para detecção de IgE anti-tropomiosina de camarão, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23	68
Tabela 21-	Distribuição dos resultados do ELISA para detecção de IgE contra tropomiosina recombinante de <i>Periplaneta americana</i> , segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23.....	69

Tabela 22-	Manifestações clínicas desencadeadas nas provas de desencadeamento oral com camarão pré e pós-ITE nos pacientes alérgicos a camarão N=7	71
Tabela 23-	Frequência do diagnóstico de rinite, conjuntivite e asma nos grupos que receberam imunoterapia (n=25) e no grupo controle (n=10)	72
Tabela 24-	Valores do VEF1 pré BD (porcentagem do predito) e do VEF1 pós BD, pré e pós-ITE, nos grupos imunoterapia (n=25 pré ITE e n= 23 pós-ITE) e controle (n= 10).....	77
Tabela 25-	Reações adversas sistêmicas na imunoterapia quanto à gravidade dos sintomas, dose desencadeadora, frequência por paciente, e diagnóstico de alergia a camarão e asma	80

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Valores das médias das pápulas em mm do TCLI para os alérgenos (Der p titulado 1/1, 1/10, 1/100/, 1/1000; Camarão; *Periplaneta americana*; *Blatella germanica*; Tropomiosina recombinante de *P. americana*, Per a 7; *Blomia tropicalis*; Cão; Gato; e Fungos), para o controle negativo e para a histamina, realizados pré-ITE, pós-indução da imunoterapia, e após um ano de ITE, no grupo que recebeu imunoterapia. N=2353
- Gráfico 2-** Valores das médias das pápulas em mm do TCLI para os alérgenos (Der p titulado 1/1, 1/10, 1/100/, 1/1000; Camarão; *Periplaneta americana*; *Blatella germanica*; Tropomiosina recombinante de *P. americana*, Per a 7; *Blomia tropicalis*; Cão; Gato; e Fungos), para o controle negativo e para a histamina, realizados pré-tratamento, pós-4meses, e após um ano de tratamento, no grupo controle. N=1054

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Valores de IgE total, eosinófilos no sangue periférico, e exame protoparasitológico de fezes dos pacientes do grupo imunoterapia e do grupo controle	105
Quadro 2-	Distribuição das pápulas (em mm) no TCLI para camarão, nos 35 pacientes incluídos no estudo (Tempo zero)	106
Quadro 3-	Distribuição dos resultados do ImmunoCAP para camarão, segundo as classes do teste, nos 35 pacientes incluídos no estudo (Tempo zero)	107
Quadro 4-	Distribuição dos resultados da dosagem de IgE específica para tropomiosina de camarão no início do estudo, nos 35 pacientes incluídos	108
Quadro 5-	Distribuição dos resultados dos 35 pacientes estudados segundo o desfecho da provocação oral, história anterior de reação a camarão, TCLI e ImmunoCAP para camarão, e dosagem de IgE para tropomiosina de camarão	109
Quadro 6-	Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata, em diferentes titulações, para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo	110
Quadro 7-	Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata para alérgenos com potencial para reatividade cruzada com tropomiosina, nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo	111
Quadro 8-	Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata para alérgenos não relacionados à reatividade cruzada com tropomiosina e histamina, nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo	112
Quadro 9-	Quantificação de IgE específica (ImmunoCAP), por classes do teste, para ácaro, barata e camarão, nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo	113
Quadro 10-	Quantificação de IgE específica para tropomiosina de Der p, camarão e barata (Per a 7) nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo	114

Quadro 11-	Evolução dos escores de rinite e asma, no início e ao final do estudo, nos grupos imunoterapia e controle.....	115
Quadro 12-	Uso de medicações para tratamento da asma e/ou rinite alérgicas pré- imunoterapia e após um ano de seguimento, nos grupos imunoterapia e controle	116
Quadro 13-	Valores espirométricos (VEF1 pré e pós-broncodilatador) inicial e após 1 ano de tratamento (porcentagem do predito)	117

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Alt a	<i>Alternaria alternata</i>
ARIA	<i>Allergic Rhinitis Impact of Asthma</i>
Asp f	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B7	Molécula ligante da APC (Célula apresentadora de antígeno) que expressa o MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) da classe II
BD	Biosciences Kit
Bla g 1	Antígeno específico 1 da barata <i>Blatella germanica</i>
Bla g 2	Antígeno específico 2 da barata <i>Blatella germanica</i>
Bla g 4	Antígeno específico 4 da barata <i>Blatella germanica</i>
Bla g 5	Antígeno específico 5 da barata <i>Blatella germanica</i>
Bla g 6	Antígeno específico 6 da barata <i>Blatella germanica</i>
BSA	Albumina Antisoro Bovina
C	Grupo Controle
Ca	Grupo controle não sensibilizados ao camarão
Cb	Grupo controle sensibilizados ao camarão
CD25+	<i>Cluster of differentiation</i> 25 positivo
CD28	<i>Cluster of differentiation</i> 28
CD4+	<i>Cluster of differentiation</i> 4 positivo
Cla h	<i>Cladosporium herbarum</i>
CVF	Capacidade Vital Forçada
DBPCFC	Provocação Oral Duplo Cego Controlada por Placebo
Der f 10	Antígeno específico 10 do ácaro <i>Dermatophagoides farinae</i> (tropomiosina)
Der p 1	Antígeno específico 1 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>

Der p 7	Antígeno específico 7 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p 9	Antígeno específico 9 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p 10	Antígeno específico 10 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (tropomiosina)
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>
ELISA	Ensaio imunosorbente ligado à enzima
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
IFN γ	Interferon γ
Ig G	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IgG ₄	Imunoglobulina G 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Children</i>
IT a	Grupo de pacientes selecionados não sensibilizados ao camarão
IT b	Grupo de pacientes selecionados sensibilizados ao camarão
ITE	Imunoterapia específica
LABA	Broncodilatador de longa ação
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-T	PBS-Tween
Pen a 1	Antígeno específico 1 da tropomiosina de camarão
Pen n	<i>Penicillium notatum</i>

Per a 1	Antígeno específico 1 da <i>Periplaneta americana</i>
Per a 3	Antígeno específico 3 da <i>Periplaneta americana</i>
Per a 7	Antígeno específico 7 da <i>Periplaneta americana</i> (tropomiosina)
rBlo t 10	Tropomiosina recombinante de <i>Blomia tropicalis</i>
PBS-T	<i>Buffered Saline Tween</i>
TCLI	Teste cutâneo de leitura imediata
TGF β	Fator transformador do crescimento β
Th 0	Célula T auxiliar 0
Th 1	Célula T auxiliar 1
Th 2	Célula T auxiliar 2
VEF 1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual a
>	Maior que
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
g	Gramma
Kd	Kilodalton
kU/L	Kilounidades por litro
mg	Miligrama
mL	Mililítros
n	Frequência Absoluta
N	Número de participantes
n°	Número
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
°	Grau
µg	Microgramas
µg/ mL	Micrograma por mililitro
µg/ dia	Micrograma por dia
µL	Microlitro

Resumo

Yang AC. *Efeito da imunoterapia com Dermatophagoides pteronyssinus na resposta clínica e imunológica ao camarão* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 129 p.

Objetivo: O objetivo desse estudo foi avaliar alterações na resposta clínica e imunológica ao camarão após a imunoterapia com *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Métodos:** Selecionou-se 35 indivíduos alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), os quais foram submetidos a testes cutâneos de leitura imediata para ácaros, baratas, camarão, tropomiosina recombinante, além de cão, gato e fungos. A detecção de IgE específica *in vitro* foi feita para o ácaro, camarão, barata americana e para suas tropomiosinas. Em todos, avaliou-se reatividade clínica ao camarão através de provocação oral. Dez pacientes foram alocados para o grupo controle, e 25 foram submetidos à imunoterapia alérgeno específica para o ácaro. Os testes cutâneos e a dosagem de IgE sérica específica foram repetidas após a indução da imunoterapia, e após 1 ano do início. A reatividade clínica ao camarão foi reavaliada no final do estudo pela provocação oral. **Resultados:** No grupo dos pacientes que foram submetidos à imunoterapia, observamos diminuição na reatividade nos testes cutâneos e dosagem de IgE específica para Der p, camarão e tropomiosina recombinante. Dos 10 pacientes com testes cutâneos positivos para camarão, 4 foram negativos na dosagem após um ano de imunoterapia ($p=0,04$). Quanto à dosagem sérica de IgE para camarão, dos 9 positivos no início, 6 ficaram negativos ($p=0,014$). Nenhum paciente submetido a imunoterapia desenvolveu nova sensibilização para camarão. Não houve alteração na reatividade clínica ao camarão após imunoterapia. **Conclusão:** A imunoterapia para *Dermatophagoides pteronyssinus* foi acompanhada de diminuição da reatividade imunológica para camarão e clinicamente não houve alteração da sensibilidade a camarão.

Descritores: imunoterapia, alergia alimentar, alergia a camarão, tropomiosina, reatividade cruzada

Summary

Yang AC. *Effect of immunotherapy with Dermatophagoides pteronyssinus in the clinical and immunological response to shrimp* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 129 p.

Objective: The objective of this study was to determine changes in clinical and immunological response to shrimp after immunotherapy with *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Methods:** We studied 35 allergic subjects to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), submitted to skin tests to mites, cockroach, shrimp, recombinant tropomyosin, and dog, cat and fungi. The detection of serum specific IgE was performed to mite, shrimp, and tropomyosin from American cockroach. In all patients, the clinical reactivity to shrimp was assessed through oral challenge. Ten patients were allocated to the control group, and 25 were submitted to immunotherapy for mite. Skin tests and determination of serum specific IgE were repeated after the induction of immunotherapy (3-4 months) and 1 year after of beginning of the treatment. The clinical reactivity to shrimp was assessed again at the end of the study by oral challenge. **Results:** In the group of patients who were undergoing immunotherapy, we observed decreased reactivity in the skin tests and specific IgE levels to Der p, shrimp and recombinant tropomyosin. Among the 10 patients with positive skin tests to shrimp, 4 were negative when assessed after one year of immunotherapy ($p = 0.04$). About serum specific IgE to shrimp, from the 9 positive reactors in the beginning of treatment, 6 became negative ($p = 0.014$). There was no change in clinical reactivity to shrimp after immunotherapy. **Conclusion:** The immunotherapy for *Dermatophagoides pteronyssinus* was accompanied by decreased immune reactivity to shrimp and clinically there was no change in sensitivity to shrimp.

Descriptors: immunotherapy, food allergy, shrimp allergy, tropomyosin, cross-reactivity

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Yang, Ariana Campos

Efeito da imunoterapia com *Dermatophagoides pteronyssinus* na resposta
clínica e imunológica ao camarão / Ariana Campos Yang. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Fábio Fernandes Morato Castro.

Co-orientadora: Luisa Karla de Paula Arruda.

Descritores: 1.Imunoterapia 2.Hipersensibilidade alimentar 3.Tropomiosina
4.Reatividade cruzada 5.Camarões

USP/FM/SBD-184/09

1 Introdução

1.1 Imunoterapia específica

A imunoterapia específica (ITE), descrita pela primeira vez por Noon, é utilizada há mais de 90 anos (Noon, 1911). A ITE consiste na administração de extratos de alérgenos purificados e padronizados por via subcutânea. O objetivo do tratamento é modificar a resposta imune ao futuro contato com o alérgeno, visando a redução dos sintomas. Diferente de outras intervenções, a imunoterapia é a única forma de tratamento que proporciona melhora a longo prazo das doenças alérgicas, que se mantém mesmo após a sua interrupção. Tem sido demonstrado que a ITE também atua prevenindo novas sensibilizações e desenvolvimento de asma em crianças (Moller C, 2002; Passalacqua G, 2007). A ITE é efetiva no tratamento da asma alérgica, rinite alérgica e hipersensibilidade aos venenos de himenópteros, não sendo recomendada para alergia alimentar, urticária crônica e/ou angioedema. A utilidade da imunoterapia foi enfatizada em relatório da OMS, que recomenda sua aplicação em pacientes selecionados, e que apresentem anticorpos IgE específicos a alérgenos clinicamente relevantes (Bousquet J, 1998).

O tratamento convencional é feito através de uma série de injeções por via subcutânea, geralmente com aplicação semanal, com aumento gradual das doses nas primeiras 10 a 13 semanas, quando se estabelece uma dose de manutenção, aplicadas com intervalos de 2-4 semanas, por 3

ou mais anos, a fim de obter-se tolerância a um alérgeno específico. A qualidade do alérgeno utilizado é um fator de muita importância e se correlaciona com a eficácia clínica, sabe-se que é necessário se atingir concentrações entre 5 µg e 20 µg/mL dos alérgenos principais na dose de manutenção (Bousquet J, 1998).

A ITE pode determinar reações locais e sistêmicas, que nos pacientes com asma variam segundo as estatísticas de 5 a 35% (Bousquet J, 1990). A injeção subcutânea pode determinar reações locais que geralmente são bem toleradas, não necessitando de intervenção médica, embora possam constituir-se na primeira manifestação de uma resposta sistêmica. O tratamento, quando de grande desconforto local, consiste na aplicação de compressas geladas, prescrição de anti-histamínico, corticóide tópico e redução da dose da imunoterapia. As reações sistêmicas são raras e sobrevivem em poucos minutos após a injeção e mais raramente depois de 30 minutos dela. Caracterizam-se por sinais generalizados e/ou sintomas que ocorrem longe do local da aplicação. Estas reações variam de um simples *rash* ou prurido, podendo manifestar-se como asma, rinite, urticária, angioedema até uma anafilaxia grave. Nos EUA, entre 1987 e 1991 identificaram-se 19 mortes associadas à ITE, sendo que 16 em pacientes com asma. As mortes foram atribuídas à inclusão de pacientes com doença mal controlada, erros na dose administrada e a aplicação por pessoal não qualificado, sem o acesso imediato ao instrumental de reanimação e a drogas como adrenalina (Reld

MJ, 1993). Recomenda-se que o paciente permaneça por 30 minutos em observação após a injeção subcutânea.

O mecanismo de ação da imunoterapia ainda não está completamente esclarecido. Nos primeiros meses de tratamento ocorre um aumento nas concentrações da IgE específica, seguido por uma lenta e progressiva redução durante os anos subsequentes, sendo raro o seu desaparecimento completo (Lichtenstein LM, 1973; Till SJ, 2004). Anticorpos IgG₄ alérgeno específicos aumentam durante a imunoterapia e se mantêm em níveis elevados durante o tratamento (Passalacqua G, 2007). Embora os níveis de ambos os isotipos aumentem na fase inicial do tratamento, a relação da IgE específica/IgG₄ diminui 10-100 vezes no decurso do tratamento (Gleich GJ, 1982).

Sugere-se que essas alterações são secundárias à ação da ITE sobre a resposta da célula T ao alérgeno. Na inflamação alérgica, em pacientes atópicos, ocorre um predomínio de células Th2, que liberam grandes quantidades de citocinas como: IL-4, IL5 e IL-13. Estudos sugerem que a imunoterapia específica possa atuar induzindo a tolerância imunológica, o desvio imune das respostas Th2 e Th0 a favor de uma resposta Th1 ou a uma regulação para baixo das respostas Th0-Th2, uma anergia (Till SJ, 2004, Passalacqua, 2007). Este desvio determinaria uma preponderância de células T do tipo Th1, com a liberação de IFN γ , que promove a produção de IgG pelos linfócitos B e inibe as células T do tipo Th2. Este efeito pode ser mediado por um aumento na expressão da IL-12,

principalmente pelos macrófagos, após a exposição ao alérgeno. Esta teoria apóia-se em estudos que evidenciaram queda nos níveis séricos de IgE (Lichtenstein LM, 1973), aumento nas concentrações de IgG (Gleich GJ, 1982), e inibição do recrutamento ou ativação de células efectoras como mastócitos (Otsuka H, 1991; Creticos PS, 1985) e eosinófilos nos órgãos alvo (Furin MJ, 1991 ; Rak S, 1988), em resposta à imunoterapia.

A detecção, após ITE, de células T de sangue periférico que produzem IL-10 em resposta à estimulação com alérgeno tem sido um achado altamente consistente (Till SJ, 2004; Passalacqua, 2007). A interleucina-10 também está aumentada na mucosa respiratória após ITE, esta citocina é produzida por vários tipos de células, incluindo células Th1, Th2, células T reguladoras, células B, monócitos/macrófagos, células dendríticas, mastócitos e eosinófilos. Entretanto, a fonte maior de IL-10 após ITE foi identificada como células T reguladoras CD4+CD25+ (Verhagen J, 2006). A interleucina-10 tem várias atividades biológicas que poderiam ser importantes em mediar os efeitos de da IT, que incluem: modulação da produção de IgE induzida por IL-4 em favor de IgG4; inibição da ativação de mastócito, dependente de IgE; inibição da produção de citocinas por eosinófilos e de sua sobrevivência; supressão de IL-5; e supressão de respostas proliferativas de células T à estimulação com alérgeno. Esses efeitos têm sido atribuídos ao bloqueio da interação das moléculas co-estimulatórias CD28 (em células T), dependente do receptor de IL-10, e B7 (em células apresentadoras de antígeno), resultando na inibição subsequente da sinalização intracelular em células T. Desse

modo, a proliferação e a produção de citocinas Th1 e Th2 alérgeno-dependentes são inibidas pela IL-10. A supressão de células T tem sido associada a aumento da produção de TGF- β além de IL-10 por células T alérgeno-específicas, após imunoterapia. Portanto, sugere-se que a produção de IL-10 e TGF- β por células T representam um importante componente da imunoterapia bem sucedida, ou pelo menos é um marcador de regulação para baixo bem sucedida da resposta de células T antígeno-específicas após imunoterapia (Till SJ, 2004; Verhagen J, 2006; Passalacqua G, 2007).

Por outro lado, a ação da ITE na resposta imunológica e/ou clínica para proteínas que apresentam reatividade cruzada com o alérgeno usado na vacina é alvo de dúvidas e discussões. Aproximadamente 70% dos indivíduos alérgicos a pólen desenvolvem alergia alimentar a frutas frescas da família *Rosaceae*, castanhas ou vegetais, o que é explicado pela reatividade cruzada da IgE que reconhece os alérgenos homólogos. Estudos demonstram que a ITE para pólen melhora também a alergia aos alimentos que contêm os alérgenos homólogos. Bolhaar et al (2004) mostrou que a ITE para pólen em pacientes com alergia concomitante a maçã foi capaz de induzir produção de anticorpos IgG4 para a fruta e melhorar os sintomas de alergia alimentar em nove dos treze indivíduos que receberam o tratamento, com desaparecimento completo em três deles. Num outro estudo, retrospectivo, observou-se que após imunoterapia específica para pólen, 50% dos pacientes relataram melhora dos sintomas de síndrome de alergia oral a frutas e vegetais, 44% não

perceberam impacto sobre os sintomas, e 6% referiram piora deles (Czarnecka-Operacz M, 2008). Entretanto, na ITE com ácaros não está estabelecida a implicação imunológica ou clínica sobre alérgenos com reatividade cruzada, a saber, baratas, camarão e outros crustáceos e moluscos. Van Ree et al (1996) relataram desenvolvimento de IgE específica para camarão e caramujo em três de dezessete pacientes que receberam ITE para ácaro, sendo que dois deles apresentaram sintomas de alergia oral pela ingestão de camarão. Outros relatos de surgimento e agravamento de alergia alimentar a crustáceos e moluscos durante ITE com ácaro, alertam para a necessidade de se avaliar a indicação deste tratamento em alérgicos a camarão, e chamam a atenção para a possibilidade de se induzir sensibilização alimentar através da exposição ao alérgeno de reatividade cruzada presente na vacina (Pittner G , 2004; Antonicelli L , 2003; Pajno GB, 2002; Peroni DG, 2000; De Maat-Bleeker F, 1995).

1.2 Atopia e alergia respiratória

O termo alergia foi introduzido em 1906 pelo pediatra vienense von Pirquet para designar a responsividade alterada do organismo. Atualmente este termo tem sido utilizado para designar uma forma anormal do organismo para responder aos estímulos antigênicos (alérgenos), que são tolerados em indivíduos normais.

O termo atopia vem do grego *atopos* que significa estranho, e foi introduzido por A.F. Coca e R. Cooke em 1923, para descrever doenças alérgicas. A atopia é uma predisposição genética de certos indivíduos para a síntese inapropriada de IgE específica para componentes protéicos de aeroalérgenos ambientais inalados. A atopia se expressa clinicamente através das doenças atópicas que além da asma inclui a rinoconjuntivite alérgica e a dermatite atópica. A propensão individual para atopia é geneticamente determinada, porém as grandes variações regionais na manifestação de alergia são decorrentes de fatores ambientais.

A atopia pode ser determinada, através de testes cutâneos (puntura), pela dosagem *in vitro* de IgE específica para alérgenos comuns. A elevação da IgE não é um atributo somente da atopia, sendo encontrada em outras patologias como nas doenças parasitárias, no mieloma, nas doenças inflamatórias crônicas intestinais (Sutton, BJ, 1993; Levo Y, 1986), entre outras.

A asma e a rinite alérgica apresentam alta e crescente prevalência em muitas partes do mundo. No Brasil, o estudo ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Children*) mostrou que a prevalência de chiado nos últimos 12 meses entre crianças de 13-14 foi de 18 a 27%; enquanto que a prevalência média de diagnóstico médico de rinite variou de 7,9 a 31,7% nos adolescentes (Vanna AT, 2001). Estima-se que 80 a 90% das crianças com asma sejam sensibilizadas a alérgenos

intradomiciliares, cujos principais representantes são os ácaros da poeira domiciliar.

Os ácaros mais estudados na alergia respiratória são o *Dermatophagoides pteronyssinus*, o *D. farinae*, o *D. microceras* e o *Euroglyphus maynei* pertencentes à família *Pyroglyphidae*. O *Dermatophagoides pteronyssinus* é mundialmente predominante na poeira doméstica, principalmente em regiões de clima úmido (Norte da Europa, Brasil e Noroeste do Pacífico). Medem aproximadamente 420 microns, e são fotofóbicos e suscetíveis a dissecação.

Os alérgenos sensibilizantes do ácaro da poeira doméstica estão divididos em grupos, identificados com base no peso molecular e sequência homóloga. Foram identificados como os principais alérgenos, as cisteína-proteases (alérgenos grupo 1: *D. pteronyssinus* 1, *D. farinae* 1, *D. microceras* 1); as serino-proteases (alérgenos grupo 9); e as amilases (alérgenos grupo 4). Os alérgenos do grupo 2 (*D. pteronyssinus* 2, *D. farinae* 2) derivam principalmente do corpo dos ácaros e não das fezes. Os alérgenos mais abundantes na poeira doméstica pertencem aos grupos 1 e 9, encontrando-se, também, os alérgenos do grupo 2. Alguns destes alérgenos são enzimas proteolíticas, havendo evidências de que o Der p 1 e Der p 9 interfiram na permeabilidade mucosa (Hoover GE, 1995). A relação entre atividade biológica e a capacidade de produzir alergia ainda não foi esclarecida. Outros grupos de alérgenos incluem enzimas como: grupo 3 (tripsinas), grupo 5 (função desconhecida), grupo 6

(quimiotripsinas), grupo 7 (função desconhecida), grupo 8 (glutathion-transferases), grupos 10 e 11 (tropomiosina e paramiosina). O alérgeno do grupo 10, a tropomiosina (Der p10), não é considerado um alérgeno principal entre pacientes vivendo na Europa, Estados Unidos e Coréia (Pittner G, 2004). Outro ácaro bastante importante entre atópicos é a *Blomia tropicalis* (Arruda LK, 1997), que possui diferentes alérgenos identificados, entre eles, a tropomiosina; embora este não se caracterize como alérgeno principal desse ácaro. Num estudo, que avaliou tropomiosina recombinante de *Blomia tropicalis* (rBlo t 10), a taxa de sensibilização variou entre 20% e 29% em indivíduos atópicos (Yi FC, 2002).

Outros alérgenos encontrados nas casas provêm das baratas que as infestam, e que podem também desencadear asma perene. Ao contrário dos ácaros, não dependem da umidade do ambiente, apresentando grande versatilidade na busca de água em seu hábitat. São três as espécies principais: a *Blatella germanica*, a *Periplaneta americana* e a *Blatella orientalis*. Foram identificados diversos alérgenos na *B. germanica*: Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5 e Bla g 6 (Arruda LK, 1995); e três da *P. americana*: Per a 1, Per a 3 e Per a 7 (Chapman MD, 1997; Helm RM, 1994; Schou C, 1990; Santos AB, 1999). Em relação ao alérgeno tropomiosina, ressalta-se que na *P. americana*, Per a 7 é um alérgeno principal (Santos AB, 1999), enquanto que na *B. germanica* apenas 18% dos soros de pacientes alérgicos a esta barata mostraram reatividade IgE para a sua tropomiosina (Jeong HY, 2004). Estudos demonstraram que

mesmo após o extermínio eficiente de baratas, seus alérgenos podem permanecer no ambiente por até seis a oito meses. Atualmente, os extratos de barata para imunoterapia não são padronizados e não há estudos controlados mostrando a eficácia desta forma de tratamento em pacientes com asma e rinite.

1.3 Alergia a camarão

Os crustáceos são causa importante de alergia alimentar, estão entre o grupo de oito alimentos responsáveis por 90% das reações alérgicas alimentares. A prevalência estimada nos Estados Unidos é 1,9% baseada em inquérito populacional (Vierk KA, 2007). Alergia a esses alimentos apresenta maior prevalência em países onde o seu consumo é elevado, particularmente nas zonas costeiras (Lopata AL, 2009). Os crustáceos pertencem ao filo Arthropoda, que abrange mais de 80% das espécies animais e inclui as classes Arachnida (aranhas, escorpiões), Myriapoda (millipedes) e Insecta. O filo Mollusca inclui as classes Gastropoda (caracóis), Lamellibranchia ou Bivalva (ostras, mexilhões) e a Cephalopoda (lula, polvo). O camarão, a lagosta, e o caranguejo são exemplos de crustáceos (Leher Sb, 2003). Estes animais possuem proteínas altamente preservadas ao longo da evolução, as tropomiosinas, que desempenham um papel fundamental na contração muscular (Leher Sb, 2003; Reese G, 1999). Três diferentes equipes de investigadores identificaram a tropomiosina como o alérgeno principal do camarão (Shanti

KN, 1993; Daul CB, 1994; Leung PS, 1994). Cerca de 80% dos pacientes alérgicos a camarão reagem a tropomiosina (Daul CB, 1994).

As manifestações clínicas de alergia a camarão variam em um amplo espectro de sintomatologia e gravidade: síndrome de alergia oral, urticária, angioedema, sintomas gastrointestinais, asma e até anafilaxia com risco de morte. A exposição aos vapores de cozimento destes animais pode, também, determinar manifestações de urticária, angioedema e sintomatologia respiratória em indivíduos altamente sensíveis (Chu KH, 2005; Torres BJ, 2003; Carrapatoso I, 2004; Taylor SL, 2008, Jeebhay MF, 2008). Alergias ocupacionais foram descritas em trabalhadores da indústria alimentar expostos a proteínas de crustáceos, através da via respiratória e cutânea (Taylor SL, 2008). É importante salientar que, nos indivíduos mais sensíveis, o simples contato com o alérgeno poderá desencadear uma reação. As reações a crustáceos são mais frequentes do que as reações a moluscos (Torres BJ, 2003; Sicherer SH, 2001; Taylor SL, 2008). Na alergia alimentar aos crustáceos, a homologia entre as tropomiosinas é tão elevada que, para os alérgicos a uma determinada espécie de crustáceo, o risco de reação a uma segunda espécie é de aproximadamente 75% (Torres BJ, 2003; Sicherer SH, 2001; Nakano S, 2008). O diagnóstico de alergia a camarão depende de uma história clínica consistente, presença de IgE específica (através de teste cutâneo ou da dosagem sérica), ausência de sintomas na vigência de dieta restritiva, porém o padrão ouro na investigação consiste na prova de provocação oral.

A prova de provocação oral é indicada para confirmação diagnóstica ou para determinar o desenvolvimento de tolerância. Consiste na administração fracionada do alimento suspeito, em doses crescentes, sob supervisão médica. É considerada positiva quando reproduz os sintomas relatados na anamnese. A quantidade de alimento, o intervalo das doses e o tempo de observação são determinados pela história do paciente. Representa um procedimento de risco, em razão da possibilidade de manifestações clínicas graves. Existem três principais formas de realizar a provocação oral (Sicherer SH, 1999; Niggemann B, 1994; Bock AS, 1988 e 2007) :

- Aberta: o alimento é oferecido sem disfarce. É o método mais prático e adequado para triagem de reatividade clínica, quando negativa afasta o diagnóstico de alergia alimentar, mas a positividade pode necessitar confirmação pelo duplo cego.
- Simples cego: o alimento é mascarado (em cápsulas ou em veículo), e somente o médico sabe o que está sendo oferecido. É menos trabalhoso que o duplo cego e é útil quando múltiplos alimentos serão testados.
- Duplo-cego controlado por placebo – é o método considerado “padrão ouro” para diagnóstico. Nesta forma de teste, paciente e médico desconhecem o que está sendo oferecido (alimento suspeito ou placebo), reduzindo a chance de interferências psicológicas.

Diferente da alergia ao leite de vaca, ovo, trigo e soja, a hipersensibilidade a camarão é considerada persistente e geralmente não se observa desenvolvimento de tolerância ao longo do tempo. As espécies

de camarão *Penaeus aztecus*, *Penaeus indicus* e *Metapenaeus* têm sido as mais frequentemente estudadas, entre os crustáceos. No Brasil a espécie de camarão mais consumida é *Litopenaeus manei* e desconhecemos a prevalência de alergia e/ou sensibilização a este alimento.

1.4 Tropomiosina e reatividade cruzada

A molécula de tropomiosina está associada com os filamentos delgados do músculo e a microfilamentos de muitas células em diferentes órgãos e atua na contração muscular. A função desta proteína em células diferentes dos miócitos é desconhecida. Acredita-se que participe na regulação da morfologia celular e na motilidade dos organismos.

A homologia entre as tropomiosinas de invertebrados é bastante alta (>90%) e evidências *in vitro* sugerem que ela é a base da reatividade cruzada entre alimentos (frutos do mar) e aeroalérgenos (ácaros e baratas). Em 1993, identificou-se a tropomiosina como uma proteína alergênica no camarão (Shanti KN, 1993; Daul CB, 1994; Leung PS, 1994). Outros estudos (O'Neil CE, 1995) demonstraram que a tropomiosina é também um importante alérgeno de outros crustáceos como lagosta (Pan s 1, Hom a 1), e caranguejo (Cha f 1), assim como de moluscos (Tur c 1, Tod p 1, Cra g 1) e de outros invertebrados como ácaros *Dermatophagoides farinae* (Der f 10), *D. pteronyssinus* (Der p 10) e baratas *Periplaneta americana* (Per a 7) (Leung PS, 1998 a; Leung PS,

1998 b; Aki T, 1995; Asturias JA, 1998). Por outro lado, a tropomiosina de vertebrados não é considerada alergênica (Shanti KN, 1993).

Mais recentemente, Santos et al (1999) identificaram a tropomiosina da *Periplaneta americana* (Per a7) como um alérgeno principal desta espécie, usando soros de pacientes com asma, de Ribeirão Preto e de São Paulo, através de técnicas de clonagem molecular. A sequência de aminoácidos desse alérgeno (Per a 7) mostrou alto grau de identidade com tropomiosinas de ácaros e camarão. Um anticorpo monoclonal contra tropomiosina de ácaro, que também reconhece tropomiosina de camarão, reagiu com tropomiosina de barata em imunofluorescência.

As tropomiosinas de ácaro e camarão compartilham de quatro epítomos idênticos, entre os oito que foram identificados na tropomiosina de camarão, Pen a 1 (Shanti KN, 1993). As tropomiosinas encontram -se, assim, envolvidas não somente em síndromes de reatividade cruzada entre alérgenos alimentares mas, também, em síndromes de reatividade cruzada entre aeroalérgenos e alérgenos alimentares (Torres BJ, 2003; Santos AB, 2008; Sicherer SH, 2001; Carrapatoso I, 2004).

A presença de tropomiosinas em diversos aeroalérgenos comuns é um fato que sugere a possibilidade de sensibilização primária por via inalatória. Estudos epidemiológicos demonstraram uma elevada frequência de sensibilização prévia a ácaros em doentes com alergia alimentar a crustáceos ou moluscos (Sicherer SH, 2001; van Ree R, 1996a). Um

estudo curioso, realizado numa população de judeus ortodoxos que mantinha uma dieta que proibia a ingestão de frutos do mar, demonstrou a existência de sensibilização a extrato de camarão em pacientes com rinite alérgica persistente, sensibilizados a ácaros e/ou barata (Fernandes J, 2003). Por outro lado, um outro estudo (Hallas TE, 2004) demonstrou significativa sensibilização a ácaros numa população exposta a concentrações extremamente baixas de alérgenos de ácaros, sugerindo a possibilidade de sensibilização através da exposição a alérgenos de reatividade cruzada. A possibilidade de indução de alergia alimentar por alérgenos de reatividade cruzada, presentes em extratos para imunoterapia a ácaros, foi discutida por vários autores (Carrillo T, 1994; van Ree R, 1996 b).

Além da sensibilização por reatividade cruzada na alergia alimentar a crustáceos, admite-se, ainda, a possibilidade de uma sensibilização por via digestiva, já que as tropomiosinas são alérgenos estáveis e resistentes à ação de temperaturas elevadas e de enzimas (Reese G, 1999). Estes dois mecanismos de sensibilização, além de não exclusivos, podem mesmo se potencializar.

A questão sobre o quanto as similaridades estruturais e imunoquímicas da tropomiosina entre diferentes espécies de invertebrados têm significado clínico ainda não foi totalmente esclarecida.

1.5 Justificativa

A existência de reatividade cruzada entre ácaros e alérgenos alimentares (camarão, moluscos) alerta para as possíveis implicações clínicas deste fato. Baseando-se em relatos anedóticos de sensibilização, desenvolvimento e/ou agravamento de alergia a frutos do mar, após ITE com ácaro, certos grupos começaram repensar a indicação de imunoterapia com *D. pteronyssinus* em indivíduos com alergia concomitante a crustáceos. Considerando os benefícios documentados da imunoterapia alérgeno específica para o paciente atópico, é importante que sejam conduzidos trabalhos científicos que investiguem se realmente a ITE afeta de maneira clinicamente significativa a sensibilidade aos crustáceos e moluscos. Dessa forma, com este projeto esperamos contribuir para o esclarecimento das implicações clínicas da reatividade cruzada entre ácaro e camarão em alérgicos ao *D. pteronyssinus*.

Embora existam diferenças importantes entre a sensibilização para ácaros e para alimentos (quantidade, via e frequência de exposição, necessidade de quebra de barreira), na imunoterapia a exposição ao alérgeno é feita via subcutânea o que poderia alterar as características do processo e justificar a hipótese de sensibilização indireta.

Nos trabalhos anteriores a exposição ao alimento (frutos do mar) ocorreu de maneira “acidental” e não se orientou restrição alimentar durante a imunoterapia. Em nosso estudo, utilizando o método padrão ouro no diagnóstico em alergia alimentar (DBPCFC), esperamos responder a

questão da reatividade clínica de forma mais confiável. Apesar dos relatos de desenvolvimento de alergia ou agravamento das reações alérgicas a frutos do mar, em outras situações a imunoterapia apresenta um efeito protetor para o alimento que reage de forma cruzada; como é observado na imunoterapia para pólen em pacientes com reatividade cruzada a frutas.

Além disso, com a utilização do alérgeno recombinante, a tropomiosina, avalia-se o alvo específico de reatividade cruzada entre o ácaro e o camarão.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar alterações na resposta clínica e imunológica ao camarão após a imunoterapia com *Dermatophagoides pteronyssinus*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Identificar modificações do estado de reatividade clínica ao camarão após a imunoterapia para *D. pteronyssinus*, observando o desenvolvimento de sensibilização e/ou alergia, agravamento das reações ou até mesmo desenvolvimento de tolerância ao alimento.

2.2.2 Determinar a evolução da reatividade IgE nos testes cutâneos para *D. pteronyssinus*, camarão, *Periplaneta americana* e tropomiosina (Per a7) durante a imunoterapia para *D. pteronyssinus*.

2.2.3. Determinar a evolução dos níveis de IgE específica *in vitro* para *D. pteronyssinus*, camarão, *Periplaneta americana* e tropomiosinas durante a imunoterapia para *D. pteronyssinus*.

2.2.4. Determinar a evolução da reatividade IgE nos testes cutâneos para alérgenos que não possuem a tropomiosina como alérgeno principal.

2.2.5. Estabelecer o perfil de sensibilização para tropomiosina em pacientes sensibilizados ao *D. pteronyssinus*.

2.2.6. Determinar o valor do teste cutâneo de leitura imediata e dosagem de IgEsérica específica para camarão e da IgE específica para tropomiosina no diagnóstico de alergia a camarão.

2.2.7. Avaliar a eficácia da imunoterapia com *Dermatophagoides pteronyssinus*.

3 Métodos

3.1. Seleção dos pacientes

Os pacientes foram recrutados no ambulatório de Rinite alérgica do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de abril de 2007 a janeiro de 2008.

3.1.1. Critérios de inclusão

- Idade: ≥ 12 e ≤ 65 anos
- Diagnóstico de Asma Persistente conforme o GINA 2002 (*Global Initiative for Asthma*) e/ou de Rinite Alérgica Persistente conforme o ARIA 2001 (*Allergic Rhinitis Impact of Asthma*)
- Sensibilização ao *Dermatophagoides pteronyssinus* no teste cutâneo de leitura imediata (*prick test*)

3.1.2. Critérios de exclusão

- Imunoterapia específica prévia para ácaro
- Gravidez
- Analfabetos
- Doença psiquiátrica
- Uso contínuo de Beta-bloqueadores
- Outras Doenças Imunológicas ou Autoimunes
- Asma Grave não controlada (GINA, 2002)

3.2 Casuística

Os pacientes incluídos no estudo estavam em acompanhamento ou foram encaminhados para triagem no ambulatório de Rinite alérgica do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram conduzidas as avaliações. Todos os pacientes incluídos eram sensibilizados ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, e portadores de asma e/ou rinite alérgicas persistentes. Os indivíduos foram alocados no grupo de tratamento ou no grupo controle de acordo com questões logísticas, como disponibilidade de comparecer semanalmente ao hospital para a aplicação da vacina. Além disso, no início da inclusão dos sujeitos da pesquisa, priorizou-se a alocação para o grupo que receberia imunoterapia. Assim, os critérios de alocação para grupo de imunoterapia ou controle foram: ordem de chegada para inclusão, e disponibilidade de comparecimento semanal. Elegeram-se um número de conveniência para o tamanho da amostra. Os pacientes foram seguidos durante 12 a 14 meses. O projeto foi aprovado, em sessão do dia 25 de maio de 2006, pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa nº 339/06, e os participantes ou responsáveis, que optaram por participar do estudo, assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido

3.3 Modelo do estudo

O estudo caracteriza-se como um ensaio clínico controlado, e os pacientes incluídos, de acordo com os critérios de seleção previamente estabelecidos, foram avaliados através de anamnese, exame físico, testes cutâneos de leitura imediata, espirometria e, então, submetidos à provocação oral com camarão para determinar o estado basal de tolerância clínica ao crustáceo. Nesta ocasião também foi realizada coleta de sangue. Selecionamos 35 pacientes com rinite e/ou asma sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus* que foram alocados no grupo imunoterapia ou no grupo controle. De acordo com a sensibilização a camarão, dentro de cada grupo ainda se pode distinguir subgrupos de sensibilizados e não sensibilizados ao alimento.

- Grupo ITa (não sensibilizados ao camarão): definido por teste cutâneo e pesquisa de IgE sérica específica negativos para camarão, e provocação oral negativa.
- Grupo ITb (sensibilizados ao camarão): definido por teste cutâneo e/ou pesquisa de IgE sérica específica positivos para camarão. Alguns destes pacientes eram alérgicos ao camarão, pela provocação oral positiva. Após a inclusão no estudo, esses pacientes começaram receber a imunoterapia para *D. pteronyssinus*.
- Grupo C (controle): Os controles também se distinguem em: não sensibilizados (Ca) e sensibilizados ao camarão (Cb). O grupo controle não recebeu imunoterapia, mas da mesma forma que o grupo de

imunoterapia, manteve dieta restritiva para frutos do mar. Os pacientes foram avaliados periodicamente (a cada dois meses), quanto ao controle da doença atópica, uso de medicação, escore de sintomas, aderência à dieta; além de realizarem os testes cutâneos, coleta de sangue e espirometria nos mesmos tempos que o grupo que recebeu imunoterapia. A divisão dos grupos quanto à sensibilização a camarão tem finalidade para análise descritiva dos dados em relação à sua evolução após o tratamento, pois para a avaliação estatística, os resultados foram tratados em dois grupos: imunoterapia e controle.

Após um ano, os grupos de imunoterapia e grupo controle submeteram-se a avaliação e coleta final dos dados.

Figura 1- Grupos de estudo

3.4 Testes cutâneos

Os testes cutâneos de leitura imediata (TCLI) foram realizados com extratos comerciais (IPI-ASAC, Brasil) de aeroalérgenos incluindo: *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica*, fungos mistura (Asp f + Pen n + Alt a + Cla h), cão, gato, camarão (Bayer), e com extrato de tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana* (Per a 7). Os testes cutâneos para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* foram feitos nas seguintes titulações: 1/1000 (0,01µg/mL), 1/100 (0,1µg/mL), 1/10 (1µg/mL) e 1/1 (10µg/mL).

Os TCLI foram realizados na superfície volar do antebraço, usando lanceta apropriada posicionada a um ângulo de 90°, fazendo pequena pressão através da gota na epiderme, durante 5 segundos. A leitura do teste foi feita após 15 minutos medindo-se os diâmetros das pápulas com régua transparente. Para a interpretação dos resultados calculou-se a média aritmética entre o maior diâmetro e seu respectivo diâmetro ortogonal, sendo consideradas positivas as pápulas iguais ou maiores que 3 milímetros, subtraindo-se o tamanho da pápula do controle negativo, caso houvesse (Dreborg, 1989). Controles, positivo (histamina) e negativo (solução salina), foram aplicados em todos os testes.

Visando a consistência dos resultados, apenas o pesquisador realizou todos os testes, e registrou a média dos dois diâmetros de cada pápula. Os testes cutâneos foram realizados em duplicata nos dois antebraços e como resultado final considerou-se a média aritmética obtida

entre os valores das duplicatas, conferindo a reprodutibilidade em todos os casos. Os resultados foram documentados com cópia do contorno das pápulas em fita transparente, e transferida para a folha de papel e anexada ao prontuário de cada paciente.

Todos os pacientes foram submetidos a estes testes no início do estudo e após o período de indução da imunoterapia. Os mesmos foram repetidos ao completar um ano de imunoterapia.

Para a realização do teste cutâneo foi orientado suspender o uso de anti-histamínicos por pelo menos 10 dias antes de sua realização.

3.5 Dosagem sérica de IgE específica

As dosagens de anticorpos IgE específicos para *D. pteronyssinus*, Camarão e *Periplaneta americana* no soro foram realizadas utilizando o sistema ImmunoCAP 100® (Phadia, Brasil). Os resultados são quantitativos em kU/L, sendo que são agrupados em intervalos de níveis de de IgE correspondente às classes conforme se mostra a seguir. Níveis acima de 0,7 kU/L foram considerados positivos (classe 2), seguindo-se a prática do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas de São Paulo para a interpretação de positividade neste teste.

Faixa kU/L	Classe IgE específica	Nível IgE específica
≥ 100	6	Muito elevado
50- 100	5	Muito elevado
17,5- 50	4	Muito elevado
3,5- 17,5	3	Elevado
0,7- 3,5	2	Moderado
0,35- 0,7	1	Baixo
< 0,35	0	Ausente ou indetectável

A pesquisa de IgE específica para as tropomiosinas de *D. pteronyssinus*, camarão e de tropomiosina recombinante de *P. americana* foi feita através de ELISA quimérico, como previamente descrito (Trombone et al, 2002).

De forma breve, para quantificar anticorpos IgE específicos para tropomiosinas de *D. pteronyssinus*, *P. americana* e *P. aztecus* e tropomiosina recombinante de barata americana (Per a 7), o anticorpo monoclonal 1A6 foi utilizado para cobrir placas de polipropileno (*Corning Incorporated*, USA), na concentração de 1 µg/poço, em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após lavagens com PBS-Tween (PBS-T), foram adicionados às placas tropomiosina recombinante de *P. americana* (Per a 7), na concentração 0,5 µg/mL (para quantificação de IgE anti-tropomiosina de *P. americana*); e extrato de *D. pteronyssinus* (30.000 AU/mL), diluído 1:1000 em 1% BSA-PBS-T, ou de camarão (1:10 peso:volume) diluído

1:13.000, para quantificação de IgE anti-tropomiosina de ácaro ou de camarão, respectivamente. Após lavagens, soros dos participantes do estudo foram adicionados na diluição 1:10 em 1% BSA-PBS-T. A detecção da presença de IgE específica para tropomiosina é realizada com anticorpo de cabra anti IgE humano biotinilado (*Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD*), seguida pela adição de streptavidina–peroxidase 1:1000 diluída em 1% BSA-PBS-T. A determinação da densidade óptica foi realizada a 405 nm. O ensaio foi quantificado em UI/mL e os valores obtidos foram extrapolados diretamente a partir da curva controle construída. O valor de corte estabelecido foi de 0,5 UI/mL.

A curva controle foi construída utilizando anticorpo quimérico, constituído por porção Fab de anticorpo monoclonal de camundongo (clone 2B12) direcionado contra Der p 2, alérgeno do grupo 2 de *D. pteronyssinus*, e porção Fc de cadeia humana. Para a construção da curva, placas de polipropileno foram cobertas com 100 µl/ poço de anticorpo monoclonal anti Der p 2 na concentração de 10 µg/mL. Após lavagens com PBS-Tween (PBS-T), foi adicionado às placas extrato de *D. pteronyssinus* contendo 0,5 µg/ml de Der p 2, diluído em PBS-T. Após lavagens, o anticorpo quimérico anti-IgE-2B12 diluído em 1% BSA-PBS-T foi adicionado às placas em concentrações de 140 a 0.14 ng/mL, em duplicata através da placa. As etapas subsequentes do ELISA foram realizadas da mesma forma descrita acima para determinação de IgE específica para tropomiosinas barata, ácaro e camarão.

As determinações foram realizadas pré-imunoterapia, após o período de indução, e foram repetidas no término do estudo (após 1 ano de imunoterapia).

3.6 Prova de provocação oral

Provocações orais, duplo cego, controladas por placebo (DBPCFC, *double-blind, placebo-controlled food challenge*) foram realizadas inicialmente nos indivíduos com história positiva de reação ao camarão, e foram consideradas positivas mediante desencadeamento de sinais objetivos de alergia. No caso de DBPCFC negativa ou inconclusiva o paciente era submetido a uma prova de desencadeamento aberta. Sintomas subjetivos como irritação ou desconforto em lábios, boca ou garganta, foram definidos como inconclusivos e somente foram valorizados como positivos se houvesse uma história sugestiva recente com evidência de reatividade IgE para camarão (pelo teste cutâneo ou IgE). Na DBPCFC o camarão cozido foi liofilizado e administrado em cápsulas iguais ao placebo (dose total de 8g). Cada cápsula continha 500mg de camarão liofilizado ou o equivalente de lactose (placebo). As cápsulas foram administradas a cada 20 minutos, em quantidades progressivas a cada dose (1ª dose = 500mg, 2ª dose = 500mg, 3ª dose = 1g, 4ª a 6ª doses = 2g). Aqueles indivíduos que não apresentaram manifestações objetivas na DBPCFC receberam 12 camarões inteiros cozidos (equivalente a 30g) numa prova de desencadeamento aberta que foi realizada após intervalo de pelo menos 48h. O procedimento de desencadeamento era

interrompido se uma reação objetiva fosse provocada. Por outro lado, para maior praticidade e agilidade do estudo, os indivíduos que não tinham história anterior de reação ao camarão foram inicialmente submetidos à prova de desencadeamento aberta. O desencadeamento aberto é útil para demonstrar ausência de alergia, porém, está mais propenso a falso positivo. Assim, no caso de resultado positivo ou inconclusivo procedeu-se à confirmação diagnóstica de alergia a camarão através do DBPCFC.

Durante todo o procedimento de provocação os pacientes foram acompanhados com uma ficha de observação onde foram anotados todos os sintomas referidos e sinais clínicos observados. Os registros eram feitos antes da administração de cada dose, incluindo medida de pico de fluxo expiratório, frequência respiratória, frequência cardíaca e pressão arterial. A provocação era interrompida mediante desencadeamento de sintomas sugestivos de reação alérgica: prurido oral, *rash*, urticária, angioedema, sintomas gastrointestinais, sinais e sintomas respiratórios, comprometimento cardiovascular. As reações leves, com comprometimento apenas cutâneo, foram tratadas com anti-histamínico. As reações mais graves receberam tratamento com oxigenioterapia inalatória, adrenalina solução 1:1000, 0,5 mL, intramuscular; anti-histamínico; e corticosteróide por via endovenosa e se necessário expansão volêmica.

3.7 Dieta restritiva

Durante o estudo os pacientes, do grupo controle e de imunoterapia, foram orientados a realizar dieta restritiva de crustáceos e moluscos (camarão, lagosta, lagostim, caranguejo, sururu, lula) e seus derivados. A cada reavaliação mensal questionava-se sobre a aderência à dieta, interrogando sobre a ocorrência de escape.

3.8 Imunoterapia

A imunoterapia foi realizada segundo as normas da *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI Malling et al., 1993), utilizando-se extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (IPI-ASAC Espanha, lote XB01).

Os frascos com o extrato liofilizado foram mantidos à temperatura de 4°C até o momento da reconstituição, com diluente *depot* contendo hidróxido de alumínio 0,13%, à medida que fosse necessário, e, então, voltavam a serem refrigerados.

As dosagens dos alérgenos principais de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1 e Der p2) no extrato foram realizadas pelo método de ELISA. Nesta avaliação, o material liofilizado foi reconstituído em 2 mL de diluente, obtendo-se os seguintes resultados: Der p1 8,3 µg/mL e Der p2 2,0 µg/mL. A relação Der p 1: Der p 2 foi considerada muito boa. Entretanto, por razões práticas e para facilitar o cálculo de doses, optou-se

em usar o extrato numa concentração de 10 µg/mL, reconstituindo-se o material liofilizado em 1,66 mL de diluente.

Considerando que o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia utiliza corpo total do ácaro, espera-se que também contenha a tropomiosina. Entretanto, julgamos necessário documentar se, de fato, este alérgeno está presente no extrato de ácaro. Por isso, em cooperação com um grupo de pesquisa espanhol, realizou-se *Western Blot* utilizando anticorpo anti-tropomiosina de camarão (Anexo A). Neste ensaio, foram analisadas três amostras: extrato de cultivo completo de ácaro (XB01) usado na imunoterapia, extrato de corpos de *D. pteronyssinus* purificados e, finalmente, extrato de camarão. Observou-se a presença de uma banda de aproximadamente 25 kd no extrato XB01 sugerindo ser correspondente a tropomiosina do *D. pteronyssinus* (Der p 10) com sinais de hidrólise parcial; uma banda de 66 kd no extrato de corpos purificados de ácaros que poderia corresponder ao dímero de tropomiosina; e várias bandas no extrato de camarão. O ensaio foi então repetido em condição reduzida com 2-mercaptoetanol, e extrato de camarão menos concentrado (Anexo B). Dessa vez, identificou-se no extrato purificado de ácaro uma proteína de 45 kd. Para documentar que essa banda era realmente de tropomiosina, realizou-se ensaio de inibição com extrato de camarão, que comprovou essa hipótese (Anexo C). Dessa forma, sugere-se que a banda observada no extrato XB01 de imunoterapia corresponde a Der p 10 parcialmente hidrolisada.

O esquema da imunoterapia consistiu-se na administração seriada das doses de vacina, com aumento gradual das doses do extrato, realizada uma vez por semana, por via subcutânea, até atingir a dose de manutenção de 5µg/mL do alérgeno principal Der p1, conforme mostra a tabela 1.

Na primeira etapa da imunoterapia, chamada fase de indução, iniciou-se com 0,1 mL do extrato diluído 1/1000 duplicando-se semanalmente o volume inicial das doses até 0,8 mL, prosseguiu-se sucessivamente para os extratos mais concentrados (1/100, 1/10 e 1/1), e manteve-se a mesma sequência de doses até o frasco com diluição 1/10, pois no extrato com concentração de 10µg/mL aumentou-se 0,1 mL a cada semana até atingir 0,5 mL (5µg de Der p1). Ao término da fase de indução, que durou de 17 a 20 semanas, foram repetidas as avaliações iniciais: escore clínico, teste cutâneo, coleta de sangue e espirometria.

Após essa etapa, deu-se início à fase de manutenção e as aplicações passaram a ser quinzenais (4 doses), depois a cada três semanas (4 doses) e a partir de então mensalmente. Após completar um ano de imunoterapia foi repetida a coleta de dados desse projeto.

Antecedendo o início da imunoterapia, e antes de cada aplicação de dose, os pacientes eram questionados sobre sintomas da doença ou outras intercorrências clínicas, realizavam-se a ausculta pulmonar e a medida do pico de fluxo expiratório. Na presença de sintomas da doença, ou sinais de obstrução brônquica, suspendia-se a aplicação da vacina,

orientava-se tratamento necessário para o controle clínico e programava-se outra data para a aplicação.

Os pacientes permaneceram em observação por no mínimo 30 minutos após a aplicação da dose de vacina.

As reações adversas foram classificadas em localizadas ou sistêmicas e classificadas em leves, moderadas ou graves. E, quanto ao tempo de instalação em: imediatas, quando o aparecimento dos sintomas ocorria em até 30 minutos da aplicação; e tardias quando se iniciavam após este período.

Aos primeiros sinais ou sintomas de uma reação adversa, o paciente era imediatamente avaliado pelo médico que classificava sua gravidade e instituía o tratamento adequado. Esses dados foram registrados na ficha de controle individual da imunoterapia.

Para prevenir a possibilidade de erro de dose e aumentar a segurança da imunoterapia, realizou-se dupla conferência da concentração e dose antes da aplicação da vacina.

Tabela 1- Esquema da fase de indução da imunoterapia

Diluição do Extrato <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>							
1/1000		1/100		1/10		1/1	
Vol/mL	Dose-µg	Vol/mL	Dose-µg	Vol/mL	Dose-µg	Vol/mL	Dose-µg
0,1	0,001	0,1	0,01	0,1	0,1	0,1	1,0
0,2	0,002	0,2	0,02	0,2	0,2	0,2	2,0
0,4	0,004	0,4	0,04	0,4	0,4	0,3	3,0
0,8	0,008	0,8	0,08	0,8	0,8	0,4	4,0
						0,5	5,0

3.9 Avaliação clínica dos pacientes

O diagnóstico e classificação da rinite e/ou asma foram baseados nos sintomas clínicos, obtidos através de anamnese, e nos resultados da espirometria. Na avaliação inicial foram preenchidos escores de sintomas de rinite e de asma (Anexos D e E), os quais eram repetidos bimestralmente. O escore de sintomas de rinite varia de 0 a 15, em ordem crescente de gravidade; enquanto o escore de sintomas de asma varia de 5 a 25, em ordem decrescente de gravidade. Na ficha de evolução (Anexo F), além dos sintomas, questionava-se sobre o uso da medicação, regularidade e dose, observando e corrigindo a técnica quando necessário.

Todos os pacientes incluídos já estavam em tratamento medicamentoso da rinite e/ou asma. O corticosteróide utilizado por todos foi a budesonida pela disponibilidade de acesso. No início do protocolo, a

adequação das doses foi feita conforme a necessidade individual até se atingir o controle clínico para que se pudesse realizar a prova de provocação oral, e a seguir, iniciar a imunoterapia. Esse período não foi superior a 4 semanas. As medicações adjuvantes, que os pacientes já usavam, foram mantidas inicialmente; e sua necessidade foi periodicamente reavaliada durante o seguimento do estudo.

3.10 Prova de função pulmonar

A espirometria foi realizada utilizando-se o espirômetro KOKO e software Koko PFT System (Pds Instrumentation, Inc. Louisville, CO), com valores de referência segundo as Diretrizes para Teste de Função Pulmonar (Pereira CAC, 2002).

A prova de função pulmonar foi realizada no início, repetida logo após a fase de indução da imunoterapia, e depois ao término do estudo.

A prova de função pulmonar serviu como parâmetro auxiliar à avaliação clínica, para o seguimento e orientação do manejo terapêutico dos pacientes.

Os parâmetros avaliados, do ponto de vista estatístico, foram o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), pré e pós broncodilatador (BD), comparando-se os valores no início e após um ano de imunoterapia.

3.11 Outros exames

Outros exames solicitados aos pacientes foram: hemograma completo, dosagem de IgE total, protoparasitológico de fezes (Anexo G, Quadro 1).

3.12 Análise estatística

Na análise descritiva dos dados foram realizados cálculos de médias, desvios padrão e erro padrão.

As variáveis categorizadas foram representadas em tabelas por frequência absoluta (n) e relativa (%).

O valor dos testes para diagnóstico de alergia ao camarão foi analisado através dos conceitos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência. Tabelas dois por dois foram usadas para calcular sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência. Sensibilidade foi definida como a proporção de testes verdadeiros positivos em relação ao total de alérgicos ao camarão, especificidade foi definida como proporção de testes verdadeiros negativos em relação ao total de não alérgicos ao camarão. O valor preditivo positivo refere-se à probabilidade do indivíduo ser alérgico a camarão, dado que o teste é positivo, assim calculou-se o VPP como a proporção de alérgicos com teste positivo em relação ao total de testes positivos para camarão. O valor

preditivo negativo refere-se à probabilidade do indivíduo não ser alérgico a camarão, dado que o teste é negativo, assim calculou-se o VPN como a proporção de não alérgicos com teste negativo em relação ao total de testes negativos para camarão.

Para fazer a análise comparativa estatística, dos resultados positivo ou negativo dos testes, foi utilizado o Teste de McNemar por tratar-se de dados dependentes (pré e pós-imunoterapia). No teste de McNemar as hipóteses testadas são referentes às proporções de uma mesma resposta no instante pré e pós, assim rejeitar a hipótese nula neste teste equivale a dizer que existem evidências de que as proporções de uma mesma resposta no instante seguinte sejam estatisticamente diferentes, ou seja, houve uma proporção significativa de indivíduos que responderam diferente no "pós", dizemos que não há concordância nas respostas (a proporção de indivíduos que mudaram de respostas de um tempo para o outro é significativa).

Em relação às médias dos tamanhos das pápulas dos diferentes alérgenos nos testes cutâneos, no grupo imunoterapia e controle, comparou-se seus valores pré e pós tratamento através do teste não-paramétrico de Wilcoxon Signed-Rank, apropriado para amostras pequenas nas quais se torna inviável a suposição de distribuições. Aplicamos os testes de Bhapkar e Stuart-Maxwell (extensão do teste de McNemar) para a análise das respostas categorizadas de "0" a "6", correspondentes às classes do ImmunoCAP; e teste de Wilcoxon Sum

Ranks ou de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos dentro de cada tempo, considerando-se 5% de nível de significância para o teste, exceto casos que serão mencionados no texto.

Os resultados foram obtidos através dos softwares SAS (Statistical Analysis System) versão 8.1, MH program versão 1.2 e SPSS 10.0, foram considerados como significativos os valores discriminantes do teste (p-valor) inferiores a 5%.

4 Resultados

Neste estudo foram incluídos 35 indivíduos, sendo 25 do sexo feminino (71,4%) e 10 do sexo masculino (28,6%). As idades apresentam distribuição normal com média de idade de 30 anos ($\pm 11,5$). Vinte pacientes apresentavam asma e rinite alérgica, quatorze apenas rinite alérgica, e um indivíduo asma isolada.

No penúltimo mês, dois pacientes do grupo de imunoterapia abandonaram o estudo e, portanto, os resultados que envolvem análise pré e pós-ITE são referentes aos 33 pacientes que completaram os 12 meses de seguimento; com exceção dos dados de escores clínicos e dose de medicação, onde se considerou os dados da última evolução desses dois indivíduos (coletados após 10 meses de ITE). Os motivos alegados pelos pacientes que descontinuaram o seguimento na pesquisa foram: dificuldade de conciliar horário de estudo e trabalho, distância e dificuldade de locomoção da moradia ao hospital. Um indivíduo não aceitou realizar outras coletas de sangue.

4.1 Diagnóstico de alergia a camarão

Dos 35 pacientes estudados, oito relataram história prévia de manifestações clínicas após ingestão de camarão, três destes informaram, inclusive, prurido nas mãos quando mexiam em camarão cru. Vinte e sete indivíduos negaram história conhecida de reação anterior ao camarão.

4.1.1 Sensibilização IgE para camarão e tropomiosina de camarão

Vinte pacientes foram definidos como sensibilizados ao camarão, pois apresentaram TCLI ou ImmunoCAP positivos. Dentre estes, 7 tiveram positividade nos dois métodos de avaliação da presença de IgE específica, 8 somente no teste cutâneo, e 5 somente no teste *in vitro* (tabela 2).

Tabela 2- Sensibilização ao camarão pelo TCLI e ImmunoCAP N=35

		ImmunoCAP camarãoT0		Total
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
TCLI para camarão T0	negativo	15 (42,8)	5 (14,3)	20
	positivo	8 (22,9)	7 (20)	15
Total		23	12	35

Positividade no TCLI: pápula ≥ 3 mm

Positividade ImmunoCAP: classe ≥ 2 (0,7 kU/mL)

T0= tempo zero do estudo

Dos 20 indivíduos sensibilizados, 15 receberam imunoterapia, e 5 foram alocados no grupo controle que recebeu apenas tratamento medicamentoso, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3- Distribuição dos pacientes nos grupos segundo a sensibilização a camarão

Grupo		Número
Imunoterapia	Não sensibilizados a camarão	10
	Sensibilizados a camarão	15
Controle	Não sensibilizados a camarão	5
	Sensibilizados a camarão	5
Total		35

Quanto à presença de IgE específica para tropomiosina de camarão, detectada pelo ensaio de ELISA, 20% foram positivos (7 de 35). Como mostrado na tabela 4, todos esses indivíduos com IgE positiva para tropomiosina de camarão eram sensibilizados a camarão. Destaca-se o fato de 13 indivíduos sensibilizados a camarão não apresentarem evidência de reatividade IgE para tropomiosina.

Table 4- Distribuição dos resultados da dosagem de IgE para tropomiosina de camarão segundo a sensibilização para camarão N=35

		Sensibilização para camarão*		Total
		Não n (%)	Sim n (%)	
IgE anti-tropomiosina de camarão	Negativo	15 (42,8)	13 (37,2)	28
	Positivo	0	7 (20)	7
Total		15	20	35

* Sensibilização por TCLI ou ImmunoCAP positivos

A distribuição dos resultados das pápulas no TCLI para camarão, das classes de IgE específica para camarão, e da dosagem de IgE para tropomiosina de camarão, podem ser observadas nos Anexos H, I e J, respectivamente.

4.1.2. Desfecho das provocações orais

No momento da prova de desencadeamento oral todos estavam assintomáticos de sua doença atópica. As provas de desencadeamento oral confirmaram o diagnóstico de alergia a camarão em seis dos oito pacientes com história anterior positiva; dois na provocação oral, duplo cego, controlada por placebo (DBPCFC) e quatro na provocação aberta. Os outros dois pacientes, com história positiva, relataram reação anterior ao camarão há mais de 5 anos, porém não mostravam reatividade IgE específica (teste cutâneo, IgE sérica para camarão e IgE para tropomiosina de camarão negativos) e tiveram DBPCFC e prova aberta negativas (figuras 2 e 3). A prova aberta de desencadeamento oral excluiu alergia ao camarão em 26 dos 27 pacientes sem história de reação anterior ao camarão, dispensando assim a necessidade de DBPCFC. Curiosamente, um indivíduo com história negativa teve sintomas desencadeados na prova aberta e foi então submetido à DBPCFC que confirmou o diagnóstico de alergia alimentar. Portanto, no total foram diagnosticados 7 casos de alergia a camarão, sendo 6 com história positiva e, 1 paciente sensibilizado a camarão com história anterior ausente.

Figura 2 - Desfecho das provocações orais em relação à sensibilização IgE a camarão pelo TCLi e/ou IgE sérica específica, e a história anterior de reação ao camarão

Figura 3 - Desfecho das provocações orais em relação à detecção de IgE para tropomiosina de camarão, e a história anterior de reação ao camarão

Os sintomas apresentados e relatados na história pessoal dos sete pacientes alérgicos a camarão foram comparados com os sintomas elicitados pela prova de desencadeamento oral (tabela 5). Na história pessoal de um paciente houve relato de uma reação bifásica, com reaparecimento dos sintomas algumas horas depois da remissão.

Tabela 5- Frequência de sintomas relatados na história pessoal dos sete pacientes alérgicos a camarão e frequência de sintomas elicitados pela prova de desencadeamento oral

Sintoma	Reação prévia ao camarão Número (%)	Reação na Provocação oral Número (%)
Irritação/desconforto em boca e lábios	6 (85,7)	6 (85,7)
Edema de lábios ou língua	5 (71,4)	4 (57,1)
Aperto na garganta/dificuldade na deglutição	4 (57,1)	4 (57,1)
Edema de face ou pálpebras	3 (42,8)	2 (28,5)
Prurido	2 (28,5)	2 (28,5)
Exantema/urticária	2 (28,5)	2 (28,5)
Dificuldade para respirar/ respiração “curta”	2 (28,5)	-
Sintomas rino-conjuntivais	2 (28,5)	1 (14,2)
Sensação de morte iminente	2 (28,5)	-
Náusea/ vômito/ dor abdominal	2 (28,5)	1 (14,2)
Sibilos	1(14,2)	-
Estridor	1(14,2)	-
Reação tardia com sintomas leves	1(14,2)	-

4.1.3. Valor diagnóstico do teste cutâneo de leitura imediata (TCLI), da determinação de IgE sérica específica para camarão, e da determinação de IgE para tropomiosina de camarão

Dentre os 15 TCLI positivos para camarão, 10 eram resultados falsos positivos. Enquanto que, dois pacientes com testes cutâneos negativos resultaram em desfecho positivo na provocação oral com camarão (tabela 6).

Tabela 6- Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata para camarão segundo o desfecho nas provocações orais (alergia a camarão) N=35

		Alergia a camarão		Total
		Não n (%)	Sim n (%)	
TCLI para camarão	Negativo	18 (51,5)	2 (5,7)	20
	Positivo	10 (28,5)	5 (14,3)	15
Total		28	7	35

Quanto à IgE sérica específica para camarão, dos 12 testes positivos, 7 eram falsos positivos, considerando o desfecho da provocação oral com camarão; dois pacientes com resultados negativos de IgE sérica para camarão tiveram diagnóstico de alergia a camarão pela provocação oral (tabela 7).

Tabela 7- Resultados dos testes para IgE sérica específica para camarão (ImmunoCAP) segundo o desfecho nas provocações orais (alergia a camarão) N=35

		Alergia a camarão		Total
		Não n (%)	Sim n (%)	
ImmunoCAP para camarão	Negativo	21 (60)	2 (5,7)	23
	Positivo	7 (20)	5 (14,3)	12
Total		28	7	35

Quanto aos resultados da IgE específica para tropomiosina, encontramos apenas dois falsos positivos e dois falsos negativos nos 35 testes realizados (tabela 8). Analisando separadamente os resultados da dosagem de IgE para tropomiosina entre grupos com ou sem alergia a camarão encontramos que a IgE anti-tropomiosina foi positiva em 71,4% dos alérgicos e em 7,1% dos não alérgicos ao camarão, ressaltando que todos eram sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus* (figura 3).

Tabela 8- Resultados dos testes para IgE sérica específica para tropomiosina de camarão (ELISA) segundo o desfecho nas provocações orais (alergia a camarão) N=35

		Alergia a camarão		Total
		Não n (%)	Sim n (%)	
IgE para tropomiosina de camarão	Negativo	26 (74,3)	2 (5,7)	28
	Positivo	2 (5,7)	5 (14,3)	7
Total		28	7	35

Os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), e eficiência do TCLI, IgE sérica específica para camarão e IgE específica para tropomiosina de camarão estão resumidos na tabela 9.

A sensibilidade diagnóstica encontrada nos três testes foi a mesma, 71,4%. Observamos que a especificidade da dosagem de IgE sérica específica para camarão (75%) foi maior que do TCLI (64,2%), contudo a maior especificidade foi encontrada na dosagem de IgE específica para tropomiosina de camarão com valor de 92,8%.

Os VPPs foram baixos tanto para o TCLI (33,3%), como para a dosagem sérica de IgE para camarão (41,6%). Novamente encontramos o melhor valor preditivo positivo na dosagem de IgE específica para tropomiosina de camarão (71,4%). Os VPNs foram mais satisfatórios e semelhantes nos três testes, com 90% no TCLI, 91,3% na dosagem de IgE específica para camarão e 92,8% na dosagem de IgE para tropomiosina de camarão.

Quanto à eficiência diagnóstica, o teste de detecção da IgE específica para tropomiosina também se mostrou superior (88,5%) ao teste de IgE sérica para camarão (74,2%) e ao TCLI (65,7%).

Tabela 9- Valor do teste cutâneo de leitura imediata (TCLI), da determinação da IgE específica para camarão (ImmunoCAP), e da determinação específica para tropomiosina de camarão, em termos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência diagnóstica para alergia a camarão N=35

	TCLI	ImmunoCAP	IgE para Tropomiosina
Sensibilidade	71,4%	71,4%	71,4%
Especificidade	64,2%	75%	92,8%
Valor Preditivo Positivo	33,3%	41,6%	71,4%
Valor Preditivo Negativo	90%	91,3%	92,8%
Eficiência	65,7%	74,2%	88,5%

No anexo K (Quadro 5) encontram-se as informações relacionadas ao diagnóstico de alergia a camarão dos 35 pacientes.

4.2. Evolução da reatividade IgE nos testes cutâneos de leitura imediata

Para se compreender melhor os resultados dos TCLI, a evolução da reatividade IgE nos testes cutâneos foi analisada de duas formas: avaliação da concordância dos testes positivos e negativos nos instantes pré e pós tratamento (teste de McNemar) para todos os alérgenos, e avaliação da diferença do tamanho das médias das pápulas pré e pós-tratamento (teste de Wilcoxon Signed-Rank) para os alérgenos de maior interesse para o estudo, Der p (titulações 1/1 e 1/10), camarão e tropomiosina recombinante (Per a 7). O Gráfico 1 ilustra os resultados, pré

e pós-tratamento, das médias das pápulas para os alérgenos testados no TCLI no grupo que recebeu imunoterapia, e o Gráfico 2 ilustra o mesmo tipo de observação no grupo controle.

Gráfico 1- Valores das médias das pápulas em mm do TCLI para os alérgenos (Der p titulado 1/1, 1/10, 1/100/, 1/1000; Camarão; *Periplaneta americana*; *Blatella germanica*; Tropomiosina recombinante de *P. americana*, Per a 7; *Blomia tropicalis*; Cão; Gato; e Fungos), para o controle negativo e para a histamina, realizados pré-ITE, pós-indução da imunoterapia, e após um ano de ITE, no grupo que recebeu imunoterapia. N=23

Gráfico 2- Valores das médias das pápulas em mm do TCLI para os alérgenos (Der p titulado 1/1, 1/10, 1/100/, 1/1000; Camarão; *Periplaneta americana*; *Blatella germanica*; Tropomiosina recombinante de *P. americana*, Per a 7; *Blomia tropicalis*; Cão; Gato; e Fungos), para o controle negativo e para a histamina, realizados pré-tratamento, pós-4meses, e após um ano de tratamento, no grupo controle. N=10

4.2.1. TCLI titulado para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p)

Nos pacientes submetidos à imunoterapia, as medianas das pápulas de Der p foram estatisticamente diferentes nos tempos pré-ITE e pós-ITE, tanto na titulação 1/1 ($p= 0,000$), quanto no teste titulado 1/10, onde as medianas das pápulas diminuíram de 3,25 mm para 1 mm ($p= 0,000$), como se pode observar na tabela 10.

Tabela 10- Valores das medianas das pápulas de Der p 1/1 e 1/10, camarão e tropomiosina recombinante de barata (Per a 7), nos grupos imunoterapia e controle, obtidos no início do estudo e após um ano de tratamento N pré-ITE= 35, N pós-ITE= 33

Grupo	Der p 1/1 Mediana (mm)		Der p 1/10 Mediana (mm)		Camarão Mediana (mm)		Per a 7 Mediana (mm)	
	Pré-ITE	Pós-ITE	Pré-ITE	Pós-ITE	Pré-ITE	Pós-ITE	Pré-ITE	Pós-ITE
Imunoterapia	4,75	3	3,25	1	3	2	0	0
<i>P</i> -valor Pré VS Pós-ITE	0,000		0,000		0,132		0,575	
Controle	5,9	5,8	3	3,4	2,5	3,25	1,2	1,3
<i>P</i> -valor Pré vs Pós-ITE	0,474		0,259		0,370		0,343	

Em relação aos resultados, positivo e negativo, nos instantes de tempo pré e pós-ITE, no grupo controle houve concordância nos resultados, do teste para Der p titulado 1/10 ($p= 0,083$); enquanto no grupo que recebeu imunoterapia houve mudança significativa no tipo de resposta, no teste realizado pós-ITE ($p= 0,0003$). Como podemos observar na tabela 11, treze pacientes que eram positivos, no início do estudo, tiveram o teste negativo após um ano de imunoterapia. Não foi possível aplicar o teste de concordância nas titulações de Der p 1/1, 1/100 e 1/1000.

Tabela 11- Distribuição dos resultados dos TCLI para Der p titulado 1/10, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		Der p 1/10 pós-ITE		Total
		Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Der p 1/10 pré-ITE	negativo	8 (34,8)	0	8
	positivo	13 (56,5)	2 (8,7)	15
Total		21	2	23

4.2.2. TCLI para camarão

As medianas das pápulas de camarão foram estatisticamente iguais nos tempos pré-ITE e pós-ITE, tanto no grupo imunoterapia ($p= 0,132$), como no grupo controle ($p= 0,370$), como mostrado na tabela 10.

Ao se analisar a proporção de indivíduos que mantiveram o mesmo tipo de resposta no teste, no pré e pós-tratamento, observou-se que: nenhum paciente do grupo que recebeu imunoterapia deixou de ser negativo (tabela 12). Por outro lado, identificou-se 4 indivíduos que apresentavam teste positivo e passaram ter pápulas menores que 3 mm, e esta diferença de resposta foi estatisticamente significativa ($p= 0,045$); já no grupo controle, apenas 1 paciente teve resultado discordante, era negativo e ficou positivo, e o teste estatístico demonstrou que houve concordância entre os resultados pré e pós tratamento neste grupo ($p= 0,317$).

Tabela 12- Distribuição dos resultados dos TCLI para camarão, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		TCLI camarão pós- ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
TCLI camarão pré- ITE	negativo	13 (56,5)	0	13
	positivo	4 (17,4)	6 (26,1)	10
Total		17	6	23

4.2.3. TCLI para *Periplaneta americana*

Analisando os resultados do teste para *Periplaneta americana*, no pré e pós-tratamento, observamos que, no grupo de imunoterapia, eles foram estatisticamente diferentes ($p= 0,05$ com nível de significância de 1%). Neste grupo, dos 11 pacientes inicialmente positivos para barata, 6 tiveram teste negativo no pós-ITE (tabela 13). No grupo controle, apenas 1 paciente teve resultado discordante, era negativo e ficou positivo, mas a análise estatística mostrou que não houve diferença entre os resultados pré e pós-tratamento neste grupo ($p= 0,317$).

Tabela 13- Distribuição dos resultados dos TCLI para *Periplaneta americana*, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós-ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		TCLI periplaneta pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
TCLI periplaneta pré-ITE	negativo	11 (47,8)	1 (4,4)	12
	positivo	6 (26,1)	5 (21,7)	11
Total		17	6	23

4.2.4. TCLI para tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana* (Per a 7)

As medianas das pápulas de Per a 7 foram estatisticamente iguais nos tempos pré-ITE e pós-ITE, tanto no grupo imunoterapia ($p= 0,575$), como no grupo controle ($p= 0,343$), como mostrado na tabela 10.

Ao se analisar a proporção de indivíduos que mantiveram o mesmo tipo de resposta no teste, no pré e pós-tratamento, observou-se concordância nos resultados de ambos os grupos, sendo que no grupo controle não houve pares discordantes. No grupo de imunoterapia, dos 7 positivos no início, 3 tornaram-se negativos pós-ITE, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa, obteve-se $p= 0,08$ (tabela 14).

Tabela 14- Distribuição dos resultados dos TCLI para tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana* (Per a 7), segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		TCLI Per a7 pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
TCLI Pera7 pré-ITE	negativo	16 (69,6)	0	16
	positivo	3 (13)	4 (17,4)	7
Total		19	4	23

4.2.5. TCLI para *Blatella germanica* e *Blomia tropicalis*

Houve concordância de resultados, nos tempos pré e pós-tratamento, nos testes cutâneos com *Blatella germanica* em ambos os grupos, imunoterapia ($p= 0,31$) e controle ($p= 0,65$).

Nos testes com *Blomia tropicalis* houve concordância estatística nas respostas do grupo imunoterapia ($p= 0,41$), embora tenha se observado que quatro pacientes inicialmente com testes negativos, passaram ter testes positivos, e dois positivos, ficaram negativos. No grupo controle não existiram respostas discordantes.

4.2.6. TCLI para cão, gato, e fungos

Não foi possível aplicar o teste de concordância para o TCLI para cão em nenhum dos grupos; os casos de sensibilização a este alérgeno foram raros. Em relação ao TCLI para gato encontramos que: no grupo imunoterapia, dos 9 pacientes positivos, apenas um manteve teste positivo após um ano, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p= 0,004$). No grupo controle, houve concordância nas respostas ($p= 0,31$), dos 4 sensibilizados inicialmente, apenas um caso alterou o resultado de positivo para negativo.

Quanto aos TCLI para fungos, no grupo controle não houve diferença, pré-e pós-ITE ($p= 0,31$); e para o grupo de imunoterapia não foi possível aplicar o teste, pois os dados não puderam ser dispostos numa tabela de contingência.

4.2.7. Pápula de Histamina

Avaliou-se o tamanho da pápula da histamina nos tempos pré e pós-tratamento. No grupo imunoterapia, a mediana diminuiu de 6 mm para 4,4 mm, diferença que se mostrou significativa ($p= 0,000$). No grupo controle, a mediana variou de 7,6 mm, no pré-tratamento, para 6,6 mm após um ano, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,313$).

4.3. Evolução dos níveis de IgE sérica específica para ácaro, barata e camarão

A análise comparativa estatística foi baseada nos testes de McNemar para análise de pré e pós com respostas categorizadas como "0" (negativo) ou "1" (positivo); na análise das respostas categorizadas de "0" a "6", correspondentes às classes do ImmunoCAP, por se tratar de acompanhamento no tempo para mais de dois tipos de respostas, utilizou-se o teste de Bhapkar e Stuart-Maxwell, que se caracterizam numa extensão do teste de McNemar; estes testes fornecem informação sobre a concordância das respostas e avaliam ainda a direção da resposta de uma categoria menor para maior e vice-versa (*McNemar Test of Overall Bias*).

4.3.1. IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p)

Quanto à positividade (pelo critério estipulado de IgE $\geq$ 0,7 kU/L), analisando os resultados do teste para Der p, no pré e pós-tratamento, observamos que, no grupo de imunoterapia, houve concordância entre as respostas das dosagens de IgE específica ($p=0,083$). Neste grupo, dos 22 pacientes inicialmente positivos para Der p, três tiveram teste negativo no pós-ITE (tabela 15). No grupo controle, não foi possível realizar o teste de McNemar para comparar os tempos pré e pós-tratamento, pois os dados não puderam ser dispostos em uma tabela de contingência. Neste grupo, o único caso negativo no início, ficou positivo na avaliação final.

Tabela 15- Distribuição dos resultados do ImmunoCAP para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		ImmunoCAP Der p pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
ImmunoCAP Der p pré-ITE	negativo	1 (4,4)	0	1
	positivo	3 (13)	19 (82,6)	22
Total		4	19	23

Quanto à análise das classes do ImmunoCAP para Der p, pré e pós-tratamento: no grupo de imunoterapia não houve concordância de respostas (teste de Bhapkar, $p= 0,000$), sendo estatisticamente significativa a proporção de indivíduos com resultado de classe maior no início do estudo comparados aos resultados pós-ITE ($p= 0,000$); no grupo controle, houve concordância de respostas pré e pós-tratamento (teste de Stuart-Maxwell, $p= 0,321$), e não houve evidência significativa de que os indivíduos mudassem de classe da primeira dosagem para a última ($p= 0,453$). A distribuição dos resultados das classes do ImmnuCAP pré e pós-tratamento, nos grupos imunoterapia e grupo controle, são apresentados nas tabelas 17 e 18.

4.3.2. IgE específica para camarão

Quanto à positividade (pelo critério estipulado de IgE $\geq 0,7$ kU/L), analisando os resultados do teste para camarão, no pré e pós-tratamento, observamos que, no grupo de imunoterapia, não houve concordância entre as respostas das dosagens de IgE específica ($p= 0,014$). Neste grupo, dos 9 pacientes inicialmente positivos para camarão, 6 tiveram teste negativo no pós-ITE; nenhum paciente não sensibilizado inicialmente, apresentou IgE sérica positiva para camarão após a imunoterapia (tabela 16). No grupo controle, houve concordância entre as respostas pré e pós-tratamento ($p= 0,317$). Neste grupo, dos 2 casos positivos, um ficou negativo na avaliação final.

Tabela 16- Distribuição dos resultados do ImmunoCAP para camarão, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		ImmunoCAP camarão pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
ImmunoCAP camarão pré-ITE	negativo	14 (60,9)	0	14
	positivo	6 (26,1)	3 (13)	9
Total		20	3	23

Quanto à análise das classes do ImmunoCAP para camarão, pré e pós-tratamento: no grupo de imunoterapia não houve concordância de respostas (teste de Bhapkar, $p= 0,014$), sendo estatisticamente significativa a proporção de indivíduos com resultado de classe maior no início do estudo comparados aos resultados pós-ITE ($p= 0,016$); no grupo controle, houve concordância de respostas pré e pós-tratamento (teste de Bhapkar, $p= 0,609$), e não houve evidência significativa de que os indivíduos mudassem de classe da primeira para a última dosagem ($p= 0,25$).

4.3.3. IgE específica para *Periplaneta americana*

Quanto à positividade da IgE para *Periplaneta americana* (pelo critério estipulado de IgE $\geq 0,7$ kU/L), não foi possível aplicar o teste de McNemar para comparar os tempos pré e pós-tratamento de ambos os

grupos. Os dados não puderam ser dispostos em tabelas de contingências, pois grande parte dos indivíduos era negativa, tanto na dosagem inicial, como na última.

Quanto à análise das classes do ImmunoCAP para *Periplaneta americana*, pré e pós-tratamento, houve concordância de respostas tanto no grupo imunoterapia (teste de Bhapkar, $p= 0,901$), quanto no grupo controle (teste de Bhapkar, $p= 0,981$). E em nenhum dos grupos houve evidência significativa de mudança de direção das classes ($p= 0,5$ no grupo imunoterapia, e $p= 1$ no grupo controle).

Tabela 17- Distribuição da frequência de resultados do ImmunoCAP para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), camarão e *Periplaneta americana* (Per a) segundo as classes do teste, nos instantes de tempo pré-ITE e pós-ITE, no grupo imunoterapia (n =25 pré-ITE, e n= 23 pós-ITE)

Classe ImmunoCAP	Grupo Imunoterapia					
	Der p (n)		Camarão (n)		Per a (n)	
	Pré-ITE n (%)	Pós-ITE n (%)	Pré-ITE n (%)	Pós-ITE n (%)	Pré-ITE n (%)	Pós-ITE n (%)
0	1 (4)	4 (17,4)	14 (56)	18 (78,3)	21 (84)	23 (100)
1	-	-	2 (4)	2 (8,7)	3 (12)	-
2	4 (16)	7 (30,4)	7 (28)	2 (8,7)	1 (4)	-
3	6 (24)	6 (26,1)	2 (8)	1 (4,3)	-	-
4	5 (20)	4 (17,4)	1 (4)	-	-	-
5	4 (16)	1 (4,3)	-	-	-	-
6	5 (20)	1 (4,3)	-	-	-	-
Total	25	23	25	23	25	23

Tabela 18- Distribuição da frequência de resultados do ImmunoCAP para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), camarão e *Periplaneta americana* (Per a) segundo as classes do teste, nos instantes de tempo pré e pós-tratamento, no grupo controle (n=10)

Classe ImmunoCAP	Grupo Controle					
	Der p (n)		Camarão (n)		Per a (n)	
	Pré-ITE n (%)	Pós-ITE n (%)	Pré-ITE n (%)	Pós-ITE n (%)	Pré-ITE n (%)	Pós-ITE n (%)
0	-	-	6 (60)	8 (80)	9 (90)	10 (100)
1	1 (10)	-	2 (20)	1 (10)	-	-
2	2 (20)	2 (20)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	-
3	-	5 (50)	1 (10)	-	-	-
4	4 (40)	2 (20)	-	-	-	-
5	1 (10)	-	-	-	-	-
6	2 (20)	1 (10)	-	-	-	-
Total	10	10	10	10	10	10

4.4. Evolução dos níveis de IgE específica para tropomiosina

4.4.1. IgE para tropomiosina de *Dermatophagoides pteronyssinus*

Na pesquisa de IgE para tropomiosina de Der p, não houve diferença estatisticamente significativa, nos resultados pré e pós-tratamento, quanto ao tipo de resposta, em ambos os grupos, imunoterapia ($p= 0,08$) e controle ($p= 0,31$); embora na análise descritiva dos dados observamos que no grupo de imunoterapia, dos 9 casos positivos no início, 3 se tornaram negativos pós-ITE, e nenhum caso negativo, ficou positivo; no grupo controle, havia apenas 2 casos positivos no início e um deles deixou de ser detectado na avaliação final.

Tabela 19- Distribuição dos resultados do ELISA para detecção de IgE anti-tropomiosina de Der p, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		IgE para tropomiosina Der p pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
IgE para tropomiosina Der p pré-ITE	negativo	14 (60,9)	0	14
	positivo	3 (13)	6 (26,1)	9
Total		17	6	23

4.4.2. IgE para tropomiosina de Camarão

Na pesquisa de IgE para tropomiosina de camarão, não houve diferença estatisticamente significativa, nos resultados pré e pós-tratamento, quanto ao tipo de resposta, em ambos os grupos, imunoterapia ($p= 0,31$); e no grupo controle, não existiram pares discordantes. Na análise descritiva dos dados observamos que no grupo de imunoterapia, dos 6 casos positivos no início, 1 se tornou negativo pós-ITE e todos os casos negativos mantiveram a mesma resposta na avaliação final.

Tabela 20- Distribuição dos resultados do ELISA para detecção de IgE anti-tropomiosina de camarão, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		IgE para tropomiosina camarão pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
IgE para tropomiosina camarão pré-ITE	negativo	17 (73,9)	0	17
	positivo	1 (4,4)	5 (21,7)	6
Total		18	5	23

4.4.3. IgE para tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana*

Na pesquisa de IgE para tropomiosina recombinante (Per a 7), encontramos diferença estatisticamente significativa, nos resultados pré e pós-tratamento, no grupo imunoterapia ($p= 0,02$); e no grupo controle, houve concordância de respostas ($p= 0,31$). Na análise descritiva dos dados observamos que no grupo de imunoterapia, dos 8 casos positivos no início, 4 se tornaram negativos pós-ITE, e todos os casos negativos mantiveram a mesma resposta na avaliação final; enquanto no grupo controle, havia apenas 2 casos positivos no início e um deles deixou de ser detectado na avaliação final.

Tabela 21- Distribuição dos resultados do ELISA para detecção de IgE contra tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana*, segundo o tempo de sua realização, pré-ITE e pós- ITE, no grupo que recebeu imunoterapia N=23

		IgE para Per a7 pós-ITE		Total
		negativo n(%)	positivo n(%)	
IgE para Per a7 pré-ITE	negativo	15 (65,2)	0	15
	positivo	4 (17,4)	4 (17,4)	8
Total		19	4	23

4.5. Evolução da reatividade clínica ao camarão após a imunoterapia

A reatividade clínica ao camarão foi reavaliada através da prova de desencadeamento oral após 1 ano da inclusão do paciente no estudo. Dois pacientes do grupo de imunoterapia abandonaram a pesquisa faltando 2 meses para o término (por motivos já expostos), assim, as provas de provocação oral foram conduzidas em 33 pacientes. Quanto à tolerância e/ou reatividade ao camarão, houve concordância de resposta pré e pós-ITE, em todos os 33 pacientes. Seguindo o mesmo racional do procedimento inicial, os 26 pacientes não alérgicos a camarão foram submetidos à provocação oral aberta que resultou negativa em todos eles. Os 7 pacientes alérgicos, diagnosticados no início do estudo, realizaram primeiro o procedimento duplo cego de provocação, que desencadeou sintomas em dois deles. Um indivíduo que inicialmente havia reagido no DBPCFC, na segunda provocação apresentou apenas desconforto abdominal, e, portanto, com teste inconclusivo, foi submetido à provocação aberta que então, desencadeou sintomas objetivos de alergia, com tosse, prurido oral e edema de lábios. Os outros quatro pacientes tiveram sintomas de alergia reproduzidos na provocação oral aberta.

Por conseguinte, avaliamos se houve diferença na gravidade da reação desencadeada pela provocação oral com camarão nos 7 pacientes alérgicos, conforme mostra a tabela 22. No grupo que recebeu imunoterapia, três pacientes tiveram reação de mesma intensidade na

segunda provocação. Um paciente teve reação mais intensa, e dois tiveram reações mais leves.

Tabela 22- Manifestações clínicas desencadeadas nas provas de desencadeamento oral com camarão pré e pós-ITE nos pacientes alérgicos a camarão N=7

Pacientes	Prova de Provocação Oral (quadro clínico)	
	Pré-ITE	Pós-ITE
Imunoterapia		
AEG	Angioedema de lábios	Angioedema de lábios
AWOS	Síndrome de Alergia Oral (SAO)	Angioedema de face
CESG	Rinoconjuntivite + Angioedema de pálpebras	Rinoconjuntivite +SAO
CTR	Angioedema e urticária	Angioedema e urticária
MCAF	SAO	SAO
MHM	Urticária+ náusea	SAO
Controle		
LMS	SAO	SAO
Foram considerados os sintomas que predominaram e foram mais graves em cada paciente, em cada provocação.		

4.6. Evolução clínica dos pacientes

Na tabela 23 observa-se a frequência de diagnóstico de asma, rinite e conjuntivite nos grupos imunoterapia e controle.

Tabela 23 – Frequência do diagnóstico de rinite, conjuntivite e asma nos grupos que receberam imunoterapia (n=25) e no grupo controle (n=10)

Grupos	Rinite Alérgica	Conjuntivite Alérgica	Asma
Imunoterapia	24	11	16
Controle	10	3	5

Observamos que tanto os pacientes que receberam imunoterapia, quanto os pacientes do grupo controle evoluíram com melhora clínica demonstrada principalmente pela diminuição do escore de sintomas de rinite e aumento do escore de controle da asma (Anexo Q, Quadro 11).

No grupo que recebeu imunoterapia, a média do escore de sintomas de rinite diminuiu de 10 para 4 após a imunoterapia, e esta diferença nos escores pré e pós-ITE foi estatisticamente significativa ($p=0,000$) pelo teste de Wilcoxon Signed Rank. Um paciente do grupo imunoterapia teve desaparecimento completo dos sintomas de rinite alérgica (mesmo com medicação suspensa). No grupo controle, a média inicial do escore de rinite era 9, e reduziu para 7 após um ano de tratamento, e o teste estatístico também mostrou que esta diferença foi significativa ($p=0,007$). Comparando-se os grupos imunoterapia e controle quanto aos escores de

rinite, o teste Wilcoxon Rank Sum demonstrou que não havia diferença entre eles no início do estudo ($p= 0,5674$), no entanto, a diferença passou ser significativa após um ano de tratamento ($p= 0,0036$).

Em relação ao controle da asma, no grupo que recebeu imunoterapia houve um aumento do escore de controle da doença de 22 para 24, que foi significativo ($p= 0,005$); e houve aumento de 22 para 23 no grupo controle, sendo que esta diferença não foi significativa ($p= 0,066$), considerando-se 5% de significância para o teste. Não havia diferença dos escores de asma, entre os grupos imunoterapia e controle, no início do estudo ($p= 0,9327$), no entanto, a diferença passou ser significativa após um ano de tratamento ($p= 0,0393$).

No grupo imunoterapia, havia 16 pacientes com asma, sendo 8 com doença intermitente; quatro dos 6 pacientes inicialmente classificados como portadores de asma persistente moderada (GINA, 2002), passaram para classificação de asma persistente leve. Um caso de asma persistente leve passou para intermitente leve (sendo suspenso corticosteróide inalatório); e, o único paciente do estudo com asma persistente grave melhorou sua classificação para asma persistente moderada. No grupo controle, havia cinco asmáticos: três apresentavam asma intermitente; e os dois pacientes classificados no início como asma persistente moderada passaram a se comportar como persistentes leves. Nenhum paciente, tanto do grupo imunoterapia como do grupo controle, necessitou de atendimento de emergência em decorrência da asma, após a inclusão no protocolo. As

crises de broncoespasmo, que ocorreram durante o período de seguimento, foram leves e aliviadas com medicação de resgate utilizada no domicílio.

Em relação à dose de corticosteróides (Anexo R, Quadro 12), somando a dose para uso nasal e a dose inalatória, observamos que no grupo imunoterapia a dose média utilizada no início do estudo era 467 µg/dia, e após um ano a necessidade diminuiu para 288 µg/dia, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p= 0,000$); enquanto isso, no grupo controle houve redução menos pronunciada, de 293 µg/dia para 261 µg/dia, que não foi significativa ($p= 0,129$). Comparando-se os grupos imunoterapia e controle, o teste Wilcoxon Rank Sum demonstrou que não havia diferença entre eles, quanto à dose de corticosteróides, no início do estudo ($p= 0.1724$), tão pouco houve diferença após um ano de tratamento ($p= 0.9852$).

No grupo que recebeu imunoterapia, uma paciente não fazia uso de medicamento de manutenção, apesar dos sintomas persistentes de rinite, sendo que evoluiu com melhora importante dos sintomas mesmo sem utilizar medicação de controle (escore de 9 caiu para 3). Ainda no grupo de imunoterapia, foi possível suspender o uso de corticosteróides em quatro pacientes, mantendo o controle clínico da doença. Nesse grupo, também se observou redução no uso de medicações adjuvantes aos corticosteróides: três dos oito pacientes que usavam broncodilatador de longa ação (LABA) deixaram de utilizá-lo ao longo do curso de

imunoterapia; dos quatro indivíduos que usavam antileucotrieno, apenas um manteve a necessidade; todos os quatro pacientes que usavam colírio, com ação antihistamínica e/ou estabilizadora de membrana de mastócitos, ficaram assintomáticos dos sintomas oculares, e, assim, suspenderam seu uso durante o seguimento, mantendo-se controlados.

No grupo controle, apesar da melhora observada no escore de sintomas, esta foi mantida em paralelo à manutenção da dose de corticosteróides; apenas dois pacientes mantiveram-se estáveis após redução de mais do que 25% da dose de corticosteróides, e um necessitou aumento de dose durante o seguimento do estudo. Não foi possível suspender o uso de LABA nos dois pacientes que o utilizavam; o antileucotrieno foi suspenso do único paciente que usava; e o uso de colírio deixou de ser necessário em um dos dois pacientes que faziam aplicação desse medicamento.

4.7 Avaliação de parâmetros da função pulmonar

Dos 25 pacientes incluídos no grupo ITE, 8 apresentavam diminuição na relação entre volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e a capacidade vital forçada (CVF), indicativa de obstrução brônquica. Após um ano de ITE, apenas dois pacientes deixaram de mostrar sinal de obstrução neste parâmetro espirométrico (VEF1/ CVF). No grupo controle, três dos 10 pacientes incluídos apresentavam diminuição na relação VEF1/ CVF, que se manteve diminuída após um ano de tratamento em dois deles.

No grupo imunoterapia, observamos um aumento discreto nas medidas do VEF1, pré e pós-ITE, que não foi estatisticamente significativo ($p= 0,197$), como se observa na tabela 24. No grupo controle não houve aumento ou diferença significativa do VEF1, pré e pós-ITE ($p= 0,191$). Quanto às medidas de VEF1 pós broncodilatador (BD) houve um pequeno aumento, pré e pós-ITE, nos dois grupos, sendo que esta diferença não foi significativa no grupo imunoterapia ($p= 0,230$) mas foi ou significativa no grupo controle ($p= 0,042$).

Não houve diferença entre os grupos imunoterapia e controle, pré-tratamento, nos valores de VEF1 ($p= 0,206$); entretanto após um ano de tratamento, o grupo imunoterapia apresentou valores maiores de VEF1 comparados aos do grupo controle, com diferença significativa ($p= 0,021$). Quanto aos valores de VEF1 pós-BD, no início do estudo não havia diferença entre os grupos ($p= 0,124$); e após um ano, os dois grupos

permaneceram sem diferença estatisticamente significativa entre eles nos valores de VEF1 pós-BD ($p=0,111$).

Tabela 24 – Valores do VEF1 pré BD (porcentagem do predito) e do VEF1 pós BD, pré e pós-ITE, nos grupos imunoterapia (n=25 pré ITE e n= 23 pós-ITE) e controle (n= 10)

Grupo	VEF1 Média ($\pm$ DP)		VEF1 pós-BD Média ($\pm$ DP)	
	Pré-ITE	Pós-ITE	Pré-ITE	Pós-ITE
Imunoterapia	98 ($\pm$ 13)	101($\pm$ 15)	103 ($\pm$ 13)	104 ($\pm$ 14)
<i>P</i> -valor Pré vs Pós-ITE	0,197		0,230	
Controle*	91 ($\pm$ 12)	89 ($\pm$ 12)	95 ($\pm$ 11)	97 ($\pm$ 10)
<i>P</i> -valor Pré vs Pós-ITE	0,191		0,042	
<i>P</i> -valor Imunoterapia vs Controle pré-ITE	0,206		0,124	
<i>P</i> -valor Imunoterapia vs Controle pós-ITE	0,021		0,111	

*No grupo controle os dados são comparados pré e pós-tratamento de um ano

4.8 Reações adversas à imunoterapia

As reações adversas foram classificadas em locais ou sistêmicas, imediatas ou tardias; e, quanto à gravidade, as sistêmicas podem ser leves, moderadas ou graves, segundo as recomendações da EAACI (1998). Em razão da tênue e frágil diferenciação, optou-se por considerar as reações moderadas e graves num mesmo conjunto, definidas aqui pelo aparecimento de sinais e/ou sintomas que denotem envolvimento de mais de um órgão ou sistema.

Ocorreram 9 reações sistêmicas em um total de 764 aplicações, o que representa uma frequência de 1,17% das doses aplicadas. Destas, 4 foram leves, porém uma delas foi tardia, tendo início cerca de duas horas após a aplicação. Esta reação tardia se caracterizou por urticária, e evoluiu satisfatoriamente com a medicação anti-histamínica em domicílio.

As outras 5 reações foram moderadas/graves, e todas estas ocorreram entre 2 e 15 minutos depois da aplicação da imunoterapia.

As 9 reações sistêmicas aconteceram em 5 pacientes. Um deles teve reação sistêmica por três vezes, outro, por duas vezes, e os três restantes apresentaram reação uma única vez.

Nas reações leves imediatas, duas apresentaram sintomas de congestão e prurido nasal, e uma *rash* cutâneo generalizado, sintomas que regrediram facilmente com o uso de anti-histamínico por via oral.

Nas reações moderadas/graves os sintomas progrediram em número e gravidade de forma muito rápida e incluíram: prurido, *rash* cutâneo, urticária generalizada, angioedema de lábios e pálpebras, hiperemia ocular, congestão nasal, coriza, opressão torácica, dispnéia, tosse, sibilos e um caso de sensação de morte iminente. Em todas estas reações, foi utilizada adrenalina como primeira medicação e, então, complementou-se com anti-histamínico, corticosteróide e broncodilatador inalatório, quando necessário. Após o uso da adrenalina, os sintomas iniciaram alívio entre 5 e 10 minutos, e regrediram completamente entre 15 e 30 minutos. Em apenas um caso a dose de adrenalina precisou ser repetida. Uma observação frequente foi a permanência de marcado eritema e pápulas com distribuição nas áreas típicas de dermatite atópica durante a involução dos sintomas. Isto ocorreu em 4 dos 5 pacientes que tiveram reação sistêmica moderada/grave. Nenhum deles tinha dermatite atópica.

Dentre as 9 reações sistêmicas, 8 aconteceram com o extrato na concentração 1/1 (10 µg/mL), em doses diferentes, enquanto uma ocorreu na concentração 1/100, porém foi leve.

Reações sistêmicas recorrentes à ITE ocorreram em dois pacientes alérgicos a camarão, enquanto os três pacientes não sensibilizados a camarão tiveram reação uma única vez. Todos eram asmáticos, 3 com asma intermitente e dois com asma persistente, e estavam com a doença controlada.

Foram observadas 2 reações locais (6cm) imediatas. Eritema e pápulas menores foram frequentes e consideradas normais (Malling et al., 1993).

Nódulo subcutâneo tardio, com dor no local da aplicação, foi relatado em 14 aplicações, e tratado com compressas frias, sem complicações.

Tabela 25– Reações adversas sistêmicas na imunoterapia quanto à gravidade dos sintomas, dose desencadeadora, frequência por paciente, e diagnóstico de alergia a camarão e asma

Paciente	Tipo de reação sistêmica						Alergia a camarão	Asma
	Leve		Moderada/Grave		Tardia leve			
	dose	Número reações	dose	Número reações	dose	Número reações		
MHM	0,01 µg	1	5 µg	1	4 µg	1	Sim	Intermitente
PSA	-	-	4 µg	1	-	-	Não	Intermitente
EMPA	-	-	4 µg	1	-	-	Não	Intermitente
FLS	-	-	2 µg	1	-	-	Não	Persistente
CESG	1 e 5 µg	2	3 µg	1	-	-	Sim	Persistente

5 Discussão

Considerando a diversidade de resultados a serem discutidos, optamos em subdividir este capítulo visando maior clareza e organização da discussão e assim, facilitar sua leitura.

5.1 Caracterização da casuística e do material utilizados

Neste estudo, incluímos pacientes atópicos pertencentes a três perfis de sensibilidade ao camarão: não sensibilizados, sensibilizados sem manifestação clínica e os alérgicos ao camarão. Não existem dados publicados sobre potenciais efeitos da ITE em pacientes co-sensibilizados a alérgenos que apresentam reatividade cruzada, que não têm reação clínica a um deles antes do tratamento.

Os estudos que sugerem o risco de alergia a frutos do mar para pacientes submetidos à ITE não avaliaram o perfil de sensibilização para tropomiosina nos pacientes tratados. Em nosso estudo, todos os 35 pacientes eram sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, sendo que 20 deles demonstraram sensibilização IgE para camarão, mas apenas 7 apresentaram reatividade IgE para a tropomiosina de camarão no ensaio de ELISA quimérico (tabela 2). Aqueles pacientes sensibilizados a camarão não reativos a tropomiosina talvez tenham reatividade IgE para outros alérgenos do crustáceo. Recentemente novos alérgenos (Pen m2,

Lit v2, Lit v3) têm sido identificados no camarão (Yu CJ, 2003; Ayuso R, Gristina G, Barninha). Outra possibilidade, ainda não estudada, seria a existência de algum outro alérgeno de reatividade cruzada nesses indivíduos co-sensibilizados ao ácaro e camarão, além da tropomiosina. Por fim, poderia significar simples falsa sensibilização indicada pelo SPT ou determinação sérica de IgE específica para o camarão.

Encontramos que 71,4% dos alérgicos a camarão tiveram reatividade IgE para tropomiosina, porcentagem muito próxima à citada na literatura, de aproximadamente 75- 80% (Reese G, 2006; Shanti KN, 1993; Daul Cb, 1994). Por outro lado, se considerarmos os indivíduos alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus*, encontramos reatividade IgE para tropomiosina de camarão em apenas 20% deles (table 5). Excluindo-se os alérgicos a camarão dessa avaliação, apenas 7,1% dos 28 sensibilizados ao ácaro mostraram reatividade para tropomiosina de camarão. De fato, a tropomiosina não é considerada um alérgeno principal do *Dermatophagoides pteronyssinus*. Pittner et al., em 2004 avaliaram indivíduos alérgicos a este ácaro e demonstraram reatividade IgE para tropomiosina recombinante de ácaro (Der p 10) em apenas 6% dos 78 soros testados. Por outro lado, um estudo que avaliou 20 pacientes alérgicos a camarão, demonstrou reatividade a bandas do *immunoblotting* correspondente à tropomiosina em 14 deles, sendo que 100% desses mostraram sensibilização para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Carrapatoso I, 2008). Dessa forma, acreditamos que nossos resultados, aliados a esses dados publicados, sugerem que a presença de IgE

específica para tropomiosina de camarão, em indivíduos alérgicos ao ácaro, relaciona-se diretamente com a presença de sintomas de alergia a camarão, e, portanto, poderia ser útil no diagnóstico de alergia ao crustáceo. Essa observação é reforçada pelos resultados de outro estudo que avaliou a presença de IgE para tropomiosina em 13 indivíduos com asma e/ou rinite alérgicas que apresentavam sintomas de alergia a camarão e/ou caranguejo. Dez deles (76,9%) tiveram IgE positiva para tropomiosina de ácaro, 8 (61,5%) para tropomiosina de camarão, 6 (46,1%) de caranguejo e 5 (38,4%) de barata, sugerindo a importância clínica da reatividade cruzada da tropomiosina, em alérgicos a ácaro e/ou barata (Purohit A, 2007).

5.2 Diagnóstico da alergia a camarão

O processo de diagnóstico de alergia alimentar inicia-se por uma anamnese detalhada e encerra-se com a prova de desencadeamento oral com o alimento suspeito. Em levantamentos epidemiológicos, a história isolada tem sido usada para estimativas de prevalência de alergia alimentar, mas certamente os achados são superestimados [12, 13, 14, 15]. Em nosso estudo, observamos 2 pacientes com história positiva nos quais o diagnóstico de alergia a camarão não se confirmou pela provocação oral, reforçando a necessidade de cautela no julgamento do relato pessoal do paciente. Isto pode ocorrer devido a falsas associações

etiológicas, principalmente quando os sintomas acontecem após a ingestão de uma mistura de alimentos. Particularmente em relação ao camarão, deve-se considerar também a possibilidade de reação adversa por outros mecanismos como, por exemplo, toxinas ou aditivos presentes nos crustáceos [16]. Além disso, o desenvolvimento de tolerância pode acontecer em cerca de 4% dos pacientes alérgicos a frutos do mar [12]. O oposto também pode acontecer, em nosso estudo um indivíduo sem história de reação prévia a camarão foi diagnosticado após prova de desencadeamento oral. Sabe-se que alergia a frutos do mar é mais comum em adultos [12], sendo comum a história de consumo anterior sem desencadeamento de sintomas.

Tipicamente a reação alérgica ao camarão é consequente a um mecanismo IgE mediado, como ocorre com outros alimentos, onde os sintomas se iniciam imediatamente após o mínimo contato ou ingestão do alimento. A gravidade da reação varia de um indivíduo para outro, desde sintomas leves até anafilaxia, sendo que o envolvimento respiratório com o edema laríngeo denota o maior risco para a vida do indivíduo [17]. Essa variabilidade na intensidade da reação também foi observada nos pacientes deste estudo. A maior parte das histórias de reação a camarão se manifestou como síndrome de alergia oral, havendo alguns indivíduos, entretanto, que experimentaram sintomas mais graves de anafilaxia. Interessante foi observar que durante a provocação oral desses mesmos pacientes os sintomas desencadeados foram mais leves que os relatados na história, inclusive alguns pacientes tiveram DBPCFC negativa e

reagiram somente na provocação oral aberta. As razões para explicar a falta de reprodutibilidade na DBPCFC têm sido discutidas, e uma das argumentações sugere a hipótese de que a administração de pequenas quantidades do alimento, em doses crescentes, durante o procedimento de provocação oral possa induzir a short-term specific oral tolerance induction, levando a uma transitória tolerância clínica [18]. Outro aspecto seria uma possível alteração da alergenicidade do camarão pelo processo de liofilização, uma vez que não há estudos avaliando esse aspecto na tropomiosina. Além disso, é possível que o contato com a mucosa oral seja importante para o desencadeamento de sintomas na alergia a camarão, uma vez que, muitos apresentam apenas sintomas de síndrome de alergia oral, e talvez o uso de cápsulas não seja adequado para as provocações com este alimento. Num estudo semelhante, Pajno et al (2002) realizaram teste de provocação oral duplo cego em 4 pacientes com história de alergia ao caramujo, em 2 destes (50%) a provocação foi negativa, mas os testes cutâneos positivos e a reprodutibilidade dos sintomas posteriormente confirmaram o diagnóstico.

Embora se reconheça o papel da tropomiosina como alérgeno principal do camarão e como importante alérgeno de reatividade cruzada, o valor diagnóstico da pesquisa de IgE anti-tropomiosina nunca havia sido estudado, em termos de sensibilidade, especificidade, PPV, NPV e eficiência. Os trabalhos nesta área, envolvendo diagnóstico, concentraram-se no estudo de pacientes alérgicos a frutos do mar. Entretanto, investigar a reatividade IgE para tropomiosina também em indivíduos não alérgicos,

sensibilizados ou não a camarão nos permite conhecer melhor sua especificidade e sua capacidade de discriminar um grupo do outro.

Os testes que pesquisam IgE específica constituem uma ferramenta útil na tomada de decisão quanto à necessidade da prova de desencadeamento oral. Pesquisadores inclusive dispensam a prova de desencadeamento oral no caso de história convincente de reação imediata, moderada ou grave, após ingestão de um único possível alérgeno com evidência de IgE específica positiva [4, 13, 27, 28]. Na última década, esforços têm sido realizados na busca de determinar o valor diagnóstico da IgE sérica específica na predição do desfecho das provocações orais, prestando grande auxílio na prática clínica [4-8, 29]. Apesar disso, ainda não se alcançaram resultados satisfatórios que sejam ao mesmo tempo sensíveis e específicos no diagnóstico de alergia alimentar [29, 30]. Em nosso estudo, observamos que resultados positivos no SPT ou na IgE específica para camarão não devem ser interpretados isoladamente, tendo em vista sua especificidade e seu PPV insatisfatórios. Como mostrado nas tabelas 3 e 4, respectivamente, encontramos SPT positivos para camarão em 10 pacientes sem alergia alimentar, e 7 indivíduos não alérgicos tiveram dosagem sérica de IgE positiva para camarão. Por outro lado, os SPT e IgE sérica específica apresentaram bons NPVs e, assim, testes negativos mostram-se mais úteis no julgamento de histórias negativas ou duvidosas no sentido de afastar o diagnóstico. Como notamos em nossos resultados, a determinação sérica de IgE específica para tropomiosina reuniu os melhores valores de sensibilidade, especificidade, PPV, NPV e

eficiência no diagnóstico de alergia alimentar no grupo estudado (table 6). Com sensibilidade de 71,4% e NPV de 92,8%, vemos que a dosagem de IgE para tropomiosina de camarão não perdeu em nada para o SPT e IgE sérica específica para camarão. Além disso, a dosagem de IgE para tropomiosina de camarão mostrou-se bastante superior ao SPT e IgE sérica específica para camarão em sua especificidade de 92,8% e PPV de 71,4%. Ainda assim, tivemos 2 pacientes com IgE para tropomiosina negativa que eram alérgicos ao camarão e 2 tiveram testes positivos cuja alergia não se confirmou, mostrando que seu resultado não pode ser interpretado isoladamente. Continua sendo fundamental valorizar a história e julgar a necessidade de prova de desencadeamento oral. Quando olhamos nossos resultados (figura 2), nos chama muito a atenção o fato de que quando houve concordância entre história e resultado da IgE para tropomiosina, não houve nenhum erro diagnóstico, ou seja, história positiva com IgE positiva para tropomiosina resultou em provocação oral positiva em 100% dos casos. Em relação ao teste negativo com história negativa também o desfecho da provocação foi sempre negativo. Essa observação também é válida para os SPT e IgE sérica específica para camarão concordantes entre si e com a história. Entretanto, vale ressaltar que nos indivíduos sem história prévia, 55,5% (15 de 27) tiveram SPT ou IgE sérica específica positivos, sendo que 93,3% (14 de 15) destes foram negativos na provocação oral, ou seja, eram falsos positivos (figura 1). Quando se observa os resultados da IgE para tropomiosina, os achados são bem diferentes e inspiram maior confiança. Neste caso, dos 27 pacientes com

história negativa, apenas 3 tiveram IgE para tropomiosina positiva, sendo que um deles realmente era alérgico a camarão e 2 (7,4%) tiveram provocação negativa. Isto sugere que a presença de IgE para tropomiosina talvez tenha maior correlação com pacientes sintomáticos, e na ausência de história anterior, um teste negativo estaria mais relacionado a um desfecho negativo de uma provocação oral. Novos estudos incluindo pacientes não atópicos alérgicos e/ou sensibilizados a camarão seriam importantes para definir melhor o papel diagnóstico da IgE anti-tropomiosina.

5.3 Aspectos clínicos e imunológicos relacionados à imunoterapia específica

A ITE é o único tratamento que interfere nas bases dos mecanismos fisiopatológicos das doenças alérgicas mediadas por IgE, como asma, rinite e reações a venenos de insetos himenópteros, com a possibilidade de alterar seu curso natural (Malling et al., 1993) e manter seus benefícios por períodos prolongados, após cessado o tratamento (Durhan et al., 1999). Apesar de seu uso clínico há quase um século, o tratamento imunoterápico ainda não teve seus mecanismos de ação totalmente elucidados. No que tange aos efeitos sobre alterações imunológicas para alérgenos de reatividade cruzada, a literatura mostra resultados divergentes, alguns apontando para o risco de nova sensibilização (Antonicelli L, 2003; Pajno

GB, 2002; Peroni DG, 2000; van Ree R et al., 1996; De Maat-Bleeker F, 1995), enquanto outros demonstram ausência desse risco, mostrando inclusive proteção para novas sensibilizações (Asero R, 2006 e 2005).

O tratamento de uma alergia alimentar baseia-se em evitar a exposição, restringindo o alimento da dieta, o que implica permanente estado de insegurança. Ao se utilizar, na imunoterapia, um extrato que contem um alérgeno que apresenta reatividade cruzada com um conhecido alérgeno alimentar, assume-se o risco do desenvolvimento de nova sensibilização ou alergia, e este risco tem sido avaliado em poucos trabalhos, e agora, em nosso estudo. Nesta avaliação estudamos as variações, pré e pós-imunoterapia, na positividade, tamanho das pápulas em mm, bem como os níveis de IgE específica para o ácaro *D. pteronyssinus* e para os alérgenos de reatividade cruzada. Os testes de reatividade cutânea de leitura imediata para o alérgeno reproduzem de maneira reduzida os efeitos do contato deste com o organismo, especialmente nos órgãos acometidos pela doença.

Na avaliação da reatividade cutânea ao *D. pteronyssinus* o teste de puntura titulado revelou diminuição significativa nos valores das medidas das pápulas (figuras 3 e 4), sendo que em algumas concentrações deixou de ser positivo, dados coincidentes com alguns trabalhos publicados na literatura (Olsen, 1997). Esta alteração pode ser decorrente da menor liberação de histamina e outros mediadores biativos pelos mastócitos e basófilos, após exposição ao alérgeno, fato descrito no curso da

imunoterapia (Durhan, 1998). Como consequência, os efeitos causados durante a fase imediata da reação de hipersensibilidade tipo I seriam minimizados, o provavelmente correlaciona-se com melhora clínica.

Quanto à evolução do tamanho das pápulas no *prick test* para os alérgenos de reatividade cruzada (camarão, barata e tropomiosina), pré e pós-indução da imunoterapia, não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos A (não sensibilizados ao camarão) e B (sensibilizados ao camarão (Figuras 5 e 6), sugerindo que pelo menos durante a fase de indução da imunoterapia não há alteração na reatividade cutânea IgE para esses alérgenos. Recentemente, Asero (2005) realizou imunoterapia em 31 pacientes alérgicos a ácaro e não sensibilizados ao camarão, mesmas características do nosso grupo A de estudo, e nenhum caso desenvolveu sensibilização ou alergia ao camarão após o curso de 3 anos de tratamento imunoterápico, dado que coincide com nosso resultado até o momento. Sabe-se que o nível de exposição a um determinado alérgeno é importante para o desenvolvimento de sensibilização alérgica, e talvez a quantidade de tropomiosina presente no extrato de ácaro, usado na imunoterapia, seja insuficiente para desencadear esse processo. Embora não tenha sido possível avaliar a quantidade de tropomiosina no extrato utilizado neste estudo, foi possível documentar sua presença através do *Western Blot* com anticorpo anti-tropomiosina de camarão (Bial-Arístegui). Neste ensaio, observou-se, como era esperado, Especificamente em relação ao nosso grupo B, de pacientes sensibilizados ao camarão, não encontramos dados na literatura para compararmos.

A discussão sobre evolução dos níveis de IgE (UniCAP e ELISA) não foi feita pois aguarda-se completar a coleta de todos os pacientes para analisar o soros num mesmo momento. Os resultados de IgE total, contagem de eosinófilos, parâmetros da função pulmonar e evolução clínica também serão analisadas e discutidas posteriormente.

Um último aspecto, em relação a reações adversas a imunoterapia, pretendemos analisar fatores relacionados ao surgimento das reações sistêmicas. Além de analisar fatores conhecidos como asma e doença não controlada, entre outros, tentaremos identificar se houve alguma associação com outros fatores como: época do ano e sensibilização à tropomiosina.

5.4. Considerações finais

6 Conclusões

- 1- A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não induziu nova sensibilização IgE ou alergia para camarão, ao final de um ano de tratamento.
- 2- A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não induziu tolerância clínica para o alimento nos indivíduos alérgicos a camarão, ao final de um ano de tratamento.
- 3- A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não aumentou a gravidade das manifestações clínicas induzidas nos pacientes alérgicos a camarão, pela ingestão do alimento. As reações desencadeadas pela provocação oral com camarão não seguiram um padrão de evolução de gravidade, havendo uma tendência a manter a mesma gravidade.
- 4- Nos pacientes submetidos à imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* houve diminuição da reatividade específica para o ácaro, evidenciada pela redução do tamanho das pápulas nos testes cutâneos e pela redução da quantidade de IgE específica no soro.

- 5- Nos pacientes submetidos à imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* houve diminuição da reatividade específica para camarão, evidenciada pela redução do tamanho das pápulas nos testes cutâneos e pela redução da quantidade de IgE específica no soro.
- 6- Nos pacientes submetidos à imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* houve diminuição da reatividade específica para *Periplaneta americana*, evidenciada pela redução do número de casos positivos nos testes.
- 7- A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não induziu nova sensibilização para *Periplaneta americana* ao final de um ano de tratamento.
- 8- Nos pacientes submetidos à imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* houve diminuição da reatividade específica para tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana*, evidenciada pela redução do número de casos com IgE específica no soro.
- 9- Nos pacientes submetidos à imunoterapia específica para o ácaro, ao final de um ano de tratamento, não houve nova sensibilização para tropomiosinas de *Dermatophagoides pteronyssinus*, Camarão, e *Periplaneta americana*, ou para tropomiosina recombinante de *Periplaneta americana*.

- 10- Nos pacientes submetidos à imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não houve alteração da reatividade específica para os alérgenos que não possuem a tropomiosina como alérgeno principal (*Blomia tropicalis* e *Blatella germanica*), considerando a concordância nos testes cutâneos após um ano de tratamento.
- 11- A sensibilização IgE para tropomiosina, em pacientes sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, foi mais frequente entre os indivíduos alérgicos a camarão.
- 12- A determinação de IgE específica para tropomiosina de camarão demonstrou melhor valor diagnóstico para alergia ao crustáceo, comparado aos resultados dos testes cutâneos e IgE sérica específica para camarão, considerando principalmente sua eficiência diagnóstica, seu valor preditivo positivo e sua especificidade.
- 13- A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* mostrou-se efetiva no tratamento de rinite alérgica e asma em pacientes sensibilizados a este ácaro; com melhora clínica evidenciada pela diminuição do escore de sintomas de rinite e aumento do escore de controle da asma, acompanhados de redução da dose de corticosteróides para manutenção do tratamento.
- 14- A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não promoveu aumento significativo do VEF1, porém os valores desse parâmetro espirométrico, que no início eram iguais

em ambos os grupos, foram maiores no grupo que recebeu imunoterapia do que no grupo controle, após um ano de tratamento.

7 Anexos

Anexo A- *Western Blot* dos extratos do lote XB01, extrato de corpos de ácaro Der p purificados e extrato de camarão usando anticorpo anti-tropomiosina de camarão (Bial-Arístegui).

Immunoblot com (Proteínas totais-Bradford) sem redução com 2-mercaptoetanol:

- 3 µg do lote de vacina (XB01)
- 45 µg de extrato de corpos de *D. pteronyssinus*
- 2 µg de extrato de camarão

Conclusão:

Linha 1: se detecta Der p10 em XB01 com sinais de hidrólise parcial

Linha 2: no extrato de Der p purificado se detecta Der p10 com sinais de dimerização (permaneceu 20 horas a 25°C inadvertidamente)

Linha 3: excesso de camarão (usar menos proteína).

Anticorpo utilizado: rabbit anti-shrimp tropomyosin (Pen a1)

Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martínez A, Martínez J, Palacios R. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Apr 1; 1397(1): 27-30.

Anexo B- *Western Blot*, em condições reduzidas com 2-mercaptoetanol, dos extratos do lote XB01, extrato de corpos de ácaro *Der p* purificados e extrato de camarão usando anticorpo anti-tropomiosina de camarão (Bial-Arístegui).

Immunoblot com (Proteínas totais-Bradford) reduzido com 2-mercaptoetanol:

- 4 µg del lote de vacina (XB01)
- 90 µg de extrato de corpos de *D. pteronyssinus*
- 0,5 µg de extrato de camarão

Conclusão:

Linha 1: se detecta *Der p*10 em XB01 com sinais de hidrólise parcial (da mesma forma que sem redução)

Linha 2: no extrato purificado de corpos de ácaro DPT (novo extrato fresco). Ao se reduzir com 2-mercaptoetanol apareceram muitas bandas inespecíficas (fato comum no Blot). Há excesso de proteína!! Detecta-se *Der p*10, peso molecular de 45 kDa.

Linha 3: camarão. Detecta-se *Pen a*1 (tropomiosina de camarão).

Anexo C- Inibição do *Western Blot* reduzido com 2-mercaptoetanol, para avaliar a especificidade da banda de 40-45 kDa que aparece no extrato purificado de *D. pteronyssinus*.

Antígeno: Der p purificado aproximadamente 10 µg de proteína/cm.
Inibidores (10 µg de proteína total/linha)

Linha 1: camarão
Linha 2: pólen *Phleum pratense*
Linha 3: PBS

Conclusão:

A banda de 40-45 kDa que aparece no extrato de Der p purificado deve ser Der p10, uma vez que é inibida pelo extrato de camarão. Portanto a banda que aparece no extrato de imunoterapia XB01 deve corresponder a Der p10 parcialmente hidrolisado.

Anexo D- Escore de sintomas de Rinite

Os seguintes sinais e sintomas foram avaliados:

Espirros: ____
Rinorréia: ____
Obstrução nasal: ____
Prurido: ____
Tosse: ____
Soma dos Escores: _____

- **ESCORE:**

- 0 – **Ausente:** sem sinais/sintomas evidentes;
- 1 – **Leve:** Sinais/sintomas claramente presentes, mas a percepção é mínima, facilmente tolerados;
- 2 – **Moderado:** Percepção indiscutível de sinais/sintomas, que incomodam um pouco, mas são toleráveis;
- 3 – **Grave:** Sinais/sintomas são difíceis de tolerar; podem causar interferências nas atividades diárias e/ou sono;

Anexo E- Escore utilizado para avaliar controle da asma

Faça o teste	Confira a pontuação	Acompanhe sua evolução																												
<p>1 Durante as últimas 4 semanas, com que frequência sua asma impediu você de fazer coisas no trabalho, na escola ou em casa?</p> <p>(1) O tempo todo (2) A maior parte do tempo (3) Algumas vezes (4) De vez em quando (5) Nunca ☐</p> <p>2 Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você teve falta de ar?</p> <p>(1) Mais de 1 vez por dia (2) 1 vez por dia (3) 3 a 6 vezes p/ semana (4) 1 ou 2 vezes por semana (5) Nunca ☐</p> <p>3 Durante as últimas 4 semanas, com que frequência seus sintomas de asma (chiado no peito, tosse, falta de ar, aperto no peito ou dor) acordaram você durante a noite ou de manhã mais cedo do que de costume?</p> <p>(1) 4 ou mais noites por semana (2) 2 ou 3 noites por semana (3) 1 vez por semana (4) 1 ou 2 vezes (5) Nunca ☐</p> <p>4 Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você usou sua medicação de alívio, como o inalador ou seu nebulizador (como por exemplo: Salbutamol ou Fenoterol)?</p> <p>(1) 3 ou mais vezes por dia (2) 1 ou 2 vezes por dia (3) 2 ou 3 vezes por semana (4) 1 vez por semana ou menos (5) Nunca ☐</p> <p>5 Como você avaliaria o controle da sua asma durante as últimas 4 semanas?</p> <p>(1) Não controlada (2) Mal controlada (3) Um pouco controlada (4) Bem controlada (5) Completamente controlada ☐</p> <p>TOTAL DE PONTOS: <input type="text"/></p> <p><small>ATENÇÃO: O número da resposta corresponde ao valor a ser preenchido no quadrado à direita.</small></p>	<p>25 - Parabéns!</p> <p>Você tem CONTROLE TOTAL de sua asma. Você não tem nenhum sintoma e nenhuma limitação relacionada à asma. Procure seu médico se houver qualquer mudança.</p> <p>20 a 24 - No alvo</p> <p>Sua asma pode estar BEM CONTROLADA mas não TOTALMENTE CONTROLADA. Seu médico pode ajudá-lo(a) a atingir o CONTROLE TOTAL.</p> <p>Menos de 20 - Fora do alvo</p> <p>Sua asma pode NÃO ESTAR CONTROLADA. Seu médico pode recomendar um plano de ação contra a asma para ajudá-lo(a) a melhorar o controle da asma.</p>	<p>Marque na tabela abaixo a sua pontuação mensal e acompanhe a evolução do seu tratamento</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Data</th> <th>Pontuação</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>2º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>3º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>4º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>5º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>6º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>7º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>8º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>9º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>10º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>11º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>12º mês</td><td><input type="text"/></td></tr> <tr><td>(dia/mês)</td><td></td></tr> </tbody> </table>	Data	Pontuação	1º mês	<input type="text"/>	2º mês	<input type="text"/>	3º mês	<input type="text"/>	4º mês	<input type="text"/>	5º mês	<input type="text"/>	6º mês	<input type="text"/>	7º mês	<input type="text"/>	8º mês	<input type="text"/>	9º mês	<input type="text"/>	10º mês	<input type="text"/>	11º mês	<input type="text"/>	12º mês	<input type="text"/>	(dia/mês)	
Data	Pontuação																													
1º mês	<input type="text"/>																													
2º mês	<input type="text"/>																													
3º mês	<input type="text"/>																													
4º mês	<input type="text"/>																													
5º mês	<input type="text"/>																													
6º mês	<input type="text"/>																													
7º mês	<input type="text"/>																													
8º mês	<input type="text"/>																													
9º mês	<input type="text"/>																													
10º mês	<input type="text"/>																													
11º mês	<input type="text"/>																													
12º mês	<input type="text"/>																													
(dia/mês)																														

Nathan RA. J Allergy Clin Immunol 2004; 113:59-65.

Anexo F- Ficha de evolução clínica dos pacientes

Nome: _____

Data: ____/____/____

Rinite- Os seguintes sinais e sintomas serão avaliados:

Espirros: ____
Rinorréia: ____
Obstrução nasal: ____
Prurido: ____
Tosse: ____
Soma dos Escores: ____

- ESCORE:

- 0 – **Ausente:** sem sinais/sintomas evidentes;
- 1 – **Leve:** Sinais/sintomas claramente presentes, mas a percepção é mínima, facilmente tolerados;
- 2 – **Moderado:** Percepção indiscutível de sinais/sintomas, que incomodam um pouco, mas são toleráveis;
- 3 – **Grave:** Sinais/sintomas são difíceis de tolerar; podem causar interferências nas atividades diárias e/ou sono;

Asma: Escore ACT**Aderência:**

- Higiene ambiental:
- Uso das medicações (nome dos medicamentos, dose utilizada, regularidade e técnica): Imunoterapia (cumprir o agendamento):
- Dieta de restrição para crustáceos e moluscos:

Impressão médica: _____ do paciente: _____

Anexo G, Quadro 1- Valores de IgE total, eosinófilos no sangue periférico, e exame protoparasitológico de fezes dos pacientes do grupo imunoterapia e do grupo controle

Pacientes	IgE total	Eosinófilos (nº)	PPF
Imunoterapia			
ADN	949	100	não fez
AEG	.	100	negativo
AWOS	65	100	negativo
CESG	353	100	negativo
CLA	2060	300	negativo
CPFV	.	0	não fez
CPS	969	300	não fez
CSJ	171	100	negativo
CTR	277	200	negativo
DJS	2100	400	não fez
EFS	144	800	negativo
EMPA	786	600	negativo
ESS	86	0	negativo
FLS	340	200	negativo
GOS	158	200	não fez
IFN	181	500	negativo
JPS	773	500	não fez
MASR	103	300	negativo
MCAF	101	0	negativo
MFM	91	400	negativo
MHM	177	200	negativo
MRS	116	500	negativo
PSA	1060	100	não fez
RSA	372	300	negativo
TBFS	295	100	negativo
Controle			
ESC	.	300	não fez
HEB	.	100	negativo
IMP	53	300	não fez
JAS	1770	0	negativo
LMS	560	200	não fez
MAMB	2050	100	negativo
MLCS	.	0	negativo
MRS	84	200	negativo
ROS	255	0	não fez
SDS	632	300	não fez

Anexo H, Quadro 2- Distribuição das pápulas (em mm) no TCLI para camarão, nos 35 pacientes incluídos no estudo (Tempo zero)

Média da pápula (mm)	Frequência (%)
< 3	18 (51,5)
3,00	6 (17,1)
3,25	1 (2,9)
3,50	1 (2,9)
4,00	2 (5,7)
4,25	3 (8,6)
5,25	1 (2,9)
5,50	1 (2,9)
5,75	1 (2,9)
6,25	1 (2,9)
Total	35 (100)

Dois pacientes com pápula de 3 mm apresentavam dermatografismo e portanto foram considerados testes negativos

Anexo I, Quadro 3 – Distribuição dos resultados do ImmunoCAP para camarão, segundo as classes do teste, nos 35 pacientes incluídos no estudo (Tempo zero)

Classes	Frequência (%)
0	20 (57,1)
1	3 (8,6)
2	8 (22,9)
3	3 (8,6)
4	1 (2,9)
Total	35 (100)

Anexo J, Quadro 4- Distribuição dos resultados da dosagem de IgE específica para tropomiosina de camarão no início do estudo, nos 35 pacientes incluídos

IgE anti-tropomiosina camarão em UI/mL	Frequência (%)
,00	28 (80)
4,20	1 (2,9)
4,58	1 (2,9)
4,60	1 (2,9)
10,00	1 (2,9)
15,40	1 (2,9)
52,08	1 (2,9)
291,70	1 (2,9)
Total	35 (100)

Anexo K, Quadro 5- Distribuição dos resultados dos 35 pacientes estudados segundo o desfecho da provocação oral, história anterior de reação a camarão, TCLI e ImmunoCAP para camarão, e dosagem de IgE para tropomiosina de camarão

Pacientes	Provocação positiva	História positiva	TCLI	ImmunoCAP	IgE para tropomiosina camarão
MHM	sim	sim	Negativo	0	0
AEG	sim	não	Positivo	0,63	4,2
AWOS	sim	sim	Positivo	5,53	15,4
CTR	sim	sim	Positivo	41,8	291,7
CESG	sim	sim	Negativo	0,74	0
MCAF	sim	sim	Positivo	15,1	52,08
LMS	sim	sim	Positivo	4,64	10
CSJ	não	não	Negativo	0	0
CPFV	não	não	Negativo	0	0
EFS	não	sim	Negativo	0	0
EMPA	não	não	Negativo	0	0
GOS	não	não	Negativo	0	0
MRS	não	não	Negativo	0	0
MASR	não	não	Negativo	0	0
MFM	não	sim	Negativo	0	0
PSA	não	não	Negativo	0	0
ADN	não	não	Positivo	0	0
CPS	não	não	Negativo	1,33	0
CLA	não	não	Positivo	1,09	0
DJS	não	não	Negativo	1,98	0
ESS	não	não	Positivo	0	0
FLS	não	não	Positivo	0	0
IFN	não	não	Positivo	1,54	4,6
JPS	não	não	Positivo	0	0
RSA	não	não	Positivo	1,19	4,58
TBFS	não	não	Negativo	1,53	0
ESC	não	não	Negativo	0	0
HEB	não	não	Negativo	0	0
IMP	não	não	Negativo	0	0
MAMB	não	não	Negativo	0	0
SDS	não	não	Negativo	0	0
JAS	não	não	Negativo	2,45	0
MLCS	não	não	Positivo	0,37	0
MRS	não	não	Positivo	0	0
ROS	não	não	Positivo	0,46	0

Anexo L, Quadro 6- Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata, em diferentes titulações, para *Dermatophagoides pteronyssinus* nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo

Teste cutâneo de leitura imediata para Der p titulado								
Pacientes	Pré- ITE				Pós- ITE			
	1/1	1/10	1/100	1/1000	1/1	1/10	1/100	1/1000
Imunoterapia								
CSJ	4	2	3	2,25	3	0,5	0,5	0,5
CPFV	4,25	1	0	0	4	0	0	0
EFS	4,5	3,75	3	3	2,5	1	0,5	1
EMPA	4,75	3	3	0	3	3	0,5	0,5
GOS	4,25	3	0	0	1	0,5	0	0
MRS	5,5	3,5	3,5	2,5	2,5	1,5	1	0
MHM	5,25	3,75	3	0	4	0	0	0
MASR	5,25	4,75	4,5	2,5	4,5	2,5	0	0
MFM	5,5	3,5	3,25	3	2,5	1	1	0
PSA	4,25	3,5	2,75	2,5	3,5	2	1	0
AEG	10,25	2,75	2,5	0	3	0	0	0
AWOS	4,25	3	3	2	2	0	0	0
ADN	7	3,75	2	1,5	4,5	3	1	0
CTR	3,5	3	2,5	2	3	0	0	0
CPS	4	0	0	0				
CLA	5	3,25	3,25	2,25	1	0	0	0
CESG	5,5	3,25	2,75	3	2,5	1	0	0
DJS	8,75	5,75	0	0	2,5	2	0	0
ESS	4,75	3	3	3	3,5	2	1	0
FLS	8	5	4	3	3	2,5	1	0
IFN	9	3,25	2,75	2,5	1	0	0	0
JPS	3	3	3	3				
MCAF	3	1,5	3	2	3	1	0	0
RSA	6	4	3	0	2	1	0	0
TBFS	4	3	0	0	2,75	0	0	0
Controle								
ESC	7,25	4,75	2,5	0,5	7	3,5	2	2
HEB	4	2	1,5	0	4,75	2,25	0	0
IMP	4	2	1,75	2,5	4,25	2	1	1
MAMB	9,5	3,75	3	3,25	8	4	2,5	2,5
SDS	6,5	3,75	3	3	7	5	3,5	4
JAS	4,75	2,75	1	0	5	3,5	2	0
LMS	6	3,5	2,75	2	6,5	4	3	1
MLCS	4,5	1	1,5	1	6	4	2	1
MRS	3	3	3,25	2,75	3,75	3,5	2	1
ROS	9,5	3,75	1,75	1	6,5	3	0	0

Anexo M, Quadro 7- Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata para alérgenos com potencial para reatividade cruzada com tropomiosina, nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo

	Camarão		<i>Periplaneta americana</i>		Per a 7		<i>Blatela germanica</i>		<i>Blomia tropicalis</i>	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE
Imunoterapia										
CSJ	0	2,5	4	4,5	0	1	3,5	3,75	2,75	3
CPFV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
EFS	3,25	2	3	2	1,5	1	3	1	2,5	1,5
EMPA	2,25	0	2,5	0	0	0	3	0	3,25	4
GOS	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3
MRS	2,5	0,5	2,5	1	0,5	1	1,5	2	2,75	2
MHM	0	0	2	0	0	0	2,75	0	6,75	5
MASR	2	0	2,75	1	2,75	1	2,5	4	8,25	9
MFM	0	0	0	0	0	0	0	2,5	7,75	6
PSA	0	0	4	0	0	0	0,75	0	4	6
AEG	3	4,5	2,5	3	3,25	3	5	4	3	0
AWOS	6,25	5,5	4,25	2	3,25	5	4	5	4,25	5,5
ADN	3	2	3	2,25	0	0	0	1,5	2,75	1,5
CTR	5,75	5	7,25	5,75	3,5	7	3,5	6	2,75	3,5
CPS	0		0		0		0		1,5	
CLA	4,25	4	4,25	2,5	0	0	4	4,25	5,75	5
CESG	4,25	0	4,5	2,75	1	0	3,5	4	8,25	5
DJS	0	2	0	0	0	0	3,5	3	11,75	11
ESS	3	2	0	2	0	1	3,75	1,5	10	9
FLS	4	2,5	4	3	3	0	5	4,5	0	3
IFN	4,25	4	4,5	4	5	2	4,5	3,5	7,75	6,5
JPS	3		0		0		0		5	
MCAF	5,25	5,5	5,25	6,5	5,25	5	4,75	4	3	2
RSA	4	2,5	4	2	4	2,25	3	3	8,5	7
TBFS	0	1	4	1	0	0	4	0	6,5	6,5
Controle										
ESC	2,25	1	0,5	2,5	0	0	2	1	5,5	6,25
HEB	1	1,5	2,25	2	1,25	1,25	2,5	2	6	7
IMP	2,25	2,25	4	3,75	2	1	2,75	2,5	5,75	6
MAMB	2,75	2	3	3	0	0	4,5	5	7	7,5
SDS	2,25	4	4,25	5,25	2,25	2	3	4	6,25	8
JAS	2	5	4,25	5,25	0	0	4,25	5,75	3,5	4
LMS	5,5	6,25	5	6	4,75	5	5	5,5	5,5	5,75
MLCS	3	3,5	4	5,5	0	1,5	4,25	2	5,75	5
MRS	3	3,5	3,25	4,5	3	3,5	3,5	3	5,5	6
ROS	3,5	3	3,5	4	1,25	2,25	3,5	5,25	7	4,5

Em vermelho estão identificados os pacientes que reagiram à tropomiosina de camarão no ELISA

Anexo N, Quadro 8- Resultados dos testes cutâneos de leitura imediata para alérgenos não relacionados à reatividade cruzada com tropomiosina e histamina, nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo

	Fungos		Cão		Gato		Histamina	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE
Imunoterapia								
CSJ	0	0	0	1,5	0	0	5,5	5,25
CPFV	0	0	0	0	0	0	8	4
EFS	2,5	1	3,25	1	2,5	1	7,75	4,5
EMPA	0	0	2,5	0	3	0	8,5	4,5
GOS	2,5	1	0	2	0	0	5	4,75
MRS	1,5	0	2,75	0	3	0	6,75	5
MHM	0	0	2,75	0	3,25	0	5	3
MASR	2	0	2	0	2	0	6,25	5
MFM	3,75	0	0	0	4,5	5	5,25	5,25
PSA	0	0	0	0	3	0	5,25	5
AEG	0	0	2,5	0	2	0	5,75	5,5
AWOS	3	0	2	0	2,75	0	6	4
ADN	0	0	2	0	0	0	7	5,5
CTR	0	0	0	0	0	0	8,25	6
CPS	0		0		0		4	
CLA	2,25	1	1	0	3,25	0	7,5	4,5
CESG	2,5	0	3	0	2,5	0	6,75	4,5
DJS	4,25	0	0	0	4,25	0	8	4
ESS	3,25	0	3	0	3	0	5,5	4
FLS	0	0	4	0	0	0	6	5
IFN	2,25	0	2,75	2	4	0	6,5	5
JPS	0		0		0		4	
MCAF	3	0	3	0	3	0	7,75	4,25
RSA	0	0	3	0	0	0	5	3,25
TBFS	0	0	0	0	0	1	6	9,25
Controle								
ESC	0	1	1,25	1	0,5	1	7,25	5,5
HEB	1	0	1	0	1	1	8	7,25
IMP	2	0	2	0	2	0	8	8
MAMB	3,5	4	2,75	2	3	3,5	5,75	6,25
SDS	3	2	3,5	3	3,5	2	8,75	6
JAS	0	3	2	0	0	0	4,5	7,25
LMS	1	0	0	0	5	4,5	8,75	8
MLCS	4	4	0	0	0	0	5	4,5
MRS	2,5	0	3,25	0	3	0	6	7
ROS	0	0	1,5	0	4,25	3,75	9	6
Em vermelho estão identificados os pacientes que reagiram à tropomiosina de camarão no ELISA								

Anexo O, Quadro 9- Quantificação de IgE específica (ImmunoCAP), por classes do teste, para ácaro, barata e camarão, nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo

Pacientes	IgE Der p		IgE camarão		IgE barata (Per a)	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE
Imunoterapia						
CSJ	0	0	0	0	0	0
CPFV	3	3	0	0	0	0
EFS	4	4	0	0	0	0
EMPA	6	5	0	0	1	0
GOS	2	0	0	0	0	0
MRS	4	3	0	0	0	0
MHM	4	2	0	0	0	0
MASR	3	2	0	0	0	0
MFM	2	0	0	0	0	0
PSA	6	3	0	0	0	0
AEG	3	2	1	0	0	0
AWOS	3	3	3	2	0	0
ADN	6	4	0	0	0	0
CTR	4	3	4	3	0	0
CPS	4		2		1	
CLA	6	6	2	1	0	0
CESG	5	2	2	0	0	0
DJS	6	4	2	0	0	0
ESS	2	0	0	0	0	0
FLS	5	2	0	0	0	0
IFN	5	4	2	1	0	0
JPS	3		0		1	
MCAF	3	2	3	2	0	0
RSA	5	3	2	0	0	0
TBFS	2	2	2	0	2	0
Controle						
ESC	4	3	0	0	0	0
HEB	1	2	0	0	0	0
IMP	2	3	0	0	0	0
MAMB	6	6	0	0	0	0
SDS	5	3	0	0	0	0
JAS	4	4	2	2	2	0
LMS	6	4	3	1	0	0
MLCS	4	3	1	0	0	0
MRS	2	2	0	0	0	0
ROS	4	3	1	0	0	0

Anexo P, Quadro 10- Quantificação de IgE específica para tropomiosina de Der p, camarão e barata (Per a 7) nos grupos imunoterapia e controle, no início e término do estudo

Pacientes	IgE Tropomiosina de Der p		IgE Tropomiosina de Camarão		IgE Tropomiosina de barata (Per a7)	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE
Imunoterapia						
CSJ	0	0	0	0	0	0
CPFV	0	0	0	0	0	0
EFS	0	0	0	0	0,83	0
EMPA	0	0	0	0	1,25	0
GOS	0	0	0	0	0	0
MRS	0	0	0	0	0	0
MHM	0	0	0	0	0	0
MASR	0	0	0	0	0	0
MFM	0	0	0	0	0	0
PSA	0	0	0	0	0	0
AEG	3,75	4,2	4,2	3,75	4,6	3,75
AWOS	15,4	11,25	15,4	10,4	15,4	11,25
ADN	0	0	0	0	0	0
CTR	137,5	75,9	291,7	118,75	216	208
CPS	0		0		0	
CLA	4,2	3,75	0	0	0	0
CESG	0	0	0	0	0	0
DJS	0	0	0	0	0	0
ESS	0	0	0	0	0	0
FLS	0	0	0	0	3,75	0
IFN	6,7	0	4,6	0	7,08	0
JPS	0		0		0	
MCAF	64,6	54,2	52,08	32,5	34,16	25,8
RSA	5,8	4,17	4,58	3,75	0	0
TBFS	4,58	0	0	0	0	0
Controle						
ESC	0	0	0	0	1,17	0
HEB	0	0	0	0	0	0
IMP	0	0	0	0	0	0
MAMB	0	0	0	0	0	0
SDS	0	0	0	0	0	0
JAS	0	0	0	0	0	0
LMS	10,42	15,42	10	10,83	9,6	12,08
MLCS	0	0	0	0	0	0
MRS	0	0	0	0	0	0
ROS	0	0	0	0	0	0

Anexo Q, Quadro 11- Evolução dos escores de rinite e asma, no início e ao final do estudo, nos grupos imunoterapia e controle

	Escore rinite		Escore asma	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE
Imunoterapia				
CSJ	9	1	.	.
CPFV	6	4	.	.
EFS	13	1	.	.
EMPA	9	3	25	25
GOS	11	7	.	.
MRS	10	2	.	.
MHM	12	3	25	25
MASR	11	5	19	24
MFM	13	1	18	24
PSA	8	6	25	25
AEG	8	2	23	24
AWOS	7	4	25	25
ADN	.	.	17	23
CTR	10	5	22	24
CPS	7	6	.	.
CLA	9	6	21	25
CESG	12	5	18	23
DJS	12	4	20	24
ESS	8	2	25	25
FLS	13	2	19	24
IFN	10	7	25	25
JPS	11	7	.	.
MCAF	5	4	21	24
RSA	12	6	.	.
TBFS	8	0	.	.
Controle				
ESC	7	6	.	.
HEB	12	9	.	.
IMP	9	5	.	.
MAMB	10	10	22	23
SDS	14	8	25	25
JAS	10	8	21	23
LMS	10	5	22	23
MLCS	7	6	19	23
MRS	8	7	.	.
ROS	7	3	.	.
Escore de sintomas rinite (0-15)- ordem crescente de gravidade Escore de controle da asma (5- 25)- ordem decrescente de gravidade Destacados dois resultados coletados 2 meses antes do término do estudo				

Anexo R, Quadro 12- Uso de medicações para tratamento da asma e/ou rinite alérgicas pré- imunoterapia e após um ano de seguimento, nos grupos imunoterapia e controle

	CE tóxico nasal/ inalatório (µg/dia)		LABA		Antileucotrieno		Colírio	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós-ITE
Imunoterapia								
CSJ	64	0	0	0	0	0	0	0
CPFV	512	256	0	0	0	0	0	0
EFS	512	128	0	0	0	0	0	0
EMPA	0	0	0	0	0	0	0	0
GOS	200	0	0	0	0	0	0	0
MRS	512	128	0	0	0	0	0	0
MHM	256	256	0	0	0	0	0	0
MASR	1056	1056	sim	0	0	0	0	0
MFM	928	528	sim	sim	0	0	0	0
PSA	256	256	0	0	sim	0	0	0
AEG	64	64	0	0	0	0	sim	0
AWOS	400	256	0	0	0	0	0	0
ADN	1200	800	sim	sim	0	0	0	0
CTR	500	100	sim	0	0	0	sim	0
CPS	128	0	0	0	0	0	0	0
CLA	512	256	0	0	sim	0	sim	0
CESG	928	464	sim	sim	0	0	0	0
DJS	656	256	sim	0	0	0	0	0
ESS	128	128	0	0	0	0	0	0
FLS	656	528	sim	sim	0	0	sim	0
IFN	256	256	0	0	sim	sim	0	0
JPS	128	64	0	0	0	0	0	0
MCAF	1056	928	sim	sim	0	0	0	0
RSA	512	512	0	0	0	0	0	0
TBFS	256	0	0	0	sim	0	0	0
Controle								
ESC	128	128	0	0	0	0	0	0
HEB	256	128	0	0	0	0	0	0
IMP	256	256	0	0	0	0	0	0
MAMB	1056	928	sim	sim	0	0	sim	sim
SDS	256	256	0	0	sim	0	0	0
JAS	64	128	0	0	0	0	0	0
LMS	128	64	0	0	0	0	0	0
MLCS	528	464	sim	sim	0	0	0	0
MRS	128	128	0	0	0	0	sim	0
ROS	128	128	0	0	0	0	0	0
Destacados dois resultados coletados 2 meses antes do término do estudo								

Anexo S, Quadro 13- Valores espirométricos (VEF1 pré e pós-broncodilatador) inicial e após 1 ano de tratamento (porcentagem do predito)

	VEF1 pré-broncodilatador		VEF1 pós-broncodilatador	
	Pré-ITE	Pós- ITE	Pré-ITE	Pós- ITE
Imunoterapia				
CSJ	97	108	100	109
CPFV	102	91	91	94
EFS	97	94	99	99
EMPA	104	104	116	114
GOS	119	121	118	123
MRS	113	115	116	116
MHM	86	86	89	86
MASR	112	114	121	120
MFM	70	114	96	112
PSA	88	100	92	105
AEG	94	94	95	98
AWOS	113	117	110	114
ADN	79	70	78	74
CTR	100	102	111	112
CPS	95	100	108	109
CLA	85	82	84	86
CESG	85	97	97	95
DJS	94	92	103	103
ESS	103	103	103	103
FLS	110	128	123	128
IFN	110	98	111	99
JPS	113	121	124	120
MCAF	77	75	79	81
RSA	102	126	104	124
TBFS	94	84	97	85
Controle				
ESC	80	75	85	85
HEB	110	109	117	117
IMP	102	86	105	108
MAMB	96	94	99	99
SDS	87	92	88	92
JAS	97	89	100	101
LMS	77	80	86	86
MLCS	71	69	80	86
MRS	102	100	99	99
ROS	91	91	89	92
Destacados dois resultados coletados 2 meses antes do término do estudo				

8 Referências

Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, *et al.* Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:74-83.

Amin HS, Liss GM, Bnstein DI. Evaluation of near-fatal reactions to allergen immunotherapy injections. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:169- 75. reação ITE

Antonicelli L, Mariano M. Mite immunotherapy and food allergy to snail. *Allergy*. 2003 Aug;58(8):821.

Arruda LK, *et al.* Molecular cloning of German cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Intl Arch Allergy Immunol* 1995;107:295.

Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TA, Fernandez-Caldas E, Montealegre F, Lin KL, Chua KY, Rizzo MC, Naspitz CK, Chapman MD. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(1):343-50.

Asero R. Pollen specific immunotherapy is not a risk factor for de novo sensitization to cross-reacting allergens in monosensitized subjects. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006;16:253-7.

Asero R. Lack de novo sensitization to tropomyosin in a group of mite-allergic patients treated by house dust mite-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137:62-5.

Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquent S, Franck P, Ogier V, Petit N, Proust B, Moneret-Vautrin DA, Burks AW, Bihain B, Sampson HA,

Kanny G. Predictive value of skin prick test using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:250-6.

Asturias JA, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Martinez J, Palacios R. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochim Biophys Acta* 1998;1397:27-30.

Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kundig T, Fotisch K, et al. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin Exp Allergy* 2005;35:970-8.

Bock S, Buckley J, Holst A, May C. Proper use of skin tests with food extracts in diagnosis of food hypersensitivity. *Clin Allergy* 1978;8:559-64.

Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an official procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:986- 97.

Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1016-8.

Bohle B, Vieths S. Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens. *Methods* 2004;32:292-9.

Bolhaar STHP, Tiemessen MM, Zuidmeer L, Leeuwen A van, Hoffmann-Sommergruber K. Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clin Exp Allergy* 2004;34:761-9.

Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(Suppl 5):147-334.

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper, *J Allergy Clin Immunol* 1998;**102**:558–62.

Bousquet J, Hejjaoui A, Michel FB. Specific immunotherapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:292.

Carnes J, Ferrer A, Huertas AJ, et al. The use of raw or boiled crustacean extracts for the diagnosis of seafood allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98: 349–354.

Chapman MD, et al. Defined epitopes: in vivo and in vitro studies using recombinant allergens. *Intl Arch Allergy Immunol* 1997;113:102.

Carrapatoso I. Grupos de alimentos com maior reatividade cruzada: artigo de revisão. *Rev Port Imunoalergologia* 2004;12(2):103 -13.

Carrapatoso I, Rodrigues F, Geraldes L, Faria E, Todo-Bom A, Loureiro C, Chieira C. Padrões clínicos e laboratoriais na hipersensibilidade ao camarão e reatividade cruzada com *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Rev Port Imunoalergologia* 2008;16(5):449-66.

Carrillo T, de Castro FR, Blanco C, Castillo R, Quiralte J, Cuevas M. Anaphylaxis due to limpet ingestion. *Ann Allergy* 1994;73:504 -8.

Chu KH, Tang CY, Wu A, Leung PS. Seafood allergy: lessons from clinical symptoms, immunological mechanisms and molecular biology. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005;97:205-35.

Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomenon of hypersensitiveness. *J Immunol* 1923;8:163.

Creticos PS, Adkinson NF Jr, Kagey-Sobotka A, *et al.* Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients: effect of immunotherapy. *J Clin Invest* 1985;76:2247.

Czarnecka-Operacz M, Jenerowicz D, Silny W. Oral allergy syndrome in patients with airborne pollen allergy treated with specific immunotherapy. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2008;16(1):19-24.

Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Clin Immunol*, 1994;105: 49-55.

De Maat-Bleeker F, Akkerdaas JH, van Ree R, Aalberse RC. Vineyard snail allergy possibly induced by sensitization to house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). *Allergy* 1995 May;50(5):438-40.

Dreborg S. Editor. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Allergy* 1989;44:1-59.

Durhan SR, Tills J. Immunology changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:257: 64.

Durhan SR, Walke RSM, Varga EM. Long term clinical efficacy of grass pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999; 341:468-75.

Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy.* 2003 Jul; 33(7):956-61.

Frew AJ, Powel RJ, Corrigan CJ, Durham SR. Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 319- 25. Escore medicação

Furin MJ, Norman PS, Creticos PS *et al.* Immunotherapy decreases antigen-induced eosinophil cell migration into nasal cavity. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:27.

Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yunginger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982;70:261.

Hallas TE, Gislason D, Björnsdóttir US, Jörundsdóttir KB, Janson C, Luczynska CM, Gislason T. Sensitization to house dust mites in Reykjavik, Iceland, in the absence of domestic exposure to mites. *Allergy* 2004;59(5):515-9.

Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Sastre J, Lidholm J, Andersson K, Oberhofer H, Lluch-Bernal M, Ostling J, Mattsson L, Schocker F, Vieths S, Poulsen LK. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1134-41, 1141 e 1-3.

Helm RM, *et al.* Isolation of the 36-kD German (*Blattella germanica*) cockroach allergen using fast protein liquid chromatography. *Intl Arch Allergy Immunol* 1994;103:59.

Hoover GE, Platts-Mills TAE. What the pulmonology needs to know about allergy. *Clin Chest Med* 1995;16:603.

Jeebhay MF, Robins TG, Malo JL, *et al.* Occupational allergy and asthma among salt water bony-fish processing workers. *Am J Ind Med* 2008;51:899–910.

Jeong HY, Lee J, Lee IY, Hong CS, Ree HI, Yong TS. Expression of tropomyosin from *Blattella germanica* as a recombinant non-fusion protein in *Pichia pastoris* and comparison of its IgE reactivity with its native counterpart. *Protein Expression and Purification* 2004;37(2):273-8.

Lehrer SB, Ayuso R, *et al.* Seafood allergy and allergens. A review. *Mar Biotechnol* (NY) 2003;5(4):339-48.

Leung PS, Chu KH, Chow WK, *et al.* Cloning, expression and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:882 -90.

Leung PS, Chen YC, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1998;7:12-20. a

Leung PS, Chen YC, Gershwin MR, Wong SH, Kwan HS, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:847-52. b

Levo Y, Shalit M, Wollner S, Fich A. Serum IgE levels in patients with inflammatory bowel disease. *Ann Allergy* 1986;56:85.

Lichtenstein LM, Ishizaka K, Norman PS, Hill BM. IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* 1973;52:472.

Lopata AL, Lehrer SB. New insights into seafood allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2009; 9:000–000(Apr 24 – Epub ahead print)

Malling HJ, Weeke B. EAACI Immunotherapy position papers. *Allergy* 1993;48(Suppl 14):9-35.

Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, Jacobsen L, et al. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT Study). *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:251-6.

Nakano S, Yoshinuma T, Yamada T. Reactivity of shrimp allergy-related IgE antibodies to krill tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;145(3):175-81.

Nelson HS. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 872-80. Escor de sintomas e reaçã o

NHLBI/WHO Workshop Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Issued January, 1995. NIH Publication n° 02-3659. The 2002 report is available on www.ginasthma.com .

Niggemann B, Wahn U, Sampson HA. Proposals for standardization of oral food challenge tests in infants and children. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:11-3

Noon L: Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911; i: 1572.

Olsen OT. One year placebo controlled, double blind, house dust mite immunotherapy. A study in asthmatic adults. *Allergy* 1997;52:853-9.

O'Neil CE, Lehrer SB. Seafood Allergy and Allergens: A Review. *Food Technology* 1995;49:103.

Otsuka H, Mezawa A, Ohnishi M, Okubo K, Seki H, Okuda M. Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1991;21:115.

Pajno GB, La Grutta S, Barberio G, Canonica GW, Passalacqua G. Harmful effect of immunotherapy in children with combined snail and mite allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Apr;109(4):627-9.

Passalacqua G, Durham SR; Global Allergy and Asthma European Network. Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):881-91.

Pereira CAC, Neder JA. Diretrizes para Testes de Função Pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2002;28(supl 3).

Peroni DG, Piacentini GL, Bodini A, Boner AL. Snail anaphylaxis during house dust mite immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2000 Nov;11(4):260-1.

Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1164-8.

Pittner G, Vrtala S, Thomas WR, Weghofer M, Kundi M, Horak F, Kraft D, Valenta R. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. *Clin Exp Allergy*. 2004 Apr;34(4):597-603.

Purohit A, Shao J, Degreef JM, van Leeuwen A, van ree R, Pauli G, de Blay F. Role of tropomyosin as a cross-reacting allergen in sensitization to cockroach in patients from Martinique (French Caribbean island) with a

respiratory allergy to mite and a food allergy to crab and shrimp. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2007;39(3):85-8.

Rak S, Lowhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:470.

Reld MJ, Lockey RF, Turkeltaub PC, Platts-Mills TA. Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1989. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:6.

Reese G, Schick Tanz S, Lauer I, Randow S, Luttkopf D, Vogel L, Lehrer SB, Vieths S. Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Clin Exp Allergy* 2006;Apr; 36(4):517-24.

Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119(4):247 -58.

Reuter A, Lidholm J, Andersson K, Ostling J, Lundberg M, Scheurer S, *et al.* A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy* 2006;36:815-23.

Sampson H. Diagnosis of food allergy. In: Spector SL, editor. Provocation testing in clinical practice. New York: Marcel Dekker 1995;623-46.

Sampson HA. Comparative study of commercial food antigen extracts for the diagnosis of food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:718-26.

Santos AB, Rocha GM, Oliver C, Ferriani VP, Lima RC, Palma MS, *et al.* Cross -reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1040 -6.

Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, Rizzo MC, Naspitz CK, Arruda LK. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Aug;104(2 Pt 1):329-37.

Schou C, *et al*. Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:935.

Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Sabba-Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. *J Immunol* 1993;151:5354-5363.

Sicherer SH. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10:226-34.

Sicherer SH. Clinical implications of cross -reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:881-90.

Sporik R, Holgate S, Platts-Mills TAE, Cogswell J. Exposure to house-dust mite allergen (*der p 1*) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl Med* 1990;323:502.

Sutton, BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature* 1993;366:421.

Taylor SL. Molluscan shellfish allergy. *Adv Food Nutr Res* 2008;54:139-77.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1025-1034.

Torres Borrego J, Martínez Cuevas JF, Tejero Garcia J. Reactividad cruzada entre pescados y mariscos. *Allergol et Immunopathol* 2003;31(3):146-51.

Trombone AP, Tobias KR, Ferriani VP, Schuurman J, Aalberse RC, Smith AM, Chapman MD, Arruda LK. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(9):1323-8.

Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Pajno GB, Barberio G, Corbetta L, *et al.* Asthma after consumption of snails in house -dust-mite -allergic patients: a case of IgE cross -reactivity. *Allergy* 1996;51:387-93. a

van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996 Feb;51(2):108-13. b

Vanna AT, Yamada E, Arruda LK, *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood: validation of the rhinitis symptom questionnaire and prevalence of rhinitis in schoolchildren in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:95-101.

Verhagen J, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy: T-Regulatory Cells and More. *Immunol Allergy Clin N Am* 2006; 26: 207- 231.

Vierk KA, Koehler KM, Fein SB, Street DA. Prevalence of self-reported food allergy in American adults and use of food labels. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1504-10.

Yi FC, Cheong N, Shek PC, Wang DY, Chua KY, Lee BW. Identification of shared and unique immunoglobulin E epitopes of the highly conserved tropomyosins in *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(8):1203-10.