DANIELA REGINA DOS SANTOS

"AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE IMEDIATA DE PACIENTES ATÓPICOS POR MEIO DE TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (*prick test*) A EXTRATO DE TRAÇA-DE-LIVRO (*Lepisma saccharina*) PADRONIZADO EM UNIDADES BIOLÓGICAS"

CAMPINAS

2006

DANIELA REGINA DOS SANTOS

"AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE IMEDIATA DE PACIENTES ATÓPICOS POR MEIO DE TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (*prick test*) A EXTRATO DE TRAÇA-DE-LIVRO (*Lepisma saccharina*) PADRONIZADO EM UNIDADES BIOLÓGICAS"

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Celso Henrique de Oliveira*

CAMPINAS

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59a

Santos, Daniela Regina dos

"Avaliação da sensibilidade imediata de pacientes atópicos por meio de teste cutâneo de puntura (prick test) a extrato de traça-de-livro (*Lepisma saccharina*) padronizado em unidades biológicas" / Daniela Regina dos Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Celso Henrique de Oliveira

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alergia. 2. Asma. 3. Sensibilidade. 4. Insetos. I. Oliveira, Celso Henrique de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles: Evaluation of immediate sensitivity to a biological Unit-Standardized extract of silverfish (*Lepisma saccharina*) in atopic patients by skin prick test

Keywords:
- Allergy
- Asthma
- Sensitivity
- Insect

Área de concentração : Saúde da criança e do adolescente

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Prof Dr Celso Henrique de Oliveira

Profa. Dra. Ilma Aparecida Paschoal

Prof Dr Antônio José de Pinho Júnior

Data da defesa:13/02/2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Celso Henrique de Oliveira

Membros:

1. Prof. Dr. Celso Henrique de Oliveira

2. Prof(a). Dr(a). Ilma Aparecida Paschoal

3. Prof. Dr. Antonio José de Pinho Júnior

Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 13/02/2006

Dedico este trabalho aos meus pais,
à minha irmã Kelly,
pelo carinho e apoio incondicional, pela compreensão,
por estarem sempre me apoiando na realização dos meus sonhos.

Ofereço cada conquista da minha vida a vocês e a todos
que um dia puderam acreditar na concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Henrique de Oliveira, pela confiança e paciência durante o aprendizado e pela oportunidade oferecida.

Aos voluntários que aceitaram carinhosamente participar do estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, por ter cedido o laboratório e todo o material necessário para a realização do estudo.

À Jussara Rehder, pelo apoio laboratorial.

Aos meus amigos do laboratório, em especial ao Edgar e à Patrícia Macchiaverni, pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão, amizade, companheirismo, tanto nas horas tão difíceis como nos momentos de descontração.

Aos meus pais pela paciência, incentivo, apoio.

À minha irmã Kelly, pela colaboração financeira e compreensão.

Ao meu cunhado, Elson, por todas as impressões realizadas.

Ao meu primo, Pedro, pelos consertos realizados no meu computador sempre que precisei.

A todos os meus familiares e outros amigos, os quais sempre acreditaram em mim e me agüentaram em todos os momentos de stress e mau-humor.

Muito obrigada a todos por me incentivarem nos momentos de desânimo....

Pág.

RESUMO..... *xiii*

ABSTRACT..... *xv*

1- INTRODUÇÃO..... 17

1.1- Alergia respiratória..... 18

1.2- Sensibilização imediata a aeroalérgenos de insetos..... 21

1.3- Características da traça-de-livro *Lepisma saccharina*..... 24

1.4- Diagnóstico de sensibilidade imediata..... 27

2- OBJETIVOS..... 29

2.1- Objetivo geral..... 30

2.2- Objetivos específicos..... 30

3- CASUÍSTICA..... 31

3.1- Desenho do estudo..... 32

3.2- População de estudo..... 32

4- MATERIAL E MÉTODOS..... 33

4.1- Estudo com o teste de puntura..... 34

4.2- Extratos..... 35

4.3- Preparação do extrato de Lepisma saccharina..... 35

4.4- Padronização do extrato de traça em unidades biológicas (UB)..... 36

4.5- Análise estatística..... 36

4.6- Avaliação da sensibilidade imediata ao extrato de traça padronizado em unidades biológicas..... 37

4.7- Locais de desenvolvimento do projeto..... 37

5- RESULTADOS..... 39

5.1- Padronização do extrato de traça *L. saccharina* em unidades biológicas..... 40

5.1.1- Comparação dos grupos em relação ao sexo e à idade..... 40

5.1.2- Comparação dos grupos em relação às patologias atópicas e alérgenos testados..... 41

5.1.3- Comparação dos grupos em relação ao extrato bruto de traça *L. saccharina*..... 43

5.1.4- Avaliação da sensibilidade ao extrato bruto da traça-de-livro *(L. saccharina)* em relação aos diferentes alérgenos testados..... 45

5.1.5- Padronização do extrato bruto de traça *L. saccharina* em unidades biológicas..... 46

5.2- Avaliação da sensibilidade imediata ao extrato padronizado de traça *L. saccharina* através de teste de puntura..... 46

5.2.1- Comparação dos grupos em relação ao sexo e à idade..... 46

5.2.2- Comparação dos grupos em relação às patologias atópicas e alérgenos testados..... 47

5.2.3- Comparação dos alérgenos testados..... 47

6- DISCUSSÃO..... 49

7- CONCLUSÃO..... 57

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 59

9- ANEXOS..... 68

ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido..... 69

ANEXO 2- Teste cutâneo de puntura..... 73

AB	Asma Brônquica
ARIA	*Allergic Rhinitis and Its Impact in Asthma*
CA	Conjutivite Alérgica
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria
DA	Dermatite Atópica
Der p 10	Tropomiosina Recombinante do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*
EAACI	*European Academy of Allergy and Clinical Immunology*
FA	Faringite Alérgica
FAST	*Fluorimetric Radio Allerg Absorbent Test*
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GC	Grupo Controle
GE	Grupo de Estudo
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônia de Granulócitos e Monócitos
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-9	Interleucina 9
IL-12	Interleucina 12

IL-13	Interleucina 13
ISSAC	*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*
kDa	Kilodaltons
LB	Linfócito B
µg/mL	micrograma / mililitro
µL	microlitro
NaCl	Cloreto de Sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Per a 7	Tropomiosina Recombinante de barata *Periplaneta americana*
PNU/mL	Unidades Protéicas Nitrogenada/mililitro
RA	Rinite Alérgica
RAS	Rinite Alérgica Sazonal
RAP	Rinite Alérgica Perene
rLep s 1	Tropomiosina Recombinante de traça-de-livro *Lepisma saccharina*
RAST	*Radio Allergo Absorbent Test*
TGC	Traça Grupo Controle
TGE	Traça Grupo de Estudo
Th1	Linfócito T *helper* 1 – célula auxiliadora 1
Th2	Linfócito T *helper* 2 – célula auxiliadora 2
UA	Unidades Alergênicas
UB	Unidades Biológicas
UBE/mL	Unidades Biológicas Equivalentes/mililitro
UB/mL	Unidades Biológicas/mililitro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Pág.

Tabela 1 Critério de Inclusão dos Pacientes no Estudo..... 32

Tabela 2 Porcentagem de Sensibilidade dos Pacientes do GE em relação aos Extratos Testados..... 42

Tabela 3 Positividade (%) das Diluições do Extrato de Traça-de-Livro *L. saccharina* e os Grupos Estudo e Controle..... 44

Tabela 4 Porcentagem de Sensibilidade dos Pacientes do TGC e TGE em relação aos Extratos Testados..... 48

Pág.

Figura 1 Exemplar de traça *Lepisma saccharina*..... 25

		Pág.
Gráfico 1	Distribuição por Sexo.....	40
Gráfico 2	Distribuição por Idade.....	41
Gráfico 3	Positividade do Teste de Puntura em Pacientes Atópicos.....	43
Gráfico 4	Distribuição de Testes Positivos para Extratos de Traça *Lepisma saccharina*.....	44
Gráfico 5	Área da Pápula no Teste de Puntura de Pacientes Atópicos ao Extrato de Traça.....	45
Gráfico 6	Curva Média de Correlação de Valores de Teste de Puntura a Extrato de Traça-de-Livro em Diferentes Concentrações.....	46
Gráfico 7	Positividade do Teste de Puntura em Pacientes Atópicos.....	48

RESUMO

No Brasil, pacientes atópicos com rinite alérgica e/ou asma brônquica apresentam sensibilidade a aeroalérgenos, sobretudo ácaros. Outras potenciais fontes de alérgenos como a traça-de-livro ainda necessitam ser confirmadas como alergênicas e relacionadas a doenças alérgicas respiratórias.

O objetivo do estudo foi avaliar a sensibilidade imediata de pacientes atópicos através do teste cutâneo de puntura, a extrato padronizado em Unidades Biológicas de corpo inteiro da traça-de-livro *Lepisma saccharina*.

A padronização do extrato bruto de corpo inteiro de *L. saccharina* em Unidades Biológicas (UB) foi realizada através da regressão linear dos dados do teste de puntura obtidos em pacientes atópicos e voluntários sadios. O teste cutâneo foi realizado com extratos comerciais de ácaros, epitélios de cão e gato, baratas, poeira domiciliar e os extratos-testes de *L. saccharina* nas concentrações de 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL. Após a padronização do extrato da traça, foram realizados novos testes de puntura em novos voluntários para se avaliar a sensibilidade imediata ao extrato na concentração de 100 UB/mL.

Na fase de padronização do extrato, participaram 32 atópicos e 11 indivíduos sadios. O tamanho da pápula encontrado equivalente à histamina foi de 29.336 PNU/mL. Na segunda fase, participaram 21 atópicos e 16 voluntários sadios. Houve ainda uma significativa maior positividade aos extratos de *D. pteronyssinus*, *B. tropicalis* e *Tyrophagus putrescentiae* e poeira intradomiciliar no grupo de atópicos que no grupo controle. Encontramos sensibilidade ao extrato padronizado da traça *L. saccharina* (100 UB/mL) de 14,3% no grupo de paciente atópicos e 8,1% de prevalência global.

A sensibilidade ao extrato padronizado de *L. saccharina* em UB foi considerada leve nos grupo de estudo.

ABSTRACT

In Brazil, allergic patients with allergic rhinitis and/or asthma present sensibility for several aeroallergens mainly from house dust mites. Other potential sources of allergens like silverfish remain to be investigated as really allergenic and firmly related to respiratory allergic diseases.

The aim of this study was investigate by skin prick test the immediate sensitivity to a biological unit-standardized extract of silverfish *Lepisma saccharina* in allergic patients.

The standardization of the crude extract of *L. saccharina* whole bodies by biological units (BU) was performed with linear regression of skin prick test data from allergic patients and healthy volunteers. Skin prick tests were performed using commercial extracts of mites, cat and dog dander, cockroaches, house dust and the crude-extracts of *L. saccharina* at 5.000, 10.000 and 25.000 PNU/mL. After standardization, the silverfish extract at 100 BU/mL was prick-tested to evaluate silverfish sensitivity in allergic patients.

Thirty-two allergic patients and 11 healthy volunteers were enrolled in silverfish extract standardization test. The histamine equivalent papule area of silverfish extract was calculated at the concentration of 29.336 PNU/mL. To investigate the sensitivity of silverfish standardized extract another 21 allergic patients and 16 healthy volunteers were studied. There were significant higher skin test positive results for *D. pteronyssinus*, *B. tropicalis, Tyrophagus putrescentiae* and house dust extracts in allergic patients than controls. The sensitivity of silverfish *L. saccharina* (100 BU/mL) standardized extract was 14.3% in allergic patients with 8.1% of general prevalence.

The sensibility to standardized extract of silverfish in BU was considerate light in allergic patients.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Alergia respiratória

As manifestações alérgicas são consideradas hoje comuns e afetam de 25 a 30% da população em geral, e 10% das populações infantis, sendo a rinite alérgica (RA), a asma brônquica (AB) e a dermatite atópica (DA), as entidades nosológicas mais características de atopia. Acredita-se ainda que de 10% a 40% da população mundial apresente quadro compatível com RA, atingindo mais de 15% nas crianças e adolescentes (BAUCHAU et al., 2005; GELFAND, 2004). A asma acometeria cerca de 3 a 7% da população brasileira em geral. É considerada a doença crônica mais freqüente do trato respiratório inferior, mesmo sendo subdiagnosticada.

Embora a RA ocorra freqüentemente, afetando adultos e crianças, muitas vezes permanece sem diagnóstico, podendo ser pelo paciente e/ou sem reconhecimento médico, resultando em inadequado controle dos sintomas (BAUCHAU et al., 2005). Muitos desses pacientes nunca consultaram um médico por seus problemas nasais, pois não apresentam sintomas graves suficientes para requererem atenção médica (PERONI et al., 2004). Os custos econômicos e sociais incorridos por esta doença são substanciais, contribuindo para desvalorizar as atividades diárias, qualidade do sono e a produtividade do paciente (BAUCHAU et al., 2005; GELFAND, 2004).

Como em outras desordens atópicas semelhantes à asma, eczema e alergia alimentar, a RA é parte de uma complexa doença sistêmica. Poucos minutos após a exposição ao alérgeno, mastócitos sensibilizados liberam mediadores que resultam nos sintomas da fase precoce, assim como o recrutamento de células inflamatórias adicionais, causando sintomas da fase tardia e mantendo o processo da doença (GELFAND, 2004).

Os mais freqüentes sintomas da RA são espirros, nariz bloqueado ou escorrendo, coceira e/ou congestão nasal, mesmo o paciente não apresentando gripe ou tendo contato com o frio (PERONI et al., 2003; BOUSQUET et al., 2001).

Existe uma classificação para tipos de RA, de acordo com as condições e a época do ano em que ocorrem os sintomas. Os tipos clássicos são rinite alérgica sazonal (RAS), também conhecida por “hay fever”, e rinite alérgica perene (RAP). A RAS foi

associada com sensibilização a alérgenos externos, tais como pólens, fungos e geralmente ocorre durante a estação polínica. A RAP foi associada com alérgenos comunente encontrados na poeira domiciliar, como ácaros, fungos, baratas, epitélio de animais e pode ocorrer nas diferentes estações do ano (BAUCHAU et al., 2005).

O grupo ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impacto in Asthma*) juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem revisado a classificação para a RA, incluindo a freqüência e a duração dos sintomas. Rinite alérgica intermitente é definida com apresentação de sintomas por menos de 4 dias/semana ou menos de 4 semanas consecutivas, enquanto RA persistente foi determinada como os sintomas ocorrendo por mais de 4 dias/semana e mais de 4 semanas consecutivas (BOUSQUET et al., 2001).

Estudos recentes investigaram a prevalência e os fatores de risco para a rinite, espirros, congestão nasal em uma população de crianças pré-escolares e verificaram a relação com asma, sintomas de sibilos e dermatite atópica. Encontraram que crianças que apresentam congestão nasal e espirros em um período de 12 meses comparados com crianças sem sintomas tendem a um aumento significante de asma, duração dos sibilos e dermatite atópica e também mostraram que crianças com sintomas de RA apresentaram uma freqüência maior de sensibilização aos alérgenos testados em teste de puntura, quando comparados a crianças que não apresentam sintomas (PERONI et al., 2003).

Existe uma grande relação entre RA e asma alérgica. Os mecanismos pelos quais a rinite alérgica pode ser um fator de risco para a asma tem sido revisado em estudos recentes (BOUSQUET et al, 2003; KOH & KIM, 2003; TOGIAS, 2003; FUHLBRIGGE et al., 2003; BOULAY et al., 2003; BRAUNSTAHL & HELLINGS, 2003). De fato, as duas condições são manifestações de uma síndrome em duas regiões do trato respiratório, conduzindo a uma "síndrome respiratória alérgica crônica". Mais de 80% das pessoas com asma alérgica têm RA, esta sendo um fator de risco para o desenvolvimento da asma. As duas condições também compartilham uma comum imunopatologia e patofisiologia, processo imunológico similar, com participação de linfócitos T_H2, mastócitos e eosinófilos (TOGIAS, 2003, BOUSQUET et al., 2001; SIMONS, 1999; VIGNOLA et al., 1998).

De acordo com o 'III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma' (2002), a AB foi responsável por mais de 350.000 internações em hospitais brasileiros somente no ano de 1996, ocorrendo cerca de 2.000 óbitos ao ano, em decorrências de complicações da asma.

Na cidade de São Paulo, segundo dados obtidos através da aplicação do questionário ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*), a prevalência de asma, diagnosticada por médicos, em crianças de 6 a 7 anos foi de 6.1% e de 13 a 14 anos de 10% (SOLÉ et al., 1999).

No entanto, a distribuição dos casos de doenças alérgicas não é uniforme, uma vez que em países não industrializados ela é significativamente menor (ISAAC, 1998). Esta diferença também foi observada em populações de mesma etnia submetidas a distintas condições de vida urbana. (VON MUTIUS et al., 1994; KLEIN et al., 1992).

Existem evidências de que o estado alérgico é decorrente da interação de fatores genéticos e ambientais nos primeiros anos de vida (ARRUDA et al., 2005; PERONI et al, 2003; HANSON et al, 1991). Para esclarecimento dos fatos, as pesquisas foram direcionadas para fatores ambientais não específicos e mudanças ocorridas no estilo de vida nos países industrializados nas últimas quatro décadas.

A maior parte dessas manifestações alérgicas é desencadeada pela poeira domiciliares e componentes dessa, destacando-se os ácaros que responderiam por 80 a 90% dos alérgenos inaláveis (SPORIK & PLATTS-MILLS, 1992). Outros agentes como insetos (sobretudo baratas), epitélios de animais como cães e gatos, além de fungos e pólens também são comumente responsabilizados pelo desencadeamento de sensibilidade em indivíduos atópicos. No entanto, outros insetos também encontrados em amostras de poeira coletadas de domicílios como traças e moscas domésticas já demonstraram serem potencialmente capazes de desencadear a sensibilização de indivíduos susceptíveis (BARLETTA et al., 2002; WITTEMANN et al., 1995).

As explicações imunológicas para a 'Teoria da Higiene' influenciaram as estratégias para impedir ou reverter o processo das doenças alérgicas. Estudos sugerem que mudanças nas infecções ambientais e nos padrões a exposição mibrobiana em crianças

causadas pela urbanização, são fatores críticos para a crescente gravidade e prevalência de desordens atópicas (MARTINEZ, 2001).

A atopia, maior fator de risco para desenvolvimento de asma (PEAT et al, 1999), caracteriza-se pela produção contínua exuberante de anticorpos da classe IgE específicos para antígenos comuns do meio ambiente e inócuos para pessoas normais (ABBAS, 2003; ROITT, 1999).

Em poucos minutos após o contato com o alérgeno, mastócitos sensibilizados por IgE sofrem degranulação e liberam uma série de mediadores pré-formados e mediadores lipídicos produzidos sob ativação (GELFAND, 2004; ABBAS, 2003; ROITT, 1999). Muitos desses mediadores conduzem aos sintomas característicos da RA, incluindo espirros, coceira e congestão nasal. Na fase inicial da resposta, os mediadores pré-formados liberados são leucotrienos, prostaglandinas, histamina e citocinas, sendo que a histamina é o mais importante mediador da fase inicial, se ligando ao receptor H_1 (Gelfand, 2004; ABBAS, 2003; TOGIAS, 2000; ROITT, 1999).

Na fase tardia da resposta da RA, a congestão nasal é mais proeminente. Como um resultado de citocinas ou da liberação de mediadores, a mucosa nasal começa a ser infiltrada por células inflamatórias, como basófilos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células mononucleares (GELFAND, 2004; ABBAS, 2003). Estes mastócitos, além de representar um importante papel na fase inicial, podem ser chave sustentável para a fase crônica da doença. Uma possibilidade seria que os mediadores lipídicos derivados de mastócitos e a histamina poderiam ser importantes no recrutamento de linfócitos T_H2 para os órgãos alvos.

1.2- Sensibilização imediata a aeroalérgenos de insetos

Estudos recentes reconhecem que insetos e materiais derivados de insetos apresentam fatores de risco para a sensibilização e subsequentes rinite alérgica e asma brônquica (BARLETTA et al., 2002; WITTEMAN et al., 1995). Essa sensibilização pode ser decorrente de exposição natural, domiciliar ou ocupacional.

Pelo menos 12 diferentes ordens de insetos têm sido consideradas como promotoras de alergia respiratória em humanos (BALDO & PANZINI, 1988), ainda assim, poucas informações são conhecidas quanto à distribuição e incidência de alergia a insetos, o tipo de alergia encontrada e possível reação-cruzada entre alérgenos de insetos e a natureza desses alérgenos. Esses insetos representam por volta de 80% de todo o reino animal, uma vez que mais de um milhão de espécies são conhecidas e este número aumenta dia a dia com o progresso da pesquisa entomológica (BARLETTA et al., 2005).

Têm sido relatado que soros com anticorpos da classe IgE que reagem com insetos também contém anticorpos IgE que reagem com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*. Uma possível explicação é a co-sensibilização, visto que a exposição a insetos está associada a ácaros da poeira domiciliar. Ou uma explicação alternativa é a reação cruzada entre insetos e *Dermatophagoides pteronyssinus*, devido a tropomiosina, por exemplo, proteína do corpo considerada como o maior alérgeno de camarão e insetos (LEHRE et al., 2002; WITTEMAN et al., 1995; SANTOS et al., 1999).

Durante as últimas décadas, alérgenos derivados de insetos foram investigados a fim de se conhecer seu potente papel na indução da resposta imune da imunoglobulina E (IgE) (SANTOS et al., 1999; KANG et al., 1990; BALDO & PANZINI, 1988). Nesses estudos, uma variedade de insetos foi identificada como possíveis causadores de alergia, entre eles, mariposa, baratas, etc. Destes, a traça-de-livro (*Silverfish*), um inseto da Ordem Thysanura, apresenta particular interesse (AALBERSE, 2000; WITTEMAN et al., 1996; WITTEMAN et al., 1995; BALDO & PANZINI, 1988). Já foi demonstrado que em amostras de poeira domiciliar existe um elevado número de traças (WITTEMAN et al., 1996).

Em estudos anteriores, BARLETTA et al. (2002), prepararam e caracterizaram o extrato de corpo inteiro de traça-de-livro *L. saccharina* e investigaram a reatividade da IgE de seus componentes. Essa avaliação indicou que 21% dos soros dos pacientes reconheceram um componente de peso molecular de 31-35 kDa, presente somente na fração insolúvel (precipitado) do extrato, sugerindo que estas proteínas poderiam ser tropomiosinas do corpo da traça, a qual poderia ser perdida na solução aquosa (sobrenadante) do extrato.

Tropomiosinas são proteínas que tem função na contração muscular em células musculares e participam na regulação da morfologia e motilidade de células não-musculares em vertebrados (REESE et al., 1999). Em invertebrados, as tropomiosinas tem sido reconhecidas como uma importante causa de respostas de anticorpos IgE. O mais interessante, é que a tropomiosina também está presente em alérgenos bem conhecidos, como por exemplo, nos crustáceos, camarão, lagosta e caranguejo, em moluscos, como ostras, e em ácaros da poeira domiciliar, mostrando alta reação-cruzada entre ostras e artrópodes, sendo considerada, então, um pan-alérgeno nos invertebrados (KYOUNG et al., 2004; LEHRER et al., 2003; REESE et al., 1999). A tropomiosina também tem sido identificada como o maior alérgeno de barata para *Periplaneta americana* (Per a 7) entre pacientes com asma e/ou rinite alérgica. Estudos subseqüentes identificaram uma idêntica homologia entre tropomiosina de alérgenos de baratas com outros invertebrados, particularmente ácaros e camarão (80% e 82% de identidade, respectivamente) (SANTOS et al. 1999). Mais recentemente, tropomiosina de *Blatella germanica* foi identificada e a análise seqüencial revelou que a proteína apresenta 97% de identidade a tropomiosina de *P. americana* (JEONG et al., 2003).

A fim de se investigar esse importante aspecto, BARLETTA et al., (2005), desenvolveram uma tropomiosina recombinante de traça *L. saccharina* (rLep s 1) e perceberam uma homologia de 75% com tropomiosina recombinante de *P. americana* (Per a 7), 89% de homologia com tropomiosina recombinante de *D. pteronyssinus* (Der p 10) e 99% de homologia com tropomiosina natural de camarão, sugerindo reação-cruzada de epítopos de IgE por tropomiosinas de diferentes origens. Muitos estudos sobre ligação a epítopos de IgE fornecem forte evidência molecular para reação-cruzada entre tropomiosinas de invertebrados, porém, ainda não está claro se esta reação-cruzada alergênica entre ácaros, baratas e alimentos é clinicamente relevante (AYUSO et al., 2002). Além disso, muitos estudos indicam que a exposição e sensibilização a um particular antígeno de alimento podem causar sensibilização a certos aeroalérgenos e vice-versa (VAN REE et al., 1996). Estudos realizados entre ortodoxos judeus, os quais são proibidos de ingerir ostras, encontraram reatividade de anticorpo IgE ao camarão, indicando que esta reatividade parece ser devido a reação-cruzada pela tropomiosina (FERNANDEZ et al., 2003).

Outros estudos também identificaram reação-cruzada de IgE de insetos e parasitas, sugerindo ser por tropomiosina. ARRUDA (2005), recentemente determinou a seqüência completa de tropomiosina de *Ascaris lumbricoides* e demonstrou que é uma proteína de ligação de IgE e que apresenta grande identidade a tropomiosinas de ácaros, baratas, camarão e outros parasitas como *A. simplex* e *Onchocerca volvulus* (69-98%). Estes estudos sugerem que infecções por helmintos podem ter um papel preditivo no desenvolvimento de alergia e asma, entretanto, ainda não se estabeleceu certamente a relação causal entre infecção por helminto e alergia. Alternativamente acredita-se que a predisposição alérgica pode proteger o indivíduo contra infecção por helmintos (ARRUDA & SANTOS, 2005).

Muitos debates incluindo idade da primeira infecção parasitária, tipo de parasita, condições sócio-econômicas, estilo de vida e exposição a alérgenos ambientais, podem representar um papel importante na relação entre infecções parasitárias e o desenvolvimento de doenças alérgicas (ARRUDA, 2005).

Apesar desses conhecimentos, alérgenos da traça não estão caracterizados e purificados e não existe um extrato de traça comercial para diagnóstico de doenças alérgicas (BARLETTA et al., 2002).

1.3- Características da traça-de-livro *Lepisma saccharina*

A traça-de-livro *Lepisma saccharina* (*Silverfish*) é um inseto que pertence ao Filo Artropoda, Classe Insecta, Ordem Thysanura, da Família Lepismatidae. Estes insetos estão entre os insetos mais comuns que vivem em casas e prédios, sendo considerados pestes urbanas **[Figura 1]**.

Figura 1- Exemplar de traça *Lepisma saccharina*.

As traças apresentam o corpo plano e alongado, de 3 a 12 mm de comprimento quando adultos. Apresentam antenas longas e finas na cabeça e possuem três longos apêndices semelhantes a caudas. Apresentam ainda um brilho metálico que se deve às escamas prateadas que surgem após a 3ª muda do exoesqueleto. Em geral, as traças evitam a luz, preferindo lugares escuros e tranqüilos. Escondem-se durante o dia e quando os objetos onde estão escondidos são removidos, correm e procuram um novo esconderijo. Movimentam-se rapidamente e param por pequenos intervalos, movendo-se novamente. Preferem uma elevada temperatura ambiente e alta umidade relativa do ar.

Alimentam-se de uma grande variedade de alimentos, incluindo substâncias presentes em papel de parede, livros, papéis, roupas, amido, farinha de trigo, cereal e insetos mortos. Usualmente são encontrados em frestas de banheira, pia e lavatório (RANDALL, 1998; VAIL et al., 1997; ROBINSON, 1996). Acredita-se que possam viver sem alimentação por alguns meses.

Devido à sua natureza noturna, sua reprodução só foi estudada recentemente. O macho e a fêmea correm excitadamente durante todo o processo, que consiste na deposição de um espermatóforo no chão e logo em seguida a fêmea recolhe a cápsula fertilizante (RANDALL, 1998; VAIL et al., 1997; ROBINSON, 1996).

Os ovos são postos em estreitas fendas e objetos. Apresentam forma elíptica por volta de 1mm de comprimento. Na postula, os ovos são brancos e moles, tornando-se amarelos e eventualmente marrons após algumas horas. A fêmea da traça pode postar mais de 100 ovos durante sua vida. Os ovos são postos unicamente ou em pequenos grupos, e são chocados em temperaturas que variam de 22 ºC a 32 ºC. A esta temperatura, o período médio de incubação é de 43 dias (RANDALL, 1998; VAIL et al., 1997; ROBINSON, 1996).

Quanto ao seu desenvolvimento, a primeira muda da ninfa ocorre entre 7 a 10 dias após o nascimento, e cada subseqüente estágio entre as mudas ocorre entre 2 a 3 semanas de desenvolvimento. As ninfas sofrem 6 ou 7 mudas e ganham maturidade no 3º mês de vida.

Dependendo de sua condição de vida, as traças demoram de 4 meses a 3 anos para atingirem o estágio adulto. À temperatura ambiente, atingem o seu pleno desenvolvimento após 1 ano de vida. São de vida longa, podendo viver de 2 a 8 anos e são capazes de se reproduzirem após 3,5 anos de vida em temperatura ideal de 22 ºC. Uma traça que vive todo esse período pode sofrer aproximadamente 8 mudas, apesar de isto poder acontecer até 4 vezes ao ano, já que crescem continuamente (RANDALL, 1998; VAIL et al., 1997; ROBINSON, 1996).

Espécies conhecidas são *Lepisma saccharina* (Silverfish), *Ctenolepisma longicuadata* (Gray Silverfish), *Ctenolepisma quadriseriata* (Four-Lined Silverfish) e *Thermobia domestica* (Firebrat).

Particular interesse se deve a esses insetos, em especial *L. saccharina*, devido a sua grande prevalência em amostras de poeira domiciliar, ocorrendo em cerca de 80% das amostras de poeira domiciliares pesquisadas na Holanda (WITTEMAN et al., 1995).

1.4- Diagnóstico de sensibilidade imediata

Quanto ao diagnóstico de atopia e sensibilização a aeroalérgenos, essa pode ser confirmada através de testes de sensibilidade imediata e que são realizados, sobretudo através de testes cutâneos de puntura ("*skin prick test*"), pois são considerados mais sensíveis e menos dispendiosos que os testes *in vitro* de dosagem de anticorpos específicos da classe IgE e que são geralmente dosados através de teste imunofluorimétrico ('FAST' ou mais popularmente conhecido 'RAST').

Os testes cutâneos são realizados com extratos biológicos de ácaros, pólens, fungos, epitélios de animais, etc. A maioria desses extratos, no entanto, ainda não se encontra devidamente padronizada em unidades biológicas (U.B.) ou mesmo alergênicas (U.A.) que são os dois modelos de padronização de extratos atualmente mundialmente aceitos. Optamos por utilizar a U.B. por ser essa unidade, empregada na maioria dos países (incluindo o Brasil) e por empregar o teste cutâneo de puntura e o cloridrato de histamina na sua padronização.

Além disso, deve-se salientar que parte desses agentes alergênicos - como a traça, são de difícil criação em escala industrial ou mesmo experimental, havendo poucos estudos sobre seu potencial alergênico, inclusive no Brasil.

Soma-se a isso a inexistência de testes *in vitro* (RAST) para esses mesmos agentes, o que impossibilita o diagnóstico preciso em pacientes atópicos sensíveis a seus alérgenos.

Além da utilização em testes de diagnóstico, os diferentes extratos - sobretudo de ácaros da poeira domiciliar, têm sido utilizados através de imunoterapia específica no tratamento dessensibilizante de pacientes alérgicos sensíveis. Os extratos específicos demonstrariam diferença significativa na melhora dos sintomas alérgicos e na diminuição de níveis séricos de anticorpos IgE quando comparados com extratos 'crude' de poeira domiciliar e que poderiam conter conjungados num mesmo extrato, alérgenos de diferentes fontes também presentes na poeira como pólens, fungos, mamíferos, roedores, insetos, etc.

A padronização de um modelo biológico dos extratos alergênicos tem como objetivo estabelecer uma unidade indicativa de uma similar atividade alergênica para todas as espécies. Entretanto, a sensibilidade individual em pacientes com alergia clínica para o alérgeno em questão difere consideravelmente (DREBORG et al., 1987).

A substância de referência para a padronização de extratos é o cloridrato de histamina, a qual deveria ser usada em paralelo com os alérgenos nos testes de puntura a fim de se ajustar às diferenças na técnica do teste de puntura, para se comparar os resultados entre os investigadores ou ser usada para analisar a mudança da sensibilidade dos pacientes em diferentes tempos pelo mesmo investigador (DREBORG et al., 1987).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo avaliar a alergenicidade de pacientes atópicos com alergia respiratória a extrato bruto de corpo inteiro da traça-de-livro *Lepisma saccharina* e tentar a sua padronização em Unidades Biológicas, utilizando a reação cutânea ao cloridrato de histamina e soro fisiológico, como referências.

2.2- Objetivos Específicos

- ✓ desenvolver um processo de extração de proteínas de extrato da traça-de-livro *L. saccharina* de qualidade satisfatória;
- ✓ padronizar o extrato de traça-de-livro *L. saccharina* em Unidades Biológicas (UB);
- ✓ avaliar a alergenicidade de pacientes atópicos ao extrato bruto de corpo inteiro de traça-de-livro *L. saccharina* padronizado em U.B.

3- CASUÍSTICA

3.1- Desenho do Estudo

Caracteriza-se por ser um estudo aberto, não-randomizado, com um único extrato-teste o qual foi testado em um dois períodos. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

3.2- População de estudo

Dois grupos de sujeitos foram incluídos na primeira fase do estudo, a qual objetivou a padronização do extrato bruto de corpo inteiro de traça-de-livro *Lepisma saccharina*. Para isso, 32 pacientes apresentando sensibilidade alérgica (grupo de estudo) e 11 voluntários sadios sem história de atopia (grupo controle), de ambos os sexos e com idade igual ou superior a 02 anos, sem restrições de raça. Os voluntários foram recrutados entre aqueles que se apresentaram ao Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, não havendo, portanto, randomização para a escolha dos mesmos (Tabela 1).

Novos voluntários foram recrutados para a segunda fase do estudo, que consistiu da avaliação imediata ao extrato de traça-de-livro *L. saccharina* padronizado em UB através do teste de puntura. Para isso foram recrutados voluntários que se apresentaram junto ao Ambulatório de Alergia do Hospital da Universidade São Francisco em Bragança Paulista - USF.

Consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os pacientes (Anexo 1). No caso de menores de 21 anos, o responsável legal pelo voluntário autorizou a sua inclusão no estudo e assinou o Termo de Consentimento conjuntamente.

Tabela 1- Critério de inclusão dos pacientes no estudo

Critério de Inclusão dos pacientes
1- Histórico de rinite e/ou asma brônquica.
2- Diâmetro médio > 3 mm usando histamina HCL 10 mg/mL.
3- Mais de 2 anos de idade.
4- Não tratamento com anti-alérgicos por 14 dias antecedentes ao teste.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Estudo com o Teste de Puntura

Os testes de puntura são procedimentos bem estabelecidos na literatura médica especializada e foram realizados de acordo com as normas do Sub-Comitê de Testes Cutâneos da Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica - EAACI (DREBORG, 1989). Após anti-sepsia com solução alcoólica a 70%, colocou-se na face volar de cada antebraço dos voluntários uma gota (volume médio estimado de 50 μL) de cada extrato a ser testado, eqüidistante três centímetros entre si. Com o auxílio de puntores de plástico descartáveis (Alko®, Rio de Janeiro), posicionada a um ângulo de 90 graus, fez-se uma escarificação (‘arranhão’) sob a gota do extrato na epiderme, por aproximadamente cinco segundos. Um minuto após a introdução do extrato na pele, o líquido excedente foi retirado com papel absorvente. O tempo total de leitura do teste foi de 15 minutos após a aplicação dos extratos, medindo-se os diâmetros das pápulas com régua específica. Os testes foram realizados pelo mesmo profissional qualificado e foram considerados positivos somente em pacientes que apresentaram sensibilidade ao alérgeno, formando uma pápula maior ou igual a 3,0 mm de diâmetro (DREBORG, 1989).

Cada um dos extratos foi aplicado uma única vez, excetuando-se os extratos da traça, testados em duplicata. Calculou-se então a média aritmética entre as medidas do maior diâmetro e seu respectivo ortogonal para a interpretação dos resultados. A partir da média aritmética dos diâmetros, calculou-se a área estimada da pápula, sendo essa medida utilizada nos cálculos estatísticos (DREBORG, 1989).

O teste de puntura consistiu da exposição dos voluntários a extratos padronizados em Unidades Biológicas (UB/mL) ou Unidades Protéicas Nitrogenadas (PNU/mL) e disponíveis no mercado (IPI-ASAC® do Brasil S/A). Todos os extratos permaneceram estocados a uma temperatura a 4ºC e mantidos à temperatura ambiente quando da realização dos testes.

4.2- Extratos

Todos os pacientes foram testados para os seguintes extratos comerciais:

- **Ácaros:** *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* (UBE/mL) e *Tyrophagus putrescenciae* (PNU/mL);
- **Epitélios:** cão *(Canis familiaris*) e gato (*Felis catus*) (PNU/mL);
- **Baratas:** *Blatella germanica* e *Periplaneta* americana (PNU/mL);
- **Poeira domiciliar** (PNU/mL);
- **Extratos-testes:** traça-de-livro (*Lepisma saccharina*) a 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL.

Portanto, apenas os extratos dos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* estavam padronizados em UBE/mL.

Para 'controle positivo' utilizou-se cloridrato de histamina (10 mg/mL) e como 'controle negativo' foi utilizado soro fisiológico 0,9%, fenicado a 0,4%. Todos os resultados foram documentados no prontuário de cada paciente.

Para a realização do teste foi necessário que cada voluntário não estivesse em uso de anti-histamínicos ou outros medicamentos capazes de modificar a resposta ao teste (antidepressivos tricíclicos, corticóides sistêmicos, etc) nos 14 dias que antecederam o procedimento.

4.3- Preparação do extrato de *Lepisma saccharina*

Para a preparação do extrato bruto, cerca de 50 exemplares de traças-de-livros (*L. saccharina*) foram coletadas, uma a uma, em diferentes casas da cidade de Campinas/SP, Brasil. Os insetos foram congelados e estocados a –80ºC até o preparo do extrato bruto, preparado de acordo com técnica previamente descrita para preparo de

extratos alergênicos (OLIVEIRA LIMA, 1992). Brevemente, as traças foram maceradas e desengorduradas exaustivamente utilizando-se acetona. Foram então restituídas em solução de Coca, esta sendo utilizada também como solução extratora (solução aquosa com NaCl 0,5%, NaHCO3 0,275% e fenol 0,4%) e centrifugadas a 3.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi então passado através de filtro de 45 µm de porosidade e mantido a 4ºC até a sua utilização.

Para o cálculo da concentração em PNU/mL, foi realizada primeiramente a dosagem de proteínas totais em triplicata, utilizando-se o método de Bradford em espectrofotômetro (Beckman DU® Series 500) comparando-se a dosagem encontrada, com amostra de albumina bovina em concentração padronizada (BRADFORD, 1976). Após o cálculo em µg/mL, estimou-se a concentração em PNU/mL utilizando-se a estimativa de 62ng de proteína para cada unidade em PNU (Dirksen et al.,1985). O extrato bruto foi então adequado a 25.000 PNU/mL (solução-mãe) através de diluição em glicerina, sendo diluídos em 10.000 e 5.000 PNU/mL pela diluição em proporções adequadas de solução de Coca.

4.4- Padronização do Extrato de Traça em Unidades Biológicas (UB)

O cálculo da concentração em PNU/mL equivalente àquela do cloridrato de histamina foi então realizado utilizando-se de método estatístico adequado (ver item 4.5) e a concentração obtida foi considerada o equivalente a 1.000 UB/mL (DREBORG et al., 1987).

4.5- Análise Estatística

Para a análise descritiva dos dados foram realizados cálculos de médias, desvios padrão e erro padrão. Para se verificar associação entre os grupos ou comparar proporções, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando necessário. Para se obter a comparação de medidas contínuas ou ordenáveis entre os dois grupos, foi utilizada o teste de Mann-Whitney. Para a avaliação dos diâmetros das pápulas nas diferentes concentrações do extrato de traça foi utilizados o Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA) e o Teste de Comparação Múltipla de Dunn.

Na padronização do extrato da traça-de-livro *L. saccharina* foi utilizado a análise de regressão linear e da equação:

$$\log (P) = a + b*\log (PNU)$$

Onde, P= área da pápula formada; PNU/mL: concentração do extrato em Unidades Protéicas Nitrogenadas/mL.

Os dados foram analisados pelo Departamento de Estatística da FCM da UNICAMP, utilizando o programa *SAS®* (*Statistical Analysis System*), sistema operacional baseado no programa *Windows® (Microsoft®)*, versão 8.2. O nível descritivo adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

4.6- Avaliação da Sensibilidade Imediata ao Extrato de Traça Padronizado em Unidades Biológicas

A avaliação da sensibilidade imediata ao extrato da traça de livro *L. saccharina* foi realizada em novos voluntários sadios e pacientes atópicos, através de teste de puntura e de acordo com os procedimentos já descritos anteriormente.

Utilizou-se o extrato de traça em concentração em PNU/mL equivalente a 100 UB (DREBORD et al., 1987).

Para a realização dessa avaliação, novos voluntários foram selecionados a partir do atendimento no ambulatório de alergia do Hospital da Universidade São Francisco em Bragança Paulista – USF ou disponibilidade no caso de voluntários sadios.

4.7- Locais de Desenvolvimento do Projeto

Na primeira fase do estudo, os testes de puntura foram realizados no ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

O extrato de traça-de-livro *L. saccharina* foi preparado no Laboratório e Biologia Molecular e Imunologia do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), UNICAMP.

O estudo da sensibilidade imediata ao extrato padronizado de *L. saccharina* através do teste de puntura foi realizado no ambulatório de Alergia do Hospital da Universidade São Francisco (USF) em Bragança Paulista.

5- RESULTADOS

Um total de 80 voluntários foi incluído no estudo, sendo que 43 participaram da padronização do extrato da traça-de-livro e 37 participaram da avaliação da sensibilidade imediata ao extrato padronizado em U.B. através do teste de puntura.

5.1- Padronização do Extrato de Traça *L. saccharina* em Unidades Biológicas

5.1.1- Comparação dos grupos em relação ao sexo e à idade

Foram inclusos neste estudo 43 indivíduos, onde 32 (74,4%) se enquadraram no grupo de pacientes com atopia, chamado como **grupo estudo (GE)**. Desse total, 15 pacientes (46,9%) eram do sexo feminino, enquanto 17 pacientes (53,1%) eram do sexo masculino. A idade desse grupo variou de 2 a 46 anos (16,8 ± 11, 5). O grupo de indivíduos sem histórico de atopia, chamado como **grupo controle (GC)** foi formado por 11 voluntários (25,6% do total), sendo 8 do sexo feminino (72,7%) e 3 do sexo masculino (27,3%). A idade desse grupo variou de 7 a 44 anos (23,5 ± 12, 3). Não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou a idade e o sexo dos pacientes em relação aos grupos investigados **[Gráficos 1 e 2]**.

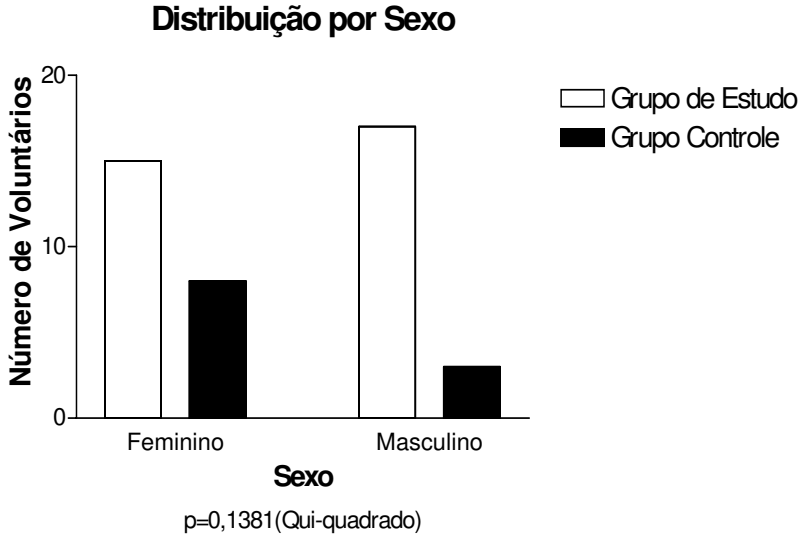


Gráfico 1- Gráfico em barras construído a partir de dados da distribuição do sexo dos pacientes quando se comparou os grupos controle (GC) e o grupo de estudo (GE) (p=0,1381, Teste de Qui-quadrado).

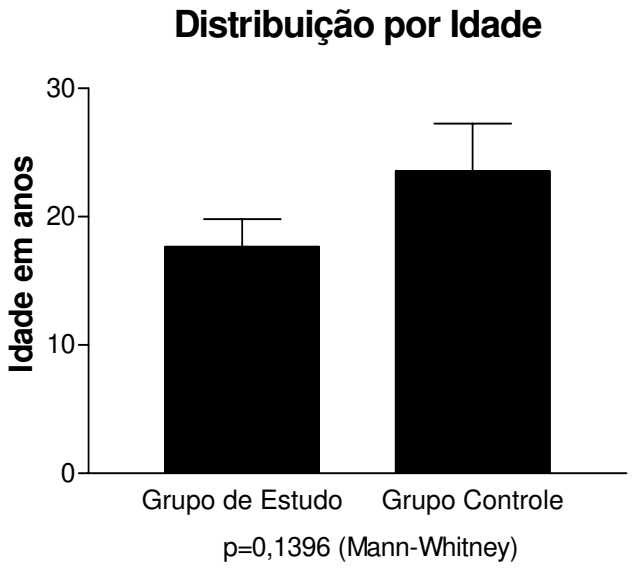


Gráfico 2- Gráfico em barras construído a partir de dados da distribuição da idade dos pacientes quando se comparou os grupos controle (GC) e o grupo de estudo (GE) (p=0,1396, Teste de Mann-Whitney).

5.1.2- Comparação dos grupos em relação às patologias atópicas e alérgenos testados

Todos os pacientes inclusos no GE (n=32, 100%) apresentaram rinite alérgica (RA) como sintoma de alergia, estando associada a quadro sugestivo de asma brônquica (AB) em 14 pacientes (43,8%). Um paciente apresentava história de RA e AB associadas a conjuntivite alérgica (CA), um outro paciente apresentou RA associada a CA, e em um terceiro paciente, a RA esteve associada à presença de faringite alérgica (FA) (n=1, 3,1% cada).

Embora sem história de atopia, uma voluntária sadia do GC apresentou positividade a vários extratos testados (*D. pteronyssinus*, *T. putrescentiae*, *B. germanica* e *P. americana*), sendo assim excluída da análise geral e estatística. Essa voluntária trabalha em laboratório de biologia em culturas de ácaros domiciliares, o que sugere sensibilização profissional.

Houve uma diferença estatisticamente significativa quando se estudou a sensibilidade imediata ao extrato de ácaro *D. pteronyssinus*, verificando um maior grau de positividade no GE se comparado ao GC (p<0,0001). O mesmo ocorreu quando se avaliou a sensibilidade aos extratos dos ácaros *B. tropicalis* e *T. putrescentiae*, bem como para o extrato de poeira intradomiciliar **[Tabela 2; Gráfico 3]**.

Também verificamos diferença estatisticamente significativa ao se comparar à positividade ao extrato de barata *Periplaneta americana* e os grupos controle e estudo (p<0,02; Teste Exato de Fisher).

Tabela 2- Porcentagem de Sensibilidade dos pacientes do GE em relação aos extratos testados.

N (%) de Sensibilidade no Teste Imediato de Puntura			
Extrato	**GC**	**GE**	**Valor de p ***
D. pteronyssinus	0 (0,0)	30 (93,8)	<0,0001
B. tropicalis	2 (18,2)	28 (87,5)	0,0002
T. putrescentiae	0 (0,0)	23 (71,9)	<0,0001
Poeira domiciliar	0 (0,0)	28 (87,5)	<0,0001
B. germanica	1 (9,1)	14 (43,8)	0,0679
P. americana	0 (0,0)	13 (40,6)	0,0182
Epitélio cão	0 (0,0)	3 (9,4)	1,00
Epitélio gato	0 (0,0)	6 (18,8)	0,3076

GE= grupo de estudo; GC= grupo controle; Teste Exato de Fisher.

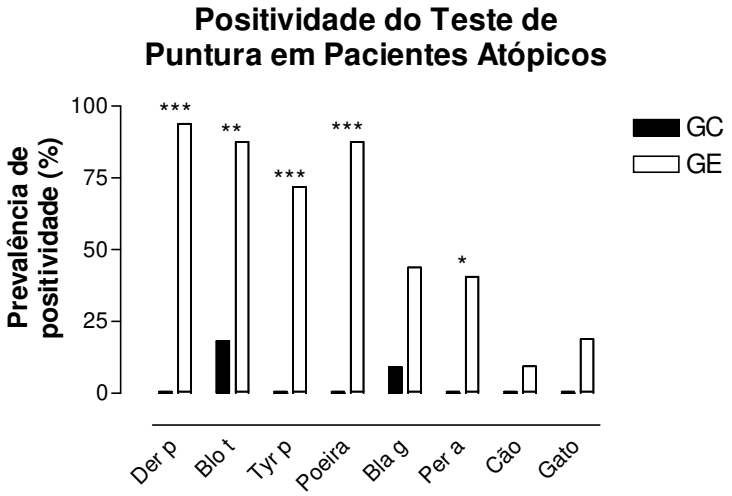
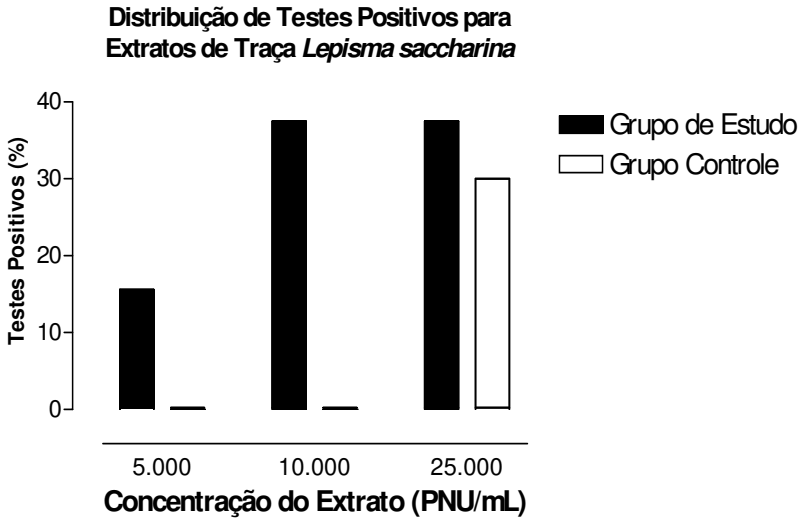


Gráfico 3- O gráfico de barras representa a comparação da porcentagem de positividade dos alérgenos testados com os grupos investigados. GE= grupo de estudo; GC= grupo controle; (* p<0,02; ** p=0,0002; *** p<0,0001; Teste Exato de Fisher).

5.1.3- Comparação dos grupos em relação ao extrato bruto de traça *L. saccharina*

A fim de se obter a padronização do extrato de traça-de-livro *L. saccharina*, utilizamos três diluições diferentes já anteriormente descritas: 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL. A avaliação da positividade ao extrato de traça de livro nas diferentes concentrações no GE demonstrou positividade em 5 indivíduos (15,6%) na concentração de 5.000 PNU/mL e em 12 voluntários (37,5%) tanto na concentração de 10.000 como na de 25.000 PNU/mL. Quanto ao GC, observou-se positividade em 3 voluntários apenas na concentração de 25.000 PNU/mL. Não houve positividade nas outras concentrações, nesse grupo **[Gráfico 4; Tabela 3]**. Houve, no entanto uma diferença significativa entre os grupos (p=0,04), apenas na concentração de 10.000 PNU/mL.



Teste Exato de Fisher

Gráfico 4- O gráfico em barras representa a prevalência de positividade (%) no teste de puntura para as três diluições testadas do extrato de traça *L. saccharina* em comparação aos grupos estudo e controle (p<0,05; Teste Exato de Fisher).

Tabela 3- Positividade (%) das diluições do extrato de traça-de-livro *L. saccharina* e os grupos estudo e controle

N (%) de pacientes com teste de puntura positivo ao extrato de L. saccharina			
Diluição (PNU/mL)	**GE**	**GC**	**Valor de p**
5.000	5 (15,6)	0 (0,0)	0,3149
10.000	12 (37,5)	0 (0,0)	0,04
25.000	12 (37,5)	3 (30,0)	1,00

GE = Grupo de Estudo; GC = Grupo Controle; p<0,05; Teste Exato de Fisher.

Pudemos observar um aumento progressivo do tamanho da área da pápula em relação às concentrações de 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL, sendo significativo quando comparados o tamanho com 5.000 e 10.000 PNU/mL e 5.000 e 25.000 PNU/mL no grupo

de estudo. Porém, quando comparamos as concentrações de 10.000 e 25.000 PNU/mL, não observamos diferença estatisticamente significativa **[Gráfico 5]**.

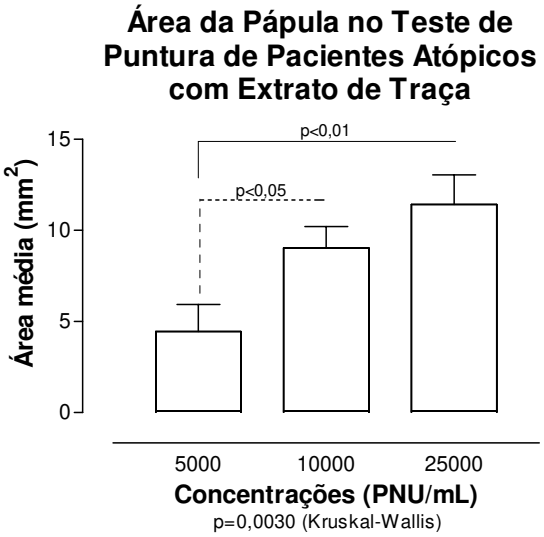


Gráfico 5- Área média da pápula (mm^2) formada em reação às concentrações de 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL no grupo de estudo (GE). Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Comparação Múltipla de Dunn.

5.1.4- Avaliação da sensibilidade ao extrato bruto da traça-de-livro *(L. saccharina*) em relação aos diferentes alérgenos testados

Dezesseis pacientes apresentaram resultado de *prick-test* positivo, quando comparamos a alergenicidade aos extratos de traça *L. saccharina* (padronizado em PNU/mL) e de ácaro *Blomia tropicalis*, resultando em uma diferença estatisticamente significativa (38,1%, p = 0,0415; Teste Qui-quadrado). O mesmo ocorreu ao se comparar à positividade entre os extratos de *L. saccharina* e do ácaro *T.* putrescentiae onde 13 pacientes apresentaram sensibilidade aos dois extratos (30,9%, p = 0,0490; Teste Qui-quadrado) e da barata *B. germanica*, onde 11 pacientes apresentaram sensibilidade aos dois extratos (26,2%, p = 0,0029; Teste Qui-quadrado).

5.1.5- Padronização do extrato bruto de traça *L. saccharina* em Unidades Biológicas

Para a padronização do extrato de *L. saccharina* em UB, observou-se que o tamanho da pápula durante o teste com os extratos de traça e correspondente, ou melhor, equivalente aquela do cloridrato de histamina foi de 29.336 PNU/mL, resultado esse representando 1.000 UB/mL.

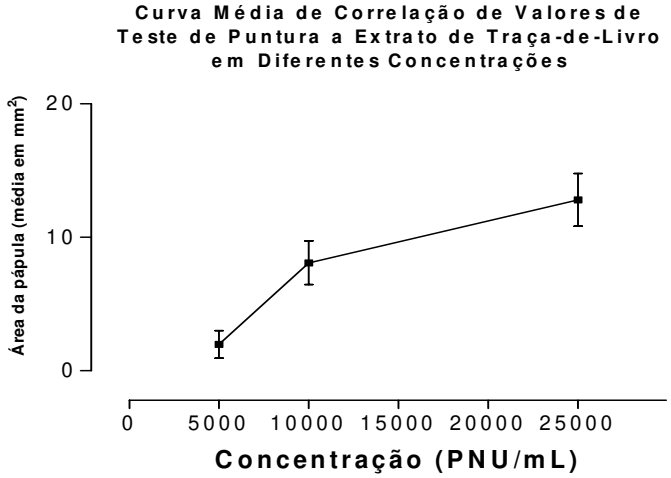


Gráfico 6- Curva média de correlação de valores de teste de puntura a extrato de traça-de-livro em diferentes concentrações.

5.2- Avaliação da Sensibilidade Imediata ao Extrato Padronizado de Traça *L. saccharina* através de Teste de Puntura

5.2.1- Comparação dos grupos em relação ao sexo e à idade

Foram inclusos nessa etapa do estudo 37 indivíduos, onde 21 (56,8%) se enquadraram no grupo de pacientes com atopia, chamado como **TRAÇA grupo estudo (TGE)**. Do TGE, 14 pacientes (66,7%) eram do sexo feminino, enquanto 7 pacientes (33,3%) eram do sexo masculino. A idade desse grupo variou de 6 a 46 anos (22,1 ± 10, 8). O grupo de indivíduos sem histórico de atopia, chamado como **TRAÇA grupo controle (TGC)** foi formado por 16 voluntários (25,6% do total), sendo 10 do sexo feminino (62,5%) e 6 do sexo masculino (37,5%). A idade desse grupo variou de 6 a 41 anos

(28,3 ± 9,2). Não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou a idade e o sexo dos pacientes em relação aos grupos investigados.

5.2.2- Comparação dos grupos em relação às patologias atópicas e alérgenos testados

Quanto aos pacientes inclusos no TGE (n=21, 100%), 20 (95,2%) apresentavam quadro de rinite alérgica (RA) como sintoma de alergia, estando associada a quadro sugestivo de asma brônquica (AB) em 4 (19,0%). Um paciente (4,8%) apresentava história de RA associada a quadro de estrófulo, um outro paciente apresentou RA associada à dermatite atópica, e em um terceiro paciente, a RA esteve associada à presença de dermatite de contato (n=1, 4,8% cada). Um único paciente sem rinite alérgica apresentava quadro cutâneo de estrófulo. Nenhum voluntário do TGC referiu doença clínica diagnosticada ou em tratamento.

Houve uma diferença estatisticamente significativa quando se estudou a sensibilidade imediata ao extrato de ácaro *D. pteronyssinus*, verificando um maior grau de positividade no TGE se comparado ao TGC ($p<0,0001$). O mesmo ocorreu quando se avaliou a sensibilidade aos extratos dos ácaros *B. tropicalis* (p=0,0023) e de poeira intradomiciliar (p=0,0002) **[Tabela 4; Gráfico 7]**.

A avaliação da sensibilidade ao extrato padronizado da traça *L. saccharina* (100 UB/mL) demonstrou sensibilidade de 14,3% no grupo de pacientes atópicos e 8,1% de prevalência global em ambos os grupos pesquisados.

5.2.3- Comparação dos alérgenos testados

A comparação entre os grupos dos resultados do teste de puntura do extrato de traça padronizada em 100 UB (2.933,6 PNU/mL) com outros extratos testados não demonstrou nenhuma associação estatisticamente significativa, ao contrário daquela observada quando do uso das diferentes concentrações (antes da padronização do extrato de traça em UB).

Tabela 4- Porcentagem de Sensibilidade dos pacientes do TGC e TGE em relação aos extratos testados.

N (%) de Sensibilidade no Teste Imediato de Puntura			
Extrato	**TGC**	**TGE**	**Valor de p**
D. pteronyssinus	2 (12,5)	15 (88,2)	<0,0001
B. tropicalis	3 (18,8)	11 (73,3)	0,0023
T. putrescentiae	2 (12,5)	6 (40,0)	NS
Poeira domiciliar	1 (6,3)	11 (73,3)	0,0002
B. germanica	2 (12,5)	4 (26,7)	NS
P. americana	2 (12,5)	3 (20,0)	NS
Epitélio cão	0 (0,0)	1 (6,7)	NS
Epitélio gato	0 (0,0)	2 (13,3)	NS
Traça L. saccharina 100 B/mL	0 (0,0)	3 (14,3)	NS

TGE= grupo de estudo para teste com extrato padronizado de traça; GC= grupo controle para teste com extrato padronizado de traça; NS= não significativos; **Teste de Fisher, p<0,0001*.

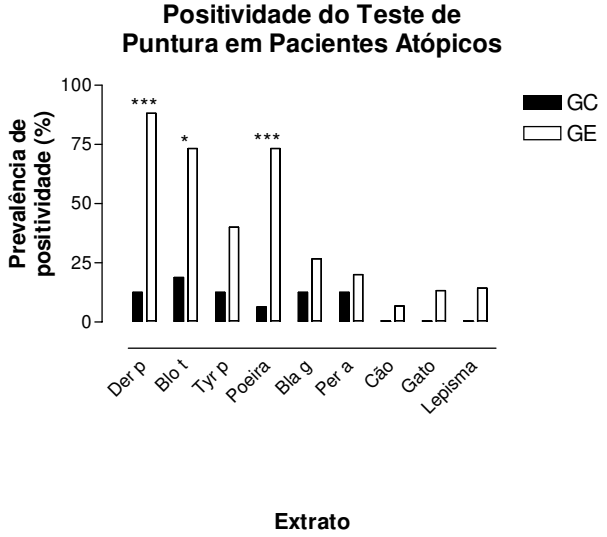


Gráfico 7- O gráfico de barras representa a comparação da porcentagem de positividade dos alérgenos testados com os grupos investigados. GE= grupo de estudo; GC= grupo controle; (*Teste Exato de Fisher: p<0,003; ***Teste Exato de Fisher: p<0,0003).

6- DISCUSSÃO

Neste estudo, nós avaliamos a sensibilidade imediata ao extrato bruto de traça-de-livro *Lepisma saccharina* por sensibilização ao teste de puntura (*prick test*) e a padronização desse extrato em Unidades Biológicas em comparação aos níveis de histamina encontrado nos pacientes.

Resultados da literatura sugerem que indivíduos que apresentam sensibilidade imediata a extratos de insetos (aproximadamente 30%) também apresentam sensibilidade a extratos de ácaros da poeira domiciliar (WITTEMAN et al., 1995). Por técnica de inibição por RAST, os autores encontraram reação-cruzada entre *silverfish* (*L. saccharina*), barata (*B. germanica*) e ácaros. BALDO & PANZINI (1988), selecionaram pacientes australianos com histórico de alergia respiratória e resultado de *prick test* positivo a pelo menos um dos extratos de insetos testados, encontrando apenas 6 (14,6%) pacientes com reação negativa ao extrato de ácaro *Dermatophagoides farinae*. Ao encontrar os componentes que reagem com IgE e que apresentam o mesmo peso molecular, sugeriram uma possível reação-cruzada entre diferentes espécies de insetos. Esta alergia pode se estender além dos insetos a artrópodes em geral, aracnídeos e até crustáceos.

Nos nossos pacientes, essa comparação de sensibilidade foi de 38,1% e de 30,9%, quando se comparou pacientes alérgicos ao extrato de *L. saccharina* aos extratos de *Blomia tropicalis* e de *T. putrescentiae*, respectivamente, não sendo significativo ao se comparar o grau de positividade do teste ao extrato de *D. pteronyssinus* com o extrato em questão. Esses resultados, no entanto só foram observados com os extratos de traça padronizados em PNU/mL e não ocorreram quando da utilização do extrato em UBE/mL. Isso talvez esteja relacionado ao baixo número de voluntários utilizados na avaliação da prevalência de positividade, necessitando assim de um número maior de voluntários para sua confirmação.

O gênero *Dermatophagoides* é o maior alérgeno encontrado na poeira domiciliar e a sensibilização a estes ácaros é reconhecida como a maior causa de asma no mundo. Em países de clima tropical e subtropical, o ácaro *B. tropicalis* é comumente encontrado nas casas. Muitos pacientes, mais de 90% com doença alérgica, apresentam positividade ao extrato deste ácaro no teste de puntura, podendo estar associado à asma. Esses dados também foram encontrados no estudo, quando comparamos a porcentagem de

sensibilidade dos pacientes do GC e GE em relação aos extratos de ácaros testados: *D. pteronyssinus* (p<0,0001), *B. tropicalis* (p=0,0002) e *T. putrescentiae* (p<0,0001). Vale ressaltar que, embora sem história de atopia, uma voluntária do GC apresentou positividade a vários extratos testados (*D. pteronyssinus, T. putrescentiae, B. tropicalis* e *P. americana*), sendo excluída da análise geral e estatística. Acredita-se que seja uma sensibilização profissional, uma vez que a mesma trabalha em laboratório de biologia em culturas de ácaros da poeira domiciliar.

Recentemente, o maior alérgeno de 14 kDa de *B. tropicalis*, Blo t 5, foi identificado, clonado e seqüenciado e mostra 40% de seqüência idêntica ao alérgeno de *D. pteronyssinus*, Der p 5 (ARRUDA et al., 1997). Aproximadamente 70% de pacientes atópicos expostos a *B. tropicalis* produzem anticorpo IgE a este alérgeno.

SIMPSON et al., (2003) investigou a reatividade de *B. tropicalis in vivo* (usando teste de puntura) e *in vitro* (medindo IgE específica), entre pacientes ingleses sabidamente sensibilizados por *D. pteronyssinus*. Sabendo que o ácaro *B. tropicalis* não faz parte da fauna acarina intradomiciliar da Inglaterra, dos pacientes sensíveis ao *D. pteronyssinus*, 37% tiveram um resultado positivo ao extrato de *B. tropicalis*, fornecendo uma evidência parcial de reação-cruzada entre as duas espécies estudadas. Este estudo sugere que, em áreas onde *B. tropicalis* faz parte da acarofauna intradomiciliar, a sensibilização a este ácaro é um fator de risco independente para asma e deve ser incluído para a avaliação da sensibilidade imediata.

PUERTA et al., (2005) estudaram a composição alergênica do ácaro *Suidasia medanensis* e a reação-cruzada com o ácaro *B. trop*icalis, encontrando 69% de positividade em RAST a ambos os extratos dos ácaros, usando soro de pacientes moradores de ambiente tropical. Este estudo demonstra a alta freqüência de sensibilidade a *S. medanensis* em pacientes asmáticos alérgicos, podendo ser observada reação cruzada com outros ácaros.

Sugere-se que a tropomiosina é o mais especializado alérgeno de camarão e apresenta reação cruzada entre camarão, ácaros e insetos, sendo um alérgeno estável a altas temperaturas (SANTOS et al., 1999; REESE et al., 1999; MARTINEZ et al., 1997; LEUNG et al., 1996; WITTEMAN et al., 1994). Segundo WITTEMAN et al., (1995),

a elevada concentração de tropomiosina em amostras de poeira domiciliar não pode ser explicada apenas pela presença de ácaros, sendo necessariamente relacionada à presença de outros insetos como as traças e baratas.

Estudos sugerem que a reação-cruzada observada com a tropomiosina se deva por sensibilização via inalatória e por ingestão de alimentos que a contém. Esta difusão de reação cruzada pode resultar em conseqüências clínicas. Muitos estudos indicam que a exposição e sensibilização a um alérgeno de alimento em particular, podem direcionar a sensibilização a certos aeroalérgenos (BARLETTA et al., 2005). Estudos sugerem que a imunoterapia a ácaros da poeira domiciliar pode conduzir à sensibilização a tropomiosinas de alimentos oriundos do mar e vice-versa (VAN REE et al., 1996). Entretanto, mais trabalhos devem ser realizados para se esclarecer quais são as causas de diferentes alergenicidades.

Nesses estudos, os experimentos realizados por RAST para insetos são inibidos em 90% por extratos de ácaros, entretanto, quando se inibe um RAST para ácaros com extrato de insetos, isso ocorre parcialmente, sugerindo que os ácaros ainda são os agentes sensibilizantes primários. Estudo com a traça-de-livros *Ctenolepisma longicaudata* demonstrou a presença de pelo menos 12 alérgenos diferentes, quando utilizado RAST com captação de iodo marcado BALDO & PANZANI, (1988).

Silverfish é um inseto da Ordem Thysanura, medindo de 3 a 12 mm de comprimento, apresenta três projeções na cauda, parecidas com antenas e seu corpo é coberto por listras. As traças evitam a luz e necessitam de umidade para sobrevivem e sua dieta básica consiste de carboidratos, como papel, cola de livro, migalhas de pão e farinha. Essas condições são ótimas em residências e escritórios e sua presença passa desapercebida por seus hábitos. Segundo WITTEMAN et al., (1996), alérgenos da traça *L. saccharina* foram encontrados em cerca de 80% das amostras de poeira domiciliar analisadas, demonstrando sua elevada prevalência no ambiente intradomiciliar, mesmo quando sua presença é negada pelos habitantes (WITTEMAN et al.,1996). Esse fato pode ser explicado por ter a traça, hábitos noturnos e se desenvolver, sobretudo em locais de menor atividade humana como armários, sótãos, etc.

Entretanto, alguns autores (AALBERSE et al., 2000; WITTEMAN et al., 1996) demonstraram que existem significativos níveis de antígenos de *silverfish* na poeira domiciliar, sendo parte importante desses antígenos inibida por antígenos acarinos, quando testados através da técnica de inibição do RAST (WITTEMAN et al., 1995).

Acredita-se que a forma de sensibilização à traça-de-livro *L. saccharina* ocorra, sobretudo por via inalatória, uma vez que esse inseto sofre muda durante sua vida. O alérgeno mais importante e identificado até o momento é a tropomiosina, porém acredita-se que outros alérgenos de tal importância ou maior existam e ainda precisam ser identificados.

Nas alergias por insetos inalados grandes atenção tem sido dada às baratas, já que estas se apresentam como importante alérgeno como causa de asma e outras doenças alérgicas em muitas regiões do mundo, uma vez que a hipersensibilidade por baratas está claramente relatada por causa de residências infestadas (MILLER & PETERS, 2004; CHAPMAN et al., 1996; KANG et al., 1987). A prevalência de IgE específicas a baratas têm sido considerada como o segundo alérgeno mais importante, depois dos anticorpos específicos aos ácaros da poeira domiciliar, representando um fator de risco para asma na forma aguda (ÜZEL et al., 2005; KYOUNG et al., 2004). Neste trabalho, os autores sugeriram através de seus resultados, que as reações cruzadas também ocorrem por outros alérgenos senão a tropomiosina, sendo necessária a investigação de outros alérgenos para se entender com precisão a reação cruzada com alérgenos de baratas.

Muitos estudos têm mostrado testes de provocação em pacientes com anticorpos IgE específicos para baratas, mas ainda não se encontrou estudos com testes de provocação para extrato de traça (WITTEMAN et al., 1995).

No nosso estudo também foi dada atenção quando comparamos pacientes que apresentaram sensibilização ao extrato padronizado em PNU/mL de *L. saccharina* e ao extrato de *B. germanica* (26,2%). Houve uma correlação de positividade do teste entre os extratos. Essa observação, no entanto não foi observada com o extrato padronizado da traça em U.B., demonstrando a necessidade de ampliação do número de voluntários testados para se confirmar esses resultados.

Duas espécies de baratas são consideradas mundialmente como pestes, *B. germanica* e *P. americana* (MILLER & PETERS, 2004). Alérgenos de baratas causam sensibilidade que varia de 23 a 60% em pacientes atópicos (ARLIAN, 2002). Tem-se encontrado uma associação entre alérgenos de barata e asma, podendo também causar rinite e dermatite (LITONJUA et al., 2001). Entre todas as espécies de baratas, a *B. germanica* é conhecida como tendo uma alta potência imunológica, e sugerem que o aumento na prevalência, morbidade e mortalidade da asma podem ser originários de sensibilidade a baratas (ÜZEL et al., 2005).

Muitos estudos têm examinado a exposição a alérgenos de barata e o risco de desenvolvimento de asma. ARRUDA, et al., (2001) encontrou que níveis maiores de 8 microgramas de um alérgeno no quarto de uma criança conduziu a um aumento na admissão hospitalar tendo como causa a asma. A sensibilidade a baratas pode ser observada mesmo sem a evidência de infestação desse inseto, os quais podem ser encontrados, além de residências, em escolas, escritórios e outras áreas urbanas (ÜZEL et al., 2005).

Em outros estudos, também se observa a reação cruzada ao extrato de *B. germanica* e ácaros da poeira domiciliar. ÜZEL et al., (2005), em seu estudo com 114 pacientes turcos asmáticos encontraram asma associada a RA em 75,9% dos pacientes sem sensibilidade a *B. germanica* e em 24,1% desses casos com sensibilidade a barata. Entre todos os pacientes asmáticos, em pacientes sem sensibilidade à barata, observaram resultados de teste de puntura positivo (28,6%) a ácaros da poeira domiciliar, *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. Em contraste, entre os pacientes que apresentavam sensibilidade à barata, foi observado que 73,9% desses pacientes tiveram resultado positivo ao teste de puntura com extratos dos mesmos ácaros, sendo estatisticamente significativo, sugerindo reação-cruzada desses antígenos.

A alta taxa de sensibilização coexistente entre ácaros e barata pode ser associada com uma predisposição imunológica, em termos de sensibilização por IgE. Neste mesmo estudo, também se verificou que asmáticos sensíveis à barata apresentavam sintomas perenes e crônicos, e quando se avaliou a gravidade da asma, encontraram que a maioria dos pacientes com sensibilidades às baratas apresentava asma moderada (48,8%) (ÜZEL et al., 2005). Devido a essa alta taxa de sensibilização dos pacientes com asma

brônquica ao extrato de barata com ou sem sensibilidade aos extratos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, por causa dessa reação cruzada a sensibilidade às baratas deve ser investigada em pacientes que apresentam resultados positivos aos extratos de ácaros da poeira domiciliar.

Não verificamos diferença estatisticamente significativa ao se comparar os grupos com os extratos de epitélio de cão e gato. LINNEBERG et al., (2003) encontraram uma incidência de sensibilização a cão e gato significativamente associada com a presença de IgE e sensibilização a outros alérgenos comuns. Sugeriram que uma predisposição imunológica deve ser vista como um determinante importante para o desenvolvimento de novas sensibilizações.

São apresentados na literatura diferentes métodos para se obter um extrato alergênico derivado de insetos (WITTEMAN et al., 1995), confirmando que as condições de extração podem afetar a qualidade das proteínas alergênicas. Identificar as condições ótimas de extração e caracterização de extratos alergênicos são o primeiro passo para se obter uma eficiente extração para diagnóstico e terapia (BARLETTA et al., 2002).

No nosso trabalho, optamos por utilizar solução de COCA como solução extratora e diluidora, diferentemente do método utilizado por Barletta et al., (2002). Os resultados dos testes demonstraram que o extrato obtido com essa solução foi de qualidade satisfatória.

BARLETTA et al., (2002), em estudo realizado com teste imunoenzimático e *Western blott* de extrato de traça *L. saccharina* demonstrou 17 alérgenos diferentes para o sobrenadante do extrato preparado e 21 alérgenos para o precipitado. Ainda segundo esse mesmo estudo, para se preparar e identificar componentes alergênicos do extrato de corpo inteiro de traça-de-livro *L. saccharina*, confirmaram que as condições de extração podem afetar a qualidade das proteínas alergênicas, onde perceberam em 21% dos casos um componente com peso molecular de 31-35 kDa presente somente na fração insolúvel do extrato, sugerindo ser tropomiosina de traça. Outro estudo do mesmo grupo (BARLETTA et al., 2005) propôs caracterizar tropomiosina recombinante de *L. saccharina*, rLep s1, encontrando reação cruzada com tropomiosina natural de camarão e

com tropomiosinas recombinantes de barata *P. americana* (rPer a7) e ácaro *D. pteronyssinus* (rDer p 10), sugerindo reação cruzada por partes dos epítopos de IgE para tropomiosinas de diferentes origens.

A fim de se obter a padronização do extrato de corpo inteiro de traça-de-livro *L. saccharina*, realizamos teste de puntura em nossos pacientes em três concentrações diferentes: 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL. Encontramos uma positividade no GE de 15,6% na concentração de 5.000 PNU/mL e de 37,5% tanto na concentração de 10.000 e 25.000 PNU/mL. Quanto ao GC, observamos uma positividade de 30% somente na concentração de 25.000 PNU/mL. Nossos resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparações das concentrações testadas no GE. Houve, no entanto, uma diferença significativa entre os grupos controle e estudo apenas na concentração de 10.000 PNU/mL ($p=0,04$).

Além desses resultados, também observamos um aumento progressivo do tamanho da área da pápula em relação às concentrações de 5.000, 10.000 e 25.000 PNU/mL no grupo de estudo, sendo significativo ao se comparar o tamanho formado com o uso de 5.000 e 10.000 PNU/mL ($p<0,05$) e 5.000 e 25.000 PNU/mL ($p<0,01$), sugerindo irritação cutânea de pele. Essa irritação também pôde ser observada com a diferença encontrada na positividade entre os grupos para o extrato na concentração de 10.000 PNU/mL.

Para a padronização do nosso extrato utilizamos as três concentrações citadas anteriormente para se fazer a transformação em unidades biológicas (UB) por teste de regressão linear (DREBORG et al., 1987) onde a unidade de referência é 1 HEP, que corresponde a unidade equivalente ao tamanho da pápula formada pela histamina no teste cutâneo de puntura, significando essa unidade, equivalente a 1.000 UB/mL. Encontramos que a concentração equivalente àquela da histamina foi de 29.336 PNU/mL, sendo a prevalência estimada de sensibilidade ao extrato de *L. saccharina* na concentração de 100 U.B., utilizada para o teste cutâneo de puntura, de aproximadamente 14,3% no grupo de pacientes atópicos e de 8,1% na população geral estudada na segunda fase do estudo.

7- CONCLUSÃO

Diante do exposto podemos concluir que:

1- A prevalência da sensibilidade ao extrato padronizado em UB de traça-de-livro *L. saccharina* foi considerada leve (14,3%) no grupo de atópicos.

2- Justifica-se a adição do extrato de traça *L. saccharina* na bateria padrão de teste de puntura (*prick test*), em vista de ser a prevalência de sensibilidade ao extrato padronizado, maior que aquelas observadas com outros antígenos inalatórios como de animais domésticos.

3- Além disso, observou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa na positividade dos testes de puntura aos extratos de ácaros *B. tropicalis* e *T. putrescentiae*, e de barata *B. germânica* com o extrato de traça padronizado em PNU/mL. Esses resultados, no entanto não foram observados quando da utilização do extrato de traça padronizado em UBE/mL, demonstrando a necessidade de novos estudos para se confirmar ou descartar tal possível correlação.

4- O extrato de traça na concentração de 25.000 PNU/mL demonstrou ser irritativo à pele.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R.C.: Autologous dust RAST. A neglected tool to detect idiopathic sources of allergens in the home. **Clin Rev Allergy Immunol**, 18:301-309 (2000).

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S.: Imunologia Celular e Molecular (4ª Edição), **Livraria e Editora Revinter Ltda**, 2003.

ARLIAN, L.G.: Arthropod allergens and human health. **Ann Rev Entomol**, 47: 395 (2002).

ARRUDA, L.K., SOLE, D., BAENA-CAGNANI, C.E., NASPITZ, C.K.: Risk factors for asthma and atopy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, 5:153-159 (2005).

ARRUDA, L.K.: Tropomyosin in parasites. A crossreactive IgE-binding Protein? **Allergy Clin Immunol Int – J World Allergy Org**, 17:243-245 (2005).

ARRUDA, L.K., SANTOS, A.B.R.: Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. **Curr Opin Allergy Clin Immunol,** 5:399-402 (2005).

ARRUDA, L.K., VAILES, L.D., FERRIANI, V.P.L., SANTOS, A.B.R., POMES, A., CHAPMAN, M.D.: Cockroach allergens and asthma. **J Allergy Clin Immunol,** 107:419-28 (2001).

ARRUDA, L.K., VAILES, L.D., PLATTS-MILLS, T.A.E., FERNANDEZ-CALDAS, E., MONTEALEGRE, F., LIN, K.L., CHUA, K.Y., RIZZO, M.C., NASPITZ, C.K., CHAPMAN, M.D.: Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **Am J Respir Crit Care Med**, 155:343-350 (1997).

AYUSO, R., REESE, G., LEONG-KEE, S., PLANTE, M., LEHRER, S.B.: Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. **Int Arch Allergy Immunol**, 129:38-48 (2002).

BALDO, B.A., PANZANI, R.C.: Detection of IgE antibodies to a Wide Range of insect species in subjects with suspected inhalant allergies to insects. Int. **Archs Allergy appl. Immun**, 85: 278-287 (1988).

BARLETTA, B., BUTTRONI, C., PUGGIONI, E.M.R., IACOVACCI, P., AFFERNI, C., TINGHINO, R., RIANO, R., PANZANI, R.C., PINI, C., DI FELICE, G.: Immunological characterization of a recombinant tropomyosin from a new indoor source, *Lepisma saccharina*. **Clin Exp Allergy**, 35:483-489 (2005).

BARLETTA, B., PUGGIONI, E.M.R., AFFERNI, C., ET AL.: Preparation and characterization of silverfish (*Lepisma saccharina*) extract and identification of allergenic components. **Int Arch Allergy Immunol,** 128:179-186 (2002).

BAUCHAU, V., DURHAM, S.R.: Epidemiological characterization of the intermittent and persistent types of allergic rhinitis. **Allergy**, 60:350-353 (2005).

BJORNSDOTTIR, U.S., CYPCAR, D.M.: Asthma: an inflammatory mediator soup. **Allergy**, 54:55-61 (1999).

BOULAY, M.E., BOULET, L.P.: The relationships between atopy, rhinitis and asthma: pathophysiological considerations. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 3:51-55 (2003).

BOUSQUET, J., BOUSKEY, H.A., BUSSE, W.W., CANONICA, G.W., DURHAM, S.R., IRVIN, C.G., KARPEL, J.P., VAN CAUWENBERGE, P., CHEN, R., IEZZONI, D.G., HARRIS, A.G.: Characterisitics of patients with seasonal allergic rhinitis and concomitant asthma. **Clin Exp Allergy**, 34:897-903 (2004).

BOUSQUET, J., VIGNOLA, A.M., DEMOLY, P.: Links between rhinitis and asthma. **Allergy**, 58:691-706 (2003).

BOUSQUET, J., VAN CAUWENBERGE, P., KHALTAEV, N., ARIA WORKSHOP GROUP, WORLD HEALTH ORGANIZATION.: Allergic rhinitis and its impact on asthma. **J. Allergy Clin Immunol**, 108(suppl.5): S147-S334 (2001).

BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt Biochem**, 72:248-254 (1976).

BRAUNSTAHL, G.J., HELLINGS P.W.: Allergic rhinitis and asthma: the link further unraveled. **Curr Opin Pulm Med**, 9:46-51 (2003).

CHAPMAN, M.D., VAILES, L.D., HAYDEN, M.L., PLATT-MILLS, T.A.E., ARRUDA, L.K.: Cockroach allergens and their role in asthma; in Kay AB (ed); **Allergy and Allergic Diseases. Oxford, Blackwell Science**, 942-951 (1996).

III CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA. **J Pneumol**, 28(Supl 1):S6-S51 (2002).

DREBORG, S.: The skin prick test in the diagnosis of atopic allergy. **J Am Acad Dermatol**, 21:820-1 (1989).

DREBORG, S., BELIN, L., ERIKSSON, N.E., GRIMMER, O., KUNKEL, G., MALLING, H.J., NILSSON, G., SJÖGREN, J., ZETTERSTRÖM, O.: Results of biological standardization with standardized allergen preparations. **Allergy**, 42:109-116 (1987).

DIRKSEN, A., MALLING, H.J., MOSBECH, H., SOBORG, M., BIERING, I.: HEP versus PNU standardization of allergen extracts in skin prick testing. A comparative randomized in vivo study. **Allergy**, 40:620-4 (1985).

FERNANDEZ, J., RESHEF, A., PATTON, L., AYUSO, R., REESE, G., LEHRER, S.B.: Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. **Clin Exp Allergy**, 33:956-961 (2003).

FUHLBRIGGE, A.L., ADAMS, R.J.: The effect of treatment of allergic rhinitis on asthma morbidity, including emergency department visits. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 3:29-32 (2003).

GELFAND, E.W.: Inflammatory mediators in allergic rhinitis. **J. Allergy Clin Immunol**, Nov., S135-S138 (2004).

HANSON, B., MACGUE, M., ROITMAN-HOHNSON, B., SEGAL, N.L., BOUCHARD, T.J.JR., BLUMENTHAL, M.N.: Allergy disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. **Am J Hum Genet.** 48:873-9 (1991).

JEONG, K.Y., HWANG, H., LEE, J., IN-YONG, L. KIM, D.S., HONG, C-S., REE, H-I., YONG T-S.: Allergenic characterization of tropomyosin from the dusky brown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, July, 680-685 (2004).

JEONG, K.Y., LEE. J., LEE, L-Y, KIM, D.S., HONG, C-S., REE, H-I., YONG, T-S.: Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin. **Allergy**, 58:1059-1063 (2003).

KANG, B.C.: Cockroach allergy. **Clin Rev Allergy**, 8:87-98 (1990).

KANG, B., JOHNSON, J., JONES, G.S., KANG, I.J.: Analysis of indoor environment and asthmatic characteristics of the urban bronchial asthma. **J. Allergy Clin Immunol**, 79:145 (1987).

KLEIN, K., DATHE, R., GOLLNITZ, S., JAGER, L.: Allergies: a comparison between two vocational schools in East and West Germany. **Allergy**, 47(Suppl 12):259 (1992).

KOH, Y.Y., and KIM, C.K.: The development of asthma in patients with allergic rhinitis. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 3:159-164 (2003).

LEHRER, S.B., AYUSO, R., REESE, G.: Seafood allergy and allergens: A review. **Mar. Biotechnol,** 5:339-348 (2003).

LEHRER, S.B., AYUSO, R., REESE, G.: Current understanding of food allergens. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** 964:69-85 (2002).

LEUNG, P.S.C., CHOW, W.K., DUFFEY A., KWAN, H.S., GERSHWIN, E., CHU, K.H.: IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacean and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. **J Allergy Clin Immunol**, 98:954-61 (1996).

LIMA, A.O., SOARES, J.B., GRECO, J.B., GALIZZI, J., CANÇADO, J.R.: Métodos de laboratório aplicados à clínica - técnica e interpretação. 7ª Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro/ RJ (1992).

LINNEBERG, A., NIELSEN, N.H., MADSEN, F., FROLUND, L., DIRKSEN, A., JORGENSEN, T.: Its in the home and the development of pet allergy in adulthood. The Copenhagen Allergy Study. **Allergy**, 58:21-6 (2003).

LITONJUA, A.A., CARY, V.J., BURGE, H.A., WEISS, S.T., GOLD, D.R.: Exposure to cockroach allergen in the home is associated with incident doctor-diagnosed asthma and recurrent wheezing. **J Allergy Clin Immunol**, 107:41-7 (2001).

MARKUSSEN, B., LOWENSTEIN, H., WEEKE, B.: Allergen extract of house hair and dandruff. Quantitative immunoelectroforetic characterization of the antigens. **Int Archs Allergy appl Imun**, 51:25-37 (1976).

MARTINEZ, F.D.: The coming-of-age of the hygiene hypotesis. **Respir Res**, 2:129-32 (2001).

MARTINEZ, A., MARTINEZ, J., PALACIOS, R., PANZINI, R.: Importance of tropomyosin in the allergy to household arthropods. Cross-reactivity with other invertebrate extracts. **Allergol et Immunopathol**, 25:118-26 (1997).

MILLER, P., and PETERS, M.: Overview of the public health implications of cockroaches and their management. **N S W Public Health Bull**, 15(11-12):208-211 (2004).

PERONI, D.G., PIACENTINI, G.L., ALFONSI, L., ZERMAN, L., DI BLASI, P., VISONA, G., NOTTEGAR, F.: Rhinitis in pre-school children: prevalence, association with allergic diseases and risk factors. **Clin Exp Allergy**, 33:1349-1354 (2003).

PEAT, J.K., and LI, J.: Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. **J Allergy Clin Immunol,** 103:1-10 (1999).

PUERTA, L., LAGARES, A., MERCADO, D., FERNÁNDEZ-CALDAS, E., CARABALLO, L.: Allergenic composition of the mite *Suidasia medanensis* and cross-reactivity with *Blomia tropicalis*. **Allergy**, 60:41-47 (2005).

RANDALL, C.: Silverfish and Firebrats. **General Pest Management**, Chapter 9, Section 2, 87-90 (1998).

REESE, G., AYUSO, R., LEHRER S.B.: Tropomyosin: An invertebrate pan-allergen. **Int Arch Allergy Immunol,** 119:247-258 (1999).

ROBINSON, W.H.: Urban Entomology – Insect and Mite Pests in the Humam Environment. **Chapman & Hall,** First edition (1996).

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D.: Imunologia (5ª edição). **Editora Manole Ltda** (1999).

SANTOS, A.B., CHAPMAN, M.D., AALBERSE, R.C., VAILES, L.D., FERRIANI, V.P., OLIVER, C., RIZZO, M.C., NASPITZ, C.K., ARRUDA, L.K.: 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**, 104:329-37 (1999).

SIMONS, F.E.: Allergic rhino bronchitis: the asthma-allergic rhinitis link. **J. Allergy Clin Immunol,** 104:534-40 (1999).

SIMPSONS, A., GREEN, R., CUSTOVIC, A., WOODCOCK, A., ARRUDA, L.K., CHAPMAN, M.D.: Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoides* spp. Allergens among mite allergic patients in the UK. **Allergy**, 58:53-56 (2003).

SOLÉ, D., YAMADA, E., VANA, A.T., COSTA-CARVALHO, B.T., NASPITZ, C.K.: Prevalence of asthma and related symptoms in school age children in São Paulo, Brazil. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **J Asthma,** 36:205-12 (1999).

SOLÉ, D., and NASPITZ, C.K.: Epidemiologia da asma: estudo ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood). **Rev Bras Alergia Imunopatol**, 21:38-45 (1998).

SPORIK, R., and PLATTS-MILLS, T.A.: Epidemiology of dust-mite-related disease. **Exp Appl Acarol,** 16:141-51 (1992).

TOGIAS, A.: Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. **J. Allergy Clin Immunol**, 111:1171-84 (2003).

TOGIAS, A.: Unique mechanistic features of allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 105(suppl):S599-604 (2000).

ÜZEL, A., ÇAPN, N., CANBAKAN, S., YURDAKUL, A.S., DURSUN, B.: Evaluation of the relationship between cockroach sensitivity and house-dust-mite sensitivity in Turkish asthmatic patients. **Respiratory Medicine**, 99:1032-1037 (2005).

VAIL, K.M., WILLIAMS, H.E., YANES-JR., J.: Silverfish and Firebrats. **The University of Tennesse, Agricultural Extension Service**. SP3410-1M-12 (1997).

VAN BRONSWIJK, J.E.M.H.: House dust biology for allergists, acarologists and mycologists. Zoelmond, The Netherlands. Published by the author, 316 (1981).

Van Ree, R., Antonicelli, L., Akkerdaas, J.H., Garrtani, M.S., Aalberse, R.C., Bonifazi, F.: Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. **Allergy**, 51:108-113 (1996).

VIGNOLA, A.M., CHANEZ, P., GODARD, P., BOUSQUET, J.: Relationships between rhinitis and asthma. **Allergy**, 53:833-9 (1998).

Von Mutius, E., Martinez, F.D., Fritzsch, C., Nicolai, T., Roel, L.G., Thiemann, H.H.: Prevalence of asthma and atopy in two areas of west and east Germany. **Am J Respir Crit Care Med,** 149:358-64 (1994).

WEINFELD, D., TERNESTEN-HASSEUS, E., LOWHGEN, O., MILLQVIST, E.: Capsaicin cough sensitivity in allergic asthmatic patients increases during the birch pollen season. **Ann Allergy Astma Immunol**, 89:419-24 (2002).

WITTEMAN, A.M., VOORNEMAN, R., VAN DEN OUDENRIJN, S., VAN LEEUWEN, J., AKKERDAAS, J., VAN DER ZEE, J., AALBERSE, R.C.: Silverfish protein in house dust in relation to mite and total arthropod level. **Clinical and Experimental Allergy**, 26:1171-1176 (1996).

WITTEMAN, A.M., VAN DEN OUDENRIJN, S., VAN LEEUWEN, J., AKKERDAAS, J., VAN DER ZEE, J., AALBERSE, R.C.: IgE antibodies reactive with Silverfish, Cockroach and Chironomid are frequently found in mite-positive allergic patients. **Int Arch Allergy Immunol**, 108:165-169 (1995).

WITTEMAN, A.M., AKKERDAAS, J.H., VAN LEEUWEN J., VAN DER ZEE, J., AALBERSE, R.C.: Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. **In Arch Allergy Immunol**, 105:56-61 (1994).

ZOLLNER, T.C.A.S. Identificação e caracterização de frações alergênicas de baixos pesos molecular do ácaro *Aleuroglyphus ovatus* (Tese de Doutoramento). Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia - UNICAMP (1998).

9- ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo para Avaliação da Sensibilidade Imediata de Pacientes Atópicos por meio de Teste Cutâneo de Puntura (*prick* test) ao Extrato da traça-de-livro *Lepisma saccharina* padronizado em Unidades Biológicas

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Responsáveis: Daniela Regina dos Santos e Dr. Celso H. de Oliveira.

O abaixo-assinado, _____, _____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico Celso Henrique de Oliveira, do Ambulatório de Alergia do Departamento de Pediatria da Unicamp. O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é verificar se o extrato da traça-de-livro *Lepisma saccharina* produzido pelo Laboratório de Biologia Molecular do CIPED - Departamento de Pediatria da Unicamp acarreta reação na pele sugestiva de alergia durante um 'teste de alergia'. Você fará um exame chamado de 'teste de sensibilidade imediata' ou teste de puntura para os Extratos de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus, Blomia tropicalis, Tyrophagus putrescenciae),* epitélio de cão *(Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis catus*), baratas (*Blatella germanica, Periplaneta americana*), poeira, traça-de-livro (*Lepisma saccharina*), num total de 13.

Antes de sua participação no estudo você será examinado por um médico que lhe fará um exame completo. O médico lhe perguntará se você teve ou tem alguma doença alérgica e se você faz uso de algum medicamento.

Após a sua aceitação de participação no estudo, você será submetido a um teste de alergia através da pele com extratos da traça-de-livro *Lepisma saccharina* e outros ácaros e insetos como a barata. Os testes serão feitos com um pequeno volume do extrato, no seu braço. Além disso, será coletado um total de 10 mL de sangue para avaliação do mesmo extrato através de exames em laboratório.

Os testes de puntura são procedimentos bem estabelecidos na medicina e são realizados com puntores de plástico descartáveis através de arranhão da pele do braço (não é injeção). O tempo total do teste é de 15 minutos após a aplicação dos extratos na pele.

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que você não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações (exceto as por spray ou 'bombinhas'). Além das regras quanto aos medicamentos, você não poderá ter realizado nenhum teste de alergia nos últimos 7 dias.

POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A realização de testes de sensibilidade imediata com extratos alergênicos de qualquer natureza geralmente não acarreta eventos adversos podendo, no entanto, ocorrer em casos raros pequenos inchaço no local da aplicação. Casos de reação alérgica como urticária, asma, rinite e mesmo tontura e diminuição da pressão sangüínea podem também ocorrer muito raramente.

A participação neste estudo, não tem o objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Consequentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do mesmo.

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento nesta Instituição, sem qualquer custo. Não haverá, no entanto, qualquer compensação de ordem financeira em função do ocorrido. Contudo, ao assinar este termo, você não está renunciando qualquer direito legal que você possui.

Esse estudo não remunerará os voluntários submetidos aos testes de sensibilidade imediata.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico deste ambulatório.

Você obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

Independente de seu desejo e consentimento, sua participação no ensaio clínico poderá ser interrompida pelo Investigador Principal. Caso haja interrupção, essa não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Unicamp.

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. A Unicamp não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o Dr. Celso Henrique de Oliveira (Fone 0xx19 9112-8820). Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética da Unicamp fone (0xx19) 3788-8936 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Se você concorda com o exposto acima leia e assine o documento abaixo.

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo o também sobre o Estudo e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento. Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Campinas, _____/_____/200_____.

Nome do voluntário:_____

Data:_____

Assinatura:_____

Responsável legal:_____
(Somente necessário se o voluntário for menor de 21 anos de idade)

Data:_____

Assinatura:_____

Pessoa que está obtendo o termo de consentimento:_____

Data:_____

Assinatura:_____

Testemunha:_____

(Somente necessário se o voluntário não souber ler)

Data:_____

Assinatura:_____

Telefones para contato

Daniela Regina Dos Santos: (11) 8564-9814

Dr. Celso H. De Oliveira: (19) 9112-8820; (19) 3255-6631

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA

Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células

Centro de Investigação em Pediatria – CIPED

Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica

Departamento de Pediatria

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (‘*Prick Test’*)

Nome:_____HC:_____

Diagnóstico:_____Responsável: _____

Local: Antebraço Extrato: _____ Leitura: _____ min. Data: ____/____/___

Ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

Ácaro *Blomia tropicalis*

Ácaro Tyrophagus putrescentiae

Cão - *Canis familiaris*

Gato - *Felis catus*

Barata1 - *Blatella germânica*

Barata2 – *Periplaneta americana*

Poeira domiciliar

Traça-de-livro (*Lepisma Saccharina*)

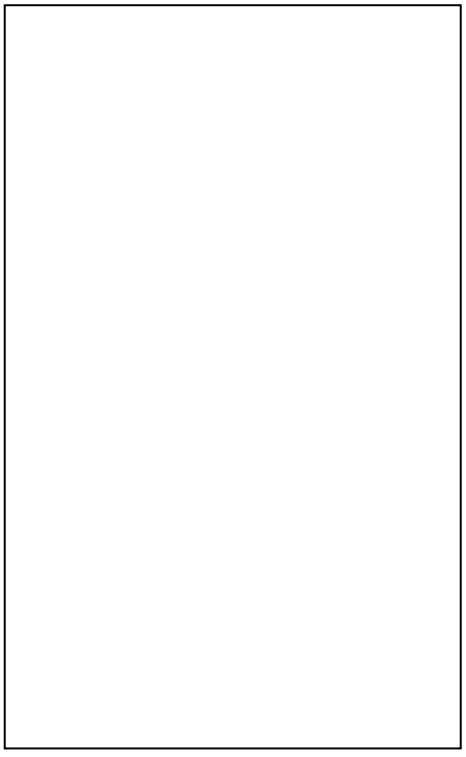
5.000

10.000

25.000

Controle Positivo

Controle Negativo



Conclusão: _____