



## Exposição a alérgenos e a endotoxina, sensibilização e expressão clínica da doença alérgica: Estudo de coorte\*

### *Exposition to allergens, endotoxin, sensitization and clinical expression of allergic disease: a cohort*

Vera E. V. Rullo<sup>1</sup>, Dirceu Solé<sup>2</sup>, Luiza K. P. Arruda<sup>3</sup>, Cláudia Nakamura<sup>4</sup>,  
Viviane Valente<sup>5</sup>, Fernando J. Nóbrega<sup>6</sup>, Charles K. Naspitz<sup>2</sup>

#### Resumo

**Objetivo:** Verificar se exposição precoce a alérgenos e a endotoxinas e outros fatores influenciam no aparecimento de sibilos e sensibilização em crianças com elevado risco para asma.

**Métodos:** 104 recém-nascidos com alto risco para manifestação de asma foram selecionados ao nascimento. Pais responderam questionários sobre condições respiratórias e de saúde das crianças aos 3, 6, 9, 12 e 15 meses. Definiu-se sibilos recorrentes como dois ou mais episódios de sibilos em seis meses. Foram coletadas amostras de poeira dos pisos e roupas de cama das residências, à seleção. Níveis de endotoxinas foram determinados pela análise de *Limulus Amebocyte Lysate* e os de alérgenos (ácaros, baratas, cão e gato) quantificados por ELISA. Testes cutâneos (TC) por puntura foram realizados em 90 crianças.

**Resultados:** concentrações de endotoxinas na cama variaram de 1,6 a 2,955 unidades de endotoxina (EU) por mg de poeira (média geométrica [MG] 21,9 EU/mg). Níveis de *Der p 1* variaram de inferior a 0,02 µg/g a 33,9 µg/g de poeira (MG = 2,07 µg/g). Foram encontrados baixos níveis de *Der f 1*, *Fel d 1*, *Can f 1* e *Bla g 1* e de sensibilização no TC. Níveis elevados de exposição a endotoxina na cama (>75 EU/mg), com OR (IC 95%) = 0,20 (0,04-0,99); e *Der p 1* na poeira dos pisos > 2 µg/g de poeira, com OR (IC 95%) = 0,36 (0,15-0,87), correlacionaram com redução significativa de sibilos recorrentes ( $p < 0,04$ ).

**Conclusão:** níveis elevados de exposição a endotoxinas e a *Der p 1* no início da vida podem proteger contra o desenvolvimento de sibilos recorrentes.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(6):292-297 Asma, endotoxinas, alérgenos, sibilos

#### Abstract

**Objective:** to verify if the exposure to endotoxin and allergens early in life, and other factors may influence the development of wheezing and sensitization among children at high risk for asthma.

**Methods:** 104 newborns at high risk for developing asthma were enrolled at birth. Parents were asked to complete a questionnaire regarding their child's respiratory conditions and health at 3, 6, and 9, 12, 15 months. Recurrent wheezing was defined as two or more wheezing episodes within any period of 6 months. Dust samples were collected from bedding and bedroom floor in the infants homes at enrollment. Endotoxin content was determined by using the *Limulus Amebocyte Lysate* assay, and major allergens from mites, cockroach, cat and dog were quantified by ELISA. Skin prick test (SPT) was performed in 90 children.

**Results:** House-dust endotoxin concentrations in bedding ranged from 1.6 to 2,955 endotoxin units (EU) per mg of dust (geometric mean [GM] 21.9 EU/mg). Levels of the *Der p 1* varied from less than 0.02 µg to 33.9 µg (GM = 2.07 µg/g). Low levels of *Der f 1*, *Fel d 1*, *Can f 1* and *Bla g 1* were found. A few children had SPT-positive. High level endotoxin exposure in bedding (>75 EU/mg), with OR (95% CI) = 0.20 (0.04-0.99); and *Der p 1* in the infants's bedroom floor dust > 2 µg/g of dust, with OR (95%CI) = 0.36 (0.15-0.87), correlated with a significant reduction in prevalence of recurrent wheezing ( $p < 0.04$ ).

**Conclusions:** High level of endotoxin and *Der p 1* exposure early in life may protect against development of recurrent wheezing.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(6):292-297 asthma: endotoxins, allergens wheezing

1. Professora afiliada, Pós-doutora, Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia, Depto de Pediatria, UNIFESP-EPM
2. Professor Titular Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia, Depto de Pediatria, UNIFESP-EPM
3. Professora Livre-Docente, Disciplina de Alergia e Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP
4. Especialista em Alergologia
5. Graduanda de Medicina - Depto de Pediatria, UNIFESP-EPM
6. Coordenador do Programa Einstein na Comunidade

**Fonte financiadora:** Projeto com Auxílio à Pesquisa e Bolsa de Pós-doutorado pela FAPESP

\* Trabalho agraciado com o prêmio Osvaldo Seabra no XXX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia

Artigo submetido em 20.10.2005, aceito em 23.11.2005.

## Introdução

A exposição a alérgenos ambientais, principalmente na infância, influencia o desenvolvimento da sensibilização atópica e a exteriorização clínica das doenças atópicas como asma, rinite e dermatite atópica<sup>1</sup>. Embora muitos pacientes não consigam relacionar os seus sintomas à exposição ambiental, vários estudos mostram que 80% das crianças asmáticas são alérgicas a um ou mais alérgenos inalados<sup>2</sup>. Em diferentes partes do mundo, tem-se confirmado, por vários estudos, a relação entre a exposição alergênica e a sensibilização alérgica<sup>3,4</sup>. Além da predisposição genética, a concentração dos alérgenos inalados a que as crianças se expõem durante fase precoce da vida tem importância. Tunnicliffe et al.<sup>5</sup> confirmaram a relação entre o grau de exposição alergênica e o desenvolvimento de asma grave em pacientes sensibilizados. Acredita-se que o ambiente associado aos fatores genéticos, possa estar implicado no aumento da prevalência das doenças alérgicas em todo o mundo<sup>6</sup>.

As endotoxinas (ET) substâncias habitualmente liberadas da parede externa de bactérias gram-negativas, presentes em vários ambientes domiciliares e ocupacionais, são capazes de estimular a liberação de citocinas inflamatórias, com potente ação pró-inflamatória. Ao serem inaladas se depositam em vários níveis do trato respiratório, e ao entrarem na circulação, rapidamente se ligam a uma glicoproteína (LBP) pela porção lípide A, e formam um complexo posterior apresentarão ação sistêmica.

A exposição a níveis elevados de ET da poeira domiciliar (superiores a 11,2 EU/mg) de poeira está relacionada à indução da asma em indivíduos susceptíveis<sup>7,8</sup>. Recentemente, estudos têm mostrado que a exposição precoce a níveis elevados de ET relaciona-se com a proteção contra a sensibilização alérgica<sup>9,10</sup>. No Brasil, recentemente, Rullo et al.<sup>11</sup> detectaram níveis elevados de ET na poeira de creches e escolas (três vezes mais elevados nas creches) públicas paulistanas. Sugere-se que a exposição a elevadas concentrações de ET no início da vida possa proteger as crianças da sensibilização atópica. Um estudo por longo prazo com acompanhamento clínico, além das detecções dos níveis de ET e alérgenos nas poeiras, é primordial para ter-se resposta a essas questões.

Foram objetivos deste estudo: determinar os níveis de ET nas poeiras de pisos e roupas de cama das residências das crianças estudadas e do serviço social do Hospital Israelita Albert Einstein, freqüentado pelas crianças e determinar o aparecimento de síbilos recorrentes e fatores de risco obtidos por questionários trimestrais aos pais das crianças, durante o período de acompanhamento (mínimo de um ano).

## Casística e Método

Foram selecionadas 104 crianças, recém-nascidas e matriculadas no Programa Einstein na Comunidade de Paraisópolis (PENC-P). Essas crianças, todas com risco elevado de desenvolver doenças alérgicas (pais com doença atópica), foram acompanhadas, por pelo menos um ano, a partir da data da matrícula.

Os pais responderam questionários padrão com informações sobre: peso ao nascimento, tempo de aleitamento, número de irmãos, ordem de nascimento, padrão alimentar, sintomas respiratórios (sua freqüência, gravidade, tratamento e necessidade de hospitalização), antecedentes alérgicos, exposição ambiental (fumo e animais), intensidade do chiado (quando presente), e medicação empregada no tratamento. Administradores e autoridades das escolas, os responsáveis pela limpeza responderam questionário sobre características de construção das creches assim como sobre os produtos utilizados na limpeza.

Após a admissão no estudo as crianças foram submetidas a exame físico completo. A seguir foram acompanha-

das e, a intervalos trimestrais, seus pais ou responsáveis responderam novamente os questionários padrão.

Foram ainda colhidas amostras de poeira do colchão e de roupas de cama, além do piso sob a cama, na casa das crianças e creche.

### Coleta de poeira

As amostras de poeira foram coletadas no interior das residências e no Serviço Social do Einstein, freqüentado pelas crianças incluídas no estudo. As amostras foram colhidas da superfície dos colchões e roupas de cama e do assoalho sob as camas (duas amostras por residência) e superfície dos colchões e piso sob os colchões (oito no Serviço Social do Einstein), no total de 216 amostras.

A coleta foi realizada com aspirador de pó manual Electrolux (fluxo de 45 l/min; 1300W), equipado com coletor acessório de cambraia de algodão e poliéster, adaptado na extremidade do tubo aspirador. De acordo com o Consenso Internacional para coleta de poeira, 1m<sup>2</sup> de superfície de pisos foi aspirado por dois minutos<sup>12</sup>. Cada amostra foi coletada com filtros de papel diferentes. Em seguida, a amostra foi removida e colocada em saco plástico distinto. No final de cada coleta, a ponta do aspirador foi limpa, com água e álcool, e seca. As amostras foram estocadas em refrigerador de 4°C a 8°C.

### Extração da poeira

As partículas de poeira foram separadas do filtro por agitação e raspagem. Em seguida, foram passadas através de uma peneira com poros de 300 -355 microns de diâmetro (Endecotts Ltd, London, UK), com a finalidade de remover fibras e partículas maiores e obter um pó fino, que foi pesado. As partículas de poeira obtidas foram de 6 a 300 µm de tamanho. Para avaliação da endotoxina, as amostras de poeira foram colocadas em tubos estéreis aprotogênicos. Para avaliação dos alérgenos dos ácaros, gato, cão e barata, a poeira de cada amostra foi colocada em tubos de ensaio de 75x12 mm.

### Obtenção dos extratos de poeira

As amostras extraídas de poeira que pesaram 100mg foram diluídas em 2ml de BBS-T (solução salina tamponada com ácido bórico com 0,1% Tween 20, pH 7,6-8,0, taxa de extração 1:10 [peso/vol]). As amostras que pesaram 50 a 100mg foram diluídas com uma quantidade proporcional da solução tampão descrita acima, que variou de 1 a 2ml. Finalmente, as amostras que pesaram 10 a 50mg foram diluídas em 1ml da solução tampão. A poeira ficou em suspensão, usando-se um misturador Vortexer-Geme (bate-deira). As amostras foram misturadas em um vibrador e ficaram duas horas a temperatura ambiente, antes de serem centrifugadas por 20 minutos, à rotação de 2500rpm e 4°C. Sobrenadantes foram removidos com pipeta Pasteur (1,5 ml) e estocados a -20°C.

### Determinação dos níveis de alérgenos principais dos ácaros (*Dermatophagoides ssp*), (*Der p 1* e *Der f 1*)

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a quantificação de alérgenos do grupo 1<sup>13</sup>. Esses ensaios foram baseados em uma fase sólida, cujo anticorpo monoclonal é ligado a uma placa de poliestireno e, em seguida, é incubado com a amostra a ser testada.

### Determinação de alérgenos de barata (*Bla g 1*)

Para a determinação dos principais alérgenos de barata (*Bla g I* e *Bla g II*), foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) segundo Pollart et al.<sup>14</sup>.

### Determinação de alérgeno de gato, *Fel d I*

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a determinação do principal alérgeno de gato (*Fel d I*), segundo Chapman et al.<sup>15</sup> e Luczynska et al.<sup>13</sup>.

**Determinação de alérgeno de cão, Can f 1**

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a determinação do principal alérgeno de cão (Can f 1), segundo De Groot et al.<sup>16</sup>.

**Determinação dos níveis de endotoxina**

Utilizamos o Limulus Amebocyte Lysate (LAL), que é um extrato aquoso derivado do Limulus ameboocytes, indicado para a determinação quantitativa de endotoxina. Método cinético turbidimétrico. As amostras foram preparadas, misturando 10 mg de cada amostra de poeira com 400 µl de água isenta de endotoxina (apirogênica) e vibrando por cinco minutos no "Vortexer" e depois descansando por uma hora. Cada amostra de suspensão foi diluída ao menos 1:40000 até 1:160000, para que ocorresse a leitura. A atividade de endotoxina das amostras foi determinada utilizando-se LAL (Pyrogent – 5000- Cambrex). As análises foram feitas em duplicata. Para prevenir um viés, cada amostra foi contaminada com endotoxina padrão e analisada em duplicata. Caso a recuperação fosse abaixo de 45% a análise era repetida com a suspensão mais concentrada. Se a recuperação fosse acima de 200% a análise era repetida com a diluição maior. Os resultados dos níveis de endotoxinas foram expressos como EU/ml.

Os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata (TCHI) foram realizados pela técnica de punctura, após um ano de acompanhamento. Foram aplicados no antebraço: histamina, solução salina, além dos alérgenos mais comuns (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinea*, *Blomia tropicalis*, *Canis familiaris*, *Felinus domesticus*, *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, Polens (*Lolium*), Fungos (mix), Leite, Ovo e Soja). Após 15 minutos, a leitura foi realizada e considerada positiva na presença de pápula com diâmetro médio igual ou maior que 3mm.

**Análise dos resultados**

Foi utilizada Análise de Regressão Logística dos dados com significância, para analisar: sibilos recorrentes (duas crises de sibilância em seis meses) **versus** fatores de risco (número de infecções, uso de antibióticos, exposição ao fumo, níveis de exposição a endotoxinas e a alérgenos).

Teste não paramétrico para duas amostras independentes de Mann-Whitney para avaliar possíveis diferenças entre os níveis de exposição as endotoxinas, do piso e da cama, entre as crianças que apresentaram sibilos recorrentes e as que não apresentaram. Da mesma forma foram calculados para os níveis de cada alérgeno. Os Testes do Qui quadrado e de Fisher foram empregados para avaliar as diferenças entre crianças com e sem sibilos recorrentes e os níveis de exposição aos alérgenos e as endotoxinas. Também analisamos a Razão de Chances (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

Regressão logística dos dados com significância para analisar: indivíduos sensibilizados (com pápula igual ou maior do que 3 mm ao teste de punctura e com pápula igual a 2 mm) e não sensibilizados; doentes (sibilos recorrentes – duas crises de sibilância em seis meses) e não doentes **versus** fatores de risco (número de infecções, exposição a fumo, antecedentes familiares e pessoais, níveis de exposição a endotoxinas, níveis de exposição a alérgenos [*Der p 1*, *Der f 1*, *Can f 1*, *Fel d 1* e *Bla g 1*])

**Resultados**

Das 104 crianças, 53 foram caracterizadas como sibilantes recorrentes e 51 não; 90 realizaram os testes cutâneos, 46 sibilantes recorrentes e 44 não. Utilizando como critério positivo para atopia, diâmetro médio de pápula induzida por alérgeno durante o TCHI de 3mm ou mais, apenas 7% das crianças se mostraram sensibilizadas até o primeiro ano de idade, entretanto, tendo-se 2mm como

critério de positividade, 37,7% (34/90) foram sensibilizadas com a mesma idade.

Embora, houvesse diferenças na prevalência de sensibilização, segundo o critério utilizado, em ambas situações, não houve diferenças significantes entre os lactentes com sibilância recorrente e os sem, quanto à frequência de sensibilização alérgica (tabelas 1 e 2). Os alérgenos responsáveis por tais sensibilizações foram: *Dp*, *Df*, pólen, e ovo induzindo pápula de 3mm ou mais.

**Tabela 1** - Crianças sibilantes ou não (%) com teste cutâneo positivo, considerando-se diâmetro médio de pápula maior ou igual a 3mm

	Sibilantes (N = 46)	Não Sibilantes (N=44)
<b>Teste cutâneo positivo</b>	3 (6%)	4 (9%)
<b>Teste cutâneo negativo</b>	43 (94%)	40 (91%)

Qui-quadrado -  $p = 0,47$

**Tabela 2** - Crianças sibilantes ou não (%) com teste cutâneo positivo, considerando-se o diâmetro médio de pápula maior ou igual a 2mm

	Sibilantes (N = 46)	Não Sibilantes (N=44)
<b>Teste cutâneo positivo</b>	25 (54%)	29 (65%)
<b>Teste cutâneo negativo</b>	21(46%)	15 (34%)

Qui-quadrado -  $p = 0,47$

Os níveis de exposição ao *Der p 1* variaram de 0,02 a 21,75 µg/g nas amostras de poeira dos pisos e, de 0,02 a 31,3 µg/g nas amostras das camas das residências. Os níveis de *Der f 1* dos pisos variaram de 0,02 a 1,38 µg/g no piso e de 0,02 a 21,1 nas camas. As concentrações de *Can f 1*, encontradas nos pisos, foram abaixo dos limites de detecção (0,04µg/g) para a maioria das amostras e, apenas em uma residência o nível foi superior a 1000 µg/g. As concentrações de *Can f 1*, nas camas, também foram abaixo dos limites de detecção (0,04 µg/g), e apenas em uma amostra (0,9%) o nível foi de 3,12 µg/g. Os níveis observados de *Fel d 1* estiveram abaixo dos níveis de sensibilização para as amostras dos pisos e das camas, variando de níveis inferiores a 0,004 a 0,65 µg/g nos pisos e 0,004 a 2,85 µg/g nas camas. A maioria das concentrações de *Bla g 1* encontrada, nos pisos e nas camas das residências, foi inferior ao limite de detecção (0,01µg/g), o nível mais elevado foi de 2,96 U/ml encontrado no piso. Não houve diferença significante dos níveis de exposição aos aeroalérgenos avaliados entre as crianças com e sem sibilos recorrentes, exceto para o *Der p 1* (tabela 3).

Não houve diferença significante entre os lactentes com sibilância recorrente ou não quanto à frequência de sensi-

bilização, para nenhum dos alérgenos testados, considerando-se o critério pápula  $\geq 2$ mm (tabela 4).

**Tabela 3** - Crianças sibilantes ou não e níveis (mediana) de exposição aos aeroalérgenos.

Alérgenos e local de análise	Sibilantes		
	Sim	Não	p
Der p 1 piso	0,86	1,2	0,01*
Der p 1 cama	4,4	5,98	0,49
Der f 1 piso	0,02	0,02	0,09
Der f 1 cama	0,02	0,02	0,21
Can f 1 piso	0,04	0,04	0,14
Can f 1 cama	0,04	0,04	0,05
Fel d 1 piso	0,004	0,004	0,28
Fel d 1 cama	0,021	0,014	0,31
Bla g 1 piso	0,01	0,01	0,07
Bla g 1 cama	0,01	0,01	0,43

Mann-Whitney - sibilantes x não sibilantes \*  $p < 0,05$

A exposição ao Der p 1 presente nos pisos foi menor (mediana de 0,86 $\mu$ g/g) no grupo de crianças com sibilos recorrentes comparado ao grupo sem sibilância (mediana 1,2  $\mu$ g) (tabela 3). Para esse alérgeno a frequência de sibilância recorrente foi significativamente menor entre os expostos a quantidades menores do alérgeno (tabela 5).

As concentrações de endotoxinas documentadas nas camas das residências variaram de 1,6 a 156 EU/mg de poeira e nos pisos de 1,6 a 2.955 EU/mg. Quando os níveis de endotoxinas nas camas das residências foram superiores a 75 EU/mg houve redução significativa na prevalência de sibilos recorrentes, 2/11 (18%) pacientes sibilaram e 9/11 (82%) não. Abaixo de 75 EU/mg: 51/93 sibilaram e 42/93 não (tabela 6).

**Tabela 6** - Níveis de exposição de Endotoxinas (cama e piso) e presença ou não de Sibilos Recorrentes

Níveis de Endotoxinas (EU/mg)	Cama			Piso		
	Sibilantes	Não sibilantes	Risco Relativo (IC95%)	Sibilantes	Não sibilantes	
100	2	8	0,36 (0,10 - 1,29)*	3	6	NS
90	2	8	0,36 (0,10 - 1,29)*	3	7	NS
80	2	9	0,33 (0,09-1,17)*	4	7	NS
75	2	9	0,22 (0,09-1,17)*	4	9	NS
70	4	9	0,57 (0,24-1,32)	7	11	NS
60	5	9	0,66 (0,32-1,38)	8	11	NS
50	8	13	0,70 (0,39-1,25)	12	14	NS
40	11	16	0,74 (0,45-1,23)	15	15	NS
30	15	18	0,84 (0,55-1,30)	22	21	NS
20	27	24	1,07 (0,74-1,57)	31	24	NS
10	45	32	1,97 (1,07-3,6)*	37	39	NS

O mesmo não aconteceu com os níveis de endotoxinas encontrados nos pisos das residências. Também não houve

**Tabela 4** - Crianças sibilantes ou não (%) com teste cutâneo positivo, considerando-se diâmetro médio da pápula maior ou igual a 2mm, para todos os alérgenos

Alérgenos	Sibilantes		
	sim	não	p
Dp	7 (15%)	4 (9%)	0,33
Df	2 (4%)	4 (9%)	0,26
Bt	0 (0%)	1 (2%)	0,47
Can f 1	1 (2%)	3 (7%)	0,45
Fel d 1	1 (2%)	0 (0%)	0,43
Bla g 1	2 (4%)	0 (0%)	0,49
Per a 1	4 (8%)	1 (2%)	0,36
Pólens	3 (6%)	7 (16%)	0,13
Fungos	1 (2%)	2 (4%)	0,32
L de vaca	3 (6%)	3 (7%)	0,34
Ovo	1 (2%)	5 (11%)	0,3
Soja	0 (0%)	1 (2%)	0,2

Teste de Mann-Whitney

**Tabela 5**- Crianças com exposição a alérgenos em níveis superiores aos de sensibilização e relação com a presença de sibilos recorrentes

Exposição acima dos níveis de sensibilização	Sibilantes		
	sim	não	p
Der p 1 piso	11	22	0,012*
Der p 1 cama	41	41	0,44
Der f 1 cama	2	4	0,32
Can f 1 piso	0	1	0,49
Bla g 1 piso	0	1	0,49

Qui-quadrado - sim x não

\*  $p < 0,05$

correlação significativa entre sibilos recorrentes e outros fatores de risco como: exposição à fumaça de cigarro, expo-

sição a animais domésticos, presença de asma nos pais, presença de eczema na criança, obstrução nasal. Houve correlação significativa entre crianças que apresentaram sibilos recorrentes e presença de infecções respiratórias

No Serviço Social do Einstein, as crianças foram expostas a níveis médios (média geométrica) de endotoxina de 65,8 EU/mg de poeira no piso e 15,9 EU/mg de poeira da superfície de colchões e cadeiras. Os níveis de alérgenos encontrados nesses locais foram muito abaixo dos considerados como níveis de sensibilização

## Discussão

Tem sido observada baixa freqüência de sensibilização atópica, assim como o desenvolvimento de asma e rinite, em crianças provenientes de regiões rurais (fazendas) de alguns países europeus, Canadá e Austrália em comparação a crianças que habitam regiões urbanas. Essas crianças são freqüentemente expostas a elevadas concentrações de endotoxinas, substâncias liberadas da camada externa de bactérias gram-negativas.

Sabidamente vários fatores podem exercer influência sobre os níveis de endotoxinas na poeira, tais como: o contato regular com os animais de fazendas, além da presença de animais domésticos, número de pessoas por residência, hábitos de limpeza, presença de mofo, ar condicionado central, fumaça de cigarro e a estação do ano. Entretanto, nem mesmo a combinação desses fatores é capaz de substituir os efeitos dessas substâncias no mecanismo imunológico humano<sup>17</sup>.

A maioria dos autores, quando estudam endotoxinas, referem-se aos níveis dessas substâncias encontrados nos pisos, apenas Park et al<sup>18</sup> mostraram que os níveis de endotoxinas da cama poderiam ter valor prognóstico na sensibilização alérgica. Apesar de, ainda não estar claro qual é a exposição mais importante no interior de uma residência, foi demonstrado que as concentrações de endotoxinas em colchões a que as crianças são expostas é inversamente proporcional à ocorrência de asma e rinite. Waser et al também sugeriram que esta seria uma avaliação mais estável e fidedigna da exposição individual<sup>19</sup>. Em nosso estudo, os níveis elevados de endotoxinas (> 75 EU/mg de poeira) presentes nas camas das residências foram inversamente proporcionais ao número de pacientes que apresentaram sibilos recorrentes, ou seja, acima de duas crises de broncoespasmo no período de 6 meses. Em nosso meio, esses resultados foram pioneiros.

Na tentativa de estudar melhor o ambiente e pesquisar a influência de outros fatores no desenvolvimento de asma e de sensibilização atópica, avaliamos, também, a exposição desse grupo de lactantes aos alérgenos mais comuns dos ácaros, gatos, cães e baratas (*Der p 1*, *Der f 1*, *Fel d 1*, *Can f 1* e *Bla g 1*) presentes nas amostras de poeira de pisos e camas de suas residências.

A exposição a *Fel d 1*, *Can f 1* e *Bla g 1* foi muito baixa, inferior aos níveis descritos como de sensibilização e próximos aos limites de detecção do método, por sua vez, não se associaram a sibilância recorrente ou à sensibilização das crianças. Os níveis de *Der p 1* encontrados nos pisos foram inferiores aos encontrados anteriormente em outras residências paulistanas (5,7 µg/g) e australianas (22,5 µg/g)<sup>20-22</sup>, mas estavam acima dos níveis de sensibilização em 33/104 residências estudadas (31,7 %, mediana de 1,085 µg/g). Os níveis de *Der p 1* das camas também foram inferiores aos encontrados em outras residências paulistanas (38,4 µg/g), australianas (38,9 µg/g) e do Reino Unido (28,3 µg/g). Entretanto, estavam acima dos níveis de sensibilização em 82/104 residências (78,8%) e acima dos níveis identificados como de desencadeamento de exacerbação aguda em 29/104 (27,8%).

Segundo os nossos resultados, a exposição elevada das nossas crianças ao alérgeno do ácaro (*Der p 1*) parece ter protegido esses lactentes da sibilância recorrente. Quando comparamos a exposição a esse alérgeno no piso, no grupo de crianças com e sem sibilos recorrentes, encontramos nível mediano significativamente menor no grupo sibilante (0,86 µg/g) comparado ao sem sibilância (1,2 µg/g). O *Der p 1* encontrado nos pisos das residências atuou junto aos níveis elevados de endotoxinas das camas como fator protetor do chiado. A exposição a esse alérgeno, também, não apresentou associação com a sensibilização documentada pelos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata.

Nosso resultado se contrapõe a outros estudos que apontam a exposição aos alérgenos intradomiciliares como fator de risco para asma<sup>23,24</sup>. Entretanto, recentemente Platts-Mills et al mostraram que quanto mais elevada a exposição ao alérgeno de gato, menor a sensibilização alérgica, ou seja, crianças expostas a concentrações superiores a 20 µg de *Fel d 1* desenvolveram uma forma de tolerância, com aumento superior a 125 U de IgG a *Fel d 1*<sup>25,26</sup>.

Os níveis de *Der f 1*, observados nos pisos, foram em sua totalidade abaixo dos níveis de sensibilização e, nas camas, foram acima destes em apenas 6/104 residências. Também não houve associação entre seus níveis e a clínica de sibilos recorrentes ou sensibilização.

Avaliamos a sensibilização por teste cutâneo de hipersensibilidade imediata em 90 das 104 crianças estudadas inicialmente. As explicações, para os 14 casos de evasão, foram: nove mudaram para outro Estado, um faleceu com um ano de vida devido à meningite bacteriana e quatro abandonaram o estudo.

A ausência de padrão para definir a sensibilização alérgica em menores de dois anos fez com que analisássemos os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, utilizando dois critérios. Um critério clássico, que considera positivo o diâmetro médio de pápula com pelo menos 3mm, e um outro critério, usado por alguns autores, que considera positivo o diâmetro médio da pápula de 2mm<sup>27</sup>.

Mesmo analisando a sensibilização das duas maneiras diferentes, o grupo de crianças que apresentou sibilos recorrentes não diferiu daquele sem sibilos. Alguns autores, utilizando uma pápula de 2mm como critério de positividade, encontraram prevalência mais elevada de atopia, entretanto, a maioria dos estudos analisou crianças com seis ou mais anos de idade. Uma explicação para a baixa prevalência que encontramos, considerando 3mm de pápula (7/90 - 7%) e 2mm (34/90 - 37,7%), foi a idade da nossa população. A sensibilização nesta fase pode ainda não estar definida. Apesar de não haver significância estatística, no nosso estudo, a resposta cutânea à histamina foi importante, com diâmetro médio de pápula variando de 3 mm a 10 mm. Halasz et al<sup>28</sup> mostraram, em um estudo brasileiro com crianças abaixo de dois anos, que a reatividade cutânea à histamina entre as atópicas era precoce, quando comparada a um grupo controle normal.

O acompanhamento prolongado desses pacientes se faz necessário para sabermos se a sensibilização antecede as manifestações clínicas e se a sua presença já é indicativa de manifestação clínica futura. No caso do nosso estudo, concluímos que as crianças deveriam ser submetidas novamente aos testes cutâneos quando tivessem idade superior a dois anos, principalmente, porque se trata de população de risco elevado para atopia. Será que a resposta elevada à histamina estaria precedendo uma futura sensibilização?

Em conclusão, exposição a níveis mais elevados de *Der p 1* no piso foi fator de proteção para o desenvolvimento de sibilos recorrentes, assim como a exposição a níveis elevados de endotoxinas na cama das residências. Para esclarecer se esses elevados níveis de *Der p 1* e de endotoxinas podem influenciar no desenvolvimento de sensibilização e no aparecimento de asma é fundamental o acompanha-

mento prolongado dessas crianças. Houve correlação significativa entre crianças que apresentaram sibilos recorrentes e presença de infecções respiratórias.

## Referências

1. Leung TF; Li AM. Allergen sensitization in asthmatic children: consecutive case series. *Hong Kong Med J* 2000; 6: 355-60.
2. Duffy DL; Mitchell CA; Martin NG. Genetic and environmental risk factors for asthma: a co twin-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 840-5.
3. Platts-Mills TA; Rakes G; Heymann PW. The relevance of allergen exposure to the development of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2000; S503-S508.
4. Sporik R; Platts-Mills TAE; Cogswell JJ. Exposure to house dust mite allergen of children admitted to hospital with asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 740-6.
5. Tunnicliffe WS; Fletcher TJ; Hammond K; Roberts K; Custovic A; Simpson A et al. Sensitivity and exposure to indoor allergens in adults with differing asthma severity. *Eur Respir J* 1999; 13: 654-9.
6. Leen MG; O'Connor T; Kelleher C; Mitchell EB; Loftus BG. Home environment and childhood asthma. *Ir Med J* 1994; 87: 142-4.
7. Michel O; Ginanni R; Duchateau J; Vertongen F; Le Bom B; Sergysels R. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 441-8.
8. Michel O; Kips J; Duchateau J; Vertongen F; Robert L; Collet H et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1641-6.
9. Gereda JE; Leung DYM; Thatayatikom A; Streib JE; Price MR; Klinnert MD et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitization in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355: 1680-3.
10. Gereda JE; Klinnert MD; Price MR; Leung DY; Liu AH. Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 107: 790-6.
11. Rullo VEV; Rizzo MC; Arruda LK; Solé D; Naspitz CK. Daycare centers and schools as sources of exposure to mite, cockroach, and endotoxin in the city of São Paulo, Brazil. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 582-8.
12. Platts-Mills TAE, De Weck AL. Dust mite allergens and asthma. A worldwide problem\*. Report of International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 416-27.
13. Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides spp* allergens, *Der p I* and *Der f I*. *J Immunol Methods* 1989; 118: 227-37.
14. Pollart SM, Smith TF, Morris EC, Gelber LE, Platts-Mills TAE, Chapman MD. Environmental exposure to cockroach allergens: Analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 505-10.
15. Chapman MD, Aalberse RC, Brown MJ, Platts-Mills TA. Monoclonal antibodies to the major feline allergen Fel d I. II. Single step affinity purification of Fel d I, N-terminal sequence analysis, and development of a sensitive two-site immunoassay to assess Fel d I exposure. *J Immunol* 1988; 140: 812-8.
16. de Groot H, Goei KG, van Swieten P, Aalberse RC. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: serologic activity of affinity-purified Can f I and of Can f I-depleted extract. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 1056-65.
17. von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: S525-32.
18. Park JH, Spiegelman DL, Gold DR, Burge HA, Milton DK. Predictors of airborne endotoxin in the home. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 859-64.
19. Waser M, von Mutius E, Riedler J, Nowak D, Maisch S, Carr D, Eder W, Tebow G, Schierl R, Schreuer M, Braun-Fahrlander C; The ALEX Study team. Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy* 2005; 60: 177-84.
20. Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TA et al. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 433-9.
21. Rizzo MC, Arruda LK, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TAE et al. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. *Ann Allergy* 1993; 71: 152-8.
22. Peat JK, Tovey E, Gray EJ, Mellis CM, Woolcock AJ. Asthma severity and morbidity in a population sample of Sydney schoolchildren: Part II-importance of house dust mite allergens. *Aust N Z J Med* 1994; 24(3): 270-6.
23. Santos ABR, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VPL, Oliver C. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 329-37.
24. Gelber LE, Seltzer LH, Bouzoukis JK, Pollart SM, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Sensitization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 573-8.
25. Platts-Mills et al. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; 357: 752-756.
26. Platts-Mills TAE, Vaughan JW, Blumenthal K, Pollart Squillace S, Sporik RB. Serum IgG and IgG4 antibodies to *Fel d 1* among children exposed to 20 microg *Fel d 1* at home: relevance of a nonallergic modified Th2 response. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 126-9.
27. Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 419-424.
28. Halaz MR, Gonsales SL, Solé D, Naspitz CK. Specific sensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* and cutaneous reactivity to histamine in Brazilian children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997; 2: 98-102.

### Correspondência:

Dirceu Solé  
Rua dos Otonis, 725  
04025-002 - Vila Mariana São Paulo - SP  
Fone/fax: 0XX-11-5579.1590