ADRIANA TEIXEIRA RODRIGUES

**Produção local de IgE e outros mediadores imunológicos no
lavado nasal dos pacientes com rinite alérgica antes e após a
realização de imunoterapia específica com o ácaro
*Dermatophagoides pteronyssinus***

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof Dr Clóvis Eduardo Santos Galvão

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Adriana Teixeira

Produção local de IgE e outros mediadores imunológicos no lavado nasal dos pacientes com rinite alérgica antes e após a realização de imunoterapia específica com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* / Adriana Teixeira Rodrigues. -- São Paulo, 2016.

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

Orientador: Clóvis Eduardo Santos Galvão.

Descritores: 1.Rinite alérgica 2.Líquido da lavagem nasal 3.Imunoterapia
4.Citocinas 5.Testes de provocação nasal 6.Eosinófilos 7.Interleucina-10
8.Interleucina-13 9.Imunoglobulinas 10.Testes cutâneos

USP/FM/DBD-134/16

Dedicatoria

Ao meu esposo, Ivo, pelo amor, paciência e companheirismo durante este trajeto.

Aos meus pais, Antonio e Maria Teresa por terem me dado tantos ensinamentos e por me guiarem nos caminhos corretos.

A minha filha, Clara, minha luz e alegria, meu puro amor.

Aos meus irmãos, Horacio e João, pelos seus exemplos de vida.

As minhas sobrinhas, Mariana e Fernanda, e ao meu sobrinho que esta chegando em breve para somar a nossa família, são minha esperança de futuro e minhas alegrias no presente.

Agradecimentos

A Deus, meu pilar, por ter me permitido concluir esta caminhada.

Ao meu marido, a minha filha, aos meus pais e irmãos que constituem o que há de mais importante em minha vida.

Professor Clóvis Eduardo Santos Galvão

Meu orientador, pela paciência e colaboração, pela sua competência e coerência em me auxiliar nesta tarefa.

Professora Beatriz Manguiera Saraiva Romanholo

A minha gratidão pela sua ajuda e disposição. Pela paciência em me ensinar as técnicas laboratoriais utilizadas neste projeto, pelo auxílio na leitura das laminas, além de sua imensa disposição em me auxiliar todas as vezes que precisei.

Professor Jorge Kalil

Exemplo de profissional a ser seguido e respeitado. Pela sua ajuda e orientação durante esta trajetória de fazer pesquisa e por permitir que se realizasse em seu serviço.

Professor Fabio Fernandes Morato Castro

Por ter aceitado ser meu orientador por um período, mostrando sua confiança em mim.

Professor Edécio Cunha Neto

Auxiliou desde o início do projeto, na formulação do desenho de estudo e também na sua fase final. Mostrando seu profundo conhecimento como pesquisador e paciência em me ajudar todas as vezes que precisei.

Professora Cristina Maria Kokron, Maria Lucia Bueno Garcia e Renata Cantisani di Francesco

Pelo participação em minha qualificação, pelas observações e sugestões muito pertinentes, além da aprovação para continuar no projeto e conclui-lo.

Andreia CK Kuramoto Takara

Pela colaboração na elaboração da metodologia laboratorial do início até o final e pelos ensinamentos oferecidos.

Carlos Roberto de Oliveira Palma

Pelo auxílio na realização voluntária de parte das análises laboratoriais.

Lia Junqueira Marçal e Caroline Faria

Pela realização de parte das análises laboratoriais.

Sr. Jair

Pelo auxílio na elaboração dos relatórios de prestações de contas para a FAPESP, sempre muito diligente.

Rosana Coutinho

Pela realização das aplicações da imunoterapia nos pacientes e pela amizade criada neste percurso.

Osvaldo Junior

Pela pronta ajuda sempre oferecida a mim e aos pacientes nestes anos de trajetória.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina LIM-60, do Laboratório de Imunologia do InCor LIM-19 e Laboratório de Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina LIM-20.

Aos residentes e especializandos do serviço de Alergia e Imunologia HCFMUSP pela ajuda sempre dispensada.

Aos pacientes que colaboraram com este trabalho com os quais criei laços de carinho e respeito.

A todos minha gratidão

O ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete.

Aristóteles

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadro

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Objetivos	2
2	Revisão de Literatura	3
2.1	Rinite Alérgica	4
2.2	IgE Local	7
2.3	Imunoterapia específica.....	9
3	Método	13
3.1	Casuística.....	14
3.2	Cálculo do tamanho da amostra	15
3.3	Alocação dos pacientes	17
3.4	Teste cutâneo	17
3.5	Provocação Nasal	20
3.6	Lavado nasal.....	22
3.7	Avaliação da citologia no lavado nasal	23
3.8	Exames laboratoriais	24
3.8.1	Exames gerais de triagem.....	24
3.8.2	Exames específicos utilizados para as análises do estudo	24
3.9	Uniformização do tratamento de controle da rinite	27
3.10	Avaliação dos sinais e sintomas	28
3.11	Imunoterapia.....	28
3.11.1	Técnica de aplicação.....	29
3.11.2	Esquema posológico	30
3.11.3	Interrupção e reinício da IT	30
3.12	Placebo	31

4	Resultados.....	33
4.1	Casuística.....	34
4.2	Escore de sintomas	35
4.3	Provocação Nasal	37
4.4	Dosagem de Imunoglobulinas	37
4.5	Determinação de Citocinas perfil Th1/Th2 e Th17 no lavado nasal	44
5	Discussão	481
6	Conclusão.....	54
7	Anexos	56
8	REFERENCIAS.....	64

APENDICES

Lista de Abreviaturas

Anvisa	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ARIA	Rhinitis and its Impact on Asthma
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD	Cluster of Differentiation
cel/ml	Células por mililitro
CT	Células Totais
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
<i>Der p</i>	<i>Dermatophagoide pteronissinus</i>
<i>Der p 1</i>	Antígeno específico 1 do ácaro <i>Dermatophagoide pteronissinus</i>
<i>Der p 2</i>	Antígeno específico 2 do ácaro <i>Dermatophagoide pteronissinus</i>
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
E	Eosinófilo
GM-CSF	Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEP	Histamine Equivalent Potency
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G, subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina G, subclasse 4
IL	Interleucina
IT	Imunoterapia
kU/L	Kilounits of allergen specific IgE per litre
L	Linfócito
máx.	Máximo
mcg/ml	Micrograma por mililitro
mg	Miligrama
mín.	Mínimo

ml	Mililitro
mm	Milímetro
MØ	Macrófago
N	Neutrófilo
n	número de pacientes
NALT	Tecido Linfóide Associado ao Tecido Nasal
NIS	Nasal Index Scores
p/v	peso/volume
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PFE	Pico de fluxo expiratório
RA	Rinite Alérgica
RAL	Rinite Alérgica Local
sCD40L	Soluble CD40-ligand
SCIT	Imunoterapia subcutânea
T reg	Linfócito T regulador
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- α	Fator de transformação do crescimento-alfa
TGF- β	Fator de transformação do crescimento-beta
Th	Linfócito T helper
Th0	Linfócito T helper 0
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UBE	Unidades Biológicas Equivalente
UI/L	Unidade Internacional por Litro
VEF1	Volume expiratório forçado no 1º minuto
μ l	Microlitro

Lista de Figuras

Figura 1.	Descrição da média e DP da escala NIS antes e após o tratamento nos grupos placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016).....	36
Figura 2.	Descrição da escala NIS antes e após o tratamento (HCFMUSP, 2016)	36
Figura 3.	Níveis de Igs específicas no Soro no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016).....	38
Figura 4.	Níveis de Igs específicas no Lavado Nasal no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016).....	38
Figura 5.	Níveis de IgE total no Soro (A) e no Lavado Nasal (B) no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)	39
Figura 6.	Níveis de Células Totais no Lavado Nasal no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016).....	39
Figura 7.	Determinação de citocinas IL-10 no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)	45
Figura 8.	Determinação de citocinas IL-13 no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016).....	45
Figura 9.	Determinação de citocinas GM-CSF no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)	46
Figura 10.	Avaliação dos níveis de imunoglobulinas no soro nos pacientes - tratamento tempo 0, 6 e 12 meses.....	47
Figura 11.	Avaliação dos níveis de Imunoglobulinas no lavado nasal nos pacientes- tratamento tempo 0, 6 e 12 meses	47
Figura 12.	Avaliação dos níveis de IgE total no soro e no lavado nasal nos pacientes - tratamento tempo 0, 6 e 12 meses.....	48
Figura 13.	Avaliação dos níveis de células no lavado nasal nos pacientes - tratamento tempo 0, 6 e 12 meses.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Descrição geral da casuística envolvida no estudo	34
Tabela 2.	Características basais da amostra entre os grupos (HCFMUSP, 2016)	35
Tabela 3.	Descrição da média $\pm$ DP e mediana da concentração de extrato de <i>Der p</i> na provocação nasal antes e após o tratamento (HCFMUSP, 2016)	37
Tabela 4.	Avaliação média $\pm$ DP dos níveis de imunoglobulinas e células no soro e lavado nasal, nos períodos pré e pós-tratamento do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)	40
Tabela 5.	Avaliação dos níveis de Imunoglobulinas e células no soro e lavado nasal entre os grupos nos períodos pré e pós-tratamento (HCFMUSP, 2016)	41
Tabela 6.	Avaliação de sintomas a cada concentração de anticorpos administrada em cada grupo. (HCFMUSP, 2016)	43
Tabela 7.	Determinação de citocinas em pg/mL no lavado nasal entre os pacientes do grupo imunoterapia nos períodos inicial e após seis meses. (HCFMUSP, 2016)	44
Tabela 8.	Avaliação dos níveis de imunoglobulinas e células no soro e lavado nasal, nos períodos pré e pós-tratamento do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)	74
Tabela 9.	Determinação de citocinas no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)	75
Tabela 10.	Determinação de citocinas no lavado nasal pré e pós provocação (desafio) em seis meses de acompanhamento, entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)	76
Tabela 11.	Determinação de citocinas no lavado nasal pré e pós provocação (desafio) em seis meses de acompanhamento, entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)	77

Lista de Quadro

Quadro 1. Escores de sintomas nasais (Nasal Index Scores) – para avaliação dos sinais e sintomas da rinite	28
---	----

Resumo

Rodrigues AT. *Produção local de IgE e outros mediadores imunológicos no lavado nasal dos pacientes com rinite alérgica antes e após a realização de imunoterapia específica com o ácaro Dermatophagoides pteronyssinus*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 72p.

A rinite alérgica (RA) é a mais comum doença mediada por IgE, que afeta aproximadamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo. A RA é a expressão clínica da ligação entre anticorpos do tipo IgE e antígenos na mucosa nasal resultando em inflamação. Estes anticorpos foram detectados na secreção nasal de pacientes com rinite alérgica. Na abordagem da doença, temos a imunoterapia específica (IT) como único tratamento imunomodulatório antígeno específico. Foi demonstrado que IT gera uma diminuição da resposta tardia ao alérgeno tanto na pele como na mucosa do trato respiratório e esta redução se correlaciona com diminuição no número de células infiltrando os tecidos e na quantidade de mediadores inflamatórios. Objetivo: Determinar a resposta local de IgE específica e IgG4 específica no lavado nasal de pacientes com rinite alérgica antes e após o tratamento com imunoterapia alérgeno específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* por um período de 6 meses; determinar a resposta inflamatória padrão Th1/ Th2/ Th17 e avaliar escore de sintomas e contagem de células no lavado nasal. Método: Selecionamos pacientes sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus* com diagnóstico de rinite alérgica persistente. Realizamos as análises de sintomas nasais através da escala NIS e antes de iniciar o tratamento estes indivíduos realizaram provocação nasal com alérgeno e coleta de lavado nasal. Após 6 meses de tratamento IT e placebo estes pacientes foram reavaliados. Realizamos a análise de Imunoglobulinas (IgE específica para *Der p* 1 e 2, IgE total, e IgG4 específica para *Der p* 1), contagem de células totais, citocinas padrão Th1/Th2 e Th17. Resultados: Analisamos 19 pacientes no grupo imunoterapia e 17 no grupo placebo. A avaliação dos sintomas pela escala NIS após 6 meses de intervenção, demonstrou diferença significativa nos grupos placebo e imunoterapia, em favor da IT. A concentração do extrato utilizado na provocação nasal foi maior no grupo imunoterapia após os 6 meses de tratamento mas sem significância estatística. Quanto a dosagem das imunoglobulinas observamos diminuição da IgE total após a intervenção assim como da contagem de células totais no lavado nasal. A dosagem das citocinas livres no lavado nasal não sofreram alterações significativas. Na provocação nasal observamos aumento de IL-13, IL-10 em ambos os grupos, independente da fase de tratamento. Conclusão: Não observamos nenhuma resposta local de IgE específica e IgG4 específica no lavado nasal de pacientes com rinite alérgica antes e após o tratamento com imunoterapia alérgeno específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* por um período de 6 meses. Houve melhora no escore de sintomas e diminuição da IgE total e da contagem de células no lavado nasal.

Descritores: 1.Rinite alérgica 2.Líquido da lavagem nasal 3.Imunoterapia 4.Citocinas 5.Testes de provocação nasal 6.Eosinófilos 7.Interleucina-10 8.Interleucina-13 9.Imunoglobulinas 10.Testes cutâneos

Summary

Rodrigues AT. *Local production of IgE and other immune mediators in the nasal lavage fluid of patients with allergic rhinitis before and after the realization of specific immunotherapy with *Dermatophagoides pteronyssinus**[Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016. 72p.

Allergic rhinitis (AR) is the most common disease mediated by IgE, affecting approximately 500 million people worldwide. The AR is the clinical expression of the link between the IgE-antibodies and antigens in the nasal mucosa resulting in inflammation. Such antibodies were detected in nasal secretions of allergic rhinitis patients. As treatment for this morbidity there is specific immunotherapy (IT) as only immunomodulatory specific antigen approach. It was demonstrated that IT generates a decrease in the late response to the allergen both in the skin and in the mucosa of the respiratory tract and this reduction correlates with the decrease in the number of infiltrating cells and in the amount of inflammatory mediators. Objective: To determine the local response of specific IgE and IgG4 in nasal lavage fluids of patients with allergic rhinitis before and after treatment with specific allergen immunotherapy to house dust mite for a period of 6 months; determine the standard inflammatory response of Th1 / Th2 / Th17 and evaluate symptom score and cell counts in nasal lavage. Method: We selected patients sensitized to *Dermatophagoides pteronissinus* diagnosed with persistent allergic rhinitis. Nasal symptoms were assessed by Nasal Index Score, and before treatment, allergen nasal challenge and collection of nasal lavage fluid were performed. After 6 months of treatment or placebo, the patients were reevaluated. IgE specific for *Der p* 1 and 2, total IgE and IgG4 specific for *Der p* 1, total cell count were determined as well as Th1 / Th2 and Th17 cytokines. Results: We analyzed 19 patients in the immunotherapy group and 17 in the placebo group. The evaluation of symptoms by NIS scale after 6 months of intervention showed significant differences in favor of the immunotherapy group. The concentration of the extract used in the nasal challenge was higher in the immunotherapy group after 6 months of treatment but without statistical significance. The total IgE decreased after the intervention as well as the total cell count in nasal lavage. The dosage of the free cytokines in nasal lavage fluid did not change significantly. In the nasal provocation we observe an increasing in IL-13 and IL-10 in both treatment groups. Conclusion: We observed no local changes in specific IgG4 or specific IgE response in nasal lavage fluid of patients with allergic rhinitis before and after treatment with specific allergen immunotherapy to house dust mite for a period of 6 months. There was an improvement in symptom scores and a decreased of total IgE and cell counts in nasal lavage.

Descriptors: 1.Rhinitis, allergic 2.Nasal lavage fluid 3.Immunotherapy 4.Cytokines 5.Nasal provocation tests 6.Eosinophils 7.Interleukin-10 8.Interleukin-13 9.Immunoglobulin 10.Skin tests

1 Introdução

1.1 Objetivos

Objetivo primário

Determinar a resposta local de IgE específica no lavado nasal de pacientes com rinite alérgica antes e após o tratamento com imunoterapia alérgeno específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* por um período de seis meses;

Determinar a resposta local de IgG4 específica no lavado nasal de pacientes com rinite alérgica antes e após o tratamento com imunoterapia alérgeno específica para *Dermatophagoides pteronyssinus* por um período de seis meses;

Objetivos secundários

Determinar a resposta inflamatória padrão Th1/ Th2/ Th17 através da dosagem no lavado nasal de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33 e sCD40L.

Avaliar, na população estudada, a efetividade da imunoterapia específica por via subcutânea para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* no tratamento da rinite alérgica através de escore de sintomas e contagem de células no lavado nasal.

2 Revisão de Literatura

2.1 Rinite Alérgica

A rinite alérgica (RA) é a mais comum doença mediada por IgE, que afeta aproximadamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo (Gómez et al., 2015). Sua prevalência tem aumentado gradualmente, sobretudo em cidades industrializadas onde há maior densidade demográfica (Kim et al., 2014). Portanto, atinge de 20% a 40% da população mundial. É uma doença com maior ocorrência nas crianças, mas se sabe que, hoje em dia, 5,4% a 10,7% das pessoas acima de 65 anos apresentam rinite alérgica. No entanto, a prevalência real mundial da doença em adultos não foi ainda estabelecida (Ozturk et al., 2015; Pefura-Yone et al., 2015).

A rinite alérgica impacta negativamente a vida social, o desempenho escolar e a produtividade do trabalho dos pacientes, além de produzir um grande ônus econômico sobre os governos. Frequentemente, a RA apresenta comorbidades como a conjuntivite alérgica e outras doenças respiratórias, como a rinosinusite e, especialmente, a asma (Gómez et al., 2015). A rinite alérgica é a expressão clínica da ligação entre anticorpos do tipo IgE e antígenos na mucosa nasal resultando em inflamação e sintomas clássicos de coriza, espirros, obstrução nasal e prurido (Bousquet et al., 2008). Trata-se da forma mais comum de rinite e acomete aproximadamente 113 milhões de pessoas na Europa e 30 a 60 milhões nos Estados Unidos (Hankin et al., 2014); segundo o estudo ISAAC fase III, 27,4, 30,1% dos adolescentes de São Paulo apresentam sintomas compatíveis com rinite alérgica (Sole et al., 2006), contudo, não é estabelecida a prevalência real em adultos no Brasil.

Em 2001 foi publicada a iniciativa ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) que classificou a rinite alérgica em persistente ou intermitente, de acordo com a frequência dos sintomas, e em leve ou moderada/grave a depender do nível de interferência na qualidade de vida do paciente (Bousquet et al., 2008). Apesar da definição de rinite alérgica depender da demonstração de sensibilização IgE-mediada causando sintomas na mucosa nasal, há vários outros mecanismos imunes envolvidos em sua fisiopatologia. Razões não inteiramente claras, envolvendo fatores genéticos e ambientais induzem a produção de IgE. Sabe-se, contudo, que características do sistema imune são essenciais. (Saarinen et al., 1984; Hallstrand et al., 2004).

Existem fenótipos de células T auxiliaadoras ou *T helper* (Th): um produtor de Interferon-gama (IFN- γ) e Interleucina-2 (IL-2) e outro produtor de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, denominados, respectivamente, Th1 e Th2 (Mosmann et al., 1986). Esta dicotomia tem sido usada para explicar as diferentes respostas imunes. As doenças alérgicas foram caracterizadas por uma polarização Th2, sabendo-se hoje que IL-4 e IL-13 levam à produção de IgE e IL-5 à produção de eosinófilo. Enquanto que IL-10 inibe de forma intensa o surgimento de linfócitos Th1, foi detectada ação desta mesma interleucina na inibição da resposta Th2, menos intensamente. A evolução do entendimento da fisiopatologia das doenças imunológicas acarretou à caracterização de outros fenótipos de linfócitos *T helper*: Treg e Th17 (Oboki et al., 2008). Os linfócitos T reguladores (Treg) são células regulatórias da resposta imune, sobretudo através da produção de IL-10, mas também de TGF- α (*Transforming Growth Factor alpha*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) e, provavelmente, de outros fatores. Os linfócitos Th17 são produtores, principalmente, de IL-17 e têm um papel ainda a ser esclarecido na resposta imune alérgica.

Não está nítido quais fatores causam, inicialmente, a polarização dos linfócitos Th2 e subsequente estímulo à produção de IgE. Diferentes fatores na mucosa nasal podem levar às alterações no padrão de ativação das células dendríticas que devem estimular os linfócitos T virgens (Th0) e definir o destino (Th1, Th2, Th17, Treg) destes. Sabe-se que alguns alérgenos têm atividade enzimática, clivam receptores ativados por protease, ativando diferentes tipos celulares e rompendo a barreira epitelial (Reed et al., 2004); podem, assim, influenciar as células dendríticas sem necessidade de IgE pré-formada. Poluentes, infecções virais, fatores genéticos e, possivelmente, fatores epigenéticos parecem estar envolvidos.

A produção de imunoglobulina E resulta da interação entre células as B e T, mastócitos e basófilos e algumas citocinas como IL-4, IL-13 e IL-18 assim como uma interação entre as células B e T através da ação de moléculas de adesão (van Vlasselaer et al., 1992). As células Th2 (Romagnani et al., 2004) e um estímulo negativo para as células T regulatórias (Romagnani et al., 2006, Akdis et al., 2006) levam à produção de IgE, além de seu recrutamento, maturação, sobrevivência e função efetora de outras células como eosinófilos, basófilos e mastócitos.

Alguns pacientes apresentam sintomas de rinite, porém não apresentam presença sistêmica de IgE específica *in vivo* ou *in vitro*. Powe (2006) propôs o termo entopia para aqueles pacientes com sensibilização alérgica na mucosa nasal e não sistêmica. Havendo produção local de IgE os níveis sistêmicos podem estar abaixo dos níveis detectáveis por exames ou podem ocorrer por ausência de exames para investigar alérgenos como aracnídeos, insetos, crustáceos etc. que podem ser os causadores destes sintomas (Carney et al., 2001).

2.2 IgE Local

A produção local de imunoglobulina E (IgE) tem sido estudada há mais de 40 anos e por muito tempo a produção de IgE por células B foi observada nos tecidos linfoides locais. Desta forma, também tem sido descrita sua produção localmente tanto na mucosa nasal quanto na mucosa brônquica (Cameron et al., 2000, Smurthwaite et al., 2002). Antes de 1970, os anticorpos IgE específicos haviam sido detectados na secreção nasal de pacientes com rinite alérgica. Em 1979, Plats-Mills usou a provocação nasal para investigar a produção de IgE, IgG e IgA na secreção nasal e salivar em indivíduos com rinite e sem rinite, encontrando um aumento no número de células na secreção nasal, mas não na salivar de indivíduos com rinite. (Powe et al., 2006)

A mucosa nasal representa a primeira linha de defesa contra infecções, cuja ação ocorre através das células do sistema imune e do tecido linfóide, o qual organizado conectado com o epitélio respiratório é denominado Tecido Linfóide Associado ao Tecido Nasal (NALT) e equivale anatomicamente à tonsila adenoideana em humanos. As fibras simpáticas cervicais são capazes de modular a resposta imune local e podem agir junto com o sistema NALT (Marafetti et al., 2014).

Sabe-se que as células B virgens maduras encontram o antígeno processado e apresentado pelas células dendríticas em órgãos linfoides periféricos. Elas ficam ativadas após a interação com células T específicas. Após sua ativação as células B têm duas opções: podem migrar para o folículo, proliferar e formar centros germinais, ou migram para uma região extrafolicular, proliferam e diferenciam-se em células plasmáticas de curta duração. As células B no centro germinativo sofrem maturação da afinidade do anticorpo por meio de hipermutação somática, recombinação, expansão clonal e seleção. Isso levará a diferenciação desta célula B em IgE específica (De Schryver et al., 2015).

A mucosa nasal é continuamente exposta a material antigênico, serve como barreira e também induz a resposta imune como, por exemplo, a IgA (Debertin et al., 2003). Na mucosa nasal, os mastócitos produzem grandes quantidades de mediadores comparados com as células T e mostram a possibilidade de manter a produção IgE confinado a poucas células B em indivíduos alérgicos (Powe et al., 2006).

A IgE refere-se a um anticorpo importante que contribui na defesa de múltiplas doenças das vias aéreas, incluindo RA e rinosinusite crônica. No entanto, medidas da IgE por testes sistêmicos clássicos não conseguem dar uma ideia adequada da quantidade de IgE local no órgão alvo, o nariz (De Schryver et al., 2015).

O grupo de Eckl-Dorna investigou o papel das células B derivadas do sangue periférico e sua produção de IgE específica e concluiu que a maioria dos anticorpos IgE específicos circulantes não é derivado de células produtoras de IgE no sangue. Este resultado sugere que a produção no órgão alvo é a fonte provável (Eckl-Dorna et al., 2012).

A evidência de produção local de IgE na RA ocorre porque se descreveu a produção local de IgE *in vitro* e *in vivo*, neste caso as células B positivas para IgE residiriam na mucosa nasal. A possibilidade de que esta IgE seja produzida localmente no órgão alvo foi proposta pela primeira vez depois de um experimento em crianças com RA por ácaros da poeira, a IgE foi medida no soro e em secreções nasais antes e após provocação nasal. Verificou-se que, após a reexposição, a IgE local aumentou mais rapidamente do que a IgE do soro (Sensi et al., 1994), reforçando a hipótese da rinite alérgica local. Alguns autores sugerem a indicação de imunoterapia alérgeno específica como opção terapêutica para estes casos (Róndon et al., 2011; Róndon et al., 2012).

2.3 Imunoterapia específica

Atualmente o único tratamento imunomodulatório antígeno específico usado em larga escala, a imunoterapia específica (IT) consiste na administração de repetidas doses de alérgeno com o objetivo de reduzir os sintomas, aumentar a qualidade de vida e induzir a tolerância ao alérgeno (Cingi et al., 2014). Embora tenham existido estudos anteriores, foi em 1911 que Leonard Noon e John Freeman, do Departamento de Inoculações do Hospital Saint Mary de Londres, publicaram os artigos chave que permitiram a popularização de “inoculações profiláticas” pré-sazonais como tratamento padrão para febre do feno (tipo de rinite sazonal grave) (Cohen et al., 2003).

Conforme o consenso ARIA e outros, o tratamento farmacológico é apenas parte do tratamento das doenças alérgicas respiratórias, devendo coexistir com a educação do paciente, o controle ambiental e a imunoterapia. Esta deve ser considerada nos pacientes que tenham anticorpos IgE específico relevante contra um alérgeno (Cingi et al., 2014). Embora diferentes vias de administração estejam disponíveis, a imunoterapia específica subcutânea (SCIT) tem sido sugerida como a primeira escolha para adultos e crianças com RA causados pelo *Dermatophagoides pteronissinus* (*Der p*). A imunoterapia específica subcutânea visa a modificar a resposta alérgica subjacente na RA, que é caracterizada por um padrão de tipo Th2, com libertação de IL-4, IL-5 e IL-13 e de baixa produção de IFN- γ , provocando uma inclinação para padrões Th1 (Gómez et al., 2015).

Os efeitos das medicações cessam com a sua interrupção (Bousquet et al., 2008), mas os efeitos da imunoterapia, pelo contrário, adequadamente indicada são duradouros (Durham et al., 1999; Jacobsen et al., 2007). Alguns estudos demonstram a diminuição de escores de sintomas e medicações doze anos depois do final da imunoterapia, com menor índice de novas sensibilizações e tendência a menor desenvolvimento de asma no

grupo ativo(Jacobsen et al., 2007). Alguma resposta à imunoterapia alérgeno específica necessita de adequada identificação do alérgeno e de sua seleção baseada na história clínica, nível de exposição e resultado dos testes. A indicação da imunoterapia ocorre naqueles com rinite alérgica, rinoconjuntivite e asma (Cingi et al., 2014).

Quanto à eficácia, atinge mais de 90% em alergia ao veneno dos insetos himenópteros (abelhas, formigas e vespas)(van Halteren et al.,1996; Golden et al., 2007), com menor efeito para os aeroalérgenos. Há metanálises demonstrando eficácia da imunoterapia para pólenes no tratamento da rinite e asma na população pediátrica (Passalacqua et al., 2007; Abramson et al., 2003), enquanto para ácaros há estudos duplo-cegos controlados com placebo (Guimarães et al., 2008) que mostram um nível de evidência em populações europeias e chinesas. Estudos em adultos que receberam tratamento com imunoterapia para pólenes por período de três anos observaram a redução dos sintomas clínicos em 30% e 40% de diminuição do uso de antialérgicos (Cingi et al., 2014). Há estudos que mostram a prevenção de evolução para asma em crianças sibilantes (Elizur et al., 2014).

Os mecanismos da imunoterapia não são totalmente compreendidos, pois a resposta imunológica à imunoterapia é caracterizada pela diminuição dos sintomas nos órgãos alvo e mudança na resposta humoral e celular. Isso gera diminuição na resposta imediata e tardia da pele, conjuntiva, mucosa nasal e brônquica exposição ao alérgeno. Além disso, há diminuição da presença de eosinófilos, basófilos e mastócitos (Cingi et al., 2014; Kim et al., 2014). O controle da síntese de IgE se dá, principalmente, através da influência dos linfócitos Th2 sobre os linfócitos B. A produção de IgE irá se ligar aos anticorpos IgG induzindo uma supressão alérgeno específica da atividade celular de basófilos e mastócitos (Gómez et al., 2015).

A presença de IgE, contudo, não é o único fator que determina a reatividade e presença de sintomas, pois a sensibilização (*i.e.*: teste cutâneo ou IgE específica sérica positiva) não se correlaciona com a clínica na totalidade dos casos. Um dos primeiros efeitos da imunoterapia é a redução da resposta tardia ao alérgeno (Francis et al., 2008), que foi demonstrada tanto na pele como na mucosa do trato respiratório. Esta redução da resposta inflamatória tardia se correlaciona com a diminuição no número de células infiltrando nos tecidos e na quantidade de mediadores inflamatórios (Kim et al., 2014; James et al., 2008). Foi demonstrada também que esta diminuição da resposta tardia é precedida por um aumento na expressão de IL-10 em células mononucleares de sangue periférico estimuladas com alérgeno e antecede a produção de IgG4 (Roger et al., 2014). Paralelamente, há diminuição da liberação de histamina por fatores séricos dos pacientes submetidos à imunoterapia (Francis et al., 2008).

Há também uma primeira geração de células T reguladoras específicas que podem levar à produção de IL-10 e TGF- β , ambos importantes na indução de tolerância (Gómez et al., 2015). O aumento da IgG específica pode ser observado em seis meses de tratamento, e é seguido pela diminuição da IgE, além de outras alterações inflamatórias já descritas (Cox et al., 2007).

O aumento dos níveis de linfócito CD41 (*cluster differentiation*) e CD251 que secretam Interleucina 10 (IL-10) e TGF- β é evidente e associado ao mecanismo de tolerância imunológica (Cingi et al., 2014). Há na literatura vários estudos demonstrando o aumento da presença de linfócitos Treg secretores de IL-10 e/ou TGF- β e do aumento de IgG1, IgG4 e IgA (Elizur et al., 2014; Cingi et al., 2014) e o aumento inicial de IgE específica seguido pela sua diminuição (Cingi et al., 2014). Em geral, há mudança da resposta Th2 para uma resposta Treg ou Th1 (Biagtan et al., 2014).

É fato que a redução da resposta cutânea imediata ocorre apenas muito depois da resposta tardia e da resposta clínica, contudo, os mecanismos que fazem com que haja resposta clínica mesmo sem diminuição da IgE sérica específica não estão claros. Os mecanismos que fazem com que crianças submetidas à imunoterapia apresentem menor número de novas sensibilizações no longo prazo também não estão nítidos (Inal et al., 2007). Embora muitos estudos avaliem a resposta imunológica da imunoterapia subcutânea, ainda existe um grande número de dúvidas a ser esclarecida.

Observa-se que existem pacientes com quadro clínico sugestivo de rinite, mas não apresentam IgE específica sistêmica. Alguns destes pacientes apresentam IgE específica local e recebem o diagnóstico de rinite alérgica local (RAL). Há autores que defendem o uso da imunoterapia nestes casos. Porém, pouco se sabe acerca das alterações produzidas pela imunoterapia na mucosa nasal dos pacientes com RA que apresentam IgE específica sistêmica. Desta forma, este estudo tenta avaliar estas alterações da IT na mucosa nasal na RA para posteriormente correlacionar com as alterações apresentadas na IT dos pacientes com RAL.

3 Método

3.1 Casuística

O projeto foi aprovado pela CAPPesq, sob o número 0360/11 na sessão do dia 13 de julho de 2011 e patrocinado pela Fapesp, processo 2001/11192-2. Foram selecionados os pacientes com rinite alérgica persistente no ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo durante um período de doze meses, de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para serem selecionados os pacientes deveriam contemplar os seguintes itens:

- Idade maior que 18 anos;
- Diagnóstico de rinite alérgica persistente moderada/grave de acordo com as diretrizes do documento ARIA (Brozek et al., 2010);
- Presença de sensibilização clinicamente relevante ao ácaro *Der p* (teste cutâneo positivo com pápula maior que 3 mm);
- Aderência ao tratamento confirmada através do preenchimento dos formulários ao longo de três meses (Carney et al., 2001); e
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Enquanto os excluídos apresentavam os seguintes empecilhos:

- Uso de tratamento imunomodulador nos últimos cinco anos;
- Tratamento prévio com imunoterapia alérgeno específica;

- Asma persistente moderada ou grave e VEF1 < 80%;
- Gravidez;
- Analfabetismo;
- Doença psiquiátrica;
- Uso contínuo de b-bloqueadores;
- Doenças cardiovasculares, insuficiência de órgãos e doenças que aumentem o risco dos efeitos colaterais da adrenalina;
- Outras doenças imunológicas, autoimunes ou malignidade;
- Presença de múltiplas sensibilizações clinicamente relevantes.

Foram descontinuados do estudo os pacientes que:

- Não tiveram aderência ao tratamento através de preenchimento de questionário de escore de medicação.
- Não tiveram aderência ao tratamento de imunoterapia apresentando três faltas seguidas durante a fase de indução.

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

A variável de análise primária deste estudo foi a resposta local de IgG4 específica na mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica antes e após o tratamento com imunoterapia alérgeno específica por um período de seis meses.

As hipóteses a serem testadas foram:

H_0 : Não há diferença entre a média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia no grupo controle e a média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia no grupo tratamento.

H_1 : A média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia no grupo tratamento é superior à média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia no grupo controle.

O cálculo adotado para a definição do tamanho de amostra do estudo foi feito seguindo a fórmula (Dawson et al., 1994) e os critérios descritos a seguir:

- σ : desvio padrão da média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia de 17 mg/L.
- μ_1 : média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia no grupo tratamento.
- μ_2 : média das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia no grupo controle.
- diferença esperada entre as médias das diferenças do valor de IgG4 específica na mucosa nasal antes e após seis meses de imunoterapia ($\mu_1 - \mu_2$) a ser detectada de 14 mg/L.
- nível de significância (α) adotado de 5% $\rightarrow Z_\alpha = 1,64$.
- poder do teste ($1 - \beta$) de 80% $\rightarrow Z_\beta = 0,84$.
- alocação uniforme dos pacientes aos grupos de tratamento (1:1).

O número mínimo de pacientes avaliáveis para cada um dos grupos, obtido a partir da fórmula mencionada, deve ser de 19 pacientes.

Estimando-se uma taxa de perda de pacientes (taxa de *drop-out*) no decorrer do estudo de 30%, deverá ser de forma aleatória para cada grupo **28 pacientes**, 56 no total, conforme cálculo apresentado a seguir: $N - (0,30 \times N) = 19 \rightarrow N = 28$.

3.3 Alocação dos pacientes

O método de alocação dos pacientes foi realizado através da inclusão de acordo com a sequência em que foram realizados os exames e o seguimento de três meses. Eram incluídos por ordem nos grupos A e B. Ao término de seis meses de tratamento, os grupos foram abertos. (Grady et al., 2008).

3.4 Teste cutâneo

Os testes de leitura imediata com aeroalérgenos são utilizados para determinar a presença de IgE específica *in vivo*, sendo o método de escolha para o diagnóstico etiológico das doenças atópicas. São de fácil execução, boa reprodutibilidade, têm alta sensibilidade e especificidade, além de representarem exame de baixo custo quando comparados com métodos laboratoriais *in vitro* (Spector et al., 1995).

Os extratos alergênicos utilizados para pesquisa de IgE específica neste estudo são mencionados no Quadro 1 com as concentrações referentes a cada alérgeno testado.

Os extratos foram fornecidos pelo Laboratório Immunotech que tem aprovação da Anvisa para comercialização deste produto no Brasil e são padronizados, glicerinados a 50% com fenol a 0,4%.

Para a realização do teste de puntura foi utilizada a técnica modificada por Pepys (1975), como descrito a seguir:

- A região do teste (superfície volar do antebraço) foi limpa suavemente com algodão embebido em álcool a 70%, 3 centímetros abaixo da fossa antecubital e 5 centímetros acima do pulso, sem nenhum traumatismo, a fim de evitar a irritação da pele;
- Foram feitas 11 marcas na região do teste, utilizando-se uma caneta dermatográfica, a uma distância de aproximadamente 2 cm uma da outra, disposta em duas linhas paralelas;
- Colocou-se uma gota de cada alérgeno perto da marca correspondente, sempre com a mesma disposição dos extratos alergênicos;
- A pele foi perfurada pressionando-se uma lanceta descartável (ALK LANCET®) através do extrato (uma para cada antígeno) sobre a superfície da pele, e num ângulo de 90°, durante cinco segundos, evitando-se sangramento;
- A pele foi seca com papel absorvente macio, sem pressioná-la ou esfregá-la;
- Utilizou-se a histamina (10mg/ml) como controle positivo e solução diluente como controle negativo. A solução de histamina desencadeia um edema ou pápula com diâmetro de 5 a 8 mm. Para o controle negativo foi utilizado solução fisiológica 0,9% (Brydonet al., 1998).

Para a leitura dos testes de puntura, foram medidos com uma régua milimetrada e calculada sua média aritmética por meio da medida do maior diâmetro do edema e o seu respectivo diâmetro ortogonal.

Os testes considerados positivos foram aqueles com pápula maior que 3mm da média comparado ao controle negativo, subtraindo-se o tamanho da pápula do controle negativo, caso houvesse, após a leitura de 20 minutos (Dreborg et al., 1989).

Os resultados foram copiados com uma fita adesiva transparente e transportados para um papel na mesma ordem que se indicou no formulário.

Para que os testes falso-negativos fossem evitados, certos medicamentos foram suspensos antes do teste, como por exemplo, anti-histamínicos e antidepressivos tricíclicos, em períodos variáveis conforme o tempo de ação destas medicações.

Concentração dos alérgenos nos extratos utilizados:

- *Dermatophagoides pteronyssinus* (10 HEP*¹/ml)
- *Blomia tropicalis* (10 HEP/ml)
- *Aspergillus fumigatus* (1:2 p/v*²)
- *Penicillium notatum* (1:2 p/v)
- *Periplaneta americana* (1:2 p/v)
- *Blatella germanica* (1:2 p/v)
- *Canis familiaris* (1:2 p/v)
- *Felis domesticus* (1:2 p/v)
- *Polens mix* (1:2 p/v)
- *¹ HEP: Histamine Equivalent Potency
- *² p/v: peso/volume

Para aumentar a reprodutibilidade, incluíram-se neste estudo os pacientes que apresentaram o teste cutâneo de leitura imediata para *Dermatophagoides pteronyssinus* maior ou igual a 3 milímetros e os demais alérgenos foram negativos ou aqueles com teste positivo para *Dermatophagoides pteronyssinus* maior que o teste positivo para *Blomia tropicalis*, pois na casuística havia um grande número de pacientes positivos para estes dois ácaros. Aqueles que tinham testes positivos para *Blomia tropicalis* maior que *Dermatophagoides pteronyssinus* foram excluídos, pois a imunoterapia aplicada continha apenas o extrato para *Dermatophagoides pteronyssinus*.

3.5 Provocação Nasal

O teste de provocação nasal pode ser utilizado para confirmar a reatividade nasal ao alérgeno antes do início da imunoterapia alérgeno específica e também como um parâmetro de controle pós-imunoterapia. (Tantilipikorn et al., 2010, Naclerio et al., 1997) Todos os pacientes realizaram nasofibroscopia para avaliar a presença e a gravidade de desvio de septo nasal, polipose nasal ou outra comorbidade que contra indicasse o procedimento (Naclerio et al., 1997).

Para a realização da provocação nasal, o paciente não podia estar em uso de corticosteroide nasal pelo período de um mês e corticosteroide oral por duas semanas (dose maior que 10mg por dia), de anti-histamínicos ou descongestionantes oral por um período de duas semanas e anti-hipertensivo inibidor da enzima conversora de angiotensina por três semanas, (grupo controle e placebo), pois o uso destas medicações poderia causar interferência nos resultados (Róndon et al., 2007; Tantilipikorn et al., 2010). Os pacientes que haviam sido submetidos à cirurgia nasal só poderiam fazer o teste de provocação nasal após oito semanas do procedimento cirúrgico. Todos os procedimentos

foram realizados no período da manhã a fim de minimizar a interferência do ciclo nasal (Tantilipikorn et al., 2010).

Os pacientes responderam ao questionário de sintomas referentes ao dia da provocação nasal de acordo com a presença de obstrução, rinorreia, prurido nasal e espirros. Os sintomas foram graduados de 0 a 3 onde 0 = sem sintomas, 1 = sintomas leves (sintomas presentes com tempo de duração pequeno), 2 = sintomas moderados (sintomas frequentes sem atrapalhar as atividades diárias ou o sono) ou 3 = sintomas graves (sintomas frequentes que atrapalharam as atividades diárias ou o sono). O escore de sintomas variou de 0 a 12 e sua gravidade foi classificada da seguinte maneira: leve (0 – 4), moderada (5 – 8) e grave (9 – 12) (Róndon et al., 2007).

O princípio da provocação nasal é aplicar na narina a substância a ser testada em concentrações crescentes e avaliar os sintomas. Os sintomas oculares e brônquicos podem ser relatados pelos pacientes. (Tantilipikorn et al., 2010) A provocação nasal foi iniciada com a aplicação de solução salina, para afastar a hiper-reatividade nasal e seguida pela solução reconstituída de *Dermatophagoides pteronyssinus* na concentração de 0,04 – 0,4 – 1 – 2 e 4 mcg/ml no intervalo de quinze minutos através de dispositivo em *spray* nasal (dois borrifos em cada narina) do Laboratório de Formulações Especiais FDA – Allergenic LTDA.

Foi considerada positiva a provocação quando houve um aumento de 30% nos valores dos escores clínicos, comparados aos basais. Este critério de positividade foi baseado em estudos prévios (Róndon et al., 2007). Após uma hora da positividade da provocação nasal o paciente foi submetido a novo lavado nasal.

3.6 Lavado nasal

A coleta de material do lavado nasal foi realizada segundo a técnica proposta por Wang (Wang et al., 1995) que se trata de uma modificação da técnica de Hilding (Hilding et al., 1972) e consiste:

- Na colocação de um cateter de dupla via - Sonda de Foley nº14 – no vestíbulo nasal.
- O balão é inflado com 7 ml de ar para criar um selo de vedação na narina.
- Com a cabeça levemente inclinada para frente, evitando o refluxo de líquido, procede-se o lavado da cavidade nasal com uma seringa contendo 10 ml de solução salina em cada narina.
- O ciclo lavagem-aspiração é repetido três vezes de cada lado.
- Após a lavagem de cada narina, o paciente faz a expulsão da secreção em recipiente coletor de inox.
- O material do lavado é imediatamente transportado em gelo.
- O material é centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm a 4°C.
- O sobrenadante é concentrado através do uso do filtro Centricon para um volume de 1 ml e separado em alíquotas de 250ml, que são armazenados em freezer a -80°C onde permanecerão estocadas até a realização das análises laboratoriais.
- O sedimento (botão celular) será preparado para a avaliação da citologia.

3.7 Avaliação da citologia no lavado nasal

Realizou-se a contagem de células no lavado nasal coletado pré e pós-provocação nasal antes e após o tratamento (imunoterapia e placebo) pelo Cytospin através do sedimento nasal que foi processado no dia da coleta.

A análise do material do lavado nasal foi realizada como descrita a seguir, cuja técnica foi modificada de Blaski e Bascom (Bascom et al., 1988; Blaski et al., 1996):

- Após coletado, o lavado nasal é transportado em gelo;
- Realiza-se centrifugação a 1800rpm 4°C por quinze minutos;
- O sobrenadante é separado do sedimento (botão celular);
- O botão celular é ressuspensão com 0,4ml de botão fosfato (PBS) (solução 1);
- A solução mãe de ditioneitol (DTT) é preparada (1ml PBS em 10 mg de DTT = 1%);
- A solução filha de DTT é obtida = 0,05ml solução mãe de DTT + 0,45ml PBS = 0,5ml solução (DTT + PBS) (solução 2);
- Acrescenta-se 0,4ml solução 2 com 0,4ml da solução 1;
- Deixa-se em banho-maria em agitação por 20 minutos;
- Centrifuga-se por dez minutos em 1.800 rpm à 4°C;
- O sobrenadante é desprezado;
- Ressuspensão-se o botão celular com 0,3ml de PBS;
- Montam-se as lâminas no cytospin, acrescenta-se 0,1ml do lavado nasal e centrifuga-se a 450 rpm por seis minutos na Centrífuga Shandon III (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA);

- Deve-se corar as lâminas com o corante Diff – Quick (Diff – Quick; New Prov LTDA., Paraná, Brasil) e deixa secar;
- Realiza-se a contagem do diferencial das células em microscópio;
- Realiza-se a contagem de células totais pela Câmara de Neubauer.

3.8 Exames laboratoriais

3.8.1 Exames gerais de triagem

Antes do início da imunoterapia, foram realizadas dosagens séricas de IgA , IgG e IgM, hemograma e protoparasitológico de fezes. Os pacientes que apresentaram qualquer alteração em qualquer um destes exames foram excluídos para não gerar nenhum viés na análise. Estas análises foram realizadas pelo laboratório do Instituto Central do HCUSP.

3.8.2 Exames específicos utilizados para as análises do estudo

3.8.2.1 Dosagem de IgE específicas

As dosagens de IgE específicas foram realizadas para *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p 1* e *Der p 2*) através da técnica de ImmunoCAP, em amostras do soro e no sobrenadante do lavado nasal, realizado em dois momentos, antes e após o período de indução da imunoterapia (26 semanas). As amostras permaneceram armazenadas a -80 °C para serem processadas posteriormente.

As amostras de lavado nasal previamente a análise foram diluídas cinco vezes com solução salina balanceada de Hank (HBSS) (Life Technologies®) para melhor processamento da amostra pelo aparelho ImmunoCAP®100E. Para a análise estatística os resultados foram multiplicados por cinco.

3.8.2.2 Dosagem de IgG4 específicas

As dosagens de IgG4 específicas foram realizadas para *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p 1*) através da técnica de ImmunoCAP, em amostras do soro e no sobrenadante do lavado nasal, realizado em dois momentos, antes e após o período de indução da imunoterapia (26 semanas). As amostras permaneceram armazenadas a -80 °C para serem processadas posteriormente.

As amostras de lavado nasal previamente a análise foram diluídas cinco vezes com solução salina balanceada de Hank (HBSS) (Life Technologies®) para melhor processamento da amostra pelo aparelho ImmunoCAP®100E. Para a análise estatística os resultados foram multiplicados por cinco.

3.8.2.3 Dosagem de IgE total

As dosagens de IgE total foram realizadas através da técnica de ImmunoCAP, em amostras do soro e no sobrenadante do lavado nasal, realizado em dois momentos, antes e após o período de indução da imunoterapia (26 semanas). As amostras permaneceram armazenadas a -80 °C para serem processadas posteriormente.

As amostras de lavado nasal previamente a análise foram diluídas cinco vezes com solução salina balanceada de Hank (HBSS) (Life Technologies®) para melhor processamento da amostra pelo aparelho ImmunoCAP®100E. Para a análise estatística os resultados foram multiplicados por cinco.

3.8.2.4 Análise das amostras pelo método ImmunoCAP

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas sem a formação de bolhas. O aparelho indica onde devem ser colocados as amostras e os reagentes. O volume para a realização do exame foi de 240 µl (40 µl para a análise e 200 µl de volume morto). Foram colocadas as canetas ImmunoCAP/EliA Well para cada anticorpo pesquisado no distribuidor do ImmnoCAP. O equipamento ImmunoCAP®100E inicia pela pré-lavagem dos CAPS. Neste momento, ocorre a preparação para a reação entre o antígeno e o anticorpo com um tempo médio de 2 horas e 36 minutos. Após este período o aparelho realiza a pipetagem da amostra (40µl) e fica incubado por 2 horas e 14 minutos.

Na sequência, realiza-se a lavagem das amostras e, após a pipetagem do conjugado em todos os CAPS, é seguido por um novo período de incubação e lavagem dos conjugados. Adiciona-se a solução de desenvolvimento e 45 minutos depois se inicia a solução STOP. Aos 26 minutos ocorre a pipetagem do branco reagente e aos 25 minutos a pipetagem do branco de RINSE e, logo, em seguida, do RINSE. Na sequencia é feita a leitura do fluorímetro que lê o branco de RINSE e todos os CAPS dos pacientes. Após 14 minutos é feita a lavagem do disco de eluição, e após 12 minutos o fim da lavagem do disco de eluição. Com o ensaio terminado, os CAPS são descartados e inicia-se a lavagem do poço de eluição.

3.8.2.5 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas padrão Th1/Th2 e Th17 foram avaliadas no sobrenadante do lavado nasal pré-provacação nasal realizados antes e após o período de indução da imunoterapia (26 semanas) através do método de Immunoassays Milliplex utilizando tecnologia Luminex®.

O lavado nasal foi diluído 1: 10, pois o muco do material atrapalhou a análise sem esta diluição, e as concentrações das citocinas foram analisadas em um sistema de suspensão Matriz Bio-Plex™ (Bio-Rad Laboratories, Munique, Alemanha). Empregando o ensaio Multiplex Cytokine de 20 citocinas (Bio-Rad Laboratories), foram determinadas as concentrações séricas e nas secreções nasais de interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, sCD40L. Os dados foram avaliados com o Bio-Plex Manager™ Software 3.0 (Bio-Rad Laboratories). O limite de detecção foi de menos de 0,5 pg/ml.

3.9 Uniformização do tratamento de controle da rinite

A todos os pacientes foi oferecido o tratamento segundo critérios do ARIA (Brozek et al., 2010) e GINA (Bateman et al., 2008) de forma a atingir o melhor controle dos sintomas. A partir da primeira visita de uniformização, todos os pacientes (grupo placebo e tratamento) usaram a medicação da seguinte forma:

- Budesonida nasal 50 mcg/jato. Aplicação de um jato em cada narina, uma vez ao dia de forma regular e contínua.
- Loratadina 10mg/ dia via oral, conforme exacerbações de sintomas (medicação de alívio).
- As medicações foram distribuídas gratuitamente aos pacientes para garantir a uniformização das medicações nos dois grupos (placebo e tratamento).

3.10 Avaliação dos sinais e sintomas

Os sintomas serão avaliados pelo médico através do escore de sintomas nasais (Nasal Index Score) (Hampelet al., 2004; Randon et al., 2007) com a seguinte gradação:

Quadro 1. Escores de sintomas nasais (Nasal Index Scores) – para avaliação dos sinais e sintomas da rinite

Sinal ou sintoma Escala Nasal	Escore			
	0	1	2	3
Obstrução Nasal Coriza Espirro Prurido Nasal	Ausente	Leve, mas não causa incômodo	Moderado, causando incômodo frequentemente, mas não o suficiente para interferir com as atividades diárias normais ou com o sono noturno.	Grave, causando incômodo suficiente para interferir com as atividades diárias normais ou com o sono noturno.

Os pacientes responderam a este questionário durante a provocação nasal realizada antes e após o período de indução da imunoterapia e placebo.

3.11 Imunoterapia

O extrato para a imunoterapia com o ácaro *Dermatophagoides pteronissinus* utilizado neste estudo foi adquirido do Laboratório Immunotech/FDA – Allergenic LTDA. que tem aprovação da Anvisa para comercialização deste produto no Brasil. O extrato utilizado contém 5.000 Unidades Biológicas Equivalente (UBE) por mililitro composto por 15mcg de *Der p 1* e *Der p 2*. Este foi reconstituído para a concentração final de 5mcg de *Der p 1* e *Der p 2* por dose, para a manutenção.

A imunoterapia foi administrada por via subcutânea, com aplicação semanal do extrato terapêutico, após avaliação clínica do paciente, seguindo o esquema a seguir. Foi utilizado o extrato *depot* padronizado em UBE/mL. No dia da administração da dose, o paciente permanecia em observação por trinta minutos após a aplicação para tratar eventuais reações imediatas. Antes de cada aplicação, o paciente era avaliado de acordo com os parâmetros:

- Queixas durante a última semana;
- Queixas durante as últimas 24 horas;
- Medicação utilizada;
- A saturação de oxigênio e a frequência cardíaca eram aferidas e anotadas antes da aplicação e 30 minutos após a aplicação;
- Pico de Fluxo Expiratório – PFE era verificado antes e 30 minutos após a aplicação;
- As reações e a conduta eram descritas na ficha de avaliação.

3.11.1 Técnica de aplicação

Aplicação em membro superior, na área do tríceps, porção posterior, terço médio, após limpeza do local com álcool;

Injeção lenta no subcutâneo, aspirando previamente à injeção, se houver saída de sangue, desprezar o material e repetir a aplicação em outro local por 15 a 20 segundos. Não massagear;

Observar o paciente por 30 minutos devido ao risco de reação (ver a seguir).

3.11.2 Esquema posológico

Aplicações semanais com concentrações e volumes crescentes. Inicialmente o paciente recebeu a concentração de 0,005mcg/ml fracionada em 4 volumes crescentes até atingir a concentração descrita aplicada semanalmente. Após a concentração era aumentada para 0,05mcg/ml; 0,5mcg/ml; 2,5mcg/ml e 5mcg/ml cada uma delas fracionada em 4 volumes crescentes semanais.

A dose de manutenção foi de 5mcg/ml, podendo ser ajustada individualmente, dependendo da necessidade. Depois de atingir a dose de manutenção, o intervalo entre as aplicações aumentou gradativamente para 15 dias (4 aplicações), 21 dias (4 aplicações) e 28 dias até completar três anos de tratamento.

A dose deve ser cancelada sempre que o paciente apresentar sintomas ou $PFE < 70\%$ do melhor valor pessoal.

3.11.3 Interrupção e reinício da IT

Caso ocorra interrupção na fase de indução:

- Até 7 dias – manter esquema;
- De 8 a 13 dias – repetir dose anterior;
- De 14 a 21 dias – reduzir a dose anterior em 25%
- De 21 a 28 dias – reduzir a dose anterior em 50%
- Manutenção mensal em atraso de:
- Até 10 dias – repetir última dose;
- 11 a 20 dias – reduzir a dose em 25%;
- 21 a 28 dias – reduzir a dose em 50%;

A seguir aumentar a dose, 25% por semana, até atingir a dose de manutenção.

3.12 Placebo

Como placebo foi utilizado a solução de excipiente igual ao da imunoterapia. Após a primeira fase do estudo, os pacientes que pertencerem ao grupo placebo receberão tratamento com imunoterapia assim como os pacientes do grupo ativo e poderão ser analisadas as mudanças de imunoglobulinas e citocinas numa segunda etapa do estudo.

3.12.1 Justificativa pela utilização de placebo

A imunoterapia é um tratamento reconhecido como eficaz através de metanálises para imunoterapia sublingual na rinite, asma e rinite pediátrica e na imunoterapia subcutânea na asma. Há evidências em estudos randomizados controlados no caso da rinite (adulta e pediátrica) com imunoterapia subcutânea (Passalacqua et al., 2007). Contudo, quando se busca estudos específicos sobre imunoterapia para ácaros, são poucos, pois os principais alérgenos são os pólenes.

Dada a imunoterapia ser um tratamento longo e com acompanhamento regular do paciente, um efeito placebo importante deve ser esperado. Em uma publicação recente da World Allergy Organization (Canonica et al., 2007) o estudo duplo-cego controlado com placebo foi determinado como o padrão ouro para novos estudos.

O estudo proposto visa avaliar alterações na mucosa nasal que podem se relacionar com a imunoterapia ou com a melhora clínica. Secundariamente, busca-se avaliar a eficácia da imunoterapia na população brasileira. Assim, o estudo duplo-cego controlado com é a opção que permite não só avaliar sem vieses as alterações imunológicas, bem como integrar este estudo a outros em futuras metanálises. Além

disso, o grupo placebo receberá o mesmo tratamento terapêutico que o outro grupo, segundo os consensos e diretrizes nacionais e internacionais, de acordo com a classificação clínica da rinite.

4 Resultados

4.1 Casuística

Foram triados 119 pacientes e, destes, 48 iniciaram o tratamento por apresentarem os critérios de inclusão do estudo, 24 no grupo placebo e 24 no grupo imunoterapia. Dos 48 incluídos, 36 concluíram a fase de seis meses de seguimento, 12 desistiram do estudo (2 retiraram o TCLE, 2 engravidaram e 8 saíram por motivos pessoais – impossibilidade de horário, mudança de residência). Dos pacientes que concluíram os seis meses de acompanhamento 19 receberam tratamento com imunoterapia e 17 placebo (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição geral da casuística envolvida no estudo

			Imunoterapia		Placebo	
	n	%	(n)	(%)	(n)	(%)
Total de Triados	119	100				
Iniciaram Tratamento	48	40	24	50	24	50
Concluíram o Estudo	36	75	19	79	17	70
Desistiram do Estudo	12	25	5	21	7	30
Razão para Desistir do Estudo						
Retirou o TCLE	2	17	1	50	1	50
Engravidou	2	17	0	0	2	100
Outro	8	66	4	50	4	50

Com relação às características basais demográficas, no grupo placebo os pacientes apresentaram a média de idade de 39 anos, com desvio padrão (DP) de 12 e no grupo de tratamento a idade média foi de 35 anos com DP de 12 ($p= 0.358$). A maioria dos pacientes foi do gênero feminino, com 88,2% e 84% nos grupos placebo e tratamento, respectivamente (Tabela2).

Tabela 2. Características basais da amostra entre os grupos (HCFMUSP, 2016)

Características	Placebo (n= 17)	Imunoterapia (n= 19)	p
	n (%)	n (%)	
Idade (média ± dp)	39,1 ± 12,2	35,2 ± 12,4	0.358 [†]
Sexo			0.555
Feminino	15 (88,2)	16 (84,2)	
Masculino	02 (11,8)	03 (15,8)	
Asma Intermitente	02 (11,8)	05 (23,3)	0.251
Dermatite Atópica	01 (5,9)	0 (0)	0.472

O teste de sensibilidade cutânea imediata (*prick test*) avaliou os milímetros (mm) de pápulas para cada alérgeno, sendo que não foram identificadas diferenças significativas no perfil de sensibilização entre os grupos. A média da pápula para *Dermatophagoides pteronissinus* foi de 6,8 mm no grupo placebo e 7,8 mm no grupo imunoterapia (p=0,091).

4.2 Escore de sintomas

A escala NIS (Nasal Index Score) foi utilizada como um parâmetro de controle clínico da rinite nos pacientes do estudo no momento da provocação nasal, no início e após seis meses de seguimento. No período inicial pré-tratamento, a média de escore foi de $4,1 \pm 2,7$ para o grupo placebo e, de $2,6 \pm 1,7$ para o grupo com imunoterapia (p= 0.102). Após seis meses de intervenção, observou-se a média de $2,8 \pm 1,8$ no grupo placebo e $1,5 \pm 1,2$ para imunoterapia, com diferença significativa nos dois grupos quando comparado ao tempo 0 meses (p= 0.023 e p= 0,030 respectivamente). A melhora no escore clínico observada após os seis meses de acompanhamento foi maior no grupo que recebeu imunoterapia (p=0,025) (Figura 1).

*p em relação ao grupo placebo no tempo 0 e 6 meses;

**p em relação ao grupo tratamento no tempo 0 e 6 meses.

Figura 1. Descrição da média e DP da escala NIS antes e após o tratamento nos grupos placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)

De acordo com as categorias da escala, na etapa inicial 59% (10) dos pacientes apresentava sintomatologia leve, 35% (6) moderada e 6% (1) grave no grupo placebo e; no grupo de imunoterapia, 84% (16) apresentavam sintomas leves e 16% (3) moderados. Ao final dos seis meses de seguimento, todos pacientes do grupo de imunoterapia tiveram sintomas leves e, 84% dos pacientes do grupo placebo (Figura 2).

Figura 2. Descrição da escala NIS antes e após o tratamento (HCFMUSP, 2016)

4.3 Provação Nasal

A média da concentração do extrato de *Der p 1* em mcg/ml utilizada na provação nasal antes do início de tratamento no grupo placebo foi de $0,84 \pm 1,0$; após seis meses de tratamento a média da concentração do extrato foi de $1,13 \pm 1,21$. No grupo imunoterapia foi de $0,74 \pm 0,86$; após seis meses de tratamento a média da concentração do extrato foi de $1,20 \pm 1,15$. A avaliação de diferenças entre os períodos pré e pós não obteve diferenças significativas, tanto para o grupo placebo ($p= 0.199$) quanto para o grupo com imunoterapia ($p= 0.063$) (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição da média $\pm$ DP e mediana da concentração de extrato de *Der p* na provação nasal antes e após o tratamento (HCFMUSP, 2016)

	Placebo (n= 17)		p	Imunoterapia (n= 19)		p
	Pré tratamento	Após seis meses		Pré tratamento	Após seis meses	
Média $\pm$ DP	0,84 $\pm$ 1,0	1,3 $\pm$ 1,21	0,199	0,74 $\pm$ 0,86	1,20 $\pm$ 1,15	0,063
Mediana	0,40	0,40		0,40	1,00	

4.4 Dosagem de Imunoglobulinas

No grupo placebo, a IgE sérica específica para *Der p 1* e *Der p 2* e a IgE total não tiveram diferença significativa nos períodos pré e pós-tratamento, entretanto, a dosagem sérica de IgG4 específica para *Der p 1* teve média de $0,92 \pm 1,1$ kU/L no pré e, no pós de $0,6 \pm 0,54$ kU/L, sendo verificada diferença deste indicador ($p= 0.049$) (Tabela 4). Os indicadores avaliados do lavado nasal neste grupo foram semelhantes nos períodos estudados (Figura 4).

No grupo com imunoterapia observaram-se diferenças significativas entre o período inicial e final (seis meses) para a dosagem de IgG4 específica para *Der p 1* no soro ($p=0.006$) (Figura 3). No lavado nasal a dosagem de IgE total e a contagem de células tiveram redução significativa ($p=0.034$ e $p=0.044$, respectivamente) (Figuras 5 e 6).

Figura 3. Níveis de Igs específicas no Soro no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Figura 4. Níveis de Igs específicas no Lavado Nasal no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016).

Níveis de Igs específicas no Lavado Nasal no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Figura 5. Níveis de IgE total no Soro (A) e no Lavado Nasal (B) no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Figura 6. Níveis de Células Totais no Lavado Nasal no Tempo 0 e 6 entre os grupos placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Tabela 4. Avaliação média±DP dos níveis de imunoglobulinas e células no soro e lavado nasal, nos períodos pré e pós-tratamento do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)

	Placebo (n= 17)		<i>p</i>	Imunoterapia (n= 19)		<i>p</i>
	Pré	Pós		Pré	Pós	
<i>Soro</i>						
IgE Derp 1	22,8 ± 27,5	25,4 ± 29,8	0.423	72,1 ± 106,3	67,5 ± 85,5	0.872
IgE Derp 2	17,8 ± 20,9	20,4 ± 22,8	0.453	55,3 ± 90,4	49,7 ± 70, 9	0.919
IgE Total	406,4 ± 570,3	394,3 ± 461,8	0.278	392,5 ± 439,7	467,2 ± 467,7	0.243
IgG4 Der p 1	0,92 ± 1,1	0,6 ± 0,54	0.049	0,95 ± 1,1	6,4 ± 10,8	0.006
<i>Lavado Nasal</i>						
IgE Derp 1	0,83 ± 0,26	1,7 ± 2,32	0.184	2,7 ± 3,7	5,7 ± 13,4	0.294
IgE Derp 2	0,69 ± 0,20	0,94 ± 0,68	0.449	2,4 ± 3,2	3,3 ± 8,3	0.259
IgE Total	28,6 ± 11,9	20,7 ± 12,7	0.163	33,5 ± 15,5	23,7 ± 13,5	0.034
IgG4 Der p 1	0,16 ± 0,14	0,13 ± 0,16	0.562	0,17 ± 0,15	0,34 ± 0,80	0.614
Células Totais	6,3 ± 12,4	2,7 ± 2,5	0.740	3,8 ± 4,7	2,6 ± 3,97	0.044
Neutrófilo	1,3 ± 2,4	1,3 ± 1,5	0.398	2,3 ± 3,7	1,8 ± 3,8	0.140
Macrófago	0,82 ± 1,8	0,48 ± 0,44	0.306	0,88 ± 1,6	0,42 ± 0,48	0.875
Linfócito	0,002 ± 0,008	0,07 ± 0,26	0.645	0,006 ± 0,03	0,007 ± 0,02	0.623
Eosinófilo	0,42 ± 0,66	0,89 ± 1,7	-	0,66 ± 1,5	0,34 ± 0,58	0.196

Legenda: IgE Der p 1 = (kU/L); IgE Der p 2 = (kU/L); IgE total = (UI/L); IgG4 Der p 1 = (kU/L); Células Totais, Neutrófilo, Macrófago, Linfócito e Eosinófilo = (10⁴ cel/ml).

Na comparação das análises do soro entre o grupo placebo e imunoterapia após seis meses de tratamento verifica-se que a dosagem de IgG4 específica para *Der p* 1 aumentou significativamente no grupo imunoterapia ($p=0,015$). No lavado nasal não se notou diferenças dos parâmetros avaliados entre os grupos após os seis meses de seguimento (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação dos níveis de Imunoglobulinas e células no soro e lavado nasal entre os grupos nos períodos pré e pós-tratamento (HCFMUSP, 2016)

	Pré Tratamento			Após seis meses		
	Placebo (n= 17)	Imunoterapi a (n= 19)	<i>p</i>	Placebo (n= 17)	Imunoterapi a (n= 19)	<i>p</i>
<i>Soro (média ± dp)</i>						
IgE Derp 1	22,8 ± 27,5	72,1 ± 106,3	0.260	25,4 ± 29,8	67,5 ± 85,5	0.204
IgE Derp 2	17,8 ± 20,9	55,3 ± 90,4	0.329	20,4 ± 22,8	49,7 ± 70,9	0.240
IgE Total	406,4 ± 570,3	392,5 ± 439,7	0.843	394,3 ± 461,8	467,2 ± 467,7	0.751
IgG4 Der p 1	0,92 ± 1,1	0,95 ± 1,1	0.518	0,6 ± 0,54	6,4 ± 10,8	0.015
<i>Lavado Nasal (média ± dp)</i>						
IgE Derp 1	0,83 ± 0,26	2,7 ± 3,7	0.014	1,7 ± 2,32	5,7 ± 13,4	0.183
IgE Derp 2	0,69 ± 0,20	2,4 ± 3,2	0.049	0,94 ± 0,68	3,3 ± 8,3	0.535
IgE Total	28,6 ± 11,9	33,5 ± 15,5	0.457	20,7 ± 12,7	23,7 ± 13,5	0.349
IgG4 Der p 1	0,16 ± 0,14	0,17 ± 0,15	0.916	0,13 ± 0,16	0,34 ± 0,80	0.421
Células Totais	6,3 ± 12,4	3,8 ± 4,7	0.824	2,7 ± 2,5	2,6 ± 3,97	0.310
Neutrófilo	1,3 ± 2,4	2,3 ± 3,7	0.493	1,3 ± 1,5	1,8 ± 3,8	0.729
Macrófago	0,82 ± 1,8	0,88 ± 1,6	0.942	0,48 ± 0,44	0,42 ± 0,48	0.628
Linfócito	0,002 ± 0,008	0,006 ± 0,03	0.491	0,07 ± 0,26	0,007 ± 0,02	0.699
Eosinófilo	0,42 ± 0,66	0,66 ± 1,5	0.788	0,89 ± 1,7	0,34 ± 0,58	0.883

Legenda: IgE Der p 1 = (kU/L); IgE Der p 2 = (kU/L); IgE total = (UI/L); IgG4 Der p 1 = (kU/L); Células Totais, Neutrófilo, Macrófago, Linfócito e Eosinófilo = (10^4 cel/ml).

A concentração da imunoterapia administrada foi aumentada gradualmente a cada mês (quatro semanas), ou seja, no mês inicial as doses eram de 0,04 mcg/ml, no mês seguinte de 0,4 mcg/ml, depois 1 mcg/ml, 2 mcg/ml e, por fim, 4 mcg/ml. Com objetivo de avaliar a redução de sintomas de acordo com a dose administrada, realizou-

se uma média mensal da frequência de obstrução, coriza, prurido e espirros que foi registrada pelos pacientes semanalmente a cada dose aplicada de tratamento. Estas análises foram utilizadas como parâmetros de melhora a cada concentração de anticorpos da vacina. Desta forma, verificou-se a cada dose a diferença na frequência de sintomas para os grupos estudados.

Na Tabela 6 estão descritos os resultados obtidos em cada grupo e a diferença estatística entre a frequência de sintomas a cada concentração utilizada. Verifica-se, na dose inicial (mais diluída) maior frequência de coriza e espirros no grupo placebo (mediana de 12 para coriza e 18 para espirros) e; para o grupo com imunoterapia maior frequência de prurido (mediana de 11) e espirros (mediana de 13).

No grupo com imunoterapia, a obstrução nasal e o prurido reduziram significativamente com o aumento da concentração 0,04 mcg/ml para 4 mcg/ml, sendo que a obstrução foi significativamente menor a partir da dose de 2mcg/ml; e o prurido e os espirros apresentaram redução em doses mais diluídas (0,4mcg/ml). Com relação à coriza, não se verificou diferença significativa entre as concentrações neste grupo, contudo, percebeu-se menor frequência do sintoma entre os indivíduos que receberam placebo.

No que diz respeito ao uso de loratadina, observou-se que, apesar de não haver significância estatística, houve a redução de uso conforme o aumento da concentração dentre aqueles com imunoterapia, entretanto, para os indivíduos com placebo observou-se o aumento no uso de loratadina ao longo do estudo.

Tabela 6. Avaliação de sintomas a cada concentração de anticorpos administrada em cada grupo. (HCFMUSP, 2016)

	Placebo (n= 17)		Imunoterapia (n= 19)		<i>p'</i>
	<i>Mediana (mín – máx.)</i>	<i>p</i>	<i>Mediana (mín – máx.)</i>	<i>p</i>	
Obstrução					
0,005 mcg/ml	7 (0-28)		6 (0-28)		0.408
0,05 mcg/ml	2 (0-27)	0.001*	1 (0-28)	0.507*	0.855
0,5 mcg/ml	4 (0-32)	0.020**	1 (0-28)	0.054**	0.232
2,5 mcg/ml	4 (0-30)	0.097 ^{††}	0 (0-27)	0.026 ^{††}	0.372
5mcg/ml	4 (0-31)	0.073 [†]	2 (0-28)	0.049 [†]	0.249
Coriza					
0,005 mcg/ml	12 (0-29)		3 (0-22)		0.075
0,05 mcg/ml	4 (0-26)	0.036*	3 (0-21)	0.488*	0.278
0,5 mcg/ml	5 (0-26)	0.041**	3 (0-21)	0.137**	0.172
2,5 mcg/ml	5 (0-29)	0.029 ^{††}	0,5 (0-27)	0.707 ^{††}	0.211
5mcg/ml	3,5 (0-21)	0.001 [†]	1 (0-20)	0.135 [†]	0.328
Prurido					
0,005 mcg/ml	7 (0-25)		11 (0-34)		0.515
0,05 mcg/ml	6 (0-30)	0.552*	7 (0-26)	0.005*	0.555
0,5 mcg/ml	7 (0-27)	0.316**	2 (0-26)	0.002**	0.773
2,5 mcg/ml	4 (0-33)	0.146 ^{††}	3 (0-24)	0.002 ^{††}	0.601
5mcg/ml	8 (0-35)	0.337 [†]	1 (0-22)	0.002 [†]	0.227
Espirros					
0,005 mcg/ml	18 (0-28)		13 (0-29)		0.775
0,05 mcg/ml	14 (0-31)	0.308*	11 (0-24)	0.004*	0.382
0,5 mcg/ml	13 (0-27)	0.062**	3 (0-26)	0.001**	0.206
2,5 mcg/ml	11 (0-29)	0.023 ^{††}	5 (0-26)	0.004 ^{††}	0.512
5mcg/ml	14,5 (0-28)	0.018 [†]	4 (0-25)	0.002 [†]	0.164
Loratadina					
0,005 mcg/ml	4 (0-23)		4 (0-15)		0.859
0,05 mcg/ml	6 (0-20)	0.962*	4 (0-15)	0.967*	0.620
0,5 mcg/ml	4 (0-23)	0.849**	3 (0-15)	0.558**	0.461
2,5 mcg/ml	4 (0-20)	0.621 ^{††}	4,5 (0-22)	0.294 ^{††}	0.884
5mcg/ml	7 (0-30)	0.233 [†]	2 (0-17)	0.408 [†]	0.091

*0,005 mcg/ml versus 0,05 mcg/ml; **0,005 mcg/ml versus 0,5mcg/ml; ^{††}0,005 mcg/ml versus 2,5 mcg/ml;

[†]0,005mcg/ml versus 5mcg/ml.

p = correlação entre as concentrações do tratamento no mesmo grupo

p' = correlação entre as concentrações do tratamento entre os grupos

4.5 Determinação de Citocinas perfil Th1/Th2 e Th17 no lavado nasal

Com relação à determinação das citocinas padrão Th1, Th2 e Th17, não foi encontrada diferença nos níveis de citocinas livres após seis meses de tratamento quando comparado a fase inicial, no grupo que recebeu imunoterapia (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação de citocinas em pg/mL no lavado nasal entre os pacientes do grupo **imunoterapia** nos períodos inicial e após seis meses. (HCFMUSP, 2016)

Lavado Nasal							
Citocinas (pg/ml)	Imunoterapia (n= 19)						p
	Tempo 0			Tempo seis meses			
	Mín	P50	Máx	Mín	P50	Máx	
IL-2	0,22	0,95	9,9	0	0,2	3,5	0.052
IL-4	0,36	0,36	6,1	0	0,36	5,9	0.075
IL-5	0,27	2,7	26,7	0	2,1	21,0	0.686
IL-10 (56)	0,07	3,45	20,7	0,07	1,37	12,3	0.643
IL-12 (p70)	0,13	8,5	69,4	0	2,1	52,4	0.225
IL-13	1,27	4,4	89,9	0,73	1,27	62,8	0.259
GM-CSF	2,3	38,7	133,9	0	19,8	66,4	0.205
INF-γ	17,8	76,1	961,6	2,9	17,8	578,6	0.597
TNF-α	0,05	1,82	140,9	0	1,34	182,5	0.984
IL-1b	1,15	44,5	898,1	0,11	26,3	857,1	0.587
IL-6	13,4	123,5	9691,5	2,8	40,1	794	0.103
IL-17A	3,1	3,1	1040	5,7	5,7	115,1	0.903
IL-17F	33,3	471	6119	143,7	143,7	2303	0.375
IL-21	20,8	2257	48612	208,4	208,4	10564	0.159
IL-22	11,0	11,0	1310	11,0	11,0	513,8	0.204
IL-23	34,1	264,6	18461	136,8	136,8	3402	0.353
IL-25	4,5	14,4	1078	0,31	5,1	145,4	0.364
IL-31	19,0	423,5	9744	56,3	110,7	1468	0.121
IL-33	1,22	259,8	8896,5	1,22	77,0	1284,2	0.103
sCD40L	6,17	6,17	773,7	8,12	8,12	329,9	0.413

Valor de p: Teste de Wilcoxon.

Após provocação nasal no início da intervenção e após seis meses observou-se que houve aumento significativo das citocinas livres IL-10 e IL-13 em ambos os grupos (Figuras 7 e 8). Os valores livres de GM-CSF aumentaram nos dois grupos, mas o GM-CSF não apresentou significância estatística no grupo imunoterapia no tempo inicial (Figura 9).

Figura 7. Determinação de citocinas IL-10 no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Figura 8. Determinação de citocinas IL-13 no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Figura 9. Determinação de citocinas GM-CSF no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Após seis meses de seguimento no estudo, seis pacientes do grupo da imunoterapia que continuaram recebendo o tratamento, foram reavaliados com os parâmetros analisados após doze meses de tratamento. Além destes, sete pacientes que haviam recebido placebo optaram por dar continuidade e receberam o tratamento com imunoterapia alérgeno específica.

Na escala de sintomatologia NIS no período inicial para os pacientes que completaram um ano de seguimento ($n=6$) a média foi de $0,2 \pm 0,4$. Ainda neste grupo com um ano de acompanhamento, observou-se a redução significativa na escala NIS, do período inicial e após um ano de terapia ($p=0,034$), entretanto, uma observação importante foi que apenas um paciente (17%) tinha sintomatologia moderada no início do tratamento e nenhum apresentava sintoma grave.

Observou-se a diminuição significativa para IgE específica para *Der p 1* e *2* no soro (Figura 10). No lavado nasal a diminuição foi significativa para IgE específica para *Der p 1* e *2*, IgE total e IgG4 (Figuras 11 e 12). Não se observou uma resposta significativa para as células totais e diferenciais (Figura 13).

SORO

Valor de p pelo Teste de Wilcoxon (início *versus* final do tratamento); * 1 *missing*
 Legenda: IgE Der p 1 = (kU/L); IgE Der p 2 = (kU/L); IgG4 Der p 1 = (kU/L)

Figura 10. Avaliação dos níveis de imunoglobulinas no soro nos pacientes - tratamento tempo 0, 6 e 12 meses.

LN

Valor de p pelo Teste de Wilcoxon (início *versus* final do tratamento); * 1 *missing*
 Legenda: IgE Der p 1 = (kU/L); IgE Der p 2 = (kU/L); IgG4 Der p 1 = (kU/L)

Figura 11. Avaliação dos níveis de Imunoglobulinas no lavado nasal nos pacientes- tratamento tempo 0, 6 e 12 meses

Valor de p pelo

Teste de Wilcoxon (início *versus* final do tratamento); * 1 *missing*

Legenda: IgE total = (UI/L)

Figura 12. Avaliação dos níveis de IgE total no soro e no lavado nasal nos pacientes - tratamento tempo 0, 6 e 12 meses

Valor de p pelo Teste de Wilcoxon (início *versus* final do tratamento); * 1 *missing*

Figura 13. Avaliação dos níveis de células no lavado nasal nos pacientes - tratamento tempo 0, 6 e 12 meses

5 Discussão

A imunoterapia alérgeno específica corresponde a um tratamento bem estabelecido em que algumas alterações imunológicas séricas são descritas, mas sem estarem totalmente esclarecidas. Alguns autores descrevem as alterações clínicas destes pacientes utilizando a escala NIS. Naclerio et al. (1997) em seu estudo com imunoterapia para Amb a 1 observaram a melhora do NIS após um ano de imunoterapia. Nesta casuística observou-se a melhora no escore de sintomas (escala NIS) no grupo placebo e imunoterapia após seis meses de seguimento, com melhora mais acentuada no grupo que recebeu a imunoterapia. A melhora observada no grupo placebo se deu provavelmente pelo acompanhamento clínico regular (semanal) e fornecimento de medicação, que favoreceu a adesão ao tratamento. O grupo imunoterapia apresentava sintomas mais leves do que o grupo placebo no início do seguimento, porém a amostra foi randomizada e esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,102$).

Muitos estudos utilizam a provocação nasal como um parâmetro de resposta para a imunoterapia ou como um exame de diagnóstico de doença alérgica local (Rondón et al., 2007; López et al., 2010; Gómez et al., 2015). O aumento do limiar nasal com a imunoterapia ocasiona a necessidade de uma concentração maior de extrato para gerar sintomas clínicos, a concentração de *Der p1* utilizada na provocação nasal após o tratamento no grupo imunoterapia foi maior para que o teste fosse positivo, mostrando um aumento no limiar de responsividade dos pacientes, entretanto, no presente estudo não se conseguiu demonstrar esse aumento ($p=0,063$).

Sabe-se que a dosagem de IgE específica durante a imunoterapia aumenta nas primeiras semanas e, posteriormente, diminui, enquanto a IgG4 específica aumenta no início da imunoterapia e segue aumentando durante todo o tratamento (Cingi et al., 2014). Não há uma variação da IgE total descrita como um fator associado à ação da imunoterapia,

embora este estudo tenha evidenciado uma diminuição desta imunoglobulina no lavado nasal após seis meses de imunoterapia. O estudo de Rondón et al. (2007) mostrou que a IgE total é encontrado no lavado nasal de pacientes com rinite alérgica e Riechelmann et al. (2005) descreveram a presença de IgE total no lavado nasal de pacientes sensibilizados a *Der p* e não sensibilizados. Smurthwaite et al. (2002) evidenciaram o aumento da IgE total no lavado broncoalveolar pós-provocação com ácaro, mas não se observou nenhum estudo que associasse a presença de IgE local ao efeito da imunoterapia alérgeno específica. Nos primeiros seis meses de seguimento, não se conseguiu demonstrar este padrão de resposta nesta casuística.

A expressão de IgE específica no lavado nasal tem sido objeto de estudos de vários autores. Rondón et al. (2007) quantificaram a IgE específica para *Der p* 1 no lavado nasal dos pacientes alérgicos e não alérgicos. Entretanto, não avaliou o impacto da imunoterapia subcutânea alérgeno específica na expressão local da IgE específica. Naclerio et al. (1997) avaliaram no lavado nasal o aumento da presença de IgE específica para *Amb a* 1 após um ano de imunoterapia, mas sem significância estatística entre os grupos placebo e tratamento. Burks et al. (2013) descrevem que, até seis meses após o início da imunoterapia, há um aumento na IgE sérica específica transitório, seguido por uma diminuição no decorrer dos anos de tratamento. Neste estudo, a dosagem sérica de IgE específica para *Der p* 1 no soro foi semelhante no início e após seis meses do tratamento, mas após doze meses de imunoterapia houve uma diminuição deste valor no soro e lavado nasal, assim como foi observado na análise da IgE específica para *Der p* 2.

No presente estudo não se verificou um aumento significativo de IgG4 específica para *Der p* 1 no lavado nasal assim como descrito para as alterações no soro. Akdis et al. (2007) descrevem um aumento sérico de IgG4 específica para ácaro a partir de sete dias após o início da imunoterapia. Marcucci et al. (2002) verificaram que a IgG4 específica para *Der p* 1 no soro aumentou no grupo que realizou imunoterapia nasal, porém na

análise do lavado nasal não houve variação no decorrer do tratamento. Naclerio et al. (1997) avaliaram no lavado nasal a presença de IgG4 específica para Amb a 1, após um ano de imunoterapia, houve diminuição dos níveis no grupo placebo, mas sem alteração com significância no grupo tratamento. Gómez et al. (2015) descrevem o aumento de IgG4 específica para *Der p 1* no soro de pacientes respondedores e não respondedores a imunoterapia em seis e doze meses, ambos os grupos encontraram aumento da imunoglobulina, mas um aumento maior no grupo respondedor.

Nesta pesquisa, as análises das células totais no lavado nasal pós-tratamento mostraram uma diminuição tanto no grupo placebo quanto no grupo imunoterapia, mas com significância estatística apenas no grupo imunoterapia. Burks et al. (2013) relatam a diminuição do número de eosinófilos tecidual nas primeiras semanas de imunoterapia alérgico específica, mas não há descrição do seu comportamento no lavado nasal. Gelardi et al. (2015) mostraram que as células nasais variam de acordo com a sensibilização dos pacientes e que na sensibilização aos ácaros existe um aumento global das células.

No presente estudo observou-se um aumento dos níveis de IL-10 após a provocação nasal específica nos grupos placebo e imunoterapia tanto no tempo inicial quanto após seis meses de acompanhamento. Till et al. (2004) relatam uma produção de célula T periférica e na mucosa levando à produção de linfócito Th1 ao invés de Th2. Verificaram também o aumento de IL-10 no sangue periférico e a presença da IL-10 na mucosa nasal por efeito da imunoterapia. Observaram que, após a provocação nasal, há ativação de células Th1 produtora de IFN- γ e IL-2. Corne JM et al (2001) avaliaram pacientes alérgicos e não alérgicos e notaram que os indivíduos alérgicos tinham níveis maiores de IL-8 e IL-13 e menores níveis de INF- γ na secreção nasal pós-provocação específica. Benson et al. (2004) analisaram a IL-1, IL-4 e o receptor de TNF na rinite intermitente comparado sem pacientes sem rinite após provocação nasal. Observaram que a provocação não alterou os níveis de IL-6 e apesar do aumento de neutrófilo no

fluido nasal pós-provocação, não observaram alteração nos níveis de eosinófilo. Scadding et al. (2014), após realizarem o teste de provocação nasal com extrato de epitélio de gato em indivíduos alérgicos, observaram o aumento de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, mas sem alteração para IL-10, IL-8, IL-17A e IL-33. Neste estudo não foi avaliada a resposta ao tratamento com imunoterapia alérgeno específica. O estudo de Muller B. et al. (2009) descreve a expressão de IL-10 pelas células endoteliais. A expressão local de IL-10 na provocação nasal mostra uma correlação com os sintomas nasais, mas não é explicado porque a IL-10 age na permeabilidade dos vasos gerando o aumento da rinorreia e obstrução nasal em indivíduos alérgicos comparado a não alérgicos.

Este estudo observou um aumento dos níveis de IL-13 após a provocação nasal específica nos grupos placebo e imunoterapia tanto no tempo inicial quanto após seis meses de acompanhamento. A IL-13 está envolvida na maturação de células B, na diferenciação e troca de isotipo IgE, modula a atividade de macrófagos, inibindo, assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Tem participação na fisiopatologia da asma e rinite alérgica e foi encontrada nas secreções nasais de indivíduos alérgicos após a provocação nasal alérgeno específica (Baumann et al., 2012).

Observou-se um aumento significativo dos níveis de GM-CSF após a provocação nasal específica nos grupos placebo no tempo 0 e após seis meses e no grupo imunoterapia após seis meses de tratamento, mas houve um aumento sem significância estatística no grupo imunoterapia antes de receber o tratamento. Margareta L et al. (2000) em seu estudo com provocação nasal avaliaram a ação tardia do GM-CSF em indivíduos alérgicos. O GM-CSF e IL-5 desempenham um papel na hematopoiese, maturação e ativação de eosinófilos. Desta forma, após a provocação nasal observa-se um aumento desta citocina na secreção nasal. As demais citocinas não tiveram um comportamento alterado após a provocação nasal alérgeno específica.

6 Conclusão

Após seis meses de imunoterapia alérgeno específica para *Der p* por via subcutânea, não se observou nenhuma alteração nos níveis de IgE específica na mucosa nasal; entretanto, após doze meses de tratamento, os pacientes apresentaram diminuição da IgE específica no lavado nasal;

Após seis meses de imunoterapia alérgeno específica para *Der p* por via subcutânea, não se observou nenhuma alteração nos níveis de IgG4 específica para *der p* 1 na mucosa nasal; embora os pacientes tenham demonstrado aumento deste anticorpo no soro, quando comparados ao grupo placebo;

A análise do lavado nasal após seis meses de imunoterapia subcutânea demonstrou uma diminuição da IgE total e das células totais, tais alterações sugerem uma diminuição da resposta inflamatória local;

O teste de provocação nasal evidenciou o aumento da IL-10 e IL-13 após o estímulo alérgênico pré e pós-imunoterapia.

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:
..... BAIRRO:

CIDADE CEP:..... TELEFONE:
DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:
..... BAIRRO:

CIDADE CEP:..... TELEFONE:
DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Produção local de IgE e outros mediadores imunológicos no lavado nasal dos pacientes com rinite alérgica antes e após a realização de imunoterapia específica com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus***

2. PESQUISADOR: Adriana Teixeira Rodrigues

3. CARGO/FUNÇÃO: Médica pós-graduanda da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia. Inscrição Conselho Regional nº. 108368-CRM

4. UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Clínica Médica - Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	X
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR	☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

O objetivo deste estudo é saber se você apresentará anticorpos (substâncias que protegem o seu organismo) contra o ácaro que você tem alergia após realizar o tratamento com imunoterapia (vacinas para alergia). A presença deste anticorpo será pesquisada em uma amostra do seu sangue e em uma amostra de soro fisiológico usada para lavar o seu nariz - lavado nasal. A sua participação neste estudo é voluntária.

Você deverá comparecer ao Ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas. Nesta visita ao ambulatório, deverão ser realizados os seguintes procedimentos:

1. Responder a um questionário com perguntas sobre a sua rinite;
2. Você será submetido a um teste alérgico, no qual serão aplicadas na pele de seu antebraço pequenas gotas de alérgenos (substâncias que podem causar alergia), como, por exemplo, ácaros, pelos de animais. Em seguida, estas gotas serão perfuradas superficialmente com uma lanceta. Após 15 minutos, iremos verificar se houve o aparecimento de reação (vermelhidão e coceira) no local da gota. Poderá ocorrer um pequeno incômodo no momento da perfuração com a lanceta.
3. Será colhida uma amostra de sangue (aproximadamente 5 ml) para avaliar a presença de anticorpos contra o ácaro.
4. O seu nariz será lavado com solução fisiológica antes e após a realização de um teste chamado provocação nasal. Uma sonda de borracha será colocada na sua narina e após será colocado o volume de 10 ml de soro fisiológico nela com uma seringa e você deve segurar este líquido dentro do nariz; após isso esta secreção será puxada com a seringa através da sonda, e realizaremos a mesma coisa na outra narina e você no final deverá expelir o restante da secreção que ficou no seu nariz dentro de um recipiente de plástico. Este material será analisado no laboratório para pesquisa de anticorpos.

5. O teste de provocação nasal será realizado após a primeira lavagem do seu nariz como descrevi acima. Com aplicação de dois jatos de um *spray* nas suas narinas, que conterá o ácaro ao qual você é alérgico e a cada 15 minutos você será avaliado quanto aos sintomas, tais como: coceira no nariz, espirros, entupimento do nariz ou coriza. Após os 15 minutos de sua avaliação, será submetido a outra dose (*spray*), que será uma dose maior que a anterior. No momento em que você começar a apresentar coceira no nariz, espirros, entupimento do nariz ou coriza o teste será interrompido e será feita uma nova lavagem do seu nariz (descrito no item 4)
6. Você irá receber aplicações semanais de imunoterapia (contra o ácaro) ou placebo (produto sem substância ativa). Neste dia você será avaliado quanto aos seus sintomas de rinite e se estiver sem crise receberá uma dose de imunoterapia/placebo de seu médico. Ela será aplicada no seu braço, na região posterior, com uma seringa, tipo de aplicação de insulina, por via subcutânea. A imunoterapia será realizada com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, usando extratos padronizados. Este procedimento pode causar reações no local da aplicação, crises de rinite/asma, ou reações sistêmicas, mas a equipe envolvida no projeto está pronta para atendê-lo(a) no caso de reações, garantindo sua segurança.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal responsável é a pesquisadora Adriana Teixeira Rodrigues que pode ser encontrada no telefone 11-96931272.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, Fax: 3069-6442 ramal 26 – correio eletrônico: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e retirar-se do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

É garantido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira

relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Durante todo o protocolo sua rinite será tratada segundo as diretrizes atuais para o tratamento da rinite alérgica, de acordo com a intensidade do seu quadro, e após os primeiros seis meses de estudo, se você estiver no grupo recebendo placebo, começará a receber imunoterapia gratuitamente até o final do tratamento.

Acredito ter sido suficientemente informado(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **Produção local de IgE e outros mediadores imunológicos no lavado nasal dos pacientes com rinite alérgica antes e após a realização de imunoterapia específica com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus***

Eu discuti com a pesquisadora Adriana Teixeira Rodrigues sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes analfabetos, semi analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/07/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0360/11, intitulado: **PRODUÇÃO LOCAL DE IgE E OUTROS MEDIADORES IMUNOLÓGICOS NO LAVADO NASAL DOS PACIENTES COM RINITE ALÉRGICA ANTES E APÓS A REALIZAÇÃO DE IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA COM O ÁCARO *Dermatophagoides pteronyssinus*** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Clóvis Eduardo Santos Galvão**

Pesquisador (a) Executante: **Adriana Teixeira Rodrigues**

CAPPesq, 15 de Julho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo 3: Termo de Outorga Fapesp

Para uso exclusivo da FAPESP
Processo: 2011/11192-2
Data impressão: 27/02/2013 10:32:07
Folha: _____
Volume: _____
Rubrica: _____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS

PROCESSO 2011/11192-2

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.

1.OUTORGADO:	Clóvis Eduardo Santos Galvão CPF: 336.120.133-00 RG: 625011-SSP/MA
2.Correspondência:	A/C Tânia Joyce, Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155 - 8 andar bloco 3, Cerqueira César, São Paulo/SP, CEP 05403-000 cdgalvao@usp.br
3.Instituição Sede:	Faculdade de Medicina/FM Universidade de São Paulo/USP
4.Projeto de Pesquisa:	Produção local de IgE e outros mediadores imunológicos no lavado nasal dos pacientes com rinite alérgica antes e após a realização de imunoterapia específica com o ácaro Dermatophagoides pteronyssinus
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Medicina Clínica Médica
7.Coordenação:	Saúde I
8.Período da Vigência:	01/01/2012 a 31/12/2013
9.Relatórios Científicos:	30/12/2012, 30/01/2014
10.Prestações de Contas:	28/02/2013, 28/02/2014

Anexo 4: Carta da Immunotech LTDA. com a informação sobre extrato de imunoterapia

8 REFERÊNCIAS

Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(4): p. CD001186.

Akdis CA, Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. *Allergy*, 2006. 61(Suppl. 81):11–14.

Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(4): 780-91.

Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge: effect of systemic steroid pretreatment. *American review of respiratory disease* 138.2 (1988): 406-412.

Bateman, ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*, 2008. 31(1): 143-178.

Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Gaether-Akerboom M, Scheckenbach K, Wiltfang J, Schipper J, Wagenmann M. The release of IL-31 and IL-13 after nasal allergen challenge and their relation to nasal symptoms. *Clinical and Translation Allergy*, 2012. 2:13.

Biagtan M, Viswanathan, Bush RK. Immunotherapy for house dust mite sensitivity: where are the knowledge gaps? *Current allergy and asthma reports* 14.12 (2014): 1-7.

Blaski CA, Watt JL, Quinn TJ, Thorne PS, Schwartz DA. Nasal lavage cellularity, grain dust, and airflow obstruction. *CHEST Journal* 109.4 (1996): 1086-1092.

Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*, 2008. 63 Suppl 86: 8-160.

Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica JW, Casale TB et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 126(3): 466 - 476.

Brydon MJ. Skin prick testing in general practice. *J Adv Nurs*, 1998. 27(2): 442-4.

Burks A, Calderon M, Akdis C, et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* [serial online]. May 2013;131(5):1288-96.e3.

Cameron L, Hamid Q, Wright E, Nakamura Y, Christodouloupoulos P, Muro S et al. Local synthesis of epsilon germline gene transcripts, IL-4, and IL-13 in allergic nasal mucosa after ex vivo allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 106:46–52.

Canonica GW, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Bousquet PJ, Lockey RF, Malling HJ et al. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy*, 2007. 62: 317-324.

Carney AS, Hooi D, Powe DG, Huskisson RS, Jones NS. Autoanti-IgE antibodies in patients with allergic and idiopathic rhinitis. *Clin.Otolaryngol*, 2001. 26: 298-301.

Cingi C, Muluk NB, Hanci D, Ulusoy S, Sahin F. Updating the role played by immunotherapy for allergic rhinitis: meta-analysis. *International forum of allergy & rhinology*. 2014.

Cohen SG, AW Frankland, M Dworetzky. Noon and Freeman on prophylactic inoculation against hay fever. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 111(5): 1142-50.

Cox L, Li JT, Nelson H, Lockey R. Allergen immunotherapy: A practice parameter second update. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 2007. 120 (3): S25-S85.

Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic & Clinical Biostatistic. 2nd edition. East Norwalk: Appleton & Lange; 1994.

De Schryver E, Devuyst L, Derycke L, et al. Local Immunoglobulin E in the Nasal Mucosa: Clinical Implications. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2015;7(4):321-331. doi:10.4168/aair.2015.7.4.321.

Debertin, A. S., et al. Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clinical & Experimental Immunology* 134.3 (2003): 503-507.

Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*, 1999. 341(7): 468-75.

Eckl-Dorna J, Pree I, Reisinger J, Marth K, Chen KW, Vrtala S, et al. The majority of allergen-specific IgE in the blood of allergic patients does not originate from blood derived B cells or plasma cells . *Clin Exp Allergy* 2012;42:1347-55.

Elizur A, Katz Y. Allergen immunotherapy: the good, the Bad, and the unknown. *The Israel Medical Association journal: IMAJ* 16.9 (2014): 580-582.

Eng PA, Reinhold M, Gnehm HP et al. Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood. *Allergy*, 2006. 61(2): 198-201.

Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, Till SJ. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 121(5): 1120-1125 e2.

Gelardi M, Ciprandi G, Incorvaia C, Buttafava S, Leo E, Iannuzzi L, Quaranta N, Frati F. Allergic rhinitis phenotypes based on mono-allergy or poly-allergy. *Inflamm Res*, 2015. 64(6): 373-5.

Golden DB. Insect sting anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2007. 27(2): 261-72, vii.

Gómez ET, Fernández DI, Rondón CD, Campo P, Gomez F, Salas M, Gonzalez M, Perkins JR, Palomares F, Blanca M, Torres MJ, Mayorga C. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clinical & Experimental Allergy*, 2015 (45) 1542–1553.

Grady DG, Cummings SR, Hulley SB. Delineamentos Alternativos para o Ensaio Clínico e Tópicos Relacionados à Implementação. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB. Delineando a Pesquisa Clínica. Trad. Duncan MS. 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 2008. 184-6.

Guimarães Junqueira de Queirós M, Oliveira Silva DA, Alves R, Fukuhara Chiba H, Soares de Amaral VB, de Almeida KC, Ynoue LH, de Oliveira Resende R, Camargo Sopelete M, Rodrigues Silva Segundo G, Ferreira de Sousa Moreira P, Sung SJ, Taketomi EA. Mite-specific immunotherapy using allergen and/or bacterial extracts in atopic patients in Brazil. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2008. 18(2): 84-92.

Hallstrand TS, Sprenger JD, Agosti JM, Longton GM, Witherspoon RP, Henderson WR Jr. Long-term acquisition of allergen-specific IgE and asthma following allogeneic bone marrow transplantation from allergic donors. *Blood*, 2004. 104(10): 3086-90.

Hampel Jr F, Howland III W, Van Bavel J, Ratner P. A randomized, double-blind, placebo- controlled study comparing the efficacy and safety of ebastine (20 mg and 10 mg) to loratadine 10 mg once daily in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2004. 14(1):56-63.

Hankin CS, Cox L. Allergy immunotherapy: what is the evidence for cost saving? Current opinion in allergy and clinical immunology 14.4 (2014): 363-370.

Hilding AC. Simple method for collecting near-normal human nasal secretion. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1972. v.81, 422-4.

Inal A, Altıntaş DU, Yilmaz M, Karakoc GB, Kendirli SG, Sertdemir Y. Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite. *J Investing Allergol Clin Immunol*, 2007. 17(2): 85-91.

Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy*, 2007. 62(8): 943-8.

James LK, Durham SR. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 2008. 38(7): 1074-88.

Kim, SH, Shin SY, Lee KH, Kim SW, Cho JS. Long-term Effects of Specific Allergen Immunotherapy Against House Dust Mites in Polysensitized Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy, asthma & immunology research* 6.6 (2014): 535-540.

Linden M, Svensson C, Andersson E, Andersson M, Greiff I, Persson CGA. Immediate Effect of Topical Budesonide on Allergen Challenge-induced Nasal Mucosal Fluid Levels of Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor and Interleukin-5. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000. 162(5): 1705-1708.

López S, Rondón C, Torres MJ, Campo P, Fernandes R, Garcia R, Martinez-Cañavate A, Blanca M. Immediate and dual response to nasal challenge with *Dermatophagoides Pteronissinus* in local allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 2010. 40: 1007-1014.

Marafetti, Lucas E., and Horacio E. Romeo. Origins of the sympathetic innervation to the nasal-associated lymphoid tissue (NALT): An anatomical substrate for a neuroimmune connection. *Journal of neuroimmunology* 276.1 (2014): 119-125.

Marcucci F, Sensi LG, Caffarelli C, Cavagni G, Bernardini R, Tiri A, Riva G et al. Low-dose local nasal immunotherapy in children with perennial allergic rhinitis due to *Dermatophagoides*. *Allergy*, 2002 . 57: 23-28.

Mosmann T, Cherwinsky H, Bond M. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986. 136(7): 2348-57.

Naclerio RM, Proud D, Moylan B, Balcer S, Freidhoff L, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Creticos PS, Hamilton RG, Norman PS. A double-blind study of hte

discontinuation of ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 1997;100(3):293-300.

Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergol Int*, 2008. 57(2): 121-34.

Ozturk, Ayse Bilge, Leyla Pur Ozyigit, and Merve Ozata Olmez. Clinical and allergic sensitization characteristics of allergic rhinitis among the elderly population in Istanbul, Turkey. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 272.4 (2015): 1033-1035.

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

Pefura-Yone EW, Kengne AP, Balkissou AD, Boulleys-Nana JR, Efe-de-Melingui NR, Ndjéutcheu-Moualeu PI, Mbele-Onana CL et al. Research Group for Respiratory Disease in Cameroon (RGRDC). Prevalence of Asthma and Allergic Rhinitis among Adults in Yaounde, Cameroon. *PloS one* 10.4 (2015).

Powe DG, Jones NS. Local mucosal immunoglobulin E production: does allergy exist in non-allergic rhinitis? *Clin Exp Allergy*, 2006. 36(11):1367-72.

Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 114(5): p. 997-1008; quiz 1009.

Riechelmann H, Essig A, Deutschle T, Rau A, Rothermel B, Weschta M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in house dust mite allergic patients and healthy controls. *Allergy*. 2005;60(11):1418-1423.

Roger A, Depreux N, Jurgens Y, Heath MD, Garcia G, Skinner MA. A novel and well tolerated mite allergoid subcutaneous immunotherapy: evidence of clinical and immunologic efficacy. *Immunity, Inflammation and Disease* 2.2 (2014): 92-98.

Romagnani S. Immunologic influences on allergy and Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 112(3): 395- 400.

Romagnani S. Regulatory T-cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy*, 2006. 61:3–14.

Róndon C, Romero JJ, Lopez S, Antunez C, Martin-Casanez E, Torres MJ, Mayorga C, R-Pena R, Blanca M. Local IgE production and positive nasal provocation test in patients with persistent nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 119(4):899-905.

Róndon C, Blanca-Lopez N, Aranda A, Herrera R, Rodriguez-Bada JL, Canto G, Moyorga C, Torres MJ, Campo, P, Blanca M. Local allergic rhinitis: Allergen tolerance and immunologic changes after preseasonal immunotherapy with grass pollen. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 2011. 127(4): 1069-1071.

Róndon C, Campo, P, Togias A, Wydke JF, Durham SR, Powe DG, Mullol J, Blanca M. Local allergic rhinitis: Concept, pathophysiology, and management. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 2012. 129(6): 1460-1467.

Saarinen, UM. Transfer of latent atopy by bone marrow transplantation? A case report. *J Allergy Clin Immunol*, 1984. 74(2): 196-200.

Scadding GW, Eifan A, Penagos M, Dumitru A, Switzer A, McMahon O, Phippard D, Togias A, Durham SR, Shamji MH. Local and systemic effects of cat allergen nasal provocation. *Clinical Experimental Allergy*, 45; 613-623.

Sensi LG, Piacentini GL, Nobile E, Ghebregzabher M, Brunori R, Zanolla L, et al. Changes in nasal specific IgE to mites after periods of allergen exposure-avoidance: a comparison with serum levels . *Clin Exp Allergy* 1994;24:377-82.

Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2002. 2 (3): 231-238.

Solé D, Wandalsen F, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Phase 3. *Jornal de Pediatria*. 2006; 82(5): 341-346.

Spector SL, Nickals RA. Practice parameters for the diagnosis and treatment of asthma. J. Allergy. Clin.Immunol., v.96, p.732-748, 1995.

Tantilipikorn P, Vichyanound P, Lacroix JS. Nasal provocation test: how to maximize its clinical. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology 28.4 (2010): 225-31.

van Halteren HK, van der Linden PW, Burgers SA, Bartelink AK. Hymenoptera sting challenge of 348 patients: relation to subsequent field stings. J Allergy Clin Immunol, 1996. 97(5): 1058-63.

van Vlasselaer P, Punnonen J, de Vries JE. Transforming growth factor- β directs IgA switching in human B cells. The Journal of Immunology. 1992; 140 (7): 2062-2067.

Wang JH, Devalia JL, Duddle JM, Hamilton AS, Davies RJ. Effect of six-hour exposure to nitrogen dioxide on early-phase nasal response to allergen challenge in patients with a history of seasonal allergic rhinitis. J. Allergy Clin. Immunol, 1995. v.96, n.5, p.669-76.

APENDICES

Tabela 8. Avaliação dos níveis de imunoglobulinas e células no soro e lavado nasal, nos períodos pré e pós-tratamento do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)

	Placebo							Imunoterapia						
	Pré			Pós			<i>p</i>	Pré			Pós			<i>p</i>
	Mín.	P50	Máx.	Mín.	P50	Máx.		Mín.	P50	Máx.	Mín.	P50	Máx.	
<i>Soro</i>														
IgE Derp 1	0,25	11,75	94	0,05	18,5	124,5	0.423	0,35	24,3	357,5	0	49,6	346,5	0.872
IgE Derp 2	0,2	9,5	72,5	0,02	16,4	96,5	0.453	0,3	11	303	0	32,5	296	0.919
IgE Total	42,4	183,8	2340	26,6	196	1460	0.278	20,9	250,5	1710	0	214,5	1605	0.243
IgG4 Der p 1	0,1	0,38	4,15	0,1	0,5	2,1	0.049	0,15	0,7	4,7	0	2	35,8	0.006
<i>Lavado Nasal</i>														
IgE Derp 1	0,5	0,75	1,4	0,55	0,8	7,9	0.184	0,6	1,3	14,9	0	0,9	58	0.294
IgE Derp 2	0,4	0,65	1,1	0,35	0,7	2,9	0.449	0,5	0,95	12,75	0	0,65	36,7	0.259
IgE Total	17,1	24,95	56	2,0	20,3	46,8	0.163	16,2	30,85	73	0	22,6	51,5	0.034
IgG4 Der p 1	0,01	0,18	0,5	0,0005	0,05	0,6	0.562	0,01	0,2	0,6	0	0,2	3,6	0.614
CT	0	1,5	50,7	0	2,7	9,67	0.740	0	2,32	15,3	0	0,8	13,95	0.044
N	0	0,28	8,5	0	0,19	3,72	0.398	0,5	1,75	15,8	0	0,48	14,14	0.140
M	0	0,16	6,89	0	0,49	1,25	0.306	0	0,13	6,06	0	0,22	1,66	0.875
L	0	0	0,03	0	0	0,94	0.645	0	0	0,11	0	0	0,06	0.623
E	0	0	2,16	0	0	5,41	-	0	0,065	6,24	0	0,04	1,7	0.196

Legenda: IgE Der p 1 = (kU/L); IgE Der p 2 = (kU/L); IgE total = (UI/L); IgG4 Der p 1 = (kU/L); Células Totais, Neutrófilo, Macrófago, Linfócito e Eosinófilo = (10^4 cel/ml).

Tabela 9. Determinação de citocinas no lavado nasal pré e pós-provocação (desafio), antes do início do tratamento entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia. (HCFMUSP, 2016)

Citocinas (pg/ml)	Placebo (n= 17)						p	Imunoterapia (n= 19)						p
	Pré-provocação			Pós-provocação				Pré-provocação			Pós-provocação			
	Mín	P50	Máx	Mín	P50	Máx		Mín	P50	Máx	Mín	P50	Máx	
IL-2	0,22	0,2	5,23	0	0	610,1	0.211	0,22	0,95	9,9	0	0	250	0.130
IL-4	0,3	0,36	20,5	0	0,5	82,02	0.276	0,36	0,36	6,1	0	1,91	46,1	0.031
IL-5	0,27	0,27	63,6	0	10,17	311,9	0.147	0,27	2,7	26,7	0	13,8	414,7	0.011
IL-10	0,07	0,38	79,4	0	37,4	352	0.009	0,07	3,45	20,7	0	5,8	591,1	0.047
IL-12	0,13	0,13	190,6	0	0	1055	0.377	0,13	8,5	69,4	0	4,72	811,9	0.326
IL-13	1,25	1,27	135,0	0	25,6	549,5	0.034	1,27	4,4	89,9	0	48,97	729,8	0.009
GM-CSF	2,3	18,7	280,6	0	182,4	792,9	0.007	2,3	38,7	133,9	0	97,21	755,1	0.058
INF- γ	17,8	17,8	10471,0	0	0	9257,2	-	17,8	76,1	961,6	0	329,3	3357,7	0.031
TNF- α	0,05	0,55	7024,0	0	60,15	2233,1	0.535	0,05	1,82	140,9	0	76,2	1152,3	0.004
IL-1b	1,6	13,5	122,6	0	3,51	31,6	0.009	1,15	44,5	898,1	0	0,6	42,9	0.000
IL-6	13,4	65,7	1358,0	0	8,5	142,6	0.006	13,4	123,5	9691,5	0	11,7	667,5	0.005
IL-17A	3,1	3,1	81,0	0	0,45	99,1	-	3,1	3,1	1040	0	0	42,4	0.007
IL-17F	33,3	333,3	2278,5	0	0	861,1	0.034	33,3	471	6119	0	0	123,2	0.000
IL-21	20,8	1163,6	21053	0	44,9	1291,6	0.007	20,8	2257	48612	0	22,4	906,2	0.001
IL-22	11,0	11,0	211,2	0	0	190,6	0.452	11,0	11,0	1310	0	0	56,01	0.000
IL-23	34,1	34,1	3827,8	0	0	1466,3	0.104	34,1	264,6	18461	0	0	208,9	0.000
IL-25	4,5	4,5	159,5	0	0	79,6	0.096	4,5	14,4	1078	0	0	19,8	0.000
IL-31	19,0	164,0	1686,5	0	0	941	0.043	19,0	423,5	9744	0	0	1102,9	0.002
IL-33	1,2	27,9	1784,2	0	0	564,9	0.108	1,22	259,8	8896,5	0	0	229,99	0.002
sCD40L	6,2	6,2	190,7	0	0	176,5	0.034	6,17	6,17	773,7	0	0	20,1	0.001

Valor de p: Teste de Wilcoxon

Tabela 10. Determinação de citocinas no lavado nasal pré e pós provocação (desafio) em seis meses de acompanhamento, entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)

Citocinas (pg/ml)	Placebo (n= 17)							Imunoterapia (n= 19)						
	Pré-provocação			Pós-provocação			p	Pré-provocação			Pós-provocação			p
	Mín	P50	Máx	Mín	P50	Máx		Mín	P50	Máx	Mín	P50	Máx	
IL-2	0,22	0,2	3,4	0	0	605,4	0.101	0	0,2	3,5	0	0	674,1	0.731
IL-4	0	0,36	0,77	0	0	90,7	0.566	0	0,36	5,9	0	0,5	66,7	0.122
IL-5	0	0,27	8,2	0	2,48	311,8	0.100	0	2,1	21,0	0	8,6	239,5	0.125
IL-10	0	1,7	29,5	0	20,4	911,6	0.003	0,07	1,37	12,3	0	35,7	721,4	0.005
IL-12 (p70)	0	0,13	55,7	0	0	1840,8	0.705	0	2,1	52,4	0	0	1852,5	0.426
IL-13	0	1,27	19,5	0	20,9	529,4	0.037	0,73	1,27	62,8	0	39,5	466,6	0.010
GM-CSF	2,3	30,6	237,6	0	166,04	694,8	0.001	0	19,8	66,4	0	181,5	541,8	0.006
INF-γ	0	17,8	300,2	0	0	7306,9	0.068	2,9	17,8	578,6	0	224,2	6965,8	0.031
TNF-α	0,05	0,25	84,0	0	33,3	2164,2	0.019	0	1,34	182,5	0	68,3	2290,1	0.002
IL-1b	4,6	20,4	752,3	0	2,33	274,14	0.018	0,11	26,3	857,1	0	1,64	76,6	0.001
IL-6	13,4	74,1	390,6	0	12,8	231,8	0.013	2,8	40,1	794	0	9,2	76,4	0.006
IL-17A	5,7	5,7	83,6	0	0	19,7	0.006	5,7	5,7	115,1	0	0	34,1	0.000
IL-17F	143,7	471,0	2130,1	0	0	15,8	0.001	143,7	143,7	2303	0	0	423,9	0.000
IL-21	45,0	2257	7769	0	0	162,3	0.001	208,4	208,4	10564	0	0	803,6	0.001
IL-22	11,0	11,0	285,3	0	0	58,2	0.007	11,0	11,0	513,8	0	0	23,4	0.001
IL-23	136,8	136,8	2737,8	0	0	171,7	0.001	136,8	136,8	3402	0	0	402,6	0.004
IL-25	5,1	25,4	112,4	0	0	1,24	0.001	0,31	5,1	145,4	0	0	60,5	0.000
IL-31	56,3	372,3	1467,5	0	0	10,9	0.001	56,3	110,7	1468	0	0	428,5	0.001
IL-33	1,2	259,8	1223,6	0	0	73,9	0.009	1,22	77,0	1284,2	0	0	169,9	0.004
sCD40L	8,1	8,1	133,6	0	0	0	0.000	8,12	8,12	329,9	0	0	20,06	0.000

Valor de p: Teste de Wilcoxon

Tabela 11. Determinação de citocinas no lavado nasal pré e pós provocação (desafio) em seis meses de acompanhamento, entre os pacientes do grupo placebo e imunoterapia (HCFMUSP, 2016)

Citocinas	Pré provocação							p	Pós provocação						p
	Placebo (n= 17)			Imunoterapia (n= 19)			Placebo (n= 17)			Imunoterapia (n= 19)					
	Mín	P50	Máx	Mín	P50	Máx	Mín		P50	Máx	Mín	P50	Máx		
IL-2	0,22	0,2	3,4	0	0,2	3,5	0.261	0	0	605,4	0	0	674,1	0.460	
IL-4	0	0,36	0,77	0	0,36	5,9	0.616	0	0	90,7	0	0,5	66,7	0.280	
IL-5	0	0,27	8,2	0	2,1	21,0	0.003	0	2,48	311,8	0	8,6	239,5	0.728	
IL-10 (56)	0	1,7	29,5	0,07	1,37	12,3	0.873	0	20,4	911,6	0	35,7	721,4	0.725	
IL-12 (p70)	0	0,13	55,7	0	2,1	52,4	0.170	0	0	1840,8	0	0	1852,5	0.745	
IL-13	0	1,27	19,5	0,73	1,27	62,8	0.156	0	20,9	529,4	0	39,5	466,6	0.608	
GM-CSF	2,3	30,6	237,6	0	19,8	66,4	0.321	0	166,04	694,8	0	181,5	541,8	0.896	
INF-γ	0	17,8	300,2	2,9	17,8	578,6	0.063	0	0	7306,9	0	224,2	6965,8	0.259	
TNF-α	0,05	0,25	84,0	0	1,34	182,5	0.540	0	33,3	2164,2	0	68,3	2290,1	0.861	
IL-1b	4,6	20,4	752,3	0,11	26,3	857,1	0.281	0	2,33	274,14	0	1,64	76,6	0.585	
IL-6	13,4	74,1	390,6	2,8	40,1	794	0.316	0	12,8	231,8	0	9,2	76,4	0.777	
IL-17a	5,7	5,7	83,6	5,7	5,7	115,1	0.610	0	0	19,7	0	0	34,1	0.164	
IL-17F	143,7	471,0	2130,1	143,7	143,7	2303	0.204	0	0	15,8	0	0	423,9	-	
IL-21	45,0	2257	7769	208,4	208,4	10564	0.197	0	0	162,3	0	0	803,6	0.435	
IL-22	11,0	11,0	285,3	11,0	11,0	513,8	0.969	0	0	58,2	0	0	23,4	0.921	
IL-23	136,8	136,8	2737,8	136,8	136,8	3402	0.397	0	0	171,7	0	0	402,6	-	
IL-25	5,1	25,4	112,4	0,31	5,1	145,4	0.187	0	0	1,24	0	0	60,5	0.536	
IL-31	56,3	372,3	1467,5	56,3	110,7	1468	0.323	0	0	10,9	0	0	428,5	-	
IL-33	1,2	259,8	1223,6	1,22	77,0	1284,2	0.267	0	0	73,9	0	0	169,9	0.595	
sCD40L	8,1	8,1	133,6	8,12	8,12	329,9	0.708	0	0	0	0	0	20,06	0.334	

Valor de *p* pelo Teste de Mann Whitney.