ANDREA COHON

**Avaliação do BCG como adjuvante na
imunoterapia específica para asmáticos**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Kalil

Co-Orientadora: Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

SÃO PAULO

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cohon, Andrea

Avaliação do BCG como adjuvante na imunoterapia específica para asmáticos

/ Andrea Cohon. -- São Paulo, 2004.

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

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Co-orientadorA: Luisa Karla de Paula Arruda.

Descritores: 1.VACINA BCG/imunologia 2.DESSENSIBILIZAÇÃO
IMUNOLÓGICA/métodos 3.ASMA/imunologia 4.DERMATOPHAGOIDES
PTERONYSSINUS/imunologia 5.ENSaios CONTROLADOS ALEATÓRIOS
6.MÉTODO DUPLO-CEGO 7.TESTES CUTÂNEOS/métodos
8.IMUNOGLOBULINAS/imunologia 9.CULTURA DE CÉLULAS/métodos
10.INTERLEUCINA-10/imunologia 11.ESPIROMETRIA/ métodos 12. HIPER-
REATIVIDADE BRÔNQUICA

USP/FM/SBD-134/04

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil por acreditar em mim, me abrir as portas do mundo da pesquisa e pela oportunidade da execução desta tese.

Ao Prof. Dr. Milton de Arruda Martins pelas opiniões valiosas, construtivas e pelo interesse em me ajudar.

À Dra. Luisa Karla de Paula Arruda pelas orientações e avaliações dos extratos para imunoterapia.

Ao Dr. Dewton Vasconcelos de Moraes pelo fornecimento de algumas alíquotas de PPD para os ensaios preliminares e pela atenção e amabilidade com que sempre me recebeu.

À Dra. Marta Heloisa Lopes diretora do Serviço de Imunizações que me recebeu com tanta cordialidade e possibilitou a utilização do serviço para aplicação do BCG.

À Dra. Luisa Guilherme Guglielmo por permitir que eu me iniciasse no universo da cultura de células.

À Dra. Ana Carla Goldenberg pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Nelson Rosário pelas orientações referentes aos testes cutâneos.

À Dra. Vera Pugliese Castilho que disponibilizou os exames no Laboratório de Protoparasitologia

Ao Dr. José Carlos Mori IPI-ASAC Brasil e Sr. Pedro Santo IPI-ASAC Espanha que graciosamente forneceram o material para imunoterapia.

Ao Dr. Luiz Augusto Fonseca Marcondes pela sua atenção e colaboração na análise estatística.

A Dra. Ione Irulegui pela atenção e correção do resumo em inglês.

A Dra. Cristina Kokron pelo interesse e apoio.

Ao Dr. Luiz Vicente Rizzo pela colaboração com as referências bibliográficas e participação na banca de qualificação.

A Dra. Joicy Yamamoto pela participação na banca de qualificação.

Sr. Fábio Arcuri - Pharmacia que gentilmente forneceu o kit para quantificação da IgG específica.

Ao Sr. Hildo Fernando de Souza - Biosintética que forneceu parte da medicação usada durante o estudo.

À Santa por sua infinita paciência, incansável disposição de colaborar e por sua sincera amizade.

À Fátima Gama e Andressa Chiarella – Lab Trade - do Brasil que colaboraram na realização dos testes de ELISA.

Ao Serafim sempre disposto a colaborar, em tudo que fosse necessário, executou os testes espirométricos e participou na implantação do teste de broncoprovocação por exercício.

À Beatriz-Bia sempre atenciosa e amiga que colaborou na compilação dos dados, execução das análises estatísticas e, juntamente com Adriana, mediu o óxido nítrico.

À Simone Fonseca pela colaboração na realização dos testes de ELISA e participação da banca da aula de qualificação.

À Cristina Caldas pela atenção, orientações e colaboração na realização dos testes de ELISA.

Ao pessoal do LIM 20, Dra. Iolanda, Edna, Fernanda A, Fernanda, David, Rosana e Sirlene pela paciência, colaboração e apoio.

Ao pessoal do Laboratório de HLA sempre prestativos em especial ao Hécio que “acolheu” minhas amostras no freezer - 80°C e pelo apoio nos momentos difíceis; ao Carlos Sergio e Cláudia pelo interesse em me ajudar.

À toda equipe do Laboratório do Incor: Kellen, Daniela, Sandra Drigo, Sandra Maria, Sandra Emiko, Léo, Rose Renata, Iolanda, Malú, Mônica, Flávio, Fabinho, Washington, Seu Jair, Douglas e Dna. Aurora que colaboraram de alguma forma para realização dos procedimentos lá executados.

À Auxiliar de enfermagem Marina do Serviço de Imunizações sempre eficiente e com sorriso nos lábios.

Aos funcionários do Ambulatório de Alergia e Imunologia: Leoni pela execução dos testes de puntura, Genair, Rosana e LIM 60: Carlos e Dna. Elza.

Aos médicos, residentes e estagiários do serviço que colaboraram com a triagem dos pacientes.

Aos médicos da Unidade Básica de Saúde - Ferreira de Araújo que encaminharam pacientes para seleção inicial.

Ao Augusto Luis sempre prestativo, que muito me auxiliou na parte de informática.

Ao Niraldo do Serviço de Psicologia pelo apoio e incentivo.

À Tânia da secretaria que se encarregou dos procedimentos burocráticos.

À Valéria e Sonia da biblioteca pelo auxílio revisão da bibliografia.

Aos pacientes e seus responsáveis que, bravamente, compareceram durante três meses, duas vezes por semana, ao hospital.

*Aos meus pais Alberto Carlos e Dulce
que me ensinaram, cada um a seu modo, trilhar a vida
com perseverança, honestidade e respeito ao próximo.*

*À minha irmã Yeda de quem
não mais desfruto a companhia.*

*Aos meus filhos e netos: Renato, Flávia. Deborah,
César e Gabriel (a caminho) que são os mais belos e
doces frutos da minha existência*

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	17
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Casuística	18
3.2 Seleção dos pacientes	19
3.3 Modelo do estudo	20
3.4 Características clínicas	23
3.5 Material e Métodos	24
3.5.1 Imunoterapia	24
3.5.2 Teste cutâneo de leitura imediata	27
3.5.3 Teste cutâneo de reatividade ao PPD	29
3.5.4 Testes espirométricos	29
3.5.5 Teste de broncoprovocação induzida por exercício	30
3.5.6 Medida do óxido nítrico no ar exalado	31
3.5.7 Quantificação da imunoglobulina E específica para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	32
3.5.8 Quantificação da imunoglobulina G específica para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	33
3.5.9 Quantificação da imunoglobulina E total	34

3.5.10	Quantificação de imunoglobulinas séricas	34
3.5.11	Cultura de células	34
3.5.12	Quantificação da interleucina 10	36
3.5.13	Contagem de eosinófilos em sangue periférico	38
3.5.14	Exame protoparasitológico	38
3.6	Locais de desenvolvimento do projeto	38
3.7	Análise estatística	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Evolução clínica dos pacientes	40
4.2	Reações adversas	44
4.3	Análise dos testes cutâneos de leitura imediata	46
4.4	Avaliação dos parâmetros da função pulmonar	47
4.5	Avaliação do teste de broncoprovocação induzida por exercício	49
4.6	Medida do óxido nítrico no ar exalado	50
4.7	Análise da imunoglobulina E total	51
4.8	Análise dos eosinófilos em sangue periférico	52
4.9	Análise da imunoglobulina E específica para Dpt	53
4.10	Análise da imunoglobulina G específica para Dpt	54
4.11	Análise das imunoglobulinas séricas	55
4.12	Teste de linfoproliferação	56
4.13	Análise de interleucina 10	59
5.	Discussão	65
5.1	Considerações a respeito do extrato para imunoterapia	74
6.	Conclusões	75

7. Anexo	86
-----------------	-----------

7.1 Guia GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA (GINA)	
--	--

8. Referências Bibliográficas	87
--------------------------------------	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características clínicas dos pacientes	24
TABELA 2	Esquema da fase de indução de imunoterapia	27
TABELA 3	Classificação da gravidade da asma Pré e Pós-ITE	41
TABELA 4	Medicação para asma Pré e Pós-ITE	42
TABELA 5	Sintomas de conjuntivite alérgica Pré e Pós-ITE	43
TABELA 6	Valores dos parâmetros da função pulmonar (porcentagem do predito) Pré e Pós-ITE	48
TABELA 7	Medidas do óxido nítrico no ar exalado Pré e Pós-ITE	51
TABELA 8	Valores da IgE total em sangue periférico Pré e Pós-ITE	52
TABELA 9	Valores percentuais de eosinófilos em sangue periférico Pré e Pós-ITE	53
TABELA 10	Valores das imunoglobulinas séricas Pré e Pós-ITE	56

TABELA 11	Evolução do quadro clínico no Grupo A	63
-----------	---------------------------------------	----

TABELA 12	Evolução do quadro clínico no Grupo B	64
-----------	---------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Número e gravidade das reações (imediatas e tardias) em pacientes asmáticos durante o período de indução da ITE para Dpt. Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n=11) - ITE+BCG 46
- FIGURA 2 - Valores das medidas das pápulas em milímetros do teste de puntura titulado para Dpt em pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE para Dpt. Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n=11) ITE+BCG. ANOVA * $p < 0,05$. A linha tracejada representa a positividade do teste 47
- FIGURA 3 - Valores do VEF₁ (% do predito) medidos aos 3, 10, 20 minutos e após BD, após a realização do teste de broncoprovocação por exercício, em pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE. Cada ponto representa a média dos dois grupos e a barra ao correspondente erro padrão. Grupo A (n=10) - ITE Grupo B (n=11) -ITE+BCG. ANOVA * $p < 0,05$ 50
- FIGURA 4 - Quantificação da IgE específica para Dpt, representada em classes, em soro de pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE. Grupo A (n=10)-ITE Grupo B (n=11)-ITE+BCG. ANOVA $p > 0,05$ Acima da linha tracejada o resultado é considerado positivo 54

- FIGURA 5 - Níveis séricos de IgG específica para Dpt em soro de pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE. ANOVA * $p < 0,001$
Grupo A (n=10) - ITE Grupo B (n=11) ITE+BCG 55
- FIGURA 6 - Resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes asmáticos, avaliada pelo índice de estimulação, após estímulo com Dpt, Pré e Pós-ITE. ANOVA Pré vs Pós $p < 0,05$. A vs B $p > 0,05$. Grupo A (n=10) - ITE Grupo B (n=11) - ITE+BCG 57
- FIGURA 7 - Resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes asmáticos, avaliada pelo índice de estimulação, após estímulo com toxóide tetânico, Pré e Pós-ITE. ANOVA Pré vs Pós $p > 0,05$. A vs B $p > 0,05$. Grupo A (n=10) - ITE Grupo B (n=11) - ITE+BCG 58
- FIGURA 8 - Resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes asmáticos, avaliada pelo índice de estimulação, após estímulo com PPD, Pré e Pós-ITE. Grupo A (n=10) - ITE Pré vs Pós $p > 0,05$ Grupo B (n=11)-ITE+BCG Pré vs Pós $p < 0,05$. A vs B Pós ITE $p < 0,05$. ANOVA 59

FIGURA 9 - Níveis médios de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de pacientes asmáticos, estimuladas com extrato de Dpt (18h) Pré e Pós-ITE. Grupo A (n=10) - ITE. ANOVA

60

FIGURA 10 - Níveis médios de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, de pacientes asmáticos, estimuladas com extrato de Dpt (18h), Pré e Pós-ITE. Grupo B (n=11) - ITE+BCG. ANOVA

61

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1** Teste de puntura titulado em pacientes dos Grupos A e B
- QUADRO 2** Valores dos parâmetros da função pulmonar Pré-ITE em pacientes dos Grupos A e B
- QUADRO 3** Valores dos parâmetros da função pulmonar Pós-ITE em pacientes dos Grupos A e B
- QUADRO 4** Mudanças dos valores do VEF₁ Pós-BD em pacientes dos Grupos A e B
- QUADRO 5** Maior queda do VEF₁ após o teste de broncoprovocação induzida por exercício em pacientes dos Grupos A e B
- QUADRO 6** Quantificação da IgE (classe) e IgG específicas para Dpt em pacientes dos Grupos A e B
- QUADRO 7** Quantificação de eosinófilos em sangue periférico de pacientes dos pacientes dos Grupos A e B

QUADRO 8 Quantificação das imunoglobulinas séricas em pacientes dos Grupos A e B

QUADRO 9 Proliferação de células mononucleares do sangue periférico de pacientes dos Grupos A e B, após estímulo com Dpt, TT, PPD

QUADRO 10 Quantificação da interleucina 10 em sobrenadante de cultura de PBMC após estímulos com Dpt e PPD (18h), em pacientes dos Grupos A e B

QUADRO 11 Valores do NO no ar exalado Pré e Pós ITE nos paciente dos Grupos A e B

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen presenting cell</i> – célula apresentadora de antígeno
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BD	Broncodilatador
BIE	Broncoprovocação induzida por exercício
CN	Controle negativo
cpm	contagem por minuto
CVF	Capacidade vital forçada
Dpt	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DV	Desvio padrão
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>
EO	Eosinófilo
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
FcεRII	Receptor de baixa afinidade para IgE
FEF _{25-75%}	Fluxo expiratório forçado no intervalo 25-75% da curva/fluxo volume
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
IE	Índice de estimulação
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
ITE	Imunoterapia específica
LPS	Lipopolissacarídeos
mg/dL	miligrama/decilitro
NK	<i>Natural Killer</i> - célula assassina
NO	Óxido nítrico
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> -célula mononuclear do sangue periférico
PFE	Pico de fluxo expiratório
ppb	partícula por milhão
PPD	<i>Purified protein derivative</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> , fator de transformação beta
Th1	Célula <i>T helper 1</i> – célula auxiliadora 1
Th2	Célula <i>T helper 2</i> – célula auxiliadora 2
Thr	Célula T reguladora
TNF	<i>Tumour necrosis factor beta</i> - fator de necrose tumoral beta
TT	Toxóide tetânico
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

RESUMO

Cohon A. **Avaliação do BCG como adjuvante na imunoterapia específica para asmáticos.** São Paulo, 2004 Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O aumento da prevalência de doenças alérgicas como a asma, tem sido atribuído à falta de estímulos infecciosos. A atopia, que embasa as manifestações alérgicas, caracteriza-se por uma disfunção imune com predomínio da resposta do tipo Th2.

Experimentos em modelos animais com micobactérias e seus produtos têm demonstrado resultados promissores na proteção e reversão de resposta imune do tipo Th2. A imunoterapia para alérgenos inalatórios tem mostrado resultados positivos e o uso do BCG como adjuvante poderia trazer benefícios adicionais.

Em estudo randomizado duplo cego foram avaliados 21 indivíduos de ambos os sexos, com idades de 8 a 17 anos sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronissynus* (Dpt) e portadores de asma leve ou moderada persistentes. Os pacientes foram divididos em dois grupos e tratados com imunoterapia específica (ITE) para Dpt. O Grupo A recebeu como adjuvante, no início da ITE, uma aplicação do diluente do BCG e o Grupo B uma dose da vacina BCG. Na avaliação realizada após o período de indução da ITE constatou-se nos dois grupos diminuição significativa dos sintomas, da necessidade de medicação para asma, da hiperreatividade brônquica inespecífica, da reatividade cutânea ao Dpt juntamente com a melhora da função pulmonar. Houve uma redução no índice de estimulação da cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com Dpt, acompanhada de uma elevação da IL-10 no sobrenadante e dos níveis da IgG específica para Dpt e da IgE total. Os eosinófilos, a IgE específica para Dpt do sangue e o óxido nítrico no ar exalado não se alteraram. Não houve diferença na comparação dentre os grupos, exceto na proliferação das células mononucleares do sangue periférico estimuladas com PPD, que foi maior no Grupo B. Conclusão: a ITE levou a resultados satisfatórios com melhora clínica e alterações imunológicas já ao final do período de indução. A avaliação do uso do BCG como adjuvante, não mostrou benefícios adicionais.

SUMMARY

Cohon A. **Assessment of BCG as an adjuvant in specific immunotherapy in asthmatic patients**. São Paulo, 2004. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo.

The increase of allergic diseases, such as asthma, has often been explained by a decline in infectious stimulation.

Atopy that is characterized as an immune dysfunction promotes a strong type Th2 immune response and underlines allergic diseases. Experimental animal models researches with mycobacteria and its products had led to promising results in prevention or reversion of type Th2 response. Positive results have been obtained to allergens specific immunotherapy (SIT) and its association with BCG vaccine, as an adjuvant, could promote additional benefits. In a randomized double blind study 21 patients sensitized to mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) with mild or moderate persistent asthma, aged 8 to 17 years of both sex were evaluated.

Patients were divided in two groups. Group A received at the beginning of SIT one dose of BCG diluent and Group B one dose of BCG vaccine. After the SIT induction period we observed in both groups a significant decrease in asthma symptoms, bronchial hyperreactivity, immediate cutaneous reactivity to Dpt and the necessity of drugs intake. Specific lymphoproliferation against Dpt significantly decreased while IL-10 levels, specific IgG and total IgE increased. Blood eosinophils, specific IgE, others immunoglobulins levels and nitric oxide in exhaled air didn't change. There were no differences in all parameters evaluated between the two groups except on specific lymphoproliferation against PPD that was higher in Group B. Conclusions: improvement in symptoms and immunologicals changes were observed at the end of SIT induction period. BCG as adjuvant didn't add additional benefits.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Imunoterapia alérgeno específica

A imunoterapia alérgeno específica (ITE) foi introduzida por Noon e Freeman em 1911 (Kim et al., 2003) para o tratamento da rinite alérgica (febre do feno) com a intenção de “neutralizar” os efeitos causados pelo pólen no organismo. Também denominada hipossensibilização ou vacina terapêutica para doenças alérgicas (Bousquet et al., 1998) é utilizada na abordagem de doenças mediadas pela imunoglobulina E (IgE), com a finalidade de alterar seletivamente a resposta imunológica alérgica para uma resposta normal. Consiste na administração seriada com aumento gradual, por via subcutânea, de pequenas doses do extrato alergênico em pacientes sensibilizados, até se atingir uma dose efetiva para melhorar ou abolir sintomas associados a exposições naturais subseqüentes.

A prevalência de doenças alérgicas vem aumentando nas últimas décadas em países industrializados (Sly 1999; Downs et al., 2001; Wulthrich, 1989). Estudos populacionais encontraram uma prevalência cumulativa de doenças atópicas na infância de 25 a 30%, entre elas a asma (7 a 10%) e a rinoconjuntivite (15 a 20%) (Downs et al., 2001; Magnus et al., 1997; Burr et al., 1989).

Na cidade de São Paulo, segundo dados obtidos através da aplicação do questionário ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in*

Childhood), a prevalência de asma, diagnosticada por médicos, em crianças de 6 a 7 anos foi de 6.1% e de 13 a 14 anos de 10% (Solé et al., 1999).

A distribuição dos casos de doenças alérgicas, entretanto, não é uniforme nas diversas partes do mundo. Em países não industrializados ela é significativamente menor (ISSAC, 1998). Esta diferença também foi observada em populações da mesma etnia submetidas a distintas condições de vida urbana. (Klein et al., 1992; von Mutius et al., 1994).

Existem plenas evidências de que o estado alérgico é decorrente da interação de fatores genéticos e ambientais nos primeiros anos de vida (Hanson et al., 1991). A possibilidade do envolvimento de mutações genéticas é altamente improvável devido ao curto espaço de tempo decorrido entre as observações epidemiológicas. Para esclarecimento dos fatos as pesquisas foram direcionadas para fatores ambientais não específicos e mudanças ocorridas no estilo de vida nos países industrializados nas últimas quatro décadas, que têm sido estudados intensamente.

A Hipótese da Higiene foi proposta por Strachan (1989) baseado na observação da maior frequência de sensibilização alérgica entre os primogênitos e sua redução nas famílias mais numerosas (1997), sugeriu que a limitada exposição a agentes infecciosos durante a primeira infância levaria a um desenvolvimento inadequado do sistema imunológico.

A hipótese teve seu princípio reforçado com o resultado de vários estudos que encontraram relação entre a falta destes estímulos e a prevalência de doenças alérgicas. Dentre eles, a melhora das condições de

higiene (Matricardi et al., 2000), o declínio de estímulos infecciosos nos primeiros anos de vida (Martinez et al., 1995), o uso de antibióticos e vacinas na primeira infância (Hopkin, 1999; ERB, 1999) e as mudanças na microflora intestinal (Bjorksten et al., 1999), decorrentes da elevação do padrão sócio econômico. O moderno estilo de vida também privaria do contato com bactérias inofensivas como micobactérias comuns encontradas na água não tratada e no solo, presentes através da evolução humana.

A falta destes estímulos no sistema imunológico em desenvolvimento, resultaria na insuficiente estimulação dos linfócitos do tipo T auxiliador 1 (Th1) que seriam incapazes de contrabalançar a expansão dos linfócitos T auxiliador 2 (Th2). Como consequência, haveria uma resposta imunológica inapropriada para antígenos inócuos do meio ambiente, levando à predisposição para alergia.

A exposição a microorganismos pode ocorrer na ausência de infecção e o ambiente rural oferece condições para que isto aconteça de forma mais intensa. Uma nítida diferença na prevalência de alergias entre a população infantil da zona rural e urbana de um mesmo país foi verificada em vários estudos (Kilpelainen et al., 2000).

O efeito protetor de estar exposto ao estilo de vida rural e apresentar alergias foi mais diretamente correlacionado aos freqüentes contatos com animais do campo e estábulos (von Ehrestein et al., 2000).

A exposição a produtos bacterianos como os lipopolissacarídeos (LPS) seria uma possibilidade para explicar essas observações, pois os LPS se ligam na membrana das células apresentadoras de antígeno (APC), através

de receptores de alta afinidade CD14 e *Toll like receptor 2* e 4, estimulando uma intensa produção de interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ , que são potentes indutores de células do subtipo Th1 (Le et al., 1986; D'Andrea et al., 1992). O CD14 também se liga à estruturas presentes na parede de micobactérias que estimulam monócitos a produzir IL-12 (Martinez 1999).

Recentemente o grupo de estudo ALEX (Allergy and Entoxin) (Riedler et al., 2001) constatou a redução de um terço no risco de sensibilização alérgica e de asma em crianças que foram expostas ao ambiente rural durante o primeiro ano de vida, quando comparadas com crianças expostas mais tardiamente.

A atopia, maior fator de risco para desenvolvimento de asma (Peat et al., 1999), caracteriza-se pela produção contínua exuberante de anticorpos da classe IgE específicos para antígenos comuns do meio ambiente e inócuos para pessoas normais (Abbas, 1997).

Com a identificação da dicotomia dos linfócitos T CD4⁺ em Th1 e Th2 (Mosmann et al., 1986), observou-se que o processo atópico é regido pelo padrão de resposta do tipo Th2, também presente nas parasitoses, que se caracteriza pela produção das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13.

Os linfócitos Th1 estão envolvidos na defesa contra vírus e bactérias e nas doenças autoimunes, produzindo IFN- γ , IL-12 e o fator de necrose tumoral (TNF) (Mosmann Coffman, 1989; Holt et al., 1999).

As citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2 têm a propriedade de interferir na regulação da síntese umas das outras, exibindo uma ação inibitória entre si (Snapper et al., 1987).

Estudos *in vitro* demonstraram que o micro ambiente de citocinas, por ocasião da apresentação do antígeno para célula T virgem, era um dos principais determinantes do perfil de sua diferenciação (Eckart, 1997). Fatores genéticos, natureza, dose e via da apresentação do alérgeno, tipo de célula apresentadora de antígeno, moléculas co-estimuladoras, sinais moleculares e fatores de transcrição também fazem parte desse processo (Hori et al., 2003; Abbas, 1996).

Existem evidências de que os primeiros anos de vida são o período de maior influência no estabelecimento do balanço Th1/Th2 e da sensibilização alérgica (Brehler et al., 1999).

Na atopia a interação do alérgeno ambiental com o sistema imunológico inato, induz a sensibilização e diferenciação do linfócito T para o subtipo Th2, que quando estimulado produz as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13. A interação da IL-4 com precursores de LB ativa mecanismos necessários para mudança da síntese de cadeia pesada, que passa a ser do isotipo ϵ , resultando na produção de IgE. A IL-5 atua nos eosinófilos elevando seu número e promovendo sua ativação. O papel essencial da IL-4 na produção de IgE foi demonstrado por Coffman e Carty (1986), embora já comprovou-se que a IL-13 é capaz de induzir sua síntese na ausência de IL-4 (Zurawski et al., 1994).

Os linfócitos Th1 e suas citocinas, IL-12 e o IFN- γ , estão envolvidos na produção de anticorpos da classe IgG e participam na regulação de síntese da IgE através da capacidade de inibir a produção de IL-4 (Romagnani, 1992).

Por ocasião da apresentação do antígeno várias moléculas co-estimuladoras em especial CD28 no linfócito T e seus ligantes B7-1 e B7-2 nas APC são necessárias para ativação e diferenciação celular (Palmer 1997).

A produção e regulação da síntese de IgE é um processo complexo envolvendo muitos fatores, entre eles sinais do linfócitos Th2 para o linfócitos B que são únicos para o sistema IgE (Lebman et al., 1988). Receptores da IgE de baixa afinidade (Fc ϵ RII) CD23 são encontrados na forma solúvel e ancorados em membranas de eosinófilos, macrófagos, monócitos, linfócitos B e plaquetas, sua expressão é estimulada em todas essas células na presença de IL-4 e IL-13. Seu papel na regulação da IgE está pouco esclarecido, podendo atuar com efeitos estimulatórios ou inibitórios (Zeiss, 1997).

As parasitoses induzem uma intensa resposta tipo Th2 com a produção de elevados níveis de IgE, entretanto, sua presença apresenta uma correlação inversa com a manifestação de doenças alérgicas (Yazdanbakhsh 2003), embora a sensibilização a ácaros esteja presente (van Den Biggelaar et al., 2000).

Após a sensibilização a interação do antígeno com a IgE específica, ancorada em seus receptores de alta afinidade (FcεRI) presentes nas membranas dos mastócitos e basófilos, ativa estas células e induz à reação de Hipersensibilidade Imediata ou Tipo I, intrinsecamente ligada à atopia (Holt et al., 1999). A ativação dos mastócitos e basófilos resulta na liberação de mediadores bioativos responsáveis pelo início aos sintomas da fase imediata da reação (vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e espasmo da musculatura lisa). Seis a oito horas após tem início a fase tardia com o afluxo de células para o local, linfócitos Th2 sensibilizados, basófilos e eosinófilos, liberam seus produtos que são responsáveis pela inflamação alérgica.

As explicações imunológicas para a Teoria da Higiene influenciaram as estratégias para impedir ou reverter o processo das doenças alérgicas.

Resultados de estudo internacional, que cruzou o número de notificações de casos de tuberculose com a prevalência de atopia em crianças, mostraram que havia uma redução bastante significativa da presença de sintomas atópicos onde a notificação de casos de tuberculose era maior (von Mutius et al., 2000).

No Japão encontrou-se uma relação inversa entre sensibilização alérgica e positividade ao PPD em crianças, sugerindo que uma resposta tipo Th1 fraca estaria correlacionada com a presença da sensibilização alérgica (Shirakawa et al., 1997). A redução da positividade nos testes cutâneos para aeroalérgenos também foi observada em crianças que haviam recebido BCG

nos primeiros dias de vida (Aaby et al., 2000). Omenaas et al. (2000) entretanto, não encontraram relação entre reatividade a tuberculina e presença de IgE total e específica em adultos jovens vacinados com BCG aos 14 anos.

A utilização do BCG tem sido preconizada como estimuladora de resposta Th1 símile (Wohlleben et al., 2001), em sua presença os macrófagos são estimulados a produzir IL-12 (Snipes et al. 1998).

Experimentos com BCG, em modelos animais, mostraram resultados promissores. Sua aplicação previamente à sensibilização com ovoalbumina impediu a sensibilização alérgica e o desenvolvimento de hiperreatividade brônquica (Hertz et al., 1998), a produção da IgE específica, a inflamação eosinofílica e a produção de muco nas vias aéreas (Yang et al., 1999). Também em modelo animal o *Mycobacterium vaccae* morto foi capaz de suprimir a resposta alérgica já estabelecida (Wang et al., 1998).

Em linfócitos humanos sensibilizados, o DNA de *Mycobacterium bovis* (BCG), foi capaz de inibir a produção de IgE (Fugieda et al., 1999).

As micobactérias expressam proteínas de choque térmico (HSPs) e, no seu DNA, foram reconhecidas moléculas imunoestimuladoras (ISS) que são compostas por grande quantidade de pares de bases de citosina e guanina desmetiladas (CpG), que estão ausentes ou metiladas nos vertebrados (Krieg, et al., 1995). Estas estruturas são reconhecidas por uma série de receptores presentes nas APC denominados *Toll like receptors*, em especial o TLR 9, que ativam as células e estimulam a produção de citocinas padrão Th1, IL-12, TNF- α e IL-6. (Hemmi, 2000). Entretanto, Kline et al. (1999)

demonstraram, em modelo de asma murino, que nucleotídeos contendo CpG não requeriam citocinas do padrão Th1 para prevenir a inflamação eosinofílica das vias aéreas.

Nos países desenvolvidos a atopia esta presente entre 30% a 50% da população (ISAAC, 1998) e acompanha 80% dos casos de asma em crianças (Pearce et al., 1999).

Dentre os agentes responsáveis por sensibilização alérgica, os ácaros encontrados no pó doméstico são os principais responsáveis pelas doenças respiratórias (Platts-Mills et al., 1989), entre eles o *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt). A exposição contínua aos alérgenos inalatórios induz à inflamação crônica da vias aéreas que é a base da fisiopatologia e das manifestações clínicas da asma.

A asma se caracteriza por episódios de limitação aguda e reversível do fluxo aéreo e pela presença de hiperresponsividade das vias aéreas a uma grande variedade de estímulos ambientais. O processo inflamatório crônico leva a alterações estruturais responsáveis pela remodelação irreversível das paredes das vias aéreas (GINA, 2002).

A prova de função pulmonar, obtida por espirometria, é utilizada para avaliar a presença e o grau de obstrução das vias aéreas. A medida do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁), sua relação com a capacidade vital forçada (CVF), e sua mudança após o uso de broncodilatador são os parâmetros avaliados (GINA, 2002).

O exercício é um dos vários fatores não medicamentosos que pode induzir ao broncoespasmo em pacientes asmáticos. A broncoprovocação induzida por exercício está presente em 63% das crianças asmáticas (Bierman et al., 1975).

Embora a responsividade pulmonar geralmente seja medida pelos testes broncoprovocação por histamina e metacolina a resposta brônquica ao exercício tem sido utilizada também com essa finalidade. Grunstein et al. (1984) encontrou uma correlação entre broncoprovocação com histamina ou metacolina e o exercício na avaliação da reatividade brônquica inespecífica.

A medida do óxido nítrico no ar exalado tem sido preconizada como método indireto, não invasivo, de avaliar a inflamação das vias aéreas presente em pacientes asmáticos (Kharitonov et al., 2000).

Apesar de um melhor conhecimento da fisiopatologia da asma e de medicações mais eficientes para seu controle, o tratamento limita-se a eliminar os sintomas decorrentes do processo alérgico que retornam pouco tempo após a retirada da medicação.

A imunoterapia alérgeno específica é o único tratamento que interfere nas bases dos mecanismos fisiopatológicos das doenças alérgicas mediadas por IgE, como asma, rinite e reações a picadas de insetos, com a possibilidade de alterar o seu curso natural (Malling et al., 1993) e manter seus benefícios por períodos prolongados, dois a três anos, após cessado o tratamento (Durhan et al.; Varga, 1999).

A ITE é preconizada para o tratamento de doenças alérgicas mediadas por IgE, quando há evidente relação entre o aparecimento dos sintomas e a exposição ao alérgeno implicado e um limitado espectro de sensibilizações (Bousquet et al., 1998).

Introduzido há quase um século na prática médica, o tratamento imunoterápico ainda continua empírico, e seus mecanismos não estão totalmente elucidados. Inúmeras pesquisas nos últimos anos trouxeram informações importantes a respeito de sua eficácia clínica, em parâmetros específicos e não específicos mecanismos imunológicos básicos e inflamação alérgica (Malling et al., 1993; Abramson, 1999).

Existem evidências que a ITE atua em vários aspectos do sistema imunológico. A indução de anticorpos da classe IgG, que foram denominados “bloqueadores”, foi um dos primeiros a ser observado (Müller et al., 1989). Este aumento nem sempre foi correlacionado com a melhora clínica dos pacientes (Ewan et al., 1998). A eles atribui-se a função de competir na captação do antígeno, impedindo a sua ligação com a IgE. Desta forma evitaria a ativação dos mastócitos e basófilos e, conseqüentemente, a liberação de mediadores bioativos envolvidos na reação de hipersensibilidade Tipo I implicada no aparecimento dos sintomas e na inflamação alérgica. O fato dos mastócitos situarem-se nas superfícies mucosas também serviu de argumento para se contestar sua atuação bloqueadora, pois o encontro da IgE com alérgeno dar-se-ia antes que os anticorpos IgG pudessem bloqueá-los (Frew, 2003).

Recentemente foi observado que a IgG específica, isolada de indivíduos alérgicos a veneno de abelha, possuía características diferentes daquelas oriundas de indivíduos protegidos naturalmente ou por ITE bem sucedida (Michils et al., 1998).

Em modelos murinos demonstrou-se que a ITE com altas concentrações do alérgeno induzia alterações tanto na quantidade quanto na afinidade e especificidade da IgG produzida.

Animais imunizados com baixas doses de antígeno apresentavam formação de IgE e IgG específicas contra epítopos diferentes, essa discriminação desaparecia se fossem utilizadas doses elevadas do antígeno. Desta forma, os anticorpos IgG passavam a compartilhar o mesmo epítipo com a IgE, propriedade que lhes possibilitaria desempenhar a função bloqueadora (Kolbe et al., 1995; Ball et al., 1999).

Estes achados são consistentes com a evidência de que a ITE deve atuar modificando a especificidade da IgG e não somente aumentando suas concentrações.

Com a purificação da IgG presente nos soros de pacientes tratados com ITE, pode ser confirmado que atividade inibitória da IgE estava associada à fração da IgG. Havia uma relação desta propriedade com a melhora dos sintomas clínicos após a ITE (Wachholz et al., 2003).

Demonstrou-se *in vitro* que os anticorpos IgG possuem a capacidade de bloquear a liberação de histamina pelos leucócitos (Daeron, 1997) e basófilos (Kimura et al., 1985). A inibição do sinal de transdução e a liberação de mediadores, ativada pelos receptores de alta afinidade de IgE

FcεRI presentes nas superfícies dos mastócitos (Zhu et al., 2002) também foi verificada.

A redução das fases imediata e tardia da reação alérgica, mediada pela IgE observada na ITE, provavelmente esta relacionada à inibição da liberação de mediadores por basófilos e mastócitos. A diminuição do recrutamento e atividade de células efectoras nos locais envolvidos, como mucosa nasal e pele (Durham et al., 1996), bem como da presença de mediadores inflamatórios, como prostaglandina D₂, histamina e proteína catiônica eosinofílica, (Durham et al., 1998) é consistente com esta afirmação.

Existem evidências de que a IgE específica teria a propriedade biológica de facilitar a apresentação do antígeno, via seu receptor de baixa afinidade CD23, focalizando o mesmo na superfície do LB ou por meio dos receptores de alta afinidade FcεRI para células apresentadoras de antígeno, evento que aumentaria a sensibilização alérgica e a resposta Th2 já estabelecida. Esta função estaria inibida na presença da IgG induzida pela ITE (van Neeve et al., 1999).

Pelo fato da IgE estar intrinsicamente ligada a reação alérgica do Tipo I, os primeiros estudos que investigaram os efeitos da imunoterapia focalizaram as atenções para sua produção. No início da ITE há um aumento temporário da IgE específica que mais tardiamente sofre uma redução gradual em relação aos níveis pré-tratamento. Não existe, entretanto, uma relação entre esses níveis e os visíveis benefícios clínicos induzidos pela ITE (Creticos et al., 1984).

A disfunção das células Th1 e Th2 resulta em várias condições imunopatológicas (Kapsenberg et al., 1992).

As doenças alérgicas estão associadas a uma maior expressão da resposta do padrão Th2. Até há pouco tempo atribuiu-se esta disfunção a uma redução da resposta Th1 que não seria capaz de contrabalançar a expansão dos linfócitos Th2.

A mudança do balanço Th2/Th1 com a diminuição da IL-4 e IL-5 e aumento de IFN- γ foi correlacionada com a eficácia da ITE para ácaros, abelhas e polens (Jutel et al., 1995; Ebner et al., 1997; Durham et al., 1998). Acreditava-se que o provável mecanismo da ITE seria através da indução do aumento de células Th1 alérgeno específica. Entretanto, recentemente demonstrou-se que culturas de células mononucleares do sangue periférico, de pacientes não atópicos, estimuladas com alérgeno do ácaro doméstico apresentavam resposta, embora com intensidade menor, do tipo Th2 (Nurse et al., 2000).

Na ITE bem sucedida para veneno de abelha observou-se a supressão da resposta das células T específicas para o antígeno (Müller et al., 1998). Recentemente identificou-se uma população de células T denominadas reguladoras (Tr). Estas células apresentam o fenótipo CD4⁺ CD25⁺ e atuam pelo contato direto célula a célula e através da produção de citocinas supressoras IL-10 e fator de transformação beta (TGF- β) suprimindo a resposta imunológica alérgeno específica (Jutel et al., 2003).

Nos modelos de ITE com resultados satisfatórios o aumento da IL-10 sugere que a exposição a elevadas doses do alérgeno induziria a expansão de células Tr específicas para o alérgeno e modulariam a resposta, do subtipo Th2, para o alérgeno (Akdis et al., 2001).

O mecanismo molecular de atuação da IL-10 seria através da inibição dos sinais enviados pelas moléculas co-estimuladoras CD28 e seus ligantes B7-1 e B7-2, por ocasião da apresentação do antígeno. A falta deste estímulo levaria a um estado de anergia específica caracterizada pela supressão da proliferação e da produção das citocinas do padrão Th2 para o alérgeno (Schandene et al., 1994).

A tolerância das células T para o alérgeno, na exposição natural ou na ITE, é dependente da IL-10 e TGF β e deixa de existir se houver um bloqueio destas citocinas (Akdis et al., 2001).

O TGF β é uma citocina pleiotrópica que, além de abolir a proliferação celular, ativa os LB e induz a mudança na produção de anticorpos para classe IgA e IgG4 específicas (Cazac et al., 2000).

A resposta imune normal para alérgenos é da classe IgG especialmente IgG4. A presença de IL-4 é necessária para a mudança de isotipo para as classes IgG4 e IgE. Entretanto, a célula B de memória depende da presença de IFN- γ para produção de IgG4 e de IL-4 para produzir IgE, esta última é abolida na presença de IFN- γ .

A IL-10 e o TGF β também suprimem a produção de IgE (Akdis et al., 1998) e inibem monócitos, fagócitos, células natural killer (NK)(Fiorentino et al., 1991; Hsu D.H. et al., 1992), suprimem a síntese de citocinas Th1 e

Th2 e a inflamação resultante da ativação de mastócitos e eosinófilos (Del Petre G. et al., 1993).

A maioria dos extratos alergênicos para ITE é acompanhada de compostos de alumínio (alúmen) como adjuvante, com a finalidade de retardar a absorção do alérgeno e, com isso, diminuir as reações adversas. Entretanto, demonstrou-se em murinos que o extrato de polens com alúmen induzia uma resposta alérgeno específica, preferencialmente do subtipo Th2 (Gronlund et al., 2002; Brewer et al., 1999).

Experimentos em animais transplantados com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes sensibilizados ao Dpt mostraram que durante a provocação com alérgeno, acompanhado do alúmen, os animais desenvolviam hiperreatividade das vias aéreas, o que não acontecia quando a provocação era feita somente com o alérgeno (Tournoy et al., 2001).

O sucesso da ITE, em grande parte, está na dependência da qualidade do extrato que deve ser padronizado e conter concentrações adequadas dos antígenos principais entre 5µg e 20 µg/mL (Bousquet, 1998).

A avaliação do uso da vacina BCG como adjuvante no tratamento clínico de pacientes asmáticos já foi objeto de estudo (Choi et al., 2002) e mostrou uma melhora do VEF₁, embora o uso da medicação para o tratamento asma não tenha sido bem controlado.

Tomando por base estes conhecimentos, surgiu a hipótese de que a associação de uma segunda dose da vacina BCG com a ITE para tratamento de asma poderia trazer benefícios adicionais. Tendo em vista que

esta proposta não foi avaliada em seres humanos, este assunto tornou-se o objetivo do presente estudo.

2. OBJETIVO

- Avaliar o efeito do BCG como adjuvante na imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), em pacientes asmáticos sensibilizados ao ácaro, por meio da comparação das respostas clínicas e imunológicas obtidas antes e depois da fase de indução da imunoterapia específica.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

O estudo caracteriza-se como um ensaio clínico randomizado duplo cego, com a participação de 21 indivíduos de ambos os sexos, com idade variando entre 8 e 17 anos (média $11,1 \pm 2$), portadores de asma leve persistente ou moderada persistente e sensibilizados ao ácaro Dpt.

Os critérios diagnósticos e classificação da asma seguiram as diretrizes do GINA (*Global Initiative for Asthma* - 2002 Anexo).

Os pacientes incluídos neste estudo encontravam-se em acompanhamento ou foram encaminhados para triagem no ambulatório de Alergia Pediátrica do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram conduzidas as avaliações, no período de outubro de 2002 a fevereiro de 2004.

O tamanho da amostra não foi baseado em cálculos de poder estatístico pelo fato de não haver estudos semelhantes na literatura; portanto elegeu-se um número de conveniência.

O projeto foi aprovado pela comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, CAPESP Nº 533/02 e os participantes ou responsáveis, que optaram por participar do estudo, assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Seleção dos pacientes

Os candidatos a participar do estudo efetivavam suas admissões à medida que fossem cumpridos os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- 1 - asma leve ou moderada persistentes
- 2 - sensibilizados ao ácaro Dpt (avaliação *in vivo* e *in vitro*).
- 3 - idade entre 8 e 17 anos

Critérios de exclusão

- 1 - presença de outras enfermidades exceto rinite e conjuntivite alérgicas e dermatite atópica, (desde que não fossem graves)
- 2 - portadores de parasitoses intestinais
- 3 - sensibilizados a outros alérgenos inalatórios (exceto a outros ácaros)
- 4 - reação intradérmica ao PPD maior que 10mm
- 5 - imunoterapia específica prévia
- 6 - uso de corticóides orais nos últimos três meses
- 7 - uso de corticóides inalatórios no último mês
- 8 - uso de anti-leucotrienos nos últimos três meses.
- 9 - uso de anti-histamínicos de longa duração nos últimos três meses.

O diagnóstico e classificação da asma foram baseados nos sintomas clínicos, obtidos através de anamnese, e nos resultados do teste de função pulmonar avaliada por espirometria.

Na história clínica indagou-se a respeito da presença e frequência dos sintomas de asma, rinite, conjuntivite, dermatite atópica e seus fatores desencadeantes.

A sensibilização ao ácaro Dpt foi investigada por meio do teste cutâneo de leitura de imediata (bateria mencionada no item 3.5.2) e pela presença da IgE específica para o ácaro no sangue.

Também foram incluídos na triagem inicial: reação cutânea ao PPD, exame protoparasitológico e hemograma completo.

3.3 Modelo do estudo

Após a seleção os pacientes davam início ao protocolo com a coleta de três amostras do ar exalado, para medida do óxido nítrico (NO), após o que se realizava o teste de broncoprovocação por exercício.

O teste cutâneo de leitura imediata para o ácaro Dpt foi repetido, desta vez com quatro titulações.

Amostras de sangue foram colhidas para quantificação de imunoglobulinas séricas, IgG específica e ensaio de linfoproliferação.

Realizadas estas avaliações teve início o tratamento medicamentoso de acordo com a classificação da gravidade da asma, segundo as recomendações do guia GINA (2002).

Ao término de trinta dias de tratamento clínico os indivíduos foram divididos aleatoriamente por sorteio em dois grupos, A ou B.

Com o resultado do sorteio, em envelope selado, os participantes dirigiam-se ao Centro de Imunizações do HC (onde foi definido o código dos grupos) para receber, por via intradérmica, uma dose da vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin, *Mycobacterium bovis*, Fundação Aataulpho de Paiva) ou do seu diluente (soro fisiológico), conforme o resultado do referido sorteio. Na mesma data, próximo ao local da aplicação do BCG, teve início a ITE para o ácaro Dpt. Posteriormente o extrato de ácaro foi aplicado até que se atingisse a dose máxima (dose de manutenção).

Esta primeira etapa, em que há aumento das doses aplicadas, denomina-se fase de indução e neste estudo teve a duração entre 12 e 16 semanas. Ao seu término foram repetidas as avaliações iniciais.

Durante as quatro semanas que precederam as reavaliações, o uso do corticóide inalatório foi suspenso, permanecendo somente a medicação tópica nasal e, quando necessário, o uso de medicação broncodilatadora (BD).

A utilização da medicação foi restabelecida, conforme necessário, após as reavaliações, levando-se em consideração os resultados dos exames e os sintomas do paciente. Os participantes ingressaram no estudo em momentos distintos.

Ao término da fase de indução, completou-se a coleta dos dados para este projeto. Entretanto, todos os pacientes continuam recebendo a dose de manutenção da ITE a cada três semanas, até que se completem dois anos de tratamento imunoterápico.

Uma nova avaliação está prevista ao final de 24 meses de tratamento.

Algoritmo do plano de trabalho.

3.4 Características clínicas

Os pacientes eram portadores de asma leve persistente ou moderada persistente.

A presença de rinite alérgica variava de leve a moderada (intermitente ou persistente), segundo classificação clínica do ARIA (*Allergic Rhinitis and its impact on asthma*) (Bousquet, 2001) estava presente em todos os pacientes.

Sintomas de conjuntivite alérgica como prurido, eritema e lacrimejamento, avaliados pelos pacientes como: ausentes, leves ou moderados foram relatados por 90% dos pacientes.

Dois pacientes apresentavam quadro clínico de dermatite atópica leve.

O teste de reatividade cutânea ao PPD foi negativo em 20 dos 21 pacientes. Todos foram vacinados durante os primeiros 45 dias de vida com o BCG intradérmico e apresentavam cicatriz vacinal.

A imunização contra o tétano estava completa.

As características clínicas dos pacientes estão representadas na Tabela 1.

As drogas utilizadas para tratamento da asma foram:

- Associação de bronco-dilatador de longa duração com corticóide: Budesonida+Fumarato de Formoterol ou Fluticasona+Salmeterol
- Corticóide inalatório: Budesonida
- Broncodilatador de curta duração: Salbutamol ou Terbutalina
- Medicação tópica para rinite: Beclometasona ou Fluticasona
- Anti-histamínicos sistêmicos: Loratadina / Dexclorfeniramina

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Características	Grupo A ITE	Grupo B ITE+BCG
Idade (anos)	11,5 ± 2,6	10,9 ± 1,3
Meninas	5	4
Meninos	5	7
Total	10	11
Asma Leve persistente	3	2
Asma Moderada persistente	7	9
Rinite	10	11
Sintomas de conjuntivite	9	10

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1 Imunoterapia

A imunoterapia foi realizada segundo as normas da *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI Malling et al., 1993) utilizando-se extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (IPI-ASAC Espanha, lote 010607).

Os frascos com o material liofilizado foram mantidos à temperatura de 4°C até o momento da reconstituição, realizadas em capela fluxo laminar

com diluente aquoso glicerinado contendo 0,4% de fenol, à medida que se fazia necessário, após o que permaneciam a 4°C.

As concentrações dos antígenos principais, presentes no extrato, foram avaliadas pelo método de ELISA e indicaram os seguintes valores: Der p1 10 µg/mL e Der p2 3,3µg/mL.

A presença de endotoxinas foi investigada pelo método de Limulus Amebocyte Lysate (QCL-1000 A Cambrex Company) em uma amostra do extrato na concentração de 1,25 µg/mL (utilizada como estímulo na cultura de células) e o valor encontrado foi de 10.000 EU/mL.

O esquema da ITE consistiu na administração seriada, com aumento gradual de pequenas doses do extrato realizadas duas vezes por semana, por via subcutânea na região superior do tríceps, até que fosse atingida a dose máxima (dose de manutenção) de 3µg/mL do antígeno principal Der p1. Nesta etapa, as aplicações passaram a ser semanais durante três semanas. Ao final deste período, teve término a fase de indução.

Antecedendo as aplicações, os pacientes eram indagados a respeito dos sintomas da doença e de outras eventuais intercorrências. A função pulmonar foi avaliada clinicamente através da ausculta pulmonar e pela medida do pico de fluxo expiratório (PFE). Este último era medido por três vezes, com auxílio de um medidor de fluxo portátil (Mini-Whight®). A maior medida obtida foi considerada como resultado. Os dados foram anotados em uma ficha de controle individual.

Após administração do extrato, o paciente permanecia em observação pelo período de uma hora. A medida do PFE era repetida a cada 30 minutos e anotada na ficha do paciente.

As reações adversas foram classificadas pela localização e gravidade de acordo com as recomendações da EAAC (Malling et al., 1993).

As reações são divididas em localizadas ou sistêmicas e classificadas em leves, moderadas ou graves.

Levando-se em consideração o tempo de surgimento dos sintomas, elas podem ser imediatas, quando o aparecimento dos sintomas ocorre até 30 minutos da aplicação do extrato, e tardias após ultrapassado este período.

Reações sistêmicas ocorrem mais freqüentemente na pele, mucosas e sistema cardiovascular.

Reações locais são consideradas presentes quando o diâmetro da endureção no local da aplicação é maior do que 6cm.

Na presença dos primeiros sinais ou sintomas de uma reação adversa, o paciente era imediatamente avaliado pelo médico que classificava sua gravidade e instituía o tratamento adequado. Esses dados foram registrados na ficha do paciente.

Material e medicações apropriadas para atendimento de emergência estão sempre disponíveis na sala de imunoterapia.

Uma ficha de controle, com os dados da evolução do tratamento foi fornecida para cada paciente onde se solicitou anotação de sintomas e reações tardias.

TABELA 2 - ESQUEMA DA FASE DE INDUÇÃO DA IMUNOTERAPIA

DILUIÇÃO DO EXTRATO Dpt							
1/1000		1/100		1/10		1/1	
vol/ mL	dose-µg/mL	vol/ mL	dose-µg/mL	vol/ mL	dose-µg/mL	vol/ mL	dose-µg/mL
0,1	0,001	0,1	0,01	0,1	0,1	0,05	0,5
0,2	0,002	0,2	0,02	0,2	0,2	0,10	1,0
0,4	0,004	0,4	0,04	0,4	0,4	0,15	1,5
0,8	0,008	0,8	0,08	0,8	0,8	0,20	2,0
						0,25	2,5
						0,30	3,0

3.5.2 Testes cutâneos de leitura imediata

Os testes cutâneos de leitura imediata foram realizados pelo método de puntura de acordo com as normas do Sub-Comitê de Testes Cutâneos da EAACI (Dreborg, 1989).

Após assepsia com solução alcoólica a 70%, coloca-se na região médio ventral do antebraço uma gota de cada extrato a ser testado, equidistante em três centímetros entre si. Com auxílio de uma lanceta Morrow-Brown posicionada a um ângulo de 90°, faz-se uma pequena pressão através da gota na epiderme, durante cinco segundos. Um minuto após a introdução do extrato na pele, o líquido excedente é retirado com papel absorvente. A leitura do teste é realizada quinze minutos após, medindo-se os diâmetros das pápulas com régua transparente.

Para interpretação dos resultados calcula-se a média aritmética entre as medidas do maior diâmetro e seu respectivo diâmetro ortogonal, sendo consideradas positivas as pápulas iguais ou maiores que três milímetros, se não houver reação do controle positivo (Dreborg, 1989).

Os extratos dos aeroalérgenos utilizados são padronizados, glicerinados, contendo 0,4% de fenol e estão disponíveis comercialmente. Permaneceram estocados a uma temperatura entre 8 e 10°C e mantidos à temperatura ambiente previamente à realização dos testes.

Os extratos testados nesta pesquisa, como avaliação inicial, foram:

Ácaros: *Dermatophagoides pteronyssinus* 112,900 UBE/mL e *Blomia tropicalis* 37,650 UBE/mL,

Epitélio de animais: cão *Canis familiaris* e gato *Felis domesticus* 10,000 PNU,

Polens (mistura): *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Lolium perene*, *Poa pratensis* e *Pheum pratense* 10,150 UBE/mL,

Fungos (mistura): *Aspegillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium notatum* e *Cladosporium herbarum* 10,000 PNU/mL (IPI-ASAC do Brasil),

Insetos: *Blatella germânica* e *Periplaneta americana* 100UB (FDA Allergenic Ltda).

Como controle positivo utilizou-se dicloridrato de histamina 10/mg/mL e solução salina 0,9%, como controle negativo (IPI-ASAC-Brasil).

Antecedendo a imunoterapia, o teste de puntura para o ácaro Dpt foi repetido em duplicata e nas seguintes titulações: 1/100, 1/10, 1/5 e 1/1.

Como resultado final considerou-se a média aritmética obtida entre os valores das duplicatas.

Os resultados foram documentados com a cópia do contorno das pápulas com caneta dermatográfica, em fita adesiva transparente e transferida para folha de papel e anexada ao prontuário de cada paciente.

Para realização do teste era necessário não estar fazendo uso de anti-histamínicos por 14 dias.

3.5.3 Teste cutâneo de reatividade ao PPD

O teste cutâneo de reatividade ao PPD foi realizado na região médio-ventral do antebraço. Após assepsia com solução alcoólica a 70%, com auxílio de uma seringa para tuberculina, inoculou-se por via intradérmica um volume de 0,1mL de PPD 2 U.T. (RT 23 SSI Statens Serum Institut Dinamarca).

A leitura foi realizada 72h após, medindo-se o diâmetro da endureção.

Interpretação da leitura:

- 0 a 5mm negativo
- 5 a 10mm reator- fraco positivo
- 10 a 15mm reator- forte positivo

3.5.4 Testes espirométricos

A espirometria foi realizada utilizando-se o espirômetro KOKO e software Koko PFT System (Pds Instrumentation, Inc. Louisville, CO) segundo normas da *American Thoracic Society* (ATS, 1991). Os valores preditos foram baseados em estudos de Polgar e Promadhat (1971).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: capacidade pulmonar forçada (CPF), o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), a relação entre eles (CPF/VEF_1) e o fluxo expiratório forçado 25-75% ($FEF_{25-75\%}$).

A prova foi realizada sem e com o uso de medicação broncodilatadora (400µg de salbutamol) para avaliação da presença e intensidade da obstrução brônquica. A resposta ao broncodilatador é considerada como presente (reversibilidade) quando há um aumento no volume do VEF₁ igual ou maior que 12% e 200mL.

3.5.5 Teste de broncoprovocação induzida por exercício

Os testes foram realizados no período da manhã, em sala dotada de ar condicionado com temperatura entre 21°C e 25°C.

Após serem medidos os valores basais da função pulmonar, como descrito no item 3.5.4, os participantes foram submetidos à carga de exercício em bicicleta ergométrica. A carga foi aumentada gradativamente até que fosse atingido 80 a 90% da frequência cardíaca máxima para idade, calculada através da fórmula (220 - idade). O exercício foi mantido por 6 minutos a uma velocidade de 30 ciclos por minuto (ATS, 1999).

A saturação sanguínea de oxigênio e a frequência cardíaca foram monitoradas através de oxímetro de pulso (Nonin Onyx) e os sintomas pulmonares através de ausculta pulmonar.

Durante a prova o participante fez uso de clipe nasal e inalou ar sintético (umidade próxima de zero) a um fluxo de 6L/minuto através de um bocal de polipropileno acoplado a uma peça em Y.

Após o término do exercício, medidas VEF₁ foram tomadas aos 3, 10, 15, 20 e 30 minutos. As manobras expiratórias forçadas foram repetidas até que

duas medidas do VEF₁, com diferença máxima de 100 mL, fossem obtidas, escolhendo-se o maior valor para análise.

A resposta ao teste foi registrada como a maior queda no VEF₁ após o exercício, expressa em porcentagem (queda do VEF₁/basal do VEF₁×100).

A resposta positiva foi definida como uma queda de 10% ou mais no VEF₁ (porcentagem do predito) em relação ao seu valor pré-exercício, queda essa que representa duas vezes o valor do desvio padrão do VEF₁ conforme demonstrado por Custovic et al. (1994). Os valores preditos foram baseados nos estudos de Polgar e Promadhat (1971). Ao final do teste o paciente inalou BD (Salbutamol 400ug) e o VEF₁ foi reavaliado após 15 minutos.

3.5.6 Medidas do óxido nítrico no ar exalado

A dosagem do óxido nítrico (NO) foi realizada em três amostras do ar exalado, colhidas em balões (Mylar Bags–Sievers) com auxílio do coletor (Bag Collection and Sampling Kit) dotado de filtro HEPA (Trox Technik do Brasil) e bocal de polipropileno.

Os participantes foram instruídos a realizar uma dieta livre de alimentos ricos em nitritos e nitratos por 24hs, assim como, suspender o uso de BD de curta duração por 6h e os de longa duração por 12hs, antes da coleta que seria realizada com 4hs de jejum.

O participante foi solicitado a respirar normalmente pela boca no sistema de coleta (Aparelho coletor de NO-Bag Collection sampling kit Sievers) por três vezes; em seguida inspirar até a capacidade pulmonar total. Neste

instante foi aberta a válvula do sistema de coleta para o balão e, após exalar aproximadamente por três segundos, fechou-se a válvula. Nesse intervalo solicitou-se ao participante manter a pressão em 12cm H₂O (fluxo 200ml/s).

Os balões foram selados e, posteriormente (até 24h após as coletas), a concentração de NO foi determinada por quimioluminescência em aparelho Sievers (modelo Sievers NOA 280, Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO, USA).

Considerou-se como resultado a média das três dosagens. Todas as coletas foram realizadas antes do teste de broncoprovocação por exercício.

3.5.7 Quantificação da IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus*

Amostras de sangue foram coletadas sem adição de anticoagulante e, após repouso de uma hora, centrifugadas a 1800rpm durante cinco minutos e o soro estocado a -20°C.

A quantificação da IgE específicas para Dpt foi realizada pela técnica imunofluoroenzimática UniCAP® automatizado no Aparelho UNICAP 100 (Pharmacia & Diagnostics), utilizando-se o kit UniCAP® Specific IgE.

Princípio da técnica: os anticorpos anti-IgE ou acoplados por ligação covalente aos Immuno-CAP, reagem com os anticorpos IgE contidos na amostra de soro analisado. Após lavagem, para retirada das imunoglobulinas não ligadas, adiciona-se anticorpos anti-IgE marcados por uma enzima para formar um imunocomplexo. Após incubação, os anticorpos

anti-IgE marcados não ligados são eliminados por lavagem e o complexo ligado é colocado para incubação com um substrato. Cessada a reação, mede-se a fluorescência do eluído. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração de IgE na amostra do soro analisado. Para avaliação dos resultados, os valores das amostras analisadas são avaliados em uma curva obtida através de calibradores.

Os resultados são dados em KUA/L, que são unidades específicas UniCAP®, onde “A” representa os anticorpos específicos. Para determinados intervalos de níveis de IgE há uma denominação correspondente em classes conforme descrito a seguir:

Faixa KUA/L	Classe IgE específica	Nível IgE específica
>100	6	Muito elevado
100-50	5	Muito elevado
50-17,5	4	Muito elevado
17,5-3,5	3	Elevado
3,5-0,7	2	Moderado
0,7-0,35	1	Baixo

3.5.8 Quantificação da IgG específica para *Dermatophagoides pteronyssinus*

O método empregado para quantificação da IgG específica para Dpt foi análogo ao da IgE específica, e o kit utilizado foi o UniCAP® Specific IgG.

Não existe valor de referência firmado para este anticorpo. O resultado é expresso em mg_A/L , onde $_A$ representa o antígeno.

3.5.9 Quantificação da Imunoglobulina E sérica total

A IgE sérica total foi quantificada pelo método de nefelometria utilizando-se o kit Dade Berhing, em aparelho automatizado, Behing Nephelometer Analyser II.

3.5.10 Quantificação de Imunoglobulinas séricas

As imunoglobulinas séricas foram quantificadas pelo método imunoturbidimétrico utilizando-se os kits: Immunoglobulin G, M e A (Roche Diagnostics) em aparelho automatizado COBAS integra 700.

3.5.11 Culturas celulares

Células mononucleares foram obtidas, após separação por meio do gradiente de Ficoll-Hypaque (PHARMACIA[®]), de uma amostra de 30 mL de sangue periférico heparinizado. Após a separação, a “nuvem” de células mononucleares foi retirada e lavada três vezes em meio de cultura RPMI (Sigma). Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em RPMI 1640, a uma concentração de 2×10^6 células/mL para avaliação da linfoproliferação e 5×10^6 células/mL para coleta de sobrenadante; a seguir

foram colocadas em microplacas para cultura de 96 poços (Costar, USA). Em triplicata, foram colocados em cada poço 200µl da suspensão celular em RPMI 1640, enriquecida com 10% de soro humano inativado suplementado com HEPES 20 mM, L-glutamina 2mM, Penicilina G cristalina 11UI/mL e Estreptomicina 100 µl/ml, sem ou com estimulação. Como estímulo foi utilizado extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* 1,25µg/mL (mesmo lote da imunoterapia), e PPD B-1 5µg/mL (Purified Protein Derivative - *M tuberculosis* H37Rv PPD Mycos Reserch LLC). Para controle da proliferação antígeno específica, as células foram estimuladas com toxóide tetânico 1,25Lf/mL (TT, Instituto Butantan).

As concentrações dos antígenos foram determinadas em ensaios preliminares em PBMC de pacientes asmáticos sensibilizados ao Dpt e indivíduos normais, para escolha da dose mais apropriada.

As placas foram mantidas em estufa (Forma Scientific) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por um período de seis dias. Dezesesseis a dezoito horas antes do término do cultivo as células foram pulsadas com timidina-triciada na concentração de 1uCi/poço (Sigma). Após o término do período de incubação, as células foram congeladas até o momento da sua aspiração com auxílio de um coletor automático de células (Titertek cell Harvester, Flow Laboratories).

A radioatividade incorporada foi medida através da cpm (contagem por minuto) em contador Beta (Beckman LSBI 50).

A linfoproliferação foi avaliada pelo índice de estimulação (IE) obtido através da média das triplicatas das cpm das células estimuladas dividida

pela média das cpm das células não estimuladas. Índices iguais ou acima de três foram considerados positivos.

Os sobrenadantes foram colhidos com 18h após o início da cultura e estocados a -70°C até a quantificação de citocina.

As amostras foram colhidas antes e ao final do período de indução da ITE.

3.5.12 Quantificação de citocina

A quantificação da interleucina 10 (IL-10) foi realizada no sobrenadante de cultura de células do sangue periférico, colhidos com 18h e estimuladas com extrato de Dpt 1,25µg/mL (mesmo lote utilizado para imunoterapia diluído em água para injeção), TT e PPD, segundo técnica desenvolvida por Waithe (1973).

As quantificações foram realizadas por ensaio imunoenzimático - ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis). Neste método, placas de 96 poços de poliestireno com fundo chato (Corning #25805-96, New York, NY, EUA) são sensibilizadas com 50µL de anticorpo monoclonal anti-citocina humana, diluído conforme titulação prévia, em tampão carbonato-bicarbonato, por 16 horas a 4°C. Após dois ciclos de cinco lavagens com 200µL de tampão de lavagem para ELISA na lavadora de placas (Micro Plate Washer Model 1550, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), as placas são bloqueadas com 100µL de tampão de bloqueio por duas horas, à

temperatura ambiente. Após um ciclo de cinco lavagens, os controles e as amostras são encubados por 16 horas a 4°C.

Para a curva-padrão das citocinas, em cada placa, são incubadas duplicatas de 50µL/poço das diluições seriadas (fator dois de diluição) das citocinas recombinantes em tampão de diluição. Os controles negativos consistem em 50µL de tampão de diluição. Neste momento, os sobrenadantes são descongelados e 50µL/poço são distribuídos, em duplicata, nas respectivas placas. Após dois novos ciclos de lavagens, incuba-se com 50µL/poço do anticorpo monoclonal anti-citocina humana biotilado diluído conforme titulação prévia em tampão de diluição, por 60 minutos à temperatura ambiente. Após dois ciclos de lavagens, adicionam-se 50µL/poço do conjugado streptoavidina-peroxidase (HRP avidin, Zymed Laboratories CA) diluído em tampão de diluição conforme titulação prévia. Após 30 minutos e mais dois ciclos de lavagens, adiciona-se 50µL/poço da solução de revelação. As placas são então mantidas em ambiente escuro por 5-60 minutos, dependendo da citocina. A reação é bloqueada com H₂SO₄ 2N (Merck, Darmstadt, Alemanha). A leitura das placas é realizada no leitor automático (Micro Plate Reader Model 3550, Bio-Rad) com comprimentos de onda 490nm. Os resultados são analisados no programa de computador Microplate Manager® 4.0 (Bio-Rad) através de regressão linear contra a curva padrão da citocina. O limite de detecção foi considerado como o limite do padrão 39 pg/mL.

Considerou-se como resultado o valor obtido com estimulação subtraído do valor encontrado sem estimulação ou o limite de detecção do teste

menos um, quando este último estava abaixo do nível de detecção do método.

3.5.13 Contagem de eosinófilos em sangue periférico

A contagem do número de eosinófilos em sangue periférico foi realizada na rotina de forma automatizada (aparelho Advia 120-Bayer).

3.5.14 Exame protoparasitológico

O exame protoparasitológico foi realizado, pela rotina, em três amostras colhidas no período de dez dias, por meio dos métodos de Hoffmann, Faust, Rugai modificado e Baerman (De Carli, 1994).

3.6 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

Os testes *in vivo*, assim como a ITE foram realizados no ambulatório do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC - FMUSP.

As medidas do NO foram realizadas no Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM 20). Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Imunologia do InCor/HC e no Laboratório de Investigação Médica (LIM 60). A sorologia para *Toxocara canis* foi realizada no Laboratório de Imunologia (LIM 48). Os exames de rotina foram executados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

A variáveis categorizadas foram representadas em tabelas por frequência absoluta (n) e relativa (%). Os grupos foram comparados pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates.

Para comparar os dados pré e pós-ITE inter e dentre os grupos, foi utilizado a análise de variáveis para medidas repetidas com fator de repetição ANOVA, usando o Teste de Tukey.

Um valor de p igual ou menor que 0,05 foi considerado indicativo de significância estatística.

Os dados foram analisados pelo programa SigmStat e pelo EPI-INFO 6.

4. RESULTADOS

A triagem inicial foi realizada em 70 pacientes dos quais 26 foram elegíveis para o estudo. Iniciaram o protocolo 22 participantes e terminaram esta primeira fase 21 deles. Uma desistência teve como causa referida a mudança de cidade.

Os grupos foram homogêneos com referência a idade, sexo e gravidade da asma.

4.1 Evolução clínica dos pacientes

Durante o acompanhamento observamos uma melhora clínica com diminuição da frequência e intensidade dos sintomas da asma em todos os pacientes.

A redução dos sintomas e o aumento do VEF_1 refletiram na mudança da classificação da gravidade da asma (GINA, 2002).

A melhora na classificação da asma ocorreu em nove dos dez pacientes do Grupo A.

A melhora na classificação da asma ocorreu em nove dos onze pacientes do Grupo B.

Estas mudanças foram estatisticamente significativas em ambos os grupos ($p < 0,05$) com referência ao tempo, pré e pós-tratamento, porém não houve diferença na comparação dentre eles ($p = 0,8$).

Dois pacientes do Grupo A referiram desaparecimento dos sintomas.

A necessidade de atendimento de emergência, em decorrência da asma, não ocorreu em nenhum dos pacientes após o ingresso no protocolo. (Tabela 3).

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DA ASMA PRÉ E PÓS-ITE

Classificação da Asma	Grupo							
	A (ITE)				B (ITE + BCG)			
	Pré		Pós		Pré		Pós	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Moderada persistente	7	70	1	10	9	81	2	18
Leve persistente	3	30	1	10	2	18	3	27
Leve intermitente	-		6	60	-		6	54
Sem sintomas	-		2	20	-		-	
Pré vs Pós A vs B	$p < 0,05$ $p = 0,81$							

Teste χ^2

Grupo A (n=10)

Grupo B (n=11)

Ao final do período da indução houve uma redução na necessidade do uso de medicação para asma, tanto com relação ao número de drogas quanto na sua posologia.

No Grupo A, quatro em dez pacientes necessitavam da associação corticóide inalatório / β_2 de longa duração e, ao final do período de indução da ITE, foi necessário mantê-la apenas em um deles. Os demais permaneceram apenas com o corticóide inalatório, na mesma dosagem (budesonida 800 μ g/dia).

Nos quatro pacientes medicados com budesonida 800µg/dia, a dose foi reduzida pela metade em todos eles.

Dois pacientes que utilizavam a dose de 400µg/dia da budesonida, não necessitaram mais da medicação.

No Grupo B seis em onze pacientes necessitavam da associação corticóide inalatório / β_2 de longa duração e, ao final do período de indução da ITE, foi necessário mantê-la em apenas um deles. Os demais permaneceram somente com o corticóide inalatório, na mesma dosagem (budesonida 800µg/dia).

Nos cinco pacientes medicados com budesonida 800µg/dia, a dose foi reduzida pela metade em quatro deles.

O uso de β_2 agonistas de curta duração passou a ser recomendado quando necessário.

TABELA 4 - MEDICAÇÃO PARA ASMA PRÉ E PÓS-ITE

Medicação	Grupo							
	A ITE				B ITE + BCG			
	Pré		Pós		Pré		Pós	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Corticóide β_2 longa duração	4	40	1	10	6	54	1	9
Budesonida 800 µg	4	40	3	30	5	45	5	45
Budesonida 400µg	2	20	4	40	-	-	5	45
Sem medicação	-	-	2	20	-	-	-	-
Pré vs Pós	$p < 0,05$							
A vs B	$p = 0,78$							

Teste χ^2

Grupo A (n=10)

Grupo B (n=11)

Inicialmente a presença de sintomas de conjuntivite alérgica como prurido, hiperemia ocular e lacrimejamento estavam presentes em nove pacientes (90%) do Grupo A e em dez (91%) do Grupo B.

Ao final do período de indução da ITE, houve remissão destes sintomas em oito pacientes do Grupo A e em sete do Grupo B. Esta mudança foi estatisticamente significativa em ambos os Grupos ($p < 0,05$) com relação ao tratamento, mas não houve diferença dentre eles.

Nos pacientes em que os sintomas persistiram, houve uma diminuição tanto na intensidade quanto na frequência dos mesmos.

**TABELA 5 - PRESENÇA DE SINTOMAS DE CONJUNTIVITE
PRÉ E PÓS-ITE**

Grupo		Sintomas de conjuntivite			
		Sim		Não	
		n	%	n	%
A ITE	Pré	9	90	1	10
	Pós	1	10	9	90
B ITE +BCG	Pré	10	91	1	9
	Pós	3	27	8	72

Pré vs Pós $p < 0,05$
A vs B $p > 0,05$
Teste χ^2

Os sintomas de rinite alérgica como obstrução, coriza, secreção pós-nasal e prurido, presentes em todos os pacientes, sofreram uma diminuição, porém menos intensa e mais tardia.

4.2 Reações adversas

As reações adversas, de acordo com as recomendações da EAACI (1998), podem ser localizadas ou sistêmicas, imediatas ou tardias e classificadas como leves, moderadas ou graves.

Durante o período de indução da ITE, no conjunto dos grupos, ocorreram 41 reações sistêmicas em um total de 463 aplicações (8,9%). Destas, 95% foram leves e 5% moderadas, não tendo ocorrido reações graves.

No Grupo A, 50% dos pacientes apresentaram reações. Em um total de 239 aplicações, ocorreram 13 reações (5,4%). Destas, sete foram imediatas (4 leves e 3 moderadas) e seis foram tardias, todas leves.

As reações ocorreram por mais de uma vez em dois pacientes.

No Grupo B, 90% dos pacientes apresentaram reações. Em 224 aplicações ocorreram 28 reações (12,5%). Destas, 14 (50%) foram imediatas (12 leves e 2 moderadas) e 14 (50%) tardias, todas leves.

Três pacientes apresentaram a reação por uma única vez e, os demais, duas ou mais vezes. (Figura 1).

Nas reações imediatas os sintomas ocorreram entre 15 e 30 minutos e todas as reações moderadas foram imediatas.

Na maior parte das reações tardias (81%) os sintomas manifestaram-se até o final da primeira hora no conjunto dos grupos. Dois pacientes relataram a ocorrência de reação tardia leve, com início entre seis a oito horas após a aplicação do extrato. Todas evoluíram satisfatoriamente com a medicação em domicílio.

Os sintomas desencadeados pela ITE, dispnéia, sibilos, obstrução nasal, rubor cutâneo, urticária generalizada e hiperemia de conjuntiva regrediram facilmente com uso de anti-histamínico e/ou BD inalatório.

As reações moderadas responderam mais lentamente ao tratamento. Embora o atendimento ambulatorial tenha sido suficiente em todos os casos, em três ocasiões foi utilizada a adrenalina por via intramuscular.

A maioria das reações ocorreu com a mudança da concentração do extrato de 1/10 para 1/1.

Por duas vezes, reações imediatas leves se manifestaram após aplicação do extrato na concentração 1/10. Um paciente apresentou uma reação tardia com o extrato na concentração 1/100.

Reações locais (6cm) não foram observadas. Eritema e pápulas menores foram freqüentes e considerados normais.

Nódulo subcutâneo tardio, com dolorimento no local da aplicação, foi mencionado por quatro pacientes do Grupo A (ITE) e três do Grupo B (ITE + BCG) e tratado com compressas frias, sem complicações.

A utilização de extrato aquoso, possibilitando uma absorção mais rápida dos antígenos e a presença de quantidades significativas de alérgenos, deve estar implicada na incidência de reações.

Com relação à vacina BCG, um paciente apresentou no local da aplicação uma lesão com 1,5cm de diâmetro que evoluiu com necrose central, de lenta cicatrização.

No paciente, em que a reação cutânea ao PPD era positiva, ocorreu uma pústula com 1cm de diâmetro de lenta cicatrização.

Os demais apresentaram eritema com pequena reação inflamatória no local.

FIGURA 1 Número e gravidade das reações (imediatas e tardias) em pacientes asmáticos, durante o período de indução da ITE para Dpt.
Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n =11) - ITE+BCG.

4.3 Análise dos testes cutâneos de leitura imediata

Na avaliação da reatividade cutânea imediata para o Dpt, através dos testes de puntura, observamos que as medidas dos diâmetros das pápulas

após a ITE foram significativamente menores em todas as titulações, nos dois grupos ($p < 0,02$), porém não diferiu dentre eles.

A resposta à histamina também apresentou uma diminuição significativa ($p = 0,04$) após o período de indução da ITE. Não houve diferença dentre os grupos.

FIGURA 2 Valores das medidas das pápulas em mm do teste de punção titulado para Dpt, em pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE para Dpt. Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n=11) - ITE+BCG. ANOVA * $p < 0,05$. A linha tracejada representa a positividade do teste.

4.4 Avaliação dos parâmetros da função pulmonar

As medidas dos parâmetros da função pulmonar, avaliados por espirometria, mostraram um aumento no VEF_1 e na sua relação com CVF, (utilizados para indicar a presença e classificar o grau de obstrução brônquica) (GINA, 2002), assim como na CVF e no $FEF_{25-75\%}$. Essas

diferenças foram estatisticamente significativas ($p= 0,03$) com relação ao tempo, pré e pós-ITE, mas não na comparação dentre os grupos. (Tabela 6)

As medidas do VEF₁ pós BD, pré versus pós-ITE, também mostraram um aumento ($p < 0,05$) nos dois grupos, sem diferença dentre eles.

TABELA 6 - VALORES DOS PARÂMETROS DA FUNÇÃO PULMONAR PRÉ BD (PERCENTAGEM DO PREDITO), PRÉ E PÓS-ITE.

Grupo		CVF L	VEF ₁ L	VEF ₁ /CVF%	FEF _{25-75%} L/s
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
A ITE	Pré	96 ± 10	85 ± 15	93 ± 10	69 ± 29
	Pós	100 ± 6	92 ± 10	99 ± 6	82 ± 18
B ITE + BCG	Pré	90 ± 12	74 ± 18	87 ± 14	58 ± 19
	Pós	97 ± 10	82 ± 14	92 ± 13	71 ± 18
Pré vs Pós		0,003	0,01	0,03	0,03
A vs B		p	> 0,05		

ANOVA

Grupo A (n=10)

Grupo B (n=11)

Capacidade vital forçada (CVF)

Volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁)

Fluxo expiratório forçado (FEF_{25-75%})

O aumento de 12% e 200mL no VEF₁ após o uso de BD (reversibilidade) é considerado acima do fisiológico e é indicativo da presença de obstrução das vias aéreas (GINA, 2002).

No Grupo A pré-ITE, dois pacientes apresentaram reversibilidade após o uso de BD. Na avaliação final, um manteve a reversibilidade.

No Grupo B pré-ITE, sete pacientes apresentaram reversibilidade após o uso de BD. Na avaliação final, três mantiveram a reversibilidade.

Um paciente do Grupo B não apresentou reversibilidade pré-ITE e passou a apresentá-la após.

No conjunto dos grupos inicialmente a reversibilidade estava presente em 42% dos pacientes e diminuiu para 23% após a ITE.

4.5 Avaliação dos testes de broncoprovocação induzida por exercício

A execução da prova de broncoprovocação induzida por exercício não apresentou dificuldades, embora 100% dos participantes tenham relatado cansaço físico pela falta de condicionamento.

Naqueles em que o teste foi positivo, o desconforto respiratório foi relatado como leve ou moderado na escala: leve, moderado e forte.

Todos foram capazes de terminar a prova e não houve relatos de sintomas tardios.

A positividade do teste é definida pela queda do VEF₁ basal (porcentagem do predito) igual ou maior que 10% (Custovic, 1994).

No Grupo A pré-ITE a prova foi positiva em nove de dez pacientes e apenas quatro mantiveram esse resultado após a ITE.

No Grupo B pré-ITE a prova foi positiva em nove de onze pacientes e apenas seis mantiveram esse resultado após a ITE.

A maior queda ocorreu aos três minutos depois de cessado o exercício. Esta queda foi significativamente menor ($p = 0,03$) nas avaliações pós-ITE nos dois grupos. A comparação dos grupos não mostrou diferença.

FIGURA 3 Valores do VEF_1 (% do predito) medidos aos 3, 10, 20 minutos e pós-BD, após realização do teste do exercício, em pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE. Cada ponto representa a média dos valores dos dois grupos e a barra ao correspondente erro padrão. ANOVA * $p < 0,05$
Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n=11) - ITE+BCG.

4.6 Medidas do óxido nítrico no ar exalado

As medidas do óxido nítrico (NO) no ar exalado estavam elevadas nos pacientes dos Grupos A (ITE) e B (ITE + BCG), pré e pós-ITE. Não houve diferença significativa nas medidas com relação ao tempo e dentre os grupos. (Tabela 7)

**TABELA 7- MEDIDAS DO ÓXIDO NÍTRICO NO AR EXALADO
PRÉ E PÓS-ITE**

Grupo	A (ITE) Média ± DP		B (ITE + BCG) Média ± DP	
	Pré	Pós	Pré	Pós
NO ppb	91 ± 58	69 ± 29	89 ± 46	84 ± 46
Pré vs Pós A vs B		$p > 0,05$		

ANOVA

Grupo A (n=8)

Grupo B (n=9)

Valor de referência até 15ppb

4.7 Análise da imunoglobulina E total

Os níveis da IgE total apresentavam-se elevados em todos os pacientes nas duas avaliações. Na análise destes valores após a ITE, observamos aumentos que foram significativos ($p=0,002$) em ambos os grupos, entretanto a comparação dentre eles não diferiu. (Tabela 8)

**TABELA 8- VALORES DA IgE TOTAL EM SANGUE PERIFÉRICO
PRÉ E PÓS-ITE**

Grupos	A (ITE) Média ± DP		B (ITE + BCG) Média ± DP	
	Pré	Pós	Pré	Pós
IgE UI/L	1582 ± 1052	1919 ± 1485	1823 ± 1649	2414 ± 1845
Pré vs Pós	$p = 0,002$			
A vs B	$p > 0,05$			

ANOVA

Grupo A (n=10) Grupo B (n=11)

Valores de referência por idade

6 a 9 até 90 UI/L

9 a 13 até 200 UI/L

Adultos até 100 UI/L

4.8 Análise dos eosinófilos em sangue periférico

Os valores percentuais de eosinófilos em sangue periférico encontravam-se elevados em todos os pacientes nas duas avaliações.

Nos indivíduos em que os valores foram iguais ou maiores que 15% foi realizada pesquisa sorológica para *Toxocara canis*, com a finalidade de afastar a parasitose, não obstante, os resultados foram negativos.

Não houve redução significativa no percentual dos eosinófilos nos dois grupos, tampouco dentre eles. (Tabela 9), assim como no número absoluto.

TABELA 9- VALORES PERCENTUAIS DE EOSINÓFILOS EM SANGUE PERIFÉRICO

Grupos	A (ITE) Média ± DP		B (ITE+ BCG) Média ± DP	
	Pré	Pós	Pré I	Pós
Eosinófilos %	9,2 ± 3,1	8,4 ± 4,6	11,3 ± 3,9	10,2 ± 3,4
Pré vs Pós A vs B	$p > 0,05$			

ANOVA

Grupo A (n=10)

Grupo B (n=11)

Valor de referência até 5%

4.9 Análise da imunoglobulina E específica para Dpt

Os resultados da quantificação da IgE específica para o ácaro Dpt “*in vitro*” foram expressos em classes que representam intervalos de valores do anticorpo.

No Grupo A (ITE), seis de dez pacientes mantiveram a mesma classe da IgE, que em outros três diminuiu e, em um aumentou.

No Grupo B (ITE + BCG), nove de onze pacientes mantiveram a mesma classe da IgE, que em um aumentou e em outro diminuiu. (Figura 4)

Não houve diferença estatisticamente significativa nas avaliações em relação ao tempo, tampouco dentre os grupos.

FIGURA 4 Quantificação da IgE específica para Dpt, representada em classes, em soro pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE. Grupo A (n=10) - ITE, Grupo B (n=11) - ITE + BCG. ANOVA $p > 0,05$. Acima da linha tracejada o resultado é considerado positivo.

4.10 Análise da imunoglobulina G específica para Dpt

A IgG específica para Dpt foi detectada no soro de quase todos os pacientes na avaliação pré-ITE. Em um paciente do Grupo A (ITE) o nível estava indetectável.

Durante a análise, pós-ITE, observamos uma elevação dos níveis da IgG específica que foi estatisticamente significativo com relação a avaliação pré e pós-ITE ($p < 0,001$). Não houve diferença na comparação dentro os grupos.

FIGURA 5 – Níveis séricos de IgG específica para Dpt em soro de pacientes asmáticos Pré e Pós-ITE . ANOVA * $p < 0,001$. A vs B $p > 0,05$
Grupo A (n=10) - ITE Grupo B (n=11) - ITE+BCG

4.11 Análise das imunoglobulinas séricas

Os valores das imunoglobulinas séricas foram similares nos dois tempos das avaliações, em ambos os grupos e não diferiram dentre eles.

Uma paciente contraiu parotidite viral no terço final do período de indução da ITE, que evoluiu sem intercorrências. Durante a avaliação pós-ITE observamos que o nível de IgA sérica estava abaixo do limite inferior. Cabe ressaltar que sua irmã é portadora de deficiência parcial de IgA. (Tabela 10)

TABELA 10 - VALORES DAS IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS PRÉ E PÓS-ITE

Grupo		IgG mg/dL Média ± DP	IgA mg/dL Média ± DP	IgM mg/dL Média ± DP
A	Pré	1318 ± 307	225 ± 123	155 ± 123
	Pós	1290 ± 282	237 ± 129	156 ± 124
B	Pré	1175 ± 126	169 ± 98	112 ± 48
	Pós	1272 ± 208	185 ± 133	132 ± 49

Pré vs Pós $p > 0,05$ ANOVA

Grupo A (n=10) – ITE

Grupo B (n=11) – ITE+BCG

Valores de referência do Laboratório Central do HC (Imunoturbidimetria)

	IgG mg/dL	IgM mg/dL		IgA mg/dL
6 – 9 anos	1000 – 1516	59 – 151	6 – 8 anos	33 - 200
9-13 anos	970 – 1710	53 – 145	9- 10 anos	45 - 234
adultos	952 – 1538	73 – 171	adultos	69 - 382

4.12 Testes de linfoproliferação

A resposta linfoproliferativa de células mononucleares de sangue periférico pré e pós-ITE, analisada através do índice de estimulação (IE) frente aos antígenos do Dpt, TT e PPD estava presente em todos os pacientes.

Em indivíduos normais não sensibilizados, as culturas celulares estimuladas com Dpt proliferaram, porém com índice de estimulação abaixo de três.

A cultura celular nos Grupos A e B, frente ao extrato de Dpt avaliada após a ITE, mostrou uma redução dos IE que foi estatisticamente significativa ($p < 0,003$) em ambos os grupos, porém não na comparação dentre eles. (Figura 6)

FIGURA 6 Resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico, de pacientes asmáticos, avaliada pelo índice de estimulação (IE), após estímulo com extrato de Dpt Pré e Pós-ITE. ANOVA Pré vs Pós $p < 0,05$. A vs B $p > 0,05$
Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n=11) - ITE+ BCG

Na avaliação da proliferação celular frente ao controle toxóide tetânico (TT), utilizado como controle, não foram observadas alterações entre os ensaios pré e pós-ITE, tampouco dentre os grupos. (Figura 7)

FIGURA – 7 Resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico, de pacientes asmáticos, avaliada pelo índice de estimulação (IE), após estímulo com toxóide tetânico Pré e Pós-ITE. ANOVA Pré vs Pós $p > 0,05$. A vs B $p > 0,05$. Grupo A (n=10) - ITE. Grupo B (n=11) - ITE + BCG

Houve um aumento na proliferação celular frente ao estímulo com o PPD na avaliação pós-ITE no Grupo B (ITE+BCG), que foi estatisticamente significativo ($p=0,04$), com referência à avaliação pré-ITE. O mesmo não ocorreu no Grupo A (ITE), onde os índices foram similares pré e pós-ITE.

A comparação dos resultados, pós-ITE dentre os Grupos A e B também foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) com relação à avaliação pré-ITE. A proliferação celular, frente ao estímulo com o PPD no Grupo A, foi similar nas avaliações pré e pós-ITE. (Figura 8)

FIGURA 8 Resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico, de pacientes asmáticos, avaliada pelo índice de estimulação (IE), após estímulo com extrato de PPD, Pré e Pós-ITE. Grupo A (n=10) -ITE Pré vs Pós $p > 0,05$. Grupo B (n=11)-ITE+BCG Pré vs Pós $p < 0,05$. A vs B Pós ITE $p < 0,05$. ANOVA

4.13 Análise da interleucina 10 (IL-10)

No Grupo A (ITE), nas avaliações iniciais pré-ITE, foram detectados níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura PBMC estimulada com extrato de Dpt em quatro de dez pacientes.

No Grupo B (ITE+BCG), nas avaliações iniciais pré-ITE, foram detectados níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura PBMC estimulada com extrato de Dpt em dez de onze pacientes.

Durante a análise dos resultados pós-ITE observamos que, com exceção de um paciente do Grupo B, todos passaram a apresentar níveis de detectáveis de IL-10 no sobrenadante de cultura.

Houve um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,001$) com relação ao tempo nos dois grupos (Figuras 9 e 10).

Na comparação dos grupos, encontrou-se uma diferença ($p = 0,02$) que foi independente do tempo, pois os níveis da IL-10 já eram mais elevados nos pacientes do Grupo B pré-ITE.

Os níveis mais elevados da IL-10 foram encontrados no paciente que apresentou intensa reação ao BCG.

FIGURA 9 Níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes asmáticos, estimuladas com extrato de Dpt (18h), Pré e Pós-ITE. Grupo A (n=10) - ITE. ANOVA

Nota: a escala está numerada até 450pg/mL

FIGURA 10 Níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes asmáticos, estimuladas com extrato de Dpt (18h), Pré e Pós-ITE. Grupo B (n=11)-ITE + BCG. ANOVA.

O estímulo com TT não induziu a produção de IL-10 no sobrenadante das culturas de PBMC nos dois grupos, pré e pós-ITE.

No Grupo A (ITE) pré-ITE apenas um de dez pacientes apresentava nível detectável de IL-10 no sobrenadante de cultura estimulada com o PPD. Nas avaliações pós-ITE, ela foi detectada no sobrenadante de seis pacientes, porém em baixas concentrações. Entretanto não houve diferença significativa entre as duas avaliações.

No Grupo B (ITE+BCG) pré-ITE, sete pacientes apresentaram níveis de detectáveis de IL-10 no sobrenadante de cultura estimulada com o PPD. Nas

avaliações pós-ITE ela foi detectada em apenas seis pacientes. Não houve diferença pré e pós-ITE.

Na comparação dentre os grupos também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 11 - EVOLUÇÃO DO QUADRO CLÍNICO - GRUPO A

	Paciente	Sintomas		Sintomas/Noturnos		Sintomas/Esforço		%VEF ₁		Classificação	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
	KR	Chiado Tosse	2 x s 0	0	3xm 0	médios	0	89	94	LP	LI
	TA	Chiado Tosse	3 x s espor	IVAS	2xm 0	pnos	gdes	83	98	LP	LI
	BL	Chiado Tosse	diário espor	0	2x s 0	pnos	0	86	99	MP	S/S
	MF	Chiado Tosse	4 x s diária	1xm	3 x s 0	pnos	médio	68	87	MP	LP
	KD	Chiado Tosse	3 x s diária	IVAS	3 x s 0	pnos	gdes	71	91	MP	LI
	SU	Chiado Tosse	4 x s diária	0 espor	2 x m 0	pnos	gdes	93	80	MP	LI
	SN	Chiado Tosse	3xs diária	1xm	3x s 0	médios	0	110	108	MP	LI
	VA	Chiado Tosse	4 x s	IVAS	2 x m 0	pnos	0	76	89	MP	LI
	TM	Chiado Tosse	3xm 3xs	IVAS	2 x s 0	pnos	gdes	67	91	MP	LI
	ER	Chiado Tosse	3 x s diária	1xm	4 x m 0	pnos	gdes	71	74	MP	MP

s semana; m Mês; espor. Esporádica; pnos. Pequenos; gdes Grandes; IVAS Infecções de vias aéreas superiores MP Moderada persistente; LP Leve persistente, LI Leve intermitente, S/S Sem sintomas.

TABELA 12 - EVOLUÇÃO DO QUADRO CLÍNICO - GRUPO B

Paciente		Sintomas		Sintomas/Noturnos		Sintomas/Esforço		%VEF ₁		Classificação	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
RD	Chiado	3 x s	0	2/s	0	pnos	0	71	68	MP	LI
	Tosse	espor	0								
KC	Chiado	3 x s	0	2/s	0	pnos	médios	98	100	LP	LI
	Tosse	2 x s	espor								
BR	Chiado	2 x s	1xm	1x s	0	médios	0	102	109	LP	LI
	Tosse										
RO	Chiado	3 x s	2 x s	3 x s	0	médios	gdes	61	64	MP	MP
	Tosse	diária									
LC	Chiado	5 x s	IVAS	2 x s	0	pnos	gdes	58	87	MP	LP
	Tosse										
ST	Chiado	3 x s	1 x s	2 x s	0	pnos	gdes	73	82	MP	LP
	Tosse	diária									
ROS	Chiado	diária	IVAS	3x s	0	pnos	0	77	88	MP	LI
	Tosse										
FO	Chiado	4 x s	1xm	2 x s	0	pnos	gdes	42	69	MP	MP
	Tosse	diária									
VS	Chiado	1 x s	IVAS	2 x s	0	pnos	gdes	67	91	MP	LI
	Tosse	diária									
JÁ	Chiado	3 x s		2 x s	0	pnos	gdes	85	95	MP	LI
	Tosse	diária									
RS	Chiado	3 x s	IVAS	2 x s	0	pnos	gdes	90	74	MP	LP
	Tosse	diária									

s semana; m Mês; espor. Esporádica; pnos. Pequenos; gdes Grandes; IVAS Infecções de vias aéreas superiores MP Moderada persistente; LP Leve persistente, LI Leve intermitente, S/S Sem sintomas.

5. Discussão

Os principais objetivos do tratamento da asma são obter o controle dos sintomas da doença e diminuir a necessidade de medicação, com isso, proporcionar melhor qualidade de vida aos seus portadores (GINA, 2002). A imunoterapia específica, atualmente vacina para doenças alérgicas, visa além, mudar as razões da sua existência na tentativa de alterar seu curso (Bousquet, 1998).

Na avaliação clínica dos pacientes, após o período de indução de ITE, observamos melhora significativa dos sintomas e diminuição da necessidade de medicação para asma quando comparada à terapia convencional. Apesar de não ter sido aplicado questionário de qualidade de vida aos pacientes ou a seus responsáveis ficou evidente que houve melhora nesse sentido.

A redução dos sintomas está de acordo com o aumento dos parâmetros da função pulmonar, especialmente o VEF_1 e sua relação com CVF, que estão caracteristicamente diminuídos nos processo de obstrução das vias aéreas (GINA, 2002) que foram observados. Resultados semelhantes foram relatados em diversos trabalhos pós-ITE para asma (Abramson, 2000).

Pudemos observar que a medida do $FEF_{25-75\%}$, desde que obtida com técnica correta, é um bom parâmetro para se avaliar presença de doença inicial e provavelmente a obstrução das pequenas vias aéreas decorrente da inflamação residual. Considerações semelhantes com relação a utilização do $FEF_{25-75\%}$ como parâmetro foram relatadas, com referência ao teste de broncoprovocação induzida por exercício (Fonseca-Guedes, 2003).

A responsividade brônquica geralmente medida pelos testes de broncoprovocação por histamina ou metacolina, foi avaliada pelo teste de broncoprovocação induzida por exercício. A hiperreatividade brônquica inespecífica inicialmente encontrava-se presente em 18 de 21 pacientes. Ao término do período de indução da ITE houve uma redução de aproximadamente 50% na positividade do teste que continuou positivo em 10 pacientes. Entretanto, de maneira geral, os valores do VEF₁ após o exercício apresentaram uma queda estatisticamente significativa, menor que na primeira avaliação. Em alguns pacientes o teste não sofreu alterações. Cabe ressaltar que a inflamação alérgica, mesmo nos casos de asma leve, induz a expressivos danos no epitélio da mucosa das vias respiratórias (Laitinen, 1985), podendo resultar em remodelação irreversível de suas estruturas (GINA 2002). A segunda avaliação foi realizada quatro meses após o início do tratamento, período que para alguns não foi suficiente para reparação das lesões decorrentes de anos de agressão desse processo.

A ITE visa modular a resposta imune e, conseqüentemente, impedir novas agressões ao epitélio das vias respiratórias, mas provavelmente não tem a capacidade de restaurar lesões já estabelecidas, razão e função do uso do corticóide inalatório.

A ITE surgiu com o propósito de tratar a rinite induzida por polens (Noon, 1991) e é neste tipo de manifestação clínica da atopia que a literatura relata seus melhores resultados.

Nas nossas observações vimos que a redução nos sintomas da asma foi mais precoce e intensa do que nos da rinite, onde o efeito do tratamento foi mais visível com referência ao prurido nasal.

O impacto da ITE na melhora clínica dos pacientes ficou mais evidente com relação aos sintomas oculares, que se encontravam presentes na maioria dos pacientes, e deixaram de ser referidos apesar de não ter sido instituído tratamento específico para a conjuntivite.

Estes achados despertaram a atenção, embora avaliar rinite e conjuntivite não tenham sido objetivos deste trabalho.

A medida do óxido nítrico no ar exalado, preconizada como um marcador indireto de inflamação pulmonar (Kharitonov, Barnes, 2000), apresentava-se elevada nas avaliações pré e pós-ITE, contrastando com as medidas dos parâmetros da função pulmonar que mostraram nítida melhora. A presença concomitante de rinite alérgica, embora a técnica de coleta do ar exalado vise não contaminar o ar proveniente dos pulmões com o da orofaringe, poderia estar implicada nestes resultados. Também é importante lembrar que o número de pacientes avaliados foi menor, por motivos técnicos.

Os testes de reatividade cutânea de leitura imediata para o alérgeno reproduzem de maneira reduzida os efeitos do contato deste com o organismo, especialmente nos órgãos acometidos pela doença.

Na avaliação da sensibilização ao Dpt, o teste de puntura titulado revelou uma queda significativa nos valores das medidas das pápulas, sendo que na

concentração mais baixa o teste deixou de ser positivo, dados coincidentes com alguns trabalhos publicados na literatura (Olsen, 1997). Esta mudança estaria correlacionada com a diminuição da liberação de histamina e outros mediadores bioativos pelos mastócitos e basófilos, por ocasião do encontro com o alérgeno, fato descrito no curso da ITE (Durhan, 1998). Como consequência haveria uma minimização dos efeitos causados durante a fase imediata da reação de hipersensibilidade Tipo I, o que provavelmente estaria correlacionado com a melhora dos sintomas.

A resposta à histamina utilizada como controle positivo, também sofreu uma redução pós-ITE.

Paradoxalmente, os níveis da IgE específica não foram alterados. Vários trabalhos observaram uma elevação dos níveis desses anticorpos no início do tratamento (Creticos, 1984). Entretanto constatou-se um aumento significativo da IgE inespecífica. A presença de grandes quantidades desses anticorpos observada no curso da ITE (Durhan, 1998) poderia estar bloqueando os receptores de alta afinidade da IgE, FcεRI ancorados nas membranas de mastócitos e basófilos impedindo assim a desgranulação dessas células efectoras e desta forma contribuindo para redução da resposta cutânea ao antígeno e dos sintomas relacionados a ele.

As parasitoses induzem uma intensa resposta do tipo Th2 com altos níveis de IgE inespecífica. Curiosamente, em indivíduos com alto grau de parasitismo a prevalência de manifestações atópicas, é bem menor (Yazdanbakhsh, 2003), embora tenha sido encontrada presença significativa

de IgE sérica específica para ácaros nestes pacientes (van den Biggelaar et al., 2000), o que nos faz pensar em um provável mecanismo de bloqueio da resposta alérgica.

O aumento de IgG específica, especialmente o subtipo IgG4 mencionada em vários trabalhos, verificado nas avaliações pós-ITE, também estaria envolvido na redução dos sintomas e da reatividade cutânea ao alérgeno, competindo com a IgE na captação do antígeno. (Wachholz et al., 2003).

O papel bloqueador da IgG foi reforçado com os resultados encontrados durante a imunização realizada com altas doses de veneno de abelha em animais de laboratório, onde observou-se a indução da mudança na afinidade e especificidade destes anticorpos que passavam a compartilhar o mesmo epítopo com a IgE, possibilitando-lhes a função bloqueadora (Kolbe et al., 1995).

A alergia caracteriza-se entre outros eventos pela eosinofilia. A participação dos eosinófilos na fase tardia da resposta alérgica está bem estabelecida. Sua atuação, através de seus mediadores, induz importantes alterações estruturais das mucosas das vias aéreas. Não observamos no presente estudo uma diminuição nos valores percentuais destas células em sangue periférico, porém já foi descrito em ITE para polens que o número de eosinófilos presentes na mucosa nasal, após o teste de provocação com o alérgeno estava diminuído, assim como, havia uma redução de sua ativação (Durham, 1996).

Intervenções no sistema imunológico podem acarretar alterações indesejadas, por essa razão os níveis das demais imunoglobulinas séricas foram monitorados, contudo não ocorreram alterações significativas, com exceção de uma paciente que foi acometida de parotidite viral dois meses após o início do tratamento imunoterápico, e na avaliação pós-ITE apresentou nível da IgA sérica abaixo do limite inferior de normalidade. Cabe ressaltar que sua irmã é portadora de deficiência parcial de IgA.

A proliferação de células linfomononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno do Dpt estava presente e elevada em alguns casos, confirmando a presença de linfócitos sensibilizados. Nas avaliações pós-ITE houve uma diminuição dos índices de estimulação que foi estatisticamente significativo nos dois grupos. Dados semelhantes aos encontrados por Akdis (1999) que, entretanto, observou uma abolição da resposta celular para o antígeno específico.

A presença de endotoxinas no extrato pode ter influenciado nos resultados, muito embora em células de indivíduos normais estimuladas com o mesmo extrato não tenha havido indução de proliferação celular.

O tratamento com a ITE não alterou a resposta proliferativa frente ao estímulo com toxóide tetânico, utilizado como controle nos dois grupos, indicando que o efeito supressivo é antígeno específico. Nos pacientes do Grupo A que foram tratados com ITE sem o BCG, os índices de estimulação

das culturas de células estimuladas com PPD também foram similares nas duas avaliações.

A resposta de proliferação de células linfomononucleares do sangue periférico frente ao PPD estava presente em todos os pacientes, a despeito da reação cutânea ao PPD ter sido negativa em 20 dos 21 pacientes. Entretanto, nos pacientes que receberam o BCG, os índices de estimulação foram significativamente maiores pós-ITE, indicando que uma dose de reforço da vacina aumenta a capacidade de resposta celular.

Faith et al. (1997) demonstraram que o estado de anergia nas células Th2 representa um processo ativo associado a um aumento dos níveis e da atividade da tirosina kinase, produção de citocinas e aumento de células reguladoras do fenotipo CD4⁺ CD25⁺.

Demonstrou-se que, na ITE para veneno de abelhas, tanto a produção de citocinas do padrão Th1 como as do Th2 frente ao estímulo antigênico estavam diminuídas. Paralelamente havia um aumento da IL-10 citoplasmática já no sétimo dia da ITE (Akdis 1999).

Durante a análise dos valores encontrados da IL-10 no sobrenadante de cultura de células linfomononucleares do sangue periférico estimuladas com o antígeno do Dpt, verificamos que houve um aumento de seu nível que foi estatisticamente significativo pós-ITE. A presença desta citocina que em alguns pacientes encontrava-se indetectável nas avaliações iniciais, passou a ser detectável.

Jutel (2003) demonstrou que a indução de anergia induzida pela ITE para Dpt e polens estava intrinsecamente relacionada à presença de IL-10 e TGF β , pois o bloqueio destas citocinas levava ao restabelecimento da resposta proliferativa das células na presença do antígeno.

Os níveis mais elevados da IL-10 foram observados nos pacientes do Grupo B (ITE+BCG) ao final do período de indução da ITE, porém estes pacientes já apresentavam valores mais elevados desta citocina nas quantificações pré-ITE quando comparados aos do Grupo A. Portanto, esta diferença não estava relacionada ao fator tempo, ou seja, com o tratamento.

Observamos pequenas quantidades de IL-10 no sobrenadante de cultura de células linfomononucleares do sangue periférico estimuladas com PPD em alguns pacientes pré-ITE. Durante as avaliações pós-ITE não houve diferença intra ou dentre os grupos, porém em alguns pacientes ela passou a ser detectada ainda que em pequenas quantidades.

O estímulo com toxóide tetânico não induziu a produção de níveis detectáveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de células linfomononucleares do sangue periférico dos dois grupos, também indicando a especificidade do processo.

A proposta da associação do BCG como adjuvante na ITE partiu do conhecimento de resultados promissores em experimentos em animais que utilizaram micobacterias e seus produtos, entre elas o BCG, na prevenção ou reversão de resposta do tipo Th2 (Hertz et al., 1998; Wang et al., 1998;

Yang et al., 1999) O objetivo seria potencializar a ITE com intuito de normalizar a resposta alérgica específica, induzindo uma relação mais equilibrada entre células Th1 e Th2, às custas da modulação da resposta Th2 e não através do direcionamento da resposta para o tipo Th1.

Relatos da literatura chinesa de 30 anos atrás mostraram que a aplicação de repetidas doses de BCG desativado foi efetiva no tratamento da asma (Loubei et al., 1991).

Em nossa avaliação não constatamos, ao final do período de indução, benefícios adicionais com o uso de BCG como adjuvante da ITE. Cabe aqui a reflexão e respeito da presença de endotoxinas no extrato alérgico. (fato que foi do nosso conhecimento depois de iniciado o protocolo).

As endotoxinas assim como as micobactérias também se ligam aos receptores de alta afinidade CD14 e *Toll- like receptor 2* e 4 estimulando a resposta imune inata (D' Andréa et al, 1992, Krieg et al., 1995, Hemmi,2000). O estudo do grupo ALEX (Riedler et al., 2002) observou que o fato de que viver em fazendas era um fator de proteção para desenvolver doenças alérgicas e era independente do efeito de sensibilização, semelhante de certa forma com os indivíduos parasitados. Esta proteção foi em parte atribuída ao contato com endotoxinas.

Nos diversos trabalhos consultados referentes a ITE para elaboração deste trabalho, em nenhum foi mencionada a presença ou ausência de endotoxinas, que poderia estar atuando como adjuvante "oculto".

A presença de endotoxinas foi avaliada recentemente por Bhavini e colaboradores (2003) em amostras de extratos alérgicos para

imunoterapia de 14 laboratórios e encontrou até 34.000 EU/mL. Segundo o laboratório do extrato utilizado a presença de endotoxinas é inerente ao processo de fabricação do material.

Deve-se ressaltar também que o poder estatístico do teste para detectar diferença entre dois grupos (erro β) foi baixo. Seria necessário um número maior de observações para aumentar o poder do teste, o que não aconteceu com relação a imunoterapia onde poder do teste foi alto.

A dificuldade de se conseguir grupos homogêneos, embora com a mesma classificação da doença, também é um fator que dificulta a observação dos resultados.

5.1 Considerações a respeito do extrato para imunoterapia.

É importante ressaltar a dificuldade encontrada na obtenção de material, com concentrações adequadas dos antígenos principais, para execução desse trabalho.

6. CONCLUSÕES

1 - O uso do BCG com adjuvante na ITE para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* não mostrou benefícios adicionais ao final do período de indução.

2 - Uma dose de reforço da vacina BCG induziu um aumento da proliferação de células linfomononucleares do sangue periférico frente ao estímulo com o PPD.

3 - A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* mostrou-se efetiva no tratamento da asma leve persistente ou moderada persistente em pacientes sensibilizados apenas a ácaros, já ao final do período de indução.

4 - A imunoterapia específica para o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, induziu mudanças nos parâmetros imunológicos avaliados, como IgE inespecífica, IgG específica para Dpt, diminuição da proliferação celular para antígenos do Dpt e aumento da IL-10, apontando para uma provável modulação à resposta imune.

QUADRO 1 - Teste de puntura titulado em pacientes dos Grupos A e B

Pacientes	TESTE DE PUNTURA PARA Dpt TITULADO									
	Pré-ITE					Pós-ITE				
	1/1	1/5	1/10	1/100	Histamina	1/1	1/5	1/10	1/100	Histamina
Grupo A										
KAI	6,50	4,00	4,25	3,00	4,50	3,75	3,50	2,25	0,00	4,50
TAM	4,50	3,50	3,75	3,25	5,25	4,50	2,50	2,50	0,00	4,75
BS	7,00	5,25	4,25	3,75	5,00	5,25	3,50	3,50	2,00	3,50
MV	5,00	4,50	3,00	0,00	3,50	3,25	2,50	2,00	0,00	4,75
KR	6,50	5,00	4,00	4,00	4,00	3,50	2,50	1,50	0,00	3,00
SU	6,75	5,00	3,00	3,25	5,25	3,25	3,00	3,00	2,25	3,50
ST	14,75	11,75	7,75	4,25	5,25	5,00	5,00	4,25	0,00	4,50
VB	15,50	11,00	8,00	7,00	5,00	3,50	4,25	3,75	2,00	4,00
TS	7,75	4,00	4,00	3,00	4,75	3,25	3,25	1,00	0,00	5,00
ED	7,00	5,00	4,50	3,50	6,00	4,50	4,00	3,50	3,50	5,50
GrupoB										
ROD	4,50	4,00	3,75	3,25	4,75	3,50	4,75	4,00	1,00	3,25
KAR	7,75	5,00	5,00	4,00	6,00	5,50	4,50	3,25	0,00	4,00
BRU	5,75	3,75	5,00	3,50	4,75	4,25	2,75	3,00	0,00	5,00
RB	6,50	7,25	7,25	3,50	5,00	5,25	4,25	3,25	0,00	4,50
LC	7,50	5,25	4,75	3,75	4,00	5,75	4,75	4,00	1,00	4,50
SV	8,35	6,50	6,00	4,50	5,50	5,50	5,50	4,25	3,25	4,50
RJ	6,50	5,00	4,00	4,00	4,00	3,50	2,50	1,50	0,00	3,00
FG	5,70	3,75	4,00	3,00	4,00	4,75	4,50	2,00	1,00	4,50
VN	11,00	12,50	7,50	5,75	4,50	4,50	4,75	6,25	1,50	3,75
JR	12,50	8,50	6,50	5,50	7,00	5,50	5,00	4,25	2,50	4,50
RE	5,75	4,00	3,25	4,25	4,00	4,00	3,25	3,25	0,00	4,25

QUADRO 2 - Valores dos parâmetros da função pulmonar pré-ITE em pacientes dos Grupos A e B

ESPIROMETRIA PRÉ-ITE								
Pacientes	Pré-BD				Pós-BD			
	CVF	VEF ₁	VEF ₁ /CVF	FEF _{25-75%}	CVF	VEF ₁	VEF ₁ /CVF	FEF _{25-75%}
KAI	90%	89%	105%	116%	89%	91%	108%	127%
TAM	100%	83%	91%	58%	101%	86%	94%	71%
BS	98%	86%	97%	68%	95%	82%	95%	61%
MV	84%	68%	86%	42%	95%	93%	103%	84%
KR	99%	71%	72%	35%	98%	74%	77%	43%
SU	97%	93%	94%	74%	91%	96%	105%	98%
ST	102%	110%	109%	122%	101%	109%	108%	127%
VB	84%	76%	96%	62%	87%	88%	108%	98%
TS	119%	108%	99%	74%	123%	115%	103%	114%
ED	87%	71%	86%	45%	103%	85%	88%	57%
Grupo B								
ROD	75%	71%	100%	64%	75%	73%	103%	72%
KAR	103%	98%	105%	98%	116%	113%	108%	128%
BRU	106%	102%	101%	95%	112%	107%	100%	93%
RB	95%	61%	68%	28%	99%	87%	94%	67%
LC	79%	58%	79%	35%	88%	79%	97%	71%
SV	87%	63%	79%	33%	90%	75%	93%	58%
RJ	95%	77%	86%	49%	100%	89%	95%	76%
FG	72%	42%	63%	17%	103%	74%	76%	41%
VN	86%	67%	86%	62%	86%	81%	103%	85%
JR	87%	85%	107%	99%	89%	90%	112%	139%
RE	106%	90%	89%	58%	105%	94%	94%	70%

QUADRO 3 - Valores dos parâmetros da função pulmonar Pós-ITE em pacientes dos Grupos A e B

Pacientes	ESPIROMETRIA PÓS-ITE							
	Pré-BD				Pós-BD			
	CVF	VEF ₁	VEF ₁ /CVF	FEF _{25-75%}	CVF	VEF ₁	VEF ₁ /CVF	FEF _{25-75%}
KAI	98%	94%	102%	107%	97%	96%	106%	123%
TAM	100%	98%	108%	100%	101%	100%	109%	110%
BS	104%	99%	105%	95%	104%	102%	107%	103%
MV	96%	87%	95%	64%	104%	104%	105%	105%
KR	103%	91%	98%	78%	104%	97%	104%	95%
SU	91%	80%	97%	72%	91%	86%	104%	93%
ST	107%	108%	101%	100%	105%	113%	109%	125%
VB	94%	89%	102%	82%	95%	96%	109%	106%
TS	113%	100%	96%	80%	114%	106%	102%	98%
ED	93%	74%	85%	48%	105%	92%	93%	70%
Grupo B								
ROD	73%	68%	98%	55%	77%	78%	106%	84%
KAR	111%	100%	100%	93%	108%	105%	107%	134%
BRU	111%	109%	103%	96%	114%	118%	108%	135%
RB	100%	64%	69%	29%	110%	93%	90%	68%
LC	97%	87%	97%	80%	100%	94%	102%	90%
SV	94%	73%	86%	46%	101%	92%	100%	92%
RJ	96%	82%	90%	59%	95%	88%	98%	81%
FG	87%	61%	75%	32%	95%	69%	78%	38%
VN	95%	91%	105%	97%	96%	97%	112%	130%
JR	95%	95%	111%	103%	97%	102%	115%	140%
RE	101%	74%	78%	38%	103%	95%	98%	82%

Classificação da obstrução - VEF1% predito

normal	80 - 100
leve	60 - 80
moderada	40 - 60
grave	< 40

QUADRO 4 - Mudanças dos valores do VEF₁ pós BD em pacientes dos Grupos A e B

ESPIROMETRIA				
Pacientes	Mudança VEF ₁ pós BD			
	PRÉ-ITE		PÓS-ITE	
	%	volume mL	%	volume mL
KAI	2	50	2	60
TAM	4	70	2	40
BS	-5	-80	3	50
MV	36	510	19	350
KR	6	110	7	200
SU	4	70	7	150
ST	-1	0	5	230
VB	17	370	8	210
TS	7	130	7	130
ED	20	340	23	440
Grupo B				
ROD	2	30	14	200
KAR	16	400	5	130
BRU	6	110	8	170
RB	43	750	45	870
LC	36	750	9	280
SV	21	360	27	240
RJ	16	320	7	170
FG	2	50	13	240
VN	20	330	7	160
JR	7	140	7	170
RE	4	80	28	430

QUADRO 5 - Maior queda do VEF₁ após o teste de broncoprovocação induzida por exercício em pacientes dos Grupo A e B

BRONCOPROVOCAÇÃO POR EXERCÍCIO		
Pacientes	Maior queda do VEF ₁	
	PRÉ ITE	PÓS ITE
KAI	-6%	-1%
TAM	-18%	-44%
BS	-14%	-5%
MV	-21%	-21%
KR	-10%	-5%
SU	-22%	-25%
ST	-11%	-1%
VB	-41%	-43%
TS	-14%	-4%
ED	-32%	-6%
Grupo B		
ROD	9%	-4%
KAR	-30%	-26%
BRU	-16%	-4%
RB	-12%	-30%
LC	-32%	-4%
SV	-16%	-31%
RJ	-52%	-14%
FG	-27%	-24%
VN	-23%	-5%
JR	-18%	-11%
RE	-59%	-33%

Teste positivo - queda do VEF₁ ≥ 10%

QUADRO 6 - Quantificação da IgE (classe) e IgG específicas para Dpt em pacientes dos Grupos A e B

Pacientes	IgE Dpt Classe / KUA/L		IgG Dpt mg _A / L	
	Pré-ITE	Pós-ITE	Pré-ITE	Pós-ITE
KAI	3 - 11,8	3 - 7,12	20,20	22,80
TAM	6 - 1052	6 - 1342	36,70	56,60
BS	6 - 358	5 - 320	33,10	55,00
MV	3 - 5,2	2 - 3,3	indeter	3,05
KR	4 - 45,5	5 - 58,1	15,80	50,00
SU	6 - 698	6 - 594	14,00	44,10
ST	6 - 262	6 - 416	30,00	42,80
VB	6 - 314	6 - 618	24,20	43,70
TS	4 - 21,9	3 - 15,3	26,80	54,90
ED	4 - 22,9	4 - 44,4	8,64	22,30
Grupo B				
ROD	4 - 24,1	4 - 34,2	6,28	18,00
KAR	6 - 1516	6 - 1002	31,80	43,80
BRU	6 - 454	6 - 1326	7,41	20,40
RB	6 - 334	6 - 428	17,40	53,70
LC	6 - 450	5 - 202	10,40	33,40
SV	4 - 33,4	4 - 37,7	30,00	42,80
RJ	5 - 153	6 - 306	31,10	61,90
FG	4 - 25,7	4 - 22,5	6,82	14,40
VN	6 - 314	6 - 202	15,00	27,10
JR	6 - 876	6 - 1146	27,30	48,20
RE	6 - 620	6 - 1210	9,33	28,60

QUADRO 7- Quantificação de eosinófilos em sangue periférico de pacientes dos Grupos A e B

EOSINÓFILOS SANGUE PERIFÉRICO				
Pacientes	Pré-ITE		Pós-ITE	
	%	nº	%	nº
KAI	7,5	500	4,7	400
TAM	12,1	800	18,7	1800
BS	9,8	600	6,9	400
MV	11,7	600	6,2	300
KR	4,4	200	5,9	400
SU	12,2	900	6,5	400
ST	8,1	700	9,3	800
VB	12,6	700	14,7	800
TS	5,4	500	5,1	400
ED	7,4	700	5,9	500
Grupo B				
ROD	6,6	500	7,8	600
KAR	8,6	800	10,6	600
BRU	17,9	1200	18,6	1600
RB	9,3	600	12,9	1000
LC	16,1	900	8,9	600
SV	10,5	1000	9,3	600
RJ	6,2	400	6,2	500
FG	6,4	600	8,2	800
VN	8,5	800	8,1	500
JR	9,7	700	8,2	500
RE	17,7	1400	13,8	1000

QUADRO 8- Quantificação das imunoglobulinas séricas em pacientes dos Grupos A e B

IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS								
Pacientes	Pré-ITE				Pós-ITE			
	IgE	IgG	IgM	IgA	IgE	IgG	IgM	IgA
KAI	1080	1014	90	147	955	1235	98	210
TAM	3520	1248	411	136	4430	1109	361	120
BS	927	1083	240	84	1050	1067	196	80
MV	954	1048	50	297	358	897	60	348
KR	1040	1749	343	415	1320	1666	363	412
SU	2190	1436	57	103	3670	1312	62	101
ST	956	1718	134	251	1090	1501	144	243
VB	3010	880	47	206	3190	946	44	197
TS	199	1507	83	438	252	1603	110	454
ED	1950	1503	110	182	2880	1564	119	210
Grupo B								
ROD	730	1190	79	133	2130	1259	95	130
KAR	4230	1190	79	133	4580	1602	220	120
BRU	4320	1158	204	84	5120	1170	198	80
RB	786	1212	48	87	2350	1374	75	152
LC	754	1020	69	361	1170	1221	98	513
SV	497	1107	161	180	562	1036	159	125
RJ	1160	1112	142	152	1570	1215	128	168
FG	58	1160	95	191	80	1048	114	215
VN	908	1500	100	40	530	1651	83	10
JR	4020	1226	169	62	4800	1351	184	76
RE	2640	1052	93	313	3670	1074	103	297

Valores de referência do LC- HCFMUSP

idade	6 a 9	9 a 13	adultos
IgE	até 90	até 200	até 100
IgG	1000 -1516	970 -1710	952 - 1538
IgM	59 -151	53 -145	73 - 171
IgA	33 -200	45 - 324	69 - 382

QUADRO 9 - Proliferação de células mononucleares do sangue periférico de pacientes dos Grupo A e B, após estímulo com Dpt, TT, PPD

PROLIFERAÇÃO CELULAR - ÍNDICE DE ESTIMULAÇÃO						
Pacientes	Pré-ITE			Pós-ITE		
	Dpt	TT	PPD	Dpt	TT	PPD
KAI	12	4	7	8	5	7
TAM	105	41	110	27	15	15
BS	58	10	41	30	8	39
MV	11	7	57	15	12	37
KR	59	12	16	38	9	11
SU	23	2	8	45	2	16
ST	12	4	52	15	12	69
VB	108	7	35	38	8	36
TS	32	12	34	15	7	34
ED	14	21	29	8	7	24
Grupo B						
ROD	30	37	84	13	15	80
KAR	54	20	187	48	16	153
BRU	30	19	33	8	4	15
RB	69	6	64	13	2	46
LC	62	7	65	29	7	83
SV	32	12	28	32	10	81
RJ	67	35	35	26	36	56
FG	22	10	26	21	23	69
VN	17	35	35	22	37	117
JR	34	10	4	23	5	75
RE	100	20	98	17	12	201

QUADRO 10 - Quantificação da interleucina 10 em sobrenadante de cultura de PBMC após estímulos com Dpt e PPD (18h), em pacientes dos Grupos A e B

Pacientes	IL-10 pg/mL Dpt		IL-10 pg/mL PPD	
	Pré-ITE	Pós-ITE	Pré-ITE	Pós-ITE
KAI	327	396	60	93
TAM	0	82	0	0
BS	75	102	0	2,2
MV	0	0	0	0
KR	35	288	0	48
SU	0	38	0	0
ST	71	206	0	73
VB	0	397	0	34
TS	0	53	0	21
ED	0	57	0	0
Grupo B				
ROD	630	1067	203	261
KAR	239	325	50	0
BRU	92	415	25	96
RB	148	47	5,8	0
LC	70	211	0	0
SV	125	5	38	0
RJ	0	0	0	0
FG	217	657	35	87
VN	203	480	97	62
JR	378	582	0	24
RE	84	712	0	28

GUIA GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA

Classificação da Gravidade da Asma pelas
Características Clínicas antes do Tratamento

	Características	Sintomas noturnos	Função pulmonar
Grau 4 Grave persistente	Sintomas persistentes Limitação da atividade física Exacerbações freqüentes	Freqüentes	$VEF_1 \leq 60\%$ do predito Variabilidade do FEF_1 ou $PEF > 30\%$
Grau 3 Moderada persistente	Sintomas diários uso diário de $\beta 2$ -agonista de curta duração Exacerbações podem afetar atividades e o sono	>1 vez na semana	VEF_1 60% -80% do predito Variabilidade do VEF_1 ou $PEF > 30\%$
Grau 2 Leve persistente	Sintomas > 1 vez semana mas <1 vez ao dia Exacerbações podem afetar atividades e o sono	>2 vezes por mês	$VEF_1 \geq 80\%$ do predito Variabilidade do VEF_1 ou $PEF 20-30\%$
Grau 1 Leve intermitente	Sintomas ≤ 1 vez semana Exacerbações leves	≤ 2 vezes por mês	$VEF_1 \geq 80\%$ do predito Variabilidade do VEF_1 ou $PEF < 20\%$

Referências Bibliográficas

Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, Goudiaby AA, Hall AJ, Shiell AW, Jensen H, Marchant A. Early BCG vaccination and reduction in allergy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:644-50.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober SJ. *Cellular and Molecular Immunology*. Effector mechanisms of immunoglobulin E- Initiated Immune Reactions Saunders Text and Review Series 3th ed 1997; p.299-311.

Abbas AK. Functional diversity of helper T lymphocyte. *Nature*. 1996;383:787-93.

Abramson M, Puy R, Weiner J. Immunotherapy in asthma: an up dated systematic review. *Allergy*. 1999;54:1022-41.

Abramson M. Allergen immunotherapy for asthma. Cochrane Data base Syst Rev 2000;2CD001186.

Akdis CA, Biensken T, Akdis M, Wultrich B, Blaser K. The role of IL-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998;102:98-106.

Akdis CA, Blaser K. IL-10 induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. 1999; FASEB;13:603-9.

Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10 mediated immune suppression. *Immunology*. 2001;103:131-6.

American Thoracic Society. Lung function testing: selection of references values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:1202-18.

American Thoracic Society. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing 1999. *Am J Respir Crit Med.* 2000;161:309-329.

Ball T, Spen WR, Valen P. Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. *Eur J Immunol.* 1999;29:2026-36.

Bhavini T, Cherry V, Slater JE. Endotoxin content of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:777-83.

Bierman CW, Kawabori I, Pierson WE. Incidence of exercise induced asthma in children. *Pediatrics.* 1975;56(Suppl):847-50.

Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Milkesaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2 year old children. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:342-6.

Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO position paper. *Allergy.* 1998;53(Suppl 44):1-42.

Bousquet J, van Calvenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. ARIA Workshop Report. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:S147-S334.

Brewer JM, Conacher CA, Hunter M, Mohrs F, Brombacher J. Aluminium hydroxide adjuvants initiates strong antigen- specific TH2 response in absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol.* 1999;163:6448-54.

Brehler R, Luger TA. Atopy: immunodesviation and environment. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:1128-30.

Burr MK, Butland BK, King S, Vaugan-Williams E. Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart. *Arch Dis Child.* 1989;64:1454-6.

Cazac B, Roes B, Roes J. TFG β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity.* 2000;13:434-51.

Choi I, S, Koh YI. Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: randomized, control trial. *Am College Allergy Asthma Immunol.* 2002; 88:584-591.

Coffman RL, Cart YJA. T-cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by IFN- γ . *J Immunol.* 1986;136:949-54.

Creticos OS, van Metre TE, Mardiney MR, Rosenberg GL, Norman OS, Adkinson. NF. Dose-response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 1984;73:97-104.

Custovic A, Arifhodzic N, Robinson A, Woolcock A. Exercise testing revised: the response to exercise in normal and atopic children. *Chest.* 1994;105: 1127-32.

Daeron M. Negative regulation of mast cell activation by receptors for IgG. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;113:138-41.

D'Andrea L, Rengaraju M, Valiante NM. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* 1992;176:1387-98.

De Carli GA. *Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas*. Métodos e técnicas. Rio de Janeiro: MEDSI;1994.

Del Petre DH, Decarli M, Amerigogna F, GuidizemG, Biegiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cells clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*. 1993;150:353-60.

Downs SH, Marks GB, Sporik R, Beloswa EG, Car NG, Peat JK. Continued increase in prevalence of asthma and atopy. *Arch Dis Child*. 2001;84:20-3.

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

Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in nasal mucosa and increase the number of cells expressing RNA for interferon-gamma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;97:1356-65.

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

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

Ebner C, Siemann U, Bohle B, Willhein U, Schenk S, Koltz F. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from Th2 to Th1 in T-cell clones specific for Phl p1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:981-5.

Eckart R. Roles of IL-4 and IFN-gamma in establishing the helper type 1 and 2 phenotype. *J Immunol.* 1997;158:2648-53.

Erb KJ. Atopic disorders: a default pathway in absence of infection? *Immunol Today.* 1999;6:317-22.

Ewan PW, Deighton J, Willson AV, Lachmann JK. Venom specific IgG antibodies in bee and wasp allergy; lack of correlation with protection from stings. *Clin Allergy.* 1998;23:647-60.

Faith A, Akdis CA, Akdis M, Simon HV, Blaser, K. Defective TCR stimulation in anergized type 2 T helper cells correlates with abrogated p 56^{lck} ZAP-70 tyrozine kinase activities. *J. Immunol* 1997;159:53-60.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrofages. *J Immunol.* 1991;147:3815-22.

Fonseca-Guedes CHF. Exercise- Induced Broncospasm in Children: Comparison of FEV₁ and FEV_{25-75%} Responses. *Pediatric Pulmonology.* 2003; 36:49-59.

Fugieda MS, Ihom S, Kimuram Y, Sunagam H, Igawam H, Chizuru MC, Yamamoto S, Saitom H. DNA from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (MY-1) inhibits immunoglobulin E production by human lymphocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:2051-6.

Frew AJ. Immunotherapy of allergy disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S712-9.

Gronlund H, Vrtala S, Wiedermann U. Carbohydrate-based particles: a new adjuvant for allergen-specific immunotherapy. *Immunol.* 2002;107:523-9.

Grunstein MM, Bhagat RG. Comparison of responsiveness to methacholine, histamine and exercise in subgroups of asthmatic patients. *Am.Rev. Respir. Dis.* 1984; 129: 221-4.

Hanson B, Macgue M, Roitman-Hohnson B, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Blumenthal MN. Allergy disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet.* 1991;48:873-9.

Hemmi H. A Toll like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408:740-5.

Hertz U, Gerhold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H, Paul K. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in animal model. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102:867-74.

Holt PG, Macaubas C, Stumbles AP, Sly PD. The role of atopy in development of asthma. *Nature.* 1999;402:B12-6.

Hopkin JM. Early life receipt of antibiotics and allergic disorder. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:733-4.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T cell. Development by the Transcription Factor FOXP3. *Science.* 2003; 299: 1057-61.

Hsu DM, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on interleukin 2 induced interferon- gamma synthesis and lymphokine activated killer activity. *Int Immunol.* 1992;4:563-9.

Ipearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 1999;54:268-72.

ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood. Steering Committee Worldwide variation in prevalence of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISSAC. *Lancet*. 1998;351:1225-32.

Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Müller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase in IFN-gamma secretion in specific allergen stimulated T cell cultures. *J Immunol*. 1995; 154:4178-94.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Casaulta CA, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis C. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003;33:1205-14.

Kharitonov AS, Barnes PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*. 2000;343:781-92.

Krieg AK, Yi AK, Matson S, Waldshmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Karetzk Y, Klinmam DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature*. 1995;374:546-549.

Kapsenberg ML, Jansen HM, Bos JD, Wierenga E. Role of type 1 and type 2 helper cells in allergic diseases. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:788-94.

Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy*. 2000 ;30:201-8.

Kim DS, Drake- Lee AB. Allergen immunotherapy in historical perspective. *J Laryngol Otol*. 2003;117:940-5.

Kimura I, Tanizati Y, Goda Y, Komagoe H, Kitani H. Decrease in reactivity of basophils by immunotherapy with house dust extract. *Clin Allergy*. 1985;15: 1-7.

Klein K, Dathe R, Gollnitz S, Jager L. Allergies: a comparison between two vocational schools in East and West Germany. *Allergy*. 1992;47(Suppl 12): 259.

Kolbe L, Heusser CH, Kolch E. Isotype associated recognition of allergen epitopes and its modulation by antigen dose. *Immunology*. 1995;84:285-9.

Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Hahle T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. REV. Respir. Dis.* 1985;131: 599-605.

Le J, Lin JX, Heriksen-Destefano D, Visek J. Bacterial lipopolysaccharide induced interferon-gamma: production roles of interleukin-1 and interleukin-2. *J Immunol*. 1986;136:2545-30.

Lebman DA, Coffman RD. Interleukin-4 causes isotype switching IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Immunol*. 1988;168:853-58.

Loubei Z, Dihua S, Jiening W. Prophylactic effect of BCG vaccination on the recurrence of children asthma. *Chin J Paediat* 1991;39:165-67.

Magnus P, Jaakkola JJ. Secular trend in occurrence of asthma among children and young adults, critical appraisal of repeated cross sectional surveys. *Br Med J*. 1997;314:1795-99.

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

Martinez FD, Stern DA, Wrigth TAL, Taussig LM, Halonen M. Association of non wheezing lower respiratory tract illness in early life with persistently diminished IgE serum levels. *Thorax*. 1995;50:167-72.

Martinez FD. Maturation of immune responses at the beginning of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:355-61.

Matricardi PM, Rosmin IF, Ferigno L. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to allergy and allergic asthma: epidemiological study. *Br Med J*. 2000;320:412-6.

Michils A, Mairesse M, Ledent C, Gasasrt B, Baldassarre S, Ducharteau J. Modified antigenic reactivity of anti-phospholipase A2 IgG antibodies in patients allergic to bee venom, conversion with immunotherapy and relation to subclass expression. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:118-26.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Gildlin MA, Coffmann KL. Two types of murine helper T cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. *J Immunol*. 1986;136:2348-54.

Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.

Müller V, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom specific IgE, IgG and subclasses of IgG antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy*. 1989;44:412-8.

Müller UR, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Bettens F, Blesken T, Blaser K. Successful immunotherapy with T cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T cell anergy in bee sting allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101:747-54.

Müller V, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom specific IgE, IgG and subclasses of IgG antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy* 1989;44: 412-8.

National Heart, Lung and Blood Institute. *Global Initiative for asthma* (GINA). Bethesda: National Institutes of Health; 2002. (Publication nº. 95-3659).

Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;1:1572-3.

Nurse B, Puterman AS, Haus M, Berman D, Weiberg EG, Potte RPC. PBMCs from asthmatic and non atopic children show a Th2 cytokine response to house mite allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106: 84-91.

Olsen OT. One year placebo controlled , double blind , house dust mite immunotherapy. A study in asthmatic adults. *Allergy*. 1997;52:853-59.

Omenaas S, Jento FHF, Vollmer WM, Buis AS, Gulsvik A. Absence of relationship between tuberculin reactivity and atopy in BCG vaccinated young adults. *Thorax*. 2000;55:454-8.

Palmer EM, van Seventer GA. Human T Helper Cell Differentiation Is Regulated by the Combined Action of Cytokines and Accessory Cell-Dependent Costimulatory Signals. *J. Immunol* 1997;158:2654-61.

Peat JK, Li J. Reversing the trend: reducing the prevalence of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:1-10.

Platts-Mills TAE, De Weck AL. Dust mite allergens and asthma a worldwide problem. *J Allergy Clin Immunol*. 1989;83:416-27.

Polgar G, Promadhat V. *Pulmonary function testing in children: techniques and standards*. Philadelphia: W B Saunders; 1971. p.87-208.

Riedler J, Braun, Fahrlander C, Eder W, Scheurer M, Waser, M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von-Mutius and Alex Study Team. Exposure to farming in early life a development of asthma and allergy: a cross- sectional survey. *Lancet*. 2001;358:1129-33.

Romagnani S. Induction of Th1 and Th2 responses a key role for natural response? *Immunol Today*. 1992;13:379-81.

Schanden L, Alonso-Vega C, Willem SF, Gerard C, Delvaux A, Velu T B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cell is inhibited by IL-10. *J Immunol*.1994;152:4368-74.

Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*. 1997;275:77-9.

Sly RM. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*.1999;82:233-48.

Snapper CM, Paul WE. IFN- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*. 1987;237:944-7.

Snipes LT, Skramene E, Radzioch D. Acquired resistance but not innate resistance to *Mycobacterium bovis* BCG is compromised by interleukin 12 ablation. *Infec Immunity*1998;66: 5268-74.

Solé D, Yamada E, Vana AT, Costa-Carvalho BT, Nasipitz CK. Prevalence of asthma and related symptoms in school age children in São Paulo, Brazil. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *J Asthma*. 1999;36:205-12.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J*. 1989;299:1259-60.

Strachan DP. Allergy and family size: a riddle worth solving. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:235-6.

Tournoy KG, Kips JC, Pawel SAR. The allergen-induced airway hyperresponsiveness in a human-mouse chimera model of asthma is T cell and IL4 and IL-5 dependent. *J Immunol*. 2001;166:6982-91.

van Den Biggelaar AHJ, Van Ree R, Rodrigues C.L, Lell B, Deelder MA, Kremsner GP, Yazdanbakhsh M. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*. 2000;356:1723-7.

von Ehrenstein OS, von Mutius E. Reduced risk of hay fever and asthma among children and farmers. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:187-93.

van-Enerven RJ, Wilboudg T, Lund G. Blocking antibodies induced by specific allergen vaccination prevent the activation of CD4 T cells by inhibiting serum IgE facilitated allergen presentation. *J Immunol*. 1999;163:2944-52.

von Mutius E, Perace N, Beasley R, Cheng S, von Ehrenstein O, Björkstén B, Weiland S. International patterns of tuberculosis and prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and eczema. *Thorax*. 2000;55:449-53.

von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roel LG, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of west and east Germany. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:358-64.

Wachholz PA, Durhan SR. Induction of blocking IgG antibodies during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1171-4.

Waithe WI, Hirschoorn K. The lymphocyte response to activators. In: Weir DM. *Handbook of experimental immunology*. 2nd ed. Oxford: Blackwell; 1973;25.1-25.10.

Wang CC, Rook GAW. Inhibition of an established response to ovalbumin in BALB/C mice by killed *Mycobacterium vaccae*. *Immunology*. 1998;93:307-13.

Wohlleben G, Edb J. Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol*. 2001;22:618-26.

Wulthrich B. Epidemiology of allergic diseases are they really on the increase? *Int Arch Allergy*. 1989;90:3.

Yang X, Wang Y, Zhu L. Systemic mycobacterial infection inhibits antigen-specific immunoglobulin E production, bronchial mucus production and eosinophilic inflammation induced by allergen. 1999;98: 329-37. *Immunol* 1999;98:329-37.

Yazdanbakhsh M. Allergy parasite and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002;296:490-94.

Zeiss CR, Pruzansky JJ. Immunology of IgE-mediated and other hypersensitivity states. In: Patterson R, Grammer LC, Greenberger PA. *Allergic diseases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997; p.27-38.

Zurawski G, Vries JE. Interleukin13 an interleukin 4 like cytokynes that acts on monocytes and B cell but not on T cells. *Immunol Today*. 1994;15:19-26.

Zhu D, Kepley CR, Zang M, Zang K, Saxon AI. A novel human immunoglobulin Fcγ Fcε bifunctional fusion protein inhibits FcεRI mediated degranulation. *Nat Med.* 2002;8:518-21.