

Avaliação da resposta imunológica à prova de provocação nasal específica: estudo de quimiocinas em secreções nasais

Avaliation of the immunological response to the specific nasal challenge test: chemokine study in nasal secretions

Graça Loureiro*¹, Carlos Loureiro**¹, Fátima Garção***², Vera Alves****², Manuel Santos Rosa*****², Celso Chieira*****¹

* *Interna do Internato Complementar de Imunoalergologia*

** *Assistente Hospitalar Graduado de Imunoalergologia*

*** *Investigador Auxiliar*

**** *Assistente Convidada de Imunologia*

***** *Professor Associado com Agregação de Imunologia*

***** *Director de Serviço de Imunoalergologia*

¹ *Serviço de Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra*

² *Centro de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra*

Resumo

A prova de provocação nasal específica (PPNE) constitui o método de eleição para a reprodutibilidade da reacção alérgica. A análise dos parâmetros imunológicos constitui a abordagem mais objectiva para monitorizar a resposta à prova de provocação específica, com a avaliação quantitativa de mediadores inflamatórios. Neste estudo pretendeu-se avaliar as concentrações das quimiocinas eotaxina e RANTES em lavados nasais e analisar a aplicabilidade do doseamento das quimiocinas em secreções nasais como parâmetro de resposta imunológica à prova de provocação nasal específica. Incluíram-se 17 doentes com rinite alérgica a parietaria. Todos os doentes foram submetidos a PPNE, fora do período polínico. Antes, 30 minutos e 6 horas após a PPNE foram efectuados lavados nasais para doseamento de mediadores inflamatórios. Procedeu-se à monitorização da PPNE através de *score* de sintomas. A PPNE foi positiva em todos os doentes, documentando-se um pico do *score* de sintomas ao 1º minuto seguido de posterior decréscimo até à 6ª hora. A eotaxina não foi mensurável em nenhuma das amostras obtidas, enquanto que o RANTES apresentou um decréscimo da avaliação basal para a avaliação aos 30 minutos, mantendo-se às 6 horas. As alterações dinâmicas das quimiocinas, após a PPNE, não reflectiram a reacção alérgica documentada clinicamente. Tal poderá ser interpretado como uma discrepância do tempo de colheita de amostras e a dinâmica dos mediadores inflamatórios de resposta à PPNE.

Palavras-chave: provocação nasal específica, quimiocinas, eotaxina, RANTES

Summary

The specific nasal challenge test (SNCT) has been described as a method to reproduce the allergic reaction. The analysis of immunological parameters is the most objective method to monitoring the response to SNCT. The aim of this study was to assess the utility of measurement of eosinophil specific chemokines (eotaxin and RANTES) as a parameter of response to SNCT. We included 17 patients with allergic rhinitis to parietaria. A SNCT was performed out of the pollen season. The SNCT was monitored by symptom scores. At 0, 30th minute and the 6th hours after the SNCT, nasal lavages were performed to assess the inflammatory mediators. In this study the SNCT reproduced the clinical reactivity to the allergen. The symptom score showed a peak at the 1st minute followed by a decrease to the 6th hour. Eotaxin was not found in any nasal lavage. RANTES showed a decrease from the basal nasal lavage to the 30th minute nasal lavage and then it maintained stable to the 6th hour. The chemokines changes observed after SNCT did not reflected the clinical response to the SCNT. This finding could be related to an early sampling before dynamic inflammatory changes occurred.

Key-words: specific nasal challenge test, chemokines, eotaxin, RANTES

INTRODUÇÃO

A prova de provocação nasal específica¹⁻³ constitui o método de eleição para a reprodutibilidade da reacção alérgica, possibilitando tanto a implementação de metodologias para o diagnóstico do doente alérgico como de metodologias para a investigação da fisiopatologia da doença alérgica. A monitorização da reacção alérgica subsequente² é clinicamente avaliável, quer através da utilização de *scores* de sintomas, quer através da avaliação funcional da obstrução nasal, por rinomanometria e/ou *peak flow* nasal. No entanto, devido à grande diversidade inter e intra-individual, o *score* de sintomas é um método de avaliação de resposta à prova de provocação nasal insatisfatório, pois não está definida a sua reprodutibilidade, nem as eventuais correlações entre as alterações imunológicas e a sintomatologia. Também, quanto à avaliação funcional da obstrução nasal, esta metodologia traduz apenas a quantificação da resposta tardia⁴.

Assim, a análise dos parâmetros imunológicos¹⁻³ constitui a abordagem mais adequada para monitorizar a resposta à prova de provocação específica, com a avaliação quantitativa de mediadores e células inflamatórias.

A reacção alérgica⁵ engloba uma fase imediata e uma fase tardia, caracterizadas por eventos imunopatológicos bem definidos, compreendendo um complexo intercâmbio entre células e mediadores inflamatórios. Várias citocinas multifuncionais regulam a duração e a intensidade da resposta imune, destacando-se as quimiocinas que são responsáveis pela quimiotaxia de células que vão constituir o infiltrado inflamatório alérgico.

As quimiocinas⁶⁻⁸ constituem uma superfamília de peptídeos com 8-14 KDa e são classificadas em 4 famílias (I) de acordo com a sequência aminoacídica em torno das cisteínas da região amino-terminal, nomeadamente família C-X-C (também designada α), família C-C (ou β), família C (ou γ) e família C-X₃-C. São produzidas por várias células (mastócitos, basófilos, linfócitos T e B, células epiteliais, células endoteliais) e exercem funções na regulação da motilidade dos leucócitos, designadamente quimiotaxia de células circulantes, desempenhando deste modo um papel fundamental no infiltrado eosinofílico que caracteriza a inflamação alérgica. As quimiocinas distinguem-se dos clássicos agentes de quimiotaxia porque têm especificidade para células. As quimiocinas da família C-C⁷⁻¹⁰ têm sido implicadas na reacção alérgica, mas não está totalmente esclarecida a dimensão da sua influência

nos eventos imunopatológicos da inflamação alérgica, pois a sua função biológica está incompletamente caracterizada. Tem sido demonstrado que a eotaxina exerce uma potente e selectiva acção de quimiotaxia sobre os eosinófilos, nomeadamente durante a inflamação alérgica¹¹. A quimiocina denominada RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and presumably Secreted) também é reconhecida pela sua acção de quimiotaxia dos monócitos, células T e eosinófilos^{10,12-15}.

Ambos, eotaxina e RANTES, têm actividade quimiotática para eosinófilos. Actuam através do receptor CCR-3, mas a 1ª tem maior afinidade pelo que será mediador da inflamação eosinofílica mais específico^{9,16}. À medida que se vai esclarecendo o envolvimento das citocinas na reacção alérgica, admite-se a importância das quimiocinas como mediador final da cascata inflamatória, com particular interesse na caracterização da resposta imediata e tardia da reacção alérgica, bem como na avaliação da resposta ao tratamento específico da doença alérgica.

Neste estudo pretendeu-se avaliar as concentrações de quimiocinas específicas de eosinófilos - Eotaxina e RANTES - em lavados nasais e analisar a aplicabilidade do doseamento das quimiocinas em secreções nasais como parâmetro de resposta imunológica à prova de provocação nasal específica.

METODOLOGIA

1. Doentes

Após consentimento informado, foram englobados 17 doentes com o diagnóstico de Rinite alérgica a parietaria, documentado por teste cutâneo por método de picada (considerado positivo para pápula ≥ 3 mm) e IgE específica (classe ≥ 2), de ambos os sexos, com idade compreendida entre os 15 e os 52 anos.

Foram factores de não inclusão neste estudo a existência de agudização de rinite alérgica e/ou asma brônquica, outra patologia nasal, nomeadamente infecciosa, gravidez, ou terapêutica com anti-histamínicos/corticóides, tópicos ou sistémicos ou bloqueadores β , nas 3 semanas prévias ao estudo.

2. Métodos

O estudo foi realizado fora do período polínico. Todos os doentes foram submetidos a prova de provocação nasal específica (PPNE). Antes, 30 minutos e 6 horas após a PPNE foram efectuados lavados nasais. A resposta à PPNE foi monitorizada através de *score* de sintomas nasais (prurido nasal, esternutos, rinorreia aquosa, obstrução nasal) e extranasais (prurido ocular, lacrimejo, prurido orofaríngeo, dispneia, sibilância, outros). O *score* de sintomas foi obtido por auto-registo de acordo com a sua gravidade (0 – nenhum; 1 – ligeiro; 2 – moderado; 3 – grave), antes e nos 1º, 5º, 10º, 15º, 30º, 45º e 60º minutos e depois a cada hora até às 6 horas após a PPNE. A figura 1 esquematiza a abordagem utilizada.

2.1 Prova de provocação nasal específica

A PPNE com extractos comerciais de parietaria para prova de provocação nasal (Leti), realizou-se de acordo com os consensos da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica¹.

2.2 Técnica dos lavados nasais

Antes, 30 minutos e 6 horas após a PPNE foram efectuados lavados nasais. Foi utilizada uma modificação do método desenvolvido por Naclerio¹⁷. Com o doente sentado e flexão do pescoço a 60º¹⁸, foram introduzidos 10 ml de solução salina

Valores basais			LN	PD	Valores controlo			PA	Valores de resposta					LN	Valores de resposta					
0'	5'	10'			0'	5'	10'		1'	5'	10'	20'	30'		45'	60'	2h	3h	4h	5h

Legenda: LN = Lavado nasal; PD = Provocação com diluente; PA = Provocação com alérgénio

(NaCl a 0,9%) pré aquecida a 30° C. Recolheu-se o líquido de lavado nasal em recipiente de plástico. De seguida, esta amostra foi centrifugada a 400g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante obtido armazenado a -80° C, para posterior doseamento de mediadores inflamatórios.

2.3 Doseamento de quimiocinas

No sobrenadante do lavado nasal foram quantificadas as quimiocinas eotaxina e RANTES, determinadas por ELISA segundo os procedimentos dos Kits Quantikine®, human Eotaxin Immunoassay e human RANTES Immunoassay, respectivamente (R&D Systems, USA).

RESULTADOS

Dados demográficos

Os dados demográficos e respeitantes às características da doença são apresentados no Quadro I.

Score de sintomas

A PPNE com parietaria foi positiva em todos os doentes, como documentado pelo *score* de

Quadro I – Dados demográficos e características da doença

M:F		11:6
Idade	(média ± ds)	36.3 ± 11.2 anos
Tempo de evolução da doença	(média ± ds)	8.5 ± 4.1 anos
IgE total	(média ± ds)	241.3 ± 154.4 UI/L
IgE específica a parietaria	(média ± ds)	52 ± 31.8 KU/L
TC - Ø pápula	(média ± ds)	7,8 ± 1,9 mm

sintomas. No gráfico 1 apresentam-se o *score* de sintomas total, nasal e extranasal, verificando-se uma resposta imediata, com um elevado *score* total de sintomas no 1º minuto e decréscimo da sintomatologia aos 30 minutos progressivamente até às 6 horas. A sintomatologia nasal acompanhou este padrão, enquanto que a sintomatologia extranasal evidenciou um padrão diferente, com um *score* mais baixo, semelhante nos 1º e 30º minutos com declínio posterior até às 6 horas. Analisando o *score* de cada sintoma nasal (gráfico 2), à excepção da obstrução nasal, todos acompanharam o padrão de resposta da sintomatologia total, com o pico da sintomatologia ao 1º minuto.

Os esternutos foram o sintoma predominante no 1º minuto, enquanto que a obstrução nasal foi o sintoma predominante no 30º minuto e à 6ª hora.

Gráfico 1 – Score de sintomas

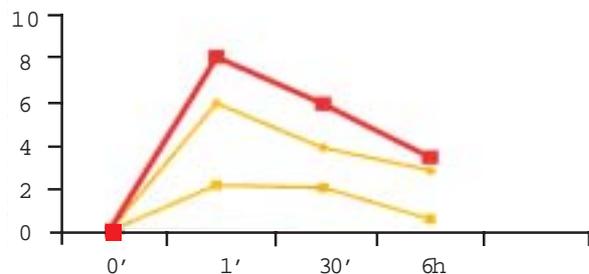


Gráfico 1: Score de sintomas total, nasal e extra-nasal. (■ score de sintomas total; ● score de sintomas nasal; ■ score de sintomas extra-nasal).

Gráfico 2 – Sintomatologia nasal

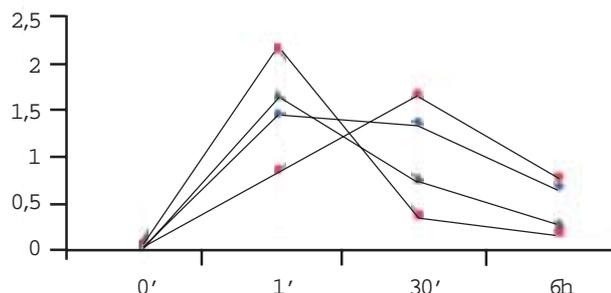


Gráfico 2: Score da sintomatologia nasal (● obstrução nasal; ■ esternutos; ▲ prurido nasal; ◆ rinorreia).

Doseamento de quimiocinas

Os resultados do doseamento da quimiocina RANTES são apresentados no gráfico 3. Em nenhum dos lavados nasais foram encontrados níveis mensuráveis de eotaxina.

DISCUSSÃO

Ainda que a PPNE tenha sido descrita como o método ideal para reprodutibilidade da reacção alérgica, tanto clínica como investigacional¹⁻³, os parâmetros de monitorização da resposta à PPNE não estão padronizados. A avaliação clínica com a utilização de *score* de sintomas, devido à grande diversidade inter e intra-individual, é uma metodologia insatisfatória, pois não está definida a sua reprodutibilidade, nem as eventuais correlações entre as alterações imunológicas e a sintomatologia. Apesar destas limitações, o *score* de sintomas constitui o parâmetro de avaliação de resposta à PPNE mais utilizado.

No presente estudo, a PPNE reproduziu a reacção alérgica, tendo sido documentado pelo *score* de sintomas, quer analisando o *score* de sintomas totais, quer avaliando separadamente o *score* de sintomas nasais e extra-nasais (gráfico 1).

A sintomatologia nasal acompanhou este padrão do *score* total de sintomas, enquanto que o *score* de sintomas extra-nasais manteve-se constante no 1º e 30º minutos e à 6ª hora. A sintomatologia nasal predominante no 1º e 30º minutos traduzem a fase imediata da reacção alérgica, clinicamente reconhecida.

No âmbito da prática clínica, a monitorização da resposta imediata à PPNE é bem fundamentada no *score* de sintomas, como documentado neste grupo de doentes. A monitorização da fase tardia é mais difícil de caracterizar e menos prática, pois não está esclarecida a correlação da magnitude do infiltrado eosinofílico com a resposta clínica, quer sintomatológica quer funcional. A análise do *score* de sintomas revelou neste estudo, o predomínio da obstrução nasal, como esperado, no entanto baseia-se numa avaliação exclusivamente subjectiva. A objectivação deste parâmetro através da avaliação funcional respiratória nasal é dificultada pela ausência de padronização dos valores de resposta.

Assim, a análise dos parâmetros imunológicos¹⁻³ constituirá a abordagem mais objectiva para monitorizar a resposta à prova de provocação específica, com a avaliação quantitativa de mediadores e células inflamatórias, implicadas na cascata imunopatológica da reacção alérgica. No entanto, diversos factores dificultam a sua implementação

na prática clínica. O tempo de avaliação (6, 12 ou 24 horas) não está definido, tal como não está esclarecido se as sucessivas colheitas de amostras, independentemente da metodologia utilizada (lavado, escovado ou biópsia) condicionam uma descamação excessiva com conseqüente não correlação dos achados com a magnitude dos eventos imunopatológicos subjacentes.

As quimiocinas da família C-C⁷⁻¹⁰ têm sido implicadas na reacção alérgica. Sim *et al*¹⁹ demonstraram pela 1ª vez a recolha de várias citocinas proinflamatórias nas secreções nasais. Desde então, o doseamento destes mediadores inflamatórios tem sido alvo de interesse investigacional, no intuito de se esclarecer o envolvimento de cada um na globalidade dos eventos imunopatológicos da reacção alérgica. Realmente, o doseamento destas quimiocinas na fase imediata envolvidas no recrutamento eosinofílico mais característico da fase tardia, seria de importância crucial no esclarecimento de eventual correlação entre esses dois parâmetros. Desta forma, seriam ultrapassadas dificuldades relacionadas com a determinação do período de monitorização e valorização da eventual lesão excessiva da mucosa nasal, evitando a necessidade de doseamentos seriados no tempo.

A **Eotaxina** é uma quimiocina da família CC, com 8,3KDa, produzida por vários tipos celulares, designadamente células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células epiteliais brônquicas, células do músculo liso e eosinófilos. Tem sido demonstrado a sua potente e selectiva acção de quimiotaxia sobre os eosinófilos, nomeadamente durante a inflamação alérgica^{8,16,19,20}. No presente estudo, não foram detectados níveis mensuráveis de eotaxina, em nenhuma das amostras nasais obtidas.

Terada *et al*²⁰ demonstraram que o doseamento de Eotaxina em lavados nasais após PPNE apresenta uma resposta bifásica, com um pico na 1ª hora (23±5 pg/ml) e níveis crescentes após a 6ª hora (11±1 pg/ml) até a 10ª hora (17±2 pg/ml) de monitorização

do estudo. Os níveis de eotaxina correlacionaram-se com a contagem de eosinófilos e EPX (correlação estatística). Hanazawa *et al*¹⁶ demonstraram um aumento, estatisticamente significativo, de eosinófilos e do *score* de sintomas às 8h após provocação nasal com eotaxina, retornando aos valores basais às 24 horas. Também Górski¹⁹ demonstrou que a provocação nasal com eotaxina provocou um aumento de eosinófilos, no entanto já observada às 4 horas e mantendo-se às 24 horas, correlacionado com o *score* de sintomas. Em ambos os estudos, a provocação com eotaxina não condicionou aumento dos níveis de ECP.

A quimiocina denominada **RANTES** também pertence à família CC. É produzida pelas células T, células epiteliais da vias aéreas, fibroblastos, células endoteliais e eosinófilos, sendo reconhecida pela sua acção de quimiotaxia dos monócitos, células T e eosinófilos^{10,12-15}.

O doseamento de RANTES nos lavados nasais (gráfico 3) revelou valores basais de 4,2±2,1 pg/ml, 3,96±0,98 pg/ml e 3,90±0,99 pg/ml nas colheitas obtidas 30 minutos e 6 horas, respectivamente, após a PPNE. Outros autores descrevem a cinética do RANTES após PPNE, ainda que com resultados discordantes. Sim *et al*¹³ descreveram a cinética do RANTES, que apresenta um pico 3h

Gráfico 3 – RANTES no lavado

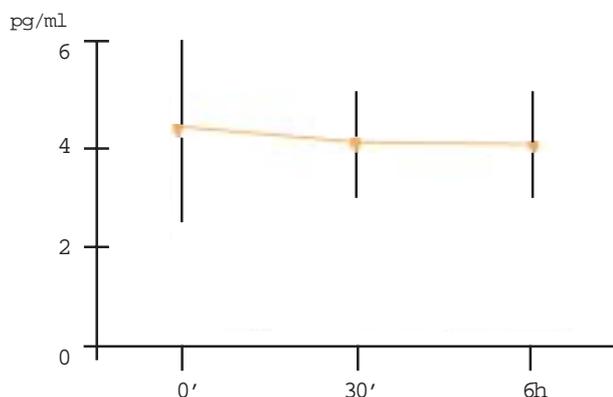


Gráfico 3: Doseamento de RANTES nos lavados nasais

após PPNE. Os níveis ($50,6 \pm 18,8$ pg/ml) correlacionaram-se com o *score* da fase tardia. Outros autores²¹ descrevem que o pico de RANTES varia entre as 1 e 5 h após PPNE. O estudo de KleinJan¹⁵ demonstrou que a pesquisa de RANTES em biópsia nasais 1 hora, 24 horas e 1 semana após PPNE se correlacionou com o *score* de sintomas. Kuna *et al*¹² demonstraram um aumento, estatisticamente significativo, de eosinófilos em lavados nasais, com um pico às 2-4h após provocação nasal com RANTES. Tal como no presente estudo, também outros autores^{7,20}, encontraram baixos níveis de RANTES. Terada *et al*²⁰ demonstraram que o doseamento de RANTES e eosinófilos não se correlacionavam. O papel relativo do RANTES permanece por esclarecer, ainda que alguns estudos referidos^{13,21}, indiquem que o pico precoce de RANTES, precedendo a fase tardia, poderá implicar um efeito causal.

No presente estudo, os níveis de quimiocinas encontrados não reflectiram a reacção alérgica documentada clinicamente, admitindo-se que a técnica de colheita não tenha sido a mais adequada. Os resultados discordantes dos diversos estudos quanto aos níveis de resposta de RANTES à PPNE, bem como os níveis de eotaxina, poderão ser justificados por diferentes técnicas de colheita. Alam²² descreve um método específico para a colheita de citocinas, utilizado no estudo de Sim *et al*¹³. No entanto esta técnica é exclusiva para o doseamento de citocinas, não permitindo a obtenção de amostras para contagem celular. Neste estudo pretendeu-se a avaliação de quimiocinas, outros mediadores inflamatórios e a dinâmica celular após a PPNE (dados não publicados). Assim, a metodologia utilizada para a obtenção de mediadores inflamatórios e células, poderá implicar excessivas diluições, esclarecendo os baixos níveis de quimiocinas encontrados neste estudo. Realmente, de entre os estudos em que foram utilizados lavados nasais como método para obter amostras nasais, apenas Terada *et al*²⁰ encontraram níveis mensu-

ráveis de quimiocinas ainda que mais baixos, comparativamente ao método descrito por Alam.

Mais estudos são necessários para definir o exacto envolvimento das quimiocinas no infiltrado celular, bem como os tempos de dinâmica. A análise comparativa de quimiocinas obtidas por colheita de rinorreia e por lavado nasal após prova de provocação nasal poderá esclarecer não só o envolvimento das quimiocinas na reacção alérgica, mas contribuir também para a padronização de métodos de obtenção de amostras nasais para estudo de mediadores inflamatórios da reacção alérgica.

Esclarecida a eventual correlação entre as quimiocinas e o infiltrado eosinofílico, bem como a correlação destes parâmetros imunológicos com os parâmetros clínicos (*score* de sintomas), parece promissor, a aplicabilidade do doseamento de quimiocinas no diagnóstico da doença alérgica e na monitorização de tratamentos, no âmbito da prática clínica.

BIBLIOGRAFIA

1. Mellilo G. *Provocation tests with allergens*. Allergy, 1997; 52 (Suppl 35): 5-35
2. Naclerio RM, Norman PS. *In vivo methods for the study of allergic rhinitis*. In: Allergy Principles & Practice, Middleton E, Reed C *et al*. Eds. St Louis, CV Mosby, 5th edition, 1998: 440-453
3. Litvyakova LI. *Nasal provocation testing: a review*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2001; 86(4): 355-365
4. Pirilä T and Nuutinen J. *Acoustic rhinometry, rhinomanometry and the amount of nasal secretion in the clinical monitoring of the nasal provocation test*. Clinical and Experimental Allergy, 1998; 28: 468-477
5. Barnes P. *Pathophysiology of Allergic Inflammation*. In: Allergy Principles & Practice, Middleton E, Reed C *et al*. Eds. St Louis, CV Mosby, 5th edition, 1998: 356-365
6. Alam R. *Chemokines in the biology of cell movement and inflammation*. In: Allergy Principles & Practice, Middleton E, Reed C *et al*. Eds. St Louis, CV Mosby, 5th edition, 1998: 124-136
7. Kuna P, Lazarovich M, Kaplan AP. *Chemokines in seasonal allergic rhinitis*. J Allergy Clin Immunol, 1996; 97: 104-112
8. Alam R. *Chemokines in allergic inflammation*. J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 273-277
9. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. *Chemokines and allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 723-742
10. Lukacs NM. *Migration of helper T-lymphocyte subsets into inflamed tissues*. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: S264-269

11. Gleich GJ. *Mechanisms of eosinophil-associated inflammation*. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 651-663
13. Kuna P, Alam R, Ruta U, Gorski P. *RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils and lymphocytes in vivo*. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 873-879
14. Sim TC, Reece LM, Hilsmeier KA, Grant A, Alam R. *Secretion of chemokines and others cytokines in allergen-induced nasal responses: inhibition by topical steroid treatment*. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 927-933
15. Lee CH *et al*. *Distribution of RANTES and IL-5 in allergic nasal mucosa and nasal polyps*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1999; 108 (6): 594-598
16. KleinJan A, Dijkstra MD, Boks S, Severijnen LWFM, Mulder PGH, Fokkens WJ. *Increase in IL-8, IL-10, IL-13 and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation*. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 441-450
17. Hanazawa T, Antuni JD, Kraritonov SA, Barnes PJ. *Intranasal administration of eotaxin increases nasal eosinophils and nitric oxide in patients with allergic rhinitis*. J Allergy Clin Immunol 2000; 105 (1 Pt 1): 58-64
18. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A *et al*. *Mediator release after nasal airway challenge with allergen*. Am Rev Respir Dis 1983; 128: 597-602
19. Nikasinovic-Fournier L, Just J, Seta N, Callais F, Sahraoui F, Grimfeld A, Momas I. *Nasal lavage as a tool for the assessment of upper airway inflammation in adults and children*. J lab Clin Med 2002; 139: 173-180
20. Sim TC, Grant JA, Hilsmeier KA, Alam R. *Detection of proinflammatory cytokines in the nasal secretions of allergic subjects following allergen challenge*. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149: 339-344
21. Gorski P, Wittczak T, Walusiak J *et al*. *Eotaxin but not MCP-3 induces eosinophil influx into nasal fluid in allergic patients*. Allergy 2002; 57 (6): 519-528
22. Terada N, Hamano N, Kim WJ *et al*. *The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid. Its key role in eosinophil recruitment in nasal mucosa*. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(4): 575-579
23. RajaKulasingam K, Hamid Q, O'Brien F *et al*. *RANTES in human allergen-induced rhinitis. Cellular source and relation to tissue eosinophilia*. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 696-703
24. Alam R, Sim TC, Hilsmeier K, Grant AJ. *Development of a new technique for recovery of cytokines from inflammatory sites in situ*. J Immunol Methods 1992; 155: 25-29.