

Imunoterapia específica pré-estacional de curta duração na rinoconjuntivite polínica *versus* placebo

Pre-seasonal specific short-term immunotherapy versus placebo in seasonal rhino-conjunctivitis

Data de recepção / Received in: 30/06/2009

Data de aceitação / Accepted for publication in: 30/11/2009

Rev Port Imunoalergologia 2010; 18 (1): 39-56

Carlos Nunes, Susel Ladeira

Centro de Imunoalergologia do Algarve / Algarve Centre for Allergology and Clinical Immunology

Nota: 1.º prémio SPAIC-ALK-Abelló 2009

RESUMO

Objectivo: Avaliar a eficácia e segurança na administração de imunoterapia específica (IT) com gramíneas *versus* placebo, em tratamento pré-estacional, durante o período de 5 anos em doentes portadores de rinoconjuntivite sazonal.

Metodologia: O trabalho decorreu em três fases. Uma fase de pré-estudo, seguida de uma segunda fase de IT durante 2 anos, e uma terceira fase de IT durante mais 3 anos. De 60 doentes portadores de rinoconjuntivite persistente de grau moderado, segundo classificação do ARIA, e com hipersensibilidade a pólenes de gramíneas, foram seleccionados 36 doentes (média 26,1 anos), 18 do sexo masculino (50%) e 18 sexo feminino (50%). A imunoterapia foi administrada em 7 injeções com gramíneas (ALK-Abelló, Espanha), cujo somatório da dose anual foi de 225 I SE (*standardized extract*). Como placebo foi administrado soro fisiológico via sublingual durante 7 semanas. Foram divulgadas aos doentes, via correio electrónico ou por SMS, informações sobre contagens de pólenes e condições climáticas. Foi utilizada o *software* SPSS versão 12 para a análise estatística. ANOVA e o test t foram usados nas comparações entre os dois grupos, nos sintomas e no uso de medicação. Para correlações foi usado o método de Spearman. **Resultados:** Observou-se uma melhoria significativa na sintomatologia e no uso da medicação, ao longo do período de tratamento ($p < 0,01$), no grupo de imunoterapia (média de 23,5 dias) quando comparada com o grupo que fez placebo (média de 61,9 dias). A tolerância e segurança da imunoterapia foram excelentes. Apenas em 0,8% das 252 injeções houve reacção local. **Conclusão:**

A IT via subcutânea, para pólenes de gramíneas, é eficaz e segura, reduzindo os sintomas e o uso de medicação. Também o fornecimento de informações para autocontrolo proporcionou uma melhor qualidade de vida aos doentes com polinose nasal.

Palavras-chave: Pólenes, meteorologia, polinose, imunoterapia específica.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the efficacy and safety of five years' pre-seasonal specific immunotherapy (SIT) with grass pollens versus placebo in a blind controlled study in patients with seasonal rhino-conjunctivitis. **Method:** The study had three stages: the pre-treatment period, SIT for two years and SIT for a further three years. Thirty-six patients were selected from a group of 60 with persistent moderate rhino-conjunctivitis (ARIA definition) sensitised to grass pollens. Eighteen patients were male (50.0%) and 18 were female (50.0%) and their mean age was 26.1 years. For five years, the patients received pre-seasonal SIT with extracts of seven grass pollens (ALK-Abello, Spain) administered in seven subcutaneous injections, with a total annual dose of 225 I SE (standardised extract). The placebo group received saline solution daily in sublingual drops for seven weeks pre-Spring. All patients received information on weather forecasts and total pollens count in their residential area via e-mail or SMS. We used the SPSS version 12 statistical software program. The ANOVA test and student's t test were used to analyse differences in symptoms and medication use between groups and the Spearman method was used to analyse correlations. **Results:** A significant improvement ($p < 0.01$) was observed in symptoms and use of medication in the SIT group (mean 23.5 days), compared with the placebo group (mean 61.9 days). The tolerance and safety of SIT were excellent. Only 0.8% of the 252 SIT injections caused local reactions. **Conclusion:** Subcutaneous SIT for patients sensitised to grass pollens is effective and safe. A considerable reduction in symptoms and in medication was found. Information on weather conditions and pollen count was also useful in providing nasal pollinosis patients with a better quality of life.

Key-words: Pollens, meteorology, pollinosis, specific immunotherapy.

INTRODUÇÃO

Em Portugal, a prevalência de sensibilização a pólenes é um factor de significativa importância para os portadores de rinite e/ou de rinoconjuntivite. Estudos de prevalência de sensibilidade usando testes cutâneos – método da picada –, revelaram valores que variam de 10% a 70%, dependendo do local onde foram efectuados e da população abrangida¹.

INTRODUCTION

In Portugal sensitisation to pollens is an important factor for patients with rhinitis and/or rhino-conjunctivitis. Studies on the prevalence of sensitisation using skin prick tests show rates ranging from 10% to 70%, depending on where the tests are performed and the target population¹.

A maioria dos doentes com hipersensibilidade a pólenes sofre de rinite associada, ou não, a conjuntivite. Em Portugal, as queixas de rinoconjuntivite são mais prevalentes na Primavera, porque é uma patologia associada a esta estação do ano; isto deve-se ao facto da maioria dos doentes com rinoconjuntivite sazonal serem sensíveis a pólenes, cuja concentração aumenta durante a Primavera.

Em Portugal, de entre os principais tipos de pólenes com poder alergizante, verifica-se maior sensibilização, por ordem decrescente, ao grupo das gramíneas, das oleáceas, das urticáceas e, em menor grau, ao das betuláceas.

Atendendo a que neste tipo de patologias a predisposição genética, por ora, não pode ser alterada, corrigida ou eliminada, a nossa actuação será ao nível da prevenção primária e da secundária.

Considerando que na prevenção primária a evicção do contacto com os pólenes nem sempre pode ser efectuada ou dificilmente é conseguida, a nossa actuação incidirá principalmente ao nível da prevenção secundária da doença.

Para controlo dos sintomas na rinoconjuntivite, os doentes utilizam mais do que um tipo de medicamentos. Habitualmente são usados anti-histamínicos na forma tópica ou oral, sendo esta a forma mais utilizada. Estes medicamentos, que melhoram a sintomatologia ocular e nasal, actuam na redução da libertação de histamina dos mastócitos. Contudo, após os primeiros sintomas, que habitualmente são o prurido nasal e/ou ocular, a rinorreia serosa e esternutos, segue-se a fase de obstrução nasal, que traduz a activação de células inflamatórias e libertação de seus mediadores; para controlo dos sintomas nesta fase é utilizada medicação anti-inflamatória, habitualmente os corticosteróides, que podem ser usados como tópicos para aplicação nasal ou por via oral, sendo preferencialmente e de maior eficácia a aplicação tópica. Também nalguns casos é adicionada medicação adrenérgica, como a pseudoefedrina via oral, ou adrenérgicos em aplicação tópica. Estes deverão estar reservados ao alívio de sintomas, nomeadamente da obstrução nasal na fase crónica, em curtos espaços de tempo (3 a 5 dias), devido à sua elevada taquifilaxia.

The majority of patients sensitised to pollens suffer from rhinitis, associated or not to conjunctivitis. In Portugal rhino-conjunctivitis is more prevalent in the Spring, and is a condition associated with this season. The majority of patients with seasonal rhino-conjunctivitis are pollen-sensitive and there is a higher pollen count in the Spring.

Among the main types of allergenic pollens in Portugal, sensitivity is seen (in decreasing order) to *gramineae*, *oleaceae*, *urticaceae* and, then, *betulaceae*. As genetic predisposition to this type of diseases cannot as yet be changed, corrected or eliminated, intervention is made at the level of primary and secondary prevention.

Considering that primary prevention consists of avoiding contact with pollens, something that may not always be possible or easy to achieve, our intervention is mainly in secondary prevention of the disease.

Patients use more than one type of medication to manage rhino-conjunctivitis symptoms. Topical or oral anti-histamines are routinely prescribed. This medication, which improves ocular and nasal symptoms, acts by reducing release of histamine from mast cells. The first symptoms are normally nasal and/or ocular pruritus, serous rhinorrhoea and sneezing, followed by the nasal obstruction stage, a result of the activation of inflammatory cells and release of these cells' mediators. Anti-inflammatory medication, usually corticosteroids, is used to control symptoms at this stage. Topical application is preferential and more efficacious. Adrenergic medication, such as oral pseudoephedrine or topical adrenergics, is associated in some cases. These should be restricted to relief of symptoms, namely chronic nasal obstruction, for a short-term period (3 – 5 days), since they have a high degree of tachyphylaxis.

Pollinosis patients are usually prescribed topical anti-inflammatory medication in association with oral anti-histamines for management of symptoms. This as-

Nos portadores de polinose o tratamento farmacológico para o controlo dos sintomas é frequentemente o de associar anti-inflamatórios tópicos a anti-histamínicos orais. Esta associação tem-se revelado eficaz no controlo da inflamação nasal, não só na melhoria da sintomatologia, mas também através de estudo de biomarcadores na mucosa nasal, quer por lavagens quer por biopsia^{2,3}.

Uma outra abordagem terapêutica, que de alguma forma pode influenciar a evolução da doença alérgica, é proporcionada pela IT específica para os alérgenos causadores da doença alérgica.

A IT está muito bem documentada em centenas de trabalhos científicos em todo o mundo, incluindo meta-análises, havendo provas concretas da sua eficácia quando comparada com placebo, em ensaios duplamente cegos, quer na rinite e na rinoconjuntivite quer na asma.^{4,5,6,7,8,9,10,11}

A IT para ácaros domésticos ou para pólenes tem-se revelado eficaz. Os métodos de avaliação da sua eficácia têm sido vários, desde a avaliação da sintomatologia clínica, quantificação de nível de IgE total, incluindo, tal como em estudos efectuados com anti-inflamatórios tópicos, o uso de lavagens nasais para estudo de mediadores da inflamação e biopsias da mucosa nasal. Tem sido evidenciada uma menor inflamação local por redução das células inflamatórias, concentração de mediadores e, em particular, de citocinas, etc.¹²

Propusemo-nos como objectivo a avaliação da eficácia e da segurança na administração de IT com gramíneas *versus* placebo durante um período de longa duração, num grupo em doentes portadores de rinoconjuntivite sazonal de grau persistente moderado, segundo a classificação do ARIA¹³.

METODOLOGIA

A captação de pólenes foi efectuada por captador volumétrico tipo Hirst (Burkard Inc UK) com capacidade para colheita de pólenes por um período de 7 dias, e ligado à rede portuguesa de aerobiologia¹⁴.

sociation has had good results in the management of nasal inflammation in terms of improved symptoms and in the study of nasal mucosa bio-markers, shown in lavage and biopsy^{2,3}.

A further treatment approach that could influence the outcome of allergic disease is specific immunotherapy (SIT) to the allergens causing the allergic disease. Hundreds of scientific studies worldwide, including meta-analyses, have documented SIT and there is concrete proof of its efficacy, comparing with placebo, in double-blind trials for rhinitis, rhino-conjunctivitis and asthma⁴⁻¹¹.

Specific immunotherapy to house-dust-mites and pollens has been efficacious. Methods of assessing its success have ranged from evaluation of clinical symptoms to measurement of total IgE levels including, as in studies of topical anti-inflammatory drugs, the use of nasal lavage to study inflammation markers and biopsies of the nasal mucosa. Less local inflammation has been observed due to decreased inflammatory cells, concentration of mediators and cytokines, in particular¹².

Our aim was to evaluate the efficacy and safety of long-term SIT to grass pollens *versus* placebo in patients with persistent moderate seasonal rhino-conjunctivitis (ARIA classification¹³).

METHODOLOGY

Pollen was captured using a seven-day Hirst (Burkard Inc UK) pollen trap connected to the Portuguese Aerobiology Network¹⁴.

We used the Weather Monitor II (Davis Instruments, USA) weather station to evaluate weather conditions. This was in daily and direct link to a computer, relating information on wind direction and speed, rainfall, outdoor and indoor temperature, outdoor and indoor humidity and atmospheric pressure throughout the

Para avaliação das condições meteorológicas utilizou-se a estação meteorológica Weather Monitor II (Davis Instruments, USA), a qual estava diária e directamente ligada informaticamente a um computador, fornecendo ao longo do período em estudo a direcção e a velocidade do vento, pluviosidade, temperatura exterior e interior, humidade de exterior e interior e ainda a pressão atmosférica. Esta estação tem a possibilidade de efectuar previsão das condições climáticas por um período de cerca de 72 horas.

Nos testes de hipersensibilidade foram utilizados misturas de extractos de alérgenos de gramíneas biologicamente padronizados (*Dactylis glomerata*, *Lolium Perenne*, *Festuca pratensis*, *Phleum pratensis* e *Poa pratensis*, na concentração de 60 µg/ml (30 HEP) do grupo 5, ALK-Abelló, Madrid, Espanha), que contém a maioria dos principais alérgenos do grupo das gramíneas. Foi considerada positividade quando se verificou uma reacção com >4 mm de diâmetro na pápula. Foi utilizada como controlo negativo uma solução glicerinada e como controlo positivo di-hidrocloridrato de histamina na concentração de 10 mg/ml.

Para avaliação dos sintomas dos doentes foi utilizada uma grelha de registo de sintomas. Esta grelha de sintomas, preenchida diariamente por cada um dos doentes, foi utilizada para caracterização da gravidade de sintomas, com quatro possibilidades de resposta. Zero para ausência de sintomas, 1 para sintomas ligeiros, 2 para sintomas de média gravidade e 3 para sintomas mais graves que influenciassem a vida normal do indivíduo, com impedimento de deslocar-se ao exterior da sua habitação. Os parâmetros avaliados foram os esternutos, a rinorreia, o prurido nasal, o prurido ocular, o lacrimejo e a obstrução nasal. O total semanal de sintomas avaliados pela grelha poderia atingir a soma de 126 pontos por doente (6 parâmetros x grau 3 x 7 dias). No ano de 2003 foi efectuado um pré-estudo, através da distribuição da grelha de avaliação a um grupo de 60 doentes para preenchimento durante o período de 1 de Março a 31 de Julho.

A inclusão dos doentes para o estudo foi efectuada segundo os seguintes critérios:

1. Diagnóstico clínico de rinoconjuntivite;
2. História clínica de rinoconjuntivite sazonal ≥ 3 anos;

entire study period. The weather station is able to predict weather conditions for an approximate 72-hour period.

In the skin prick tests we used biologically standardised extracts of grass pollen mix allergens (*Dactylis glomerata*, *Lolium Perenne*, *Festuca pratensis*, *Phleum pratensis* and *Poa pratensis*, at 60 µg/ml concentration (30 HEP) of group 5 allergens, ALK-Abelló, Madrid, Spain), which contains the majority of the main allergens of the gramineae group. A test was considered positive when there was a reaction with a wheal > 4 mm in diameter. A glycerol solution was used as a negative control and histamine dihydrochloride 10 mg/ml as a positive control.

We used a chart to record patients' symptoms, filled in daily by each patient, to classify severity of symptoms on a scale with four possible answers. Zero meant no symptoms, 1 mild symptoms, 2 moderate symptoms and 3 more severe symptoms which impacted on a patient's everyday routine, preventing him/her from leaving the house. Parameters evaluated were sneezing, runny nose, itchy nose, itchy eyes, tearing and blocked nose. The weekly total of symptoms charted had a maximum score of 126 points per patient (6 parameters x 3 degrees x 7 days). A pre-study was carried out in 2003 with 60 patients filling in an evaluation chart from March 1 to July 31.

Patients included in the study had to meet the following criteria:

1. Clinical diagnosis of rhino-conjunctivitis;
2. Clinical history of seasonal rhino-conjunctivitis ≥ 3 years;
3. Total serum IgE > 200 IU/L;
4. Total weekly nasal and/or ocular symptoms during the pre-study stage, in the Spring of 2003, with a total of symptoms > 60 points, scale = 0-126 points;
5. Monosensitised to grass pollen allergens shown by skin prick tests;

3. IgE sérica total > 200 UI/L;
4. Somatório de sintomas nasais e/ou oculares semanais na fase de pré-estudo, na Primavera de 2003 com um total de sintomas > 60 pontos, numa escala de 0 a 126 pontos;
5. Monossensibilizados aos alérgenos de pólenes de gramíneas por teste de hipersensibilidade por método da picada;
6. Terem disponibilidade para participar no estudo durante 5 anos no período de maior concentração de pólenes, ou seja, de 1 de Março a 31 de Julho;
7. Não terem efectuado IT para pólenes de gramíneas nos últimos 5 anos.

Não foram incluídos doentes que tivessem:

1. Rinite perianual;
2. Outro tipo de sensibilizações, como p.ex., hipersensibilidade a ácaros domésticos, pêlos de animais etc.;
3. Asma;
4. Episódios anteriores de pieira na Primavera;
5. Infecções presentes nas vias respiratórias superiores ou inferiores;
6. Outras infecções intercorrentes.

Foram seleccionados 36 doentes portadores de rinoconjuntivite, cuja média semanal de sintomas fosse ≥ 60 pontos; eram, portanto, doentes com rinite de grau moderado ou severo, de acordo com a classificação do ARIA.

Também foi avaliado o uso diário de medicação anti-alérgica (anti-histamínicos e/ou corticosteróides tópicos) e o número e tipo de contactos com o médico por queixas clínicas devido à sua patologia alérgica.

Como foi referido, todos os doentes seleccionados eram portadores de hipersensibilidade a pólenes de gramíneas, possuíam valores de IgE sérica total > 200 UI e não estavam a efectuar qualquer tipo de imunoterapia.

Os doentes seleccionados foram sensibilizados a participar num estudo para avaliação da sintomatologia durante várias épocas polínicas, a iniciar na Primavera de 2004.

6. Able to take part in the study over a five year period during the high pollen season (March 1 to July 31);
7. Not having undergone SIT to grass pollens during the last five years.

We ruled out patients with:

1. Year round rinitis;
2. Other types of sensitisations, e.g. to house-dust-mites, animal dander, etc.;
3. Asthma;
4. Earlier episodes of wheeze during Spring;
5. Infection of the upper or lower airways;
6. Other intercurrent infections.

We selected 36 rhino-conjunctivitis patients with mean weekly symptom load ≥ 60 points, that is, patients with moderate or severe rhinitis (ARIA classification).

We also evaluated daily recourse to anti-allergic medication (anti-histamines and/or topical corticosteroids) and the number and type of contacts with a physician due to clinical complaints of an allergic nature..

As stated, all patients selected were sensitised to grass pollens, with total serum IgE levels > 200 IU, and not undergoing any type of immunotherapy.

The patients selected agreed to take part in a study evaluating symptoms over the course of several pollen seasons, beginning in the Spring of 2004.

At this time, the 36 patients (mean age 26.1 years), 18 male (50.0%) and 18 female (50.0%), rhino-conjunctivitis sufferers, were randomly split into two groups of 18 patients. One group with mean age of 27.8 years old ($SD \pm 10.5$ years) underwent SIT with extract of grass pollens and the other group, mean age of 24.6 years ($SD \pm 11.8$ years) underwent sublingual placebo. The first patient group received subcutaneous pre-seasonal SIT for five years (2004-2008) with extracts of seven grass pollens (ALK-7). The subcutaneous injections were

Nesta data, estes 36 doentes (média de idade de 26,1 anos), 18 do sexo masculino (50,0%) e 18 sexo feminino (50,0%), portadores de rinoconjuntivite, foram divididos de forma aleatória em dois grupos de 18 doentes. Um grupo com média de idades de 27,8 anos (DP \pm 10,5 anos) fez IT com extracto de pólenes de gramíneas e um outro com média de idades de 24,6 anos (DP \pm 11,8 anos) fez placebo via sublingual. O 1.º grupo de doentes efectuou imunoterapia injectável via subcutânea com um conjunto de extractos de 7 gramíneas (ALK 7) pré-estacional, ou seja, antes da Primavera durante 5 anos, de 2004 a 2008. As administrações foram efectuadas semanalmente, via subcutânea na face posterior do braço, cerca de 10 cm abaixo do ombro, em doses progressivas. O conjunto de extracto apresenta-se em dois frascos, um com a concentração de 30 SE (*standardized extract*) e outro com a concentração de 1.000 SE. Este corresponde a concentração de 1,5 miligramas/ml de alergénios do grupo 5. A imunoterapia foi administrada em 7 injeções, cujo somatório da dose anual foi de 2251 SE. Iniciou-se com uma dose de 6 SE até uma dose de 1000 SE. O 2.º grupo de doentes utilizou em Janeiro e Fevereiro, como placebo, uma dose de 5 gotas diárias de soro fisiológico, aplicadas via sublingual, durante 7 semanas.

Durante o período de estudo, 2 doentes do grupo de imunoterapia e 5 do grupo com placebo desistiram do estudo; contudo, sob o ponto de vista estatístico, os resultados encontrados na avaliação final não sofreram influência.

Após o devido consentimento informado, todos os doentes utilizaram um suporte de informação para registo diário de sintomas, onde também era registado o tipo e a dosagem de todos os medicamentos tomados entre 1 de Março e 31 de Julho, relacionados com a patologia alérgica (Figura 1). Foi avaliada a sintomatologia, o número de embalagens de medicamentos e o tipo de medicação utilizada durante os períodos referidos nos anos do estudo; foi também analisado o número de visitas médicas e/ou contactos com os investigadores, relacionados com sintomas ou quaisquer outras patologias intercorrentes.

Para uma melhor adesão dos doentes ao estudo, foi decidido fornecer, de forma personalizada e detalhada, com

given weekly on the outer aspect of the arm approximately 10 cm below the shoulder, in progressive doses. The extracts came in two vials, one with a concentration of 30 SE (standardised extract) and the other a concentration of 1000 SE. This equalled a concentration of 1.5 milligrams/ml of group 5 allergens. Immunotherapy was given in seven injections whose total annual dose was 2251 SE, starting with a dose of 6 SE, increasing to 1000 SE. The second group took a placebo dose, in January and February, of five daily sublingual drops of saline solution over seven weeks.

During the study period, two patients from the SIT group and five from the placebo group dropped out but this did not have any impact in the statistical significance on the results.

The patients gave their informed consent to take part in the study. All patients kept a daily record of their symptoms, and this was also used to record the type and dosage of all medication related to their allergic pathology taken between March 1 and July 31 (Figure 1). We evaluated symptoms, number of packages of medication and the type of medication used over the abovementioned periods during the course of the study. We also evaluated the number of medical visits and/or contacts with the researchers related to symptoms or any other intercurrent conditions.

We decided to provide weekly, personalised detailed weather forecasts, with pollen counts, to encourage better patient compliance with the study. Our perception, following an earlier study¹⁵, was that the efficacy of this type of information would be more meaningful and useful if sent quickly and in a timely fashion. This led to our decision to send the information via e-mail or SMS. When this was not possible, the information was sent by telephone or fax. As mentioned, the patients received this information weekly, through either the Portuguese Aerobiology Network or our own information on the pollen count. The information had three levels of alert: green (no pollen or small amounts); yellow (moderate amount of

Mês / Month		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Queixas nasais / Nasal complaints	Espirros / Sneezing	0																															
		1																															
		2																															
		3																															
	Corrimento nasal / Runny nose	0																															
		1																															
		2																															
		3																															
	Comichão nas narinas / Itchy nose	0																															
		1																															
		2																															
		3																															
Narinas tapadas / Blocked nose	0																																
	1																																
	2																																
	3																																
Olhos / Eye complaints	Lacrimação / Tearing	0																															
		1																															
		2																															
		3																															
	Comichão nos olhos / Itchy eyes	0																															
		1																															
2																																	
3																																	
Actividade / Activity	Normal / Normal																																
	Limitada / Limited																																
	Em casa por doença / At home due to disease																																
Número de aplicações ou tomas / Number of applications or uses																																	
Nome medicamento / Name of medicine																																	

Figura I. Grelha de sintomas para rinoconjuntivite
 Figure I. Rhino-conjunctivitis symptoms

periodicidade semanal, a previsão das condições climatéricas e a contagem e identificação polínica. Tínhamos a percepção, após estudo anterior¹⁵, de que a eficácia deste tipo de informação seria mais significativa e útil se fosse efectuada de forma rápida e atempada, pelo que se decidiu transmitir as informações através de e-mail e/ou SMS (*short message service*). Quando tal não era possível era utilizado o contacto via telefónica ou fax. Como já foi referido, os doentes recebiam, com periodicidade semanal, quer através da Rede Portuguesa de Aerobiologia, quer por nós próprios, informação sobre o nível de pólenes. A informação tinha três níveis de alerta: verde (ausência ou pequenas quantidades de pólenes), amarelo (moderada quantidade de pólenes) e vermelho (quantidade elevada de pólenes). Os doentes foram instruídos de que seriam livres de contactar os profissionais de saúde envolvidos no estudo, sempre que fosse necessário.

Para análise estatística dos dados, utilizou-se a seguinte metodologia: para a análise da variância das variáveis (ANOVA), para a análise da sintomatologia o teste *t* de Student. Foram considerados como significativos valores com $p < 0,05$. Nas correlações entre os sintomas por grupo, usou-se o método de Spearman. Foi usado o *software* SPSS versão 12 (SPSS Inc. Illinois, USA)

RESULTADOS

Durante o quinquénio houve variações da pluviosidade, sendo 2005 o ano de menor pluviosidade. Refira-se que nos anos de 2006, 2007 e 2008 houve maior pluviosidade durante o mês de Maio do que no período homólogo dos anos anteriores.

A direcção do vento teve predominância de norte e noroeste (áreas predominantemente agrícolas). Quanto à velocidade do vento, houve oscilações ao longo dos vários meses. Foram registadas as velocidades médias e máximas do vento, porquanto, segundo vários autores, estas variações têm influência na quantidade e na dispersão de pólenes na atmosfera. Considerando que a metodologia por nós utilizada permite-

pollen); and red (high amounts of pollen). The patients were informed that they were free to contact the health care professionals involved in the study whenever they felt this was necessary.

In terms of data handling, we used analysis of variance of variables (ANOVA), and the student's *t* test to analyse symptoms. We considered $p < 0.05$ values as significant. We used the Spearman method for correlations between symptoms per group and SPSS version 12 (SPSS Inc. Illinois, USA) software.

RESULTS

There were variations in rainfall over the five-year period, with 2005 the year with least rainfall. There was heavier rainfall in May 2006, 2007 and 2008 than in the same month of previous years.

Wind direction was predominantly north and north-west (predominantly coming from farming areas). There were oscillations in wind speed over the months. Mean and maximum wind speeds were recorded, as several authors feel these variations influence the airborne pollen count and dispersal. Considering that our methodology allowed us to see the pollen count variations per hour and day and knowing the wind speed throughout the day, we saw that the period with the highest pollen count was when wind speeds ranged from 4 km/h to 10 km/h, with the wind coming from a predominantly northern direction.

The pollen frequency and type over the study period differed significantly, despite the pollen trap always being placed in the same spot, the identification technique not changed and being carried out by the same person. The differences in the total pollen counts and the proportion of the type of pollens (Figure 2), which were significant, could have been influenced by the different climatic conditions seen over the years of the study, particularly rainfall.

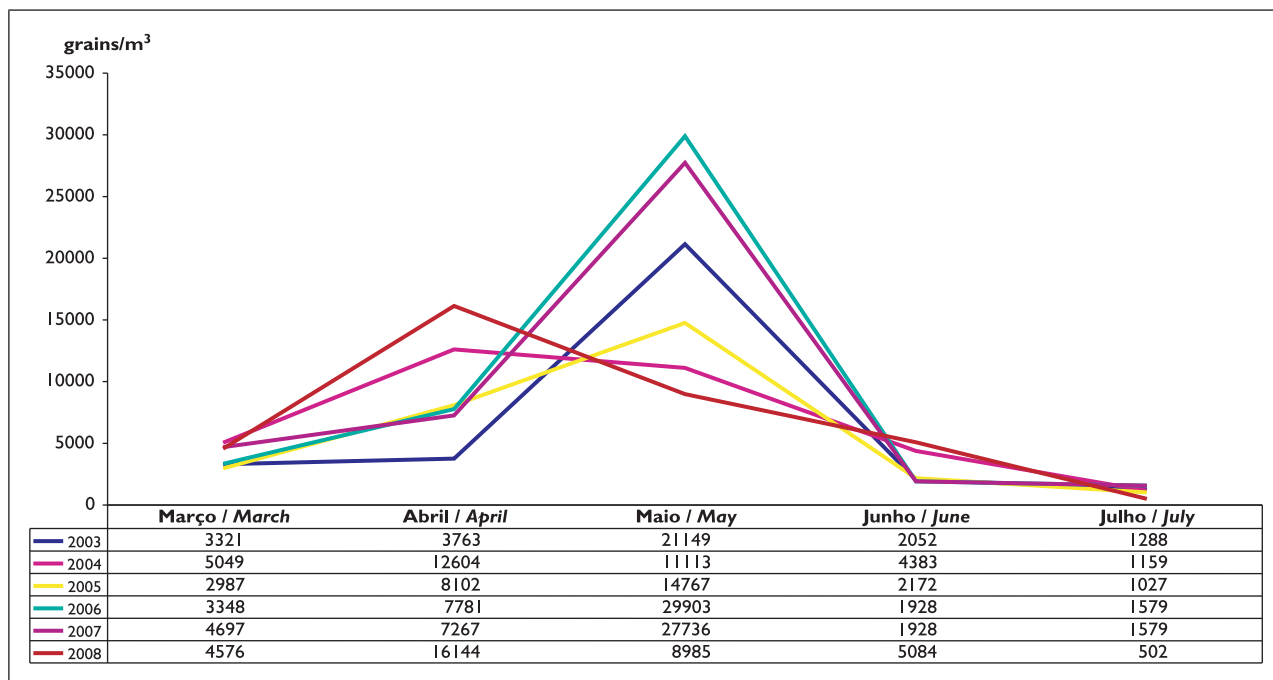


Figura 2. Total de pólenes (grãos/m³) Primavera 2003 a 2008
Figure 2. Total pollen count (grains/m³) Spring 2003-2008

-nos conhecer as oscilações do número de pólenes por hora e por dia, e sabendo a velocidade do vento ao longo do dia, pudemos verificar que o período de maior concentração polínica foi observado com velocidades do vento entre 4 km/h e 10 km/h, tendo a direcção norte sido a predominante.

A frequência e tipo de pólenes no período do estudo foram significativamente diferentes, apesar do polinómetro estar colocado no mesmo local, a técnica de identificação ser a mesma e efectuada sempre pelo mesmo indivíduo. As diferenças nas concentrações totais de pólenes e na proporção do tipo de pólenes (Figura 2), que foram significativas, poderão ter sido influenciadas pelas diferentes condições climáticas verificadas nos anos em estudo, nomeadamente na pluviosidade.

Na Figura 3, apresentamos a concentração de pólenes de gramíneas, por mês e por ano. Verificam-se diferenças significativas nos seus valores relativos aos anos em estudo. Estas diferenças verificadas quanto ao tipo e quantidade pólenes tiveram influência na sintomatologia dos doentes em estudo.

Figure 3 shows the grass pollen count per month and year. There were significant differences in grass pollen count over the years of the study. The symptoms of the study patients were affected by these different pollen types and counts. The *gramineae* pollen count (*Poaceae*) in the Spring of 2003 and 2006 was higher than in the other years (Figure 3). Neither wind direction nor mean wind speed over the months of the study were significantly different from previous years.

We correlated the patients' recourse to medication for symptom relief and control, such as anti-histamines, with the number of times patients contacted the researchers (medical visits, e-mail, SMS, or telephone) over those periods.

The total amount of symptoms of patients who underwent SIT was significantly less than the patients who took placebo (Figure 4). The evaluation was made comparing the mean weekly symptoms between the initial stage

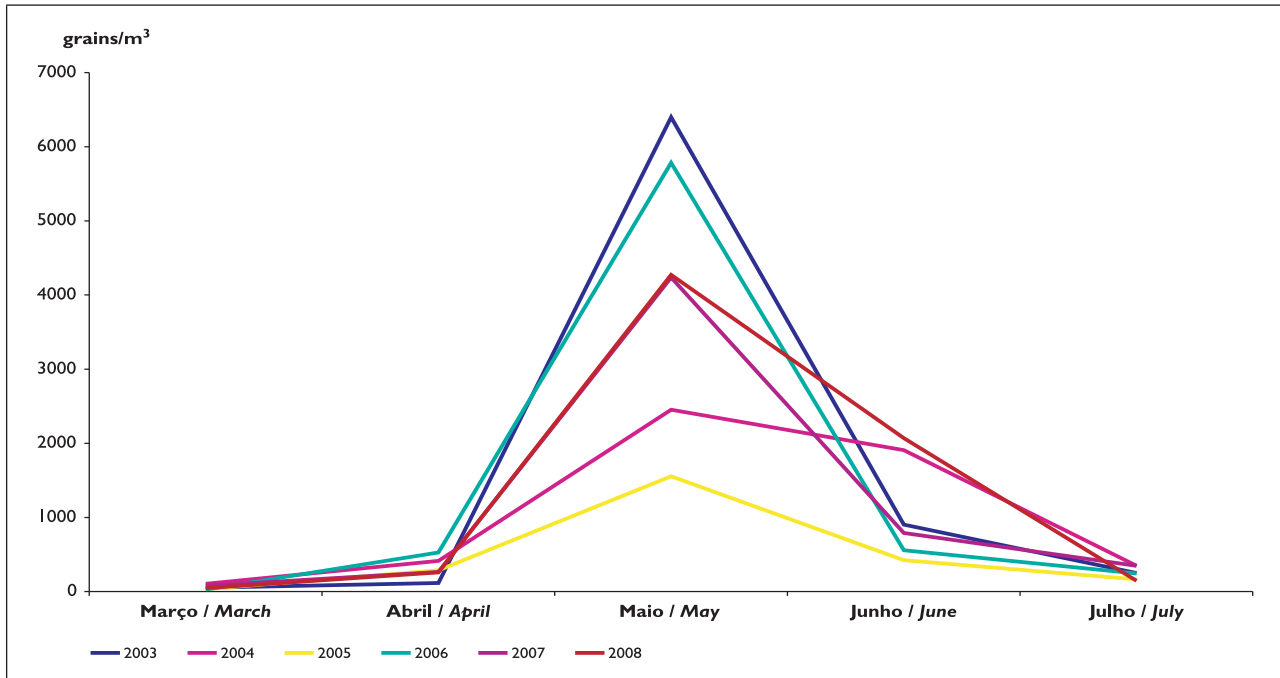


Figura 3. Total de grãos de pólenes de gramíneas/m³ de Março a Julho de 2003 a 2008
Figure 3. Total grass pollen count (grains/m³) March-July 2003-2008

Refira-se que a concentração de pólenes de gramíneas (Poaceae) foi nas Primaveras de 2003 e 2006, mais elevada que nos outros anos (Figura 3). Quer a direcção do vento quer a velocidade média do vento nos meses em estudo não foi significativamente diferente dos anos anteriores.

Correlacionámos a necessidade dos doentes terem de utilizar medicamentos para alívio e controlo dos sintomas, como os anti-histamínicos, com o número de vezes que recorreram a contactos com os investigadores (visitas médicas, via correio electrónico, SMS, ou telefónica) durante esses períodos.

O somatório de sintomas nos doentes que efectuaram a IT foi significativamente menor quando comparado com os doentes que efectuaram placebo (Figura 4). A avaliação foi efectuada comparando a média semanal de sintomas entre a fase inicial de selecção de doentes para o estudo, ou seja, antes da administração de qualquer terapêutica, e o período compreendido entre 1 de Março e 31 de Julho de

of selecting patients for the study, i.e. before any treatment was administered, and the period March 1 – July 31 of each year. Symptoms were not recorded beyond the end of July because after this month there are not high enough airborne grass pollen counts in our region to trigger symptoms.

Patients' complaints in the SIT group were significantly less over the treatment period than the initial period. A significant drop in recourse to medication to prevent and/or manage symptoms, in both the number of days of taking anti-histamines and nasal corticosteroids (Table 1), was also seen. This difference was more evident in terms of anti-histamine (AH) than topical corticosteroid (Cort) use. Medication listed under 'other' was considered when patients mentioned using medication such as local vasoconstrictors and/or anti-leukotrienes. Table 1 shows that mean medication intake (anti-histamines, topical corticosteroids or other) per

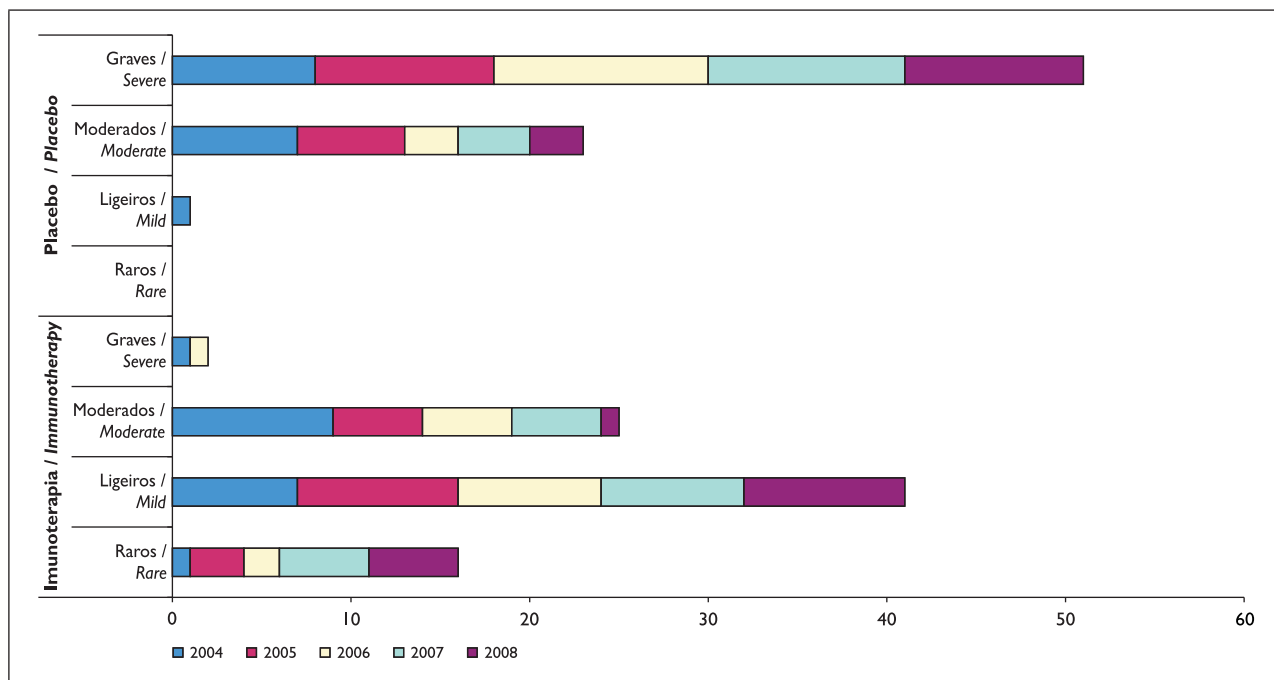


Figura 4. Avaliação do somatório de sintomas durante 5 anos nos que fizeram IT versus placebo
Figure 4. Total symptoms over the five years of SIT versus placebo

cada ano. Não se prolongou o período de registo de sintomas para além de final de Julho, porquanto a partir dessa data a quantidade de pólenes de gramíneas no ar, na nossa região, não é significativa para a provocação de sintomas.

Ao longo do período de tratamento, as queixas dos doentes foram significativamente menores, quando comparadas com o período inicial no grupo que efectuou IT. Também foi verificada uma significativa redução na necessidade de uso de medicamentos para prevenir e/ou tratar os sintomas, quer no número de dias de tomas de anti-histamínicos, quer no número de dias de uso de corticosteróides de aplicação nasal (Quadro 1). Esta diferença foi mais evidente no que concerne ao uso de anti-histamínicos (AH), quando comparada com os corticosteróides tópicos (Cort.). A medicação referida em “outra” foi considerada quando os doentes referiam a aplicação de medicação, como vasoconstritores locais e/ou a ingestão de anti-leucotrienos. Verificou-se (Quadro 1) que a média do

year and per patient in the SIT group was 23.5 days, while the mean in the placebo group was 61.9 days, a very significant difference ($p < 0.001$).

Medical contacts included need for clinical observation for uncontrolled symptoms or patients asking for clarification or due to doubts. These were more frequent via telephone than electronically or by SMS (Table 2).

The placebo group had a significantly higher need for clinical observation due to worsening or insufficient control of symptoms with medication ($p < 0.001$).

Patients in the placebo group had greater recourse ($p < 0.001$) to medical support via all the means of contact throughout the study (Table 2).

Tolerance to SIT application was good. We administered 595 subcutaneous injections and saw only five local reactions (0.8%), none of which had any significant repercussion, with no need to suspend treatment. All injections were administered by a physician. A check was made for

Quadro 1. Número de dias de medicação

Table 1. No. of days of medication

	2004			2005			2006			2007			2008		
	AH	Cort	Outra / Other	AH	Cort	Outra / Other	AH	Cort	Outra / Other	AH	Cort	Outra / Other	AH	Cort	Outra / Other
Imuno* / Immunotherapy*	46	69	5	31	57	2	27	38	2	15	29	1	11	20	0
Placebo / Placebo	75	95	3	86	89	3	54	71	2	81	48	1	77	57	1

* Significância / significance $p < 0.01$

Quadro 2. Contactos médicos

Table 2. Medical contacts

	2004		2005		2006		2007		2008	
	Imuno* / Immunotherapy	Placebo / Placebo	Imuno* / Immunotherapy	Placebo / Placebo	Imuno* / Immunotherapy	Placebo / Placebo	Imuno* / Immunotherapy	Placebo / Placebo	Imuno* / Immunotherapy	Placebo / Placebo
E-mail / E-mail	9	8	6	9	7	14	7	24	5	27
Telefone / Telephone	19	24	13	29	14	31	8	36	10	39
SMS / SMS	5	2	8	12	10	14	11	13	13	17
Visita / Visit	5	9	3	11	3	14	3	14	2	15
Total / Total	38	43	30	61	34	71	29	87	30	98

* Significância / significance $p < 0.01$

número de dias de ingestão de medicação (anti-histamínicos, corticóides tópicos ou outra) por ano e por doente no grupo de imunoterapia foi de 23,5 dias, enquanto no grupo placebo a média foi de 61,9 dias, sendo consequentemente muito significativa ($p < 0,001$).

Os contactos médicos havidos, quer por necessidade de observação clínica devido ao não controlo dos sintomas, ou para solicitar esclarecimentos ou por surgirem quaisquer dúvidas, por parte dos doentes, paradoxalmente, foram mais frequentes por via telefónica do que por via electrónica ou por SMS (Quadro 2).

Refira-se que a necessidade de observação clínica, por agravamento ou insuficiente controlo de sintomas com a

any type of reaction approximately 20 minutes after each application. Patients were informed that they should communicate any delayed reaction by the most rapid means at their disposal.

DISCUSSION

It is estimated that around 10% to 20% of individuals in Europe could experience pollen hypersensitivity^{16,17}. Increased prevalence of pollinosis is related to the length and intensity of the pollen season, its frequency, pollen peaks and total allergenic load during these periods¹⁸⁻²⁰.

medicação, foi significativamente mais elevada no grupo que tomou placebo ($p < 0,001$).

Ao longo do estudo, em qualquer uma das várias possibilidades de contacto, foi sempre mais elevada ($p < 0,001$) a procura de apoio médico nos doentes no grupo que efectuou placebo (Quadro 2).

A tolerância na aplicação da imunoterapia foi bastante boa, tendo sido administradas 595 injeções por via subcutânea e tendo apenas sido verificada a ocorrência de 5 reacções locais (0,8%), as quais não tiveram qualquer repercussão significativa, e não tendo havido necessidade de interrupção do tratamento. As inoculações foram sempre efectuadas por médico. Após cada aplicação, era verificada, cerca de 20 minutos depois, se havia ou não qualquer tipo de reacção. Os doentes eram informados que, caso houvesse reacção retardada, deveriam comunicar esse facto pela via mais rápida ou mais fácil ao seu alcance.

DISCUSSÃO

Estima-se que as hipersensibilidades a pólenes possam estar a atingir 10 a 20% dos indivíduos na Europa^{16,17}. O aumento de prevalência das polinoses está relacionado com a duração e a intensidade do período polínico, a frequência, os picos de polinização e carga alérgica total durante esses períodos^{18,19,20}. Estes factores podem ser influenciados por modificações na temperatura do ar e pelos níveis de pluviosidade regional que alteram a polinização em várias espécies de plantas. Verificaram-se alterações significativas, quer na quantidade total de pólenes quer na quantidade de pólenes de gramíneas, durante o quinquénio, devido a alterações na pluviosidade. Tem sido verificado que nas últimas décadas a duração da fase polínica está a expandir-se e, por vezes, mais precoce. Segundo a Organização Mundial de Saúde, nos últimos 30 anos, estima-se que houve um aumento da “estação” polínica em cerca de 10/11 dias²¹. No presente estudo também verificámos que a concentração de pólenes no ar, em

These factors could be influenced by changes in air temperature and regional rainfall levels, which change pollinisation in several plant species. Significant changes in the total pollen count and the amount of grass pollen grains were observed over the five year period were due to changes in rainfall. The length of the pollen season has expanded over the last few decades and it is sometimes earlier. The World Health Organization estimates that over the last 30 years the pollen season has increased by around 10/11 days²¹. We also found that there were still significant amounts of airborne pollen in June and July, unlike what was seen in earlier decades²².

Although there is a higher incidence of allergic diseases worldwide, the quality of life of patients with allergic disease caused by pollen hypersensitivity has changed for the better over the last ten years through a better understanding of the causes and better preventive attitudes. It is known, however, that patients with seasonal allergic rhinitis who feel no need for anti-histamines or other medication for control of symptoms are rare.

The great majority of patients with moderate to severe seasonal rhinitis who, according to ARIA criteria, are currently considered as having persistent allergic rhinitis if symptoms persist over four consecutive weeks, have to take daily anti-histamines associated or not to topical corticosteroids.

Knowledge of flora and weather variables, such as wind direction and speed, rainfall, etc., of each region throughout the year allow, with a slight margin of error, the development of highly precise aerobiological research projects to supply real time information on airborne pollen type and count, and forecasts as to its development to apply to a better and more timely prevention of pollen-related allergic diseases. The implementation and maintenance of the Portuguese Society of Allergology and Clinical Immunology's (SPAIC) Portuguese Aerobiology Network has been very useful to physicians, the population at large and pollinosis patients in particular.

quantidades significativas, prolongou-se para os meses de Junho e Julho, situação diferente da que ocorria em décadas anteriores²².

Apesar da maior prevalência a nível mundial das doenças alérgicas, a qualidade de vida dos doentes portadores de patologia alérgica por hipersensibilidade a pólenes tem evoluído positivamente nos últimos 10 anos, através de uma melhor compreensão das causas e melhores atitudes preventivas. Sabe-se, contudo, que são raros os doentes com rinite alérgica sazonal que passam sem necessidade de uso de anti-histamínicos ou de outra medicação para controlo dos seus sintomas.

Na grande maioria dos casos dos doentes com rinite sazonal de grau moderado ou grave, que, segundo os critérios do ARIA, são actualmente considerados como tendo rinite alérgica persistente, se houver sintomas superior a 4 semanas seguidas têm de tomar anti-histamínicos diariamente associados ou não a corticóides tópicos.

O conhecimento da flora e as variações climatéricas, como a direcção e a velocidade do vento, a pluviosidade, etc., de cada região ao longo do ano, permite, com uma ligeira margem de erro, desenvolver projectos de investigação aerobiológica com elevado grau de precisão para fornecimento em tempo real informação sobre o tipo e concentrações polínicas no ar e sua previsão de evolução, de modo a que se apliquem numa melhor e atempada prevenção das doenças polínicas. Refira-se que a implementação e manutenção da Rede Portuguesa de Aerobiologia, pela Sociedade Portuguesa de Alergologia e de Imunologia Clínica (SPAIC), tem sido de grande utilidade, quer para os médicos, quer para a população em geral e para os doentes com polinose em particular.

Actualmente, as diversas formas de contacto dos médicos com os seus doentes, e vice-versa, são muitíssimo mais facilitadas do que há uns anos. Também as novas tecnologias, como o correio electrónico através da Internet, a recepção e envio de mensagens pelos telemóveis, são, sem dúvida, uma mais-valia na relação médico-doente e uma forma de transmitir informação.

Nowadays, the many forms of mutual patient-physician contact are easier than in past years, and new technologies such as Internet e-mail and SMS are undoubtedly an asset in the physician-patient relationship and a way to transmit information to patients. Despite it being easier to clear up doubts via contact by e-mail or SMS, the patients used the telephone more than expected to contact physician. Direct contact was still the best form of the physician-patient relationship in cases of need.

Immunotherapy is one of the more efficacious therapeutic techniques for managing and reducing symptoms in patients with moderate to severe rhinoconjunctivitis. Immunotherapy with pollen extracts has been used by several authors over various years in different countries and with varying types of pollens. Recent meta-analyses of numerous clinical studies from various publications have shown the efficacy of pre-seasonal and co-seasonal treatments, in both double-blind and open trials^{4-12,23}. Good tolerance during the application of this type of treatment has also been seen and highlighted. In comparison with other published works on SIT with pre-seasonal grass pollen in rhinoconjunctivitis sufferers, we found a higher patient compliance in our study, maybe due to the greater proximity of patients to researchers through better and easier contact.

In our study, we proved that pre-seasonal SIT with grass pollen extracts considerably reduces symptoms in practically all patients and significantly reduces the need for anti-histamine intake and/or nasal topical corticosteroid use.

The seven pre-seasonal injection use has advantages over the year-long 12 to 18 injections; it is efficacious and promotes more compliance with treatment.

The efficacy of pre-seasonal SIT, knowledge of meteorological data and the existence of daily airborne pollen data available for free in Portugal through the Portuguese Aerobiology Network are advantages in treatment

Refira-se que, apesar da facilidade de contacto por via electrónica ou por SMS para esclarecimento de dúvidas, paradoxalmente os doentes recorreram mais vezes do que o esperado ao contacto com o médico por via telefónica. Continua a verificar-se que a conversação directa é ainda a que melhor traduz a relação médico-doente, em caso de necessidade.

Nos doentes com rinoconjuntivite de grau moderado ou grave, tem estado indicado a IT, como uma das técnicas de tratamento mais eficazes para controlar e reduzir os sintomas. A IT com extractos de pólenes tem sido usada por vários autores, ao longo dos anos, em diferentes países e com distintos tipo de pólenes. Recentes estudos de meta-análises com dezenas de trabalhos clínicos publicados em diversas publicações têm revelado uma boa eficácia nos tratamentos nas fases pré-estacional e coestacional, tanto em ensaios duplamente cegos como em ensaios abertos^{4,5,6,7,8,9,10,11,12,23}. Também tem sido salientado e verificado uma boa tolerância durante a aplicação deste tipo de tratamento. Comparativamente com outros trabalhos publicados sobre IT com gramíneas pré-sazonal em portadores de rinoconjuntivite, a adesão dos doentes neste estudo foi mais elevada, quiçá pela maior proximidade dos doentes com os investigadores, através de melhor e mais fácil contacto.

Neste trabalho comprovou-se que a IT, quando efectuada numa fase pré-estacional com extractos de pólenes de gramíneas, reduz consideravelmente a sintomatologia em praticamente todos os doentes e reduz significativamente a necessidade de ingestão de anti-histamínicos e/ou uso tópico de corticosteróides por via nasal.

O uso de apenas 7 injeções na fase pré-estacional, quando comparada com administração ao longo do ano, com o uso de 12 a 18 injeções, revelou-se vantajosa, eficaz e de mais fácil adesão ao tratamento.

A eficácia da IT pré-sazonal, o conhecimento de dados meteorológicos e a existência de dados diários de quantidade de pólenes na atmosfera de Portugal, através da Rede Portuguesa de Aerobiologia, de forma gratuita a toda a população, são uma mais-valia para a abordagem a doen-

approaches for patients sensitive to grass pollens with respiratory airway disease, associated or not to ocular pathology.

CONCLUSION

It was possible and useful to supply timely information on pollen counts and changes in weather to seasonal rhino-conjunctivitis patients for preventive attitudes that minimise the effects of contact with allergens to which they are sensitised. We found significant changes in grass pollen count in the different years of the study, and the mutual physician-patient communication was important for a better approach to patients with seasonal rhino-conjunctivitis.

Patients who underwent SIT had a better quality of life and significant reduction of symptoms than patients who took a placebo.

Administering SIT with a reduced number of applications, good tolerance and few side effects, with up-to-date data on pollen counts and weather conditions available, allowed for a set of factors that taken together may provide adequate and indispensable improvement in pollinosis patients' quality of life. Immunotherapy provided a significant reduction in the use of medication for the relief of seasonal rhino-conjunctivitis symptoms (anti-histamines and/or topical corticosteroids).

Finally, we highlight that good patient compliance throughout the study period, the result of modern information services coupled with easy and rapid contact for clinical observation by health care professionals when necessary, is undoubtedly an important factor for performing this type of studies.

Conflict of interest disclosure: None

Funding: None

tes hipersensíveis a pólenes de gramíneas e portadores de patologia das vias respiratórias, associadas ou não a patologia ocular.

CONCLUSÃO

Foi possível e útil fornecer informação atempada sobre concentração polínica e alterações climatéricas aos doentes portadores de rinoconjuntivite sazonal, de forma a poderem, através de atitudes preventivas, minimizar os efeitos do contacto com os alergénios aos quais são sensíveis.

No presente estudo verificou-se a existência de significativas alterações na concentração de pólenes de gramíneas nos diferentes anos em estudo, tendo-se revelado importante para uma melhor abordagem dos doentes portadores de rinoconjuntivite sazonal a comunicação médico-doente, e vice-versa.

Os doentes que efectuaram IT tiveram melhoria na qualidade de vida e redução significativa de sintomas, quando comparados com os que usaram placebo.

A administração de IT em reduzido número de aplicações, com boa tolerância e com escassos efeitos secundários, com a possibilidade de dispor de dados actualizados sobre as concentrações polínicas e condições climáticas, de fácil divulgação, proporcionam e desencadeiam uma associação de factores que, conjugados, podem prestar uma adequada e imprescindível melhoria na melhor qualidade de vida dos doentes com polinose. A IT proporcionou uma redução significativa no uso de medicação para alívio de sintomas da rinite alérgica sazonal (anti-histamínicos e/ou corticosteróides tópicos).

Finalmente, é de realçar a boa aderência dos doentes durante o período em estudo, porquanto a oferta de serviço de informação modernos, aliado ao fácil e rápido contacto para observação clínica quando necessário, por parte dos profissionais de saúde, é sem dúvida um factor importante para a execução de estudos deste tipo.

Declaração de conflitos de interesse: Nenhuma

Financiamento: Nenhum

Contacto / Contact
cn@imunoalergologia.com

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Loureiro G, Blanco B, São Braz MA, Pereira C. Reactividade cruzada a aeroalergénios numa população alérgica da Cova da Beira. *Rev Port Imunoalergologia* 2003;11:107-16.
2. Mygind N, Secher C, Kirkegaard J. Role of histamine and antihistamines in the nose. *Eur J Respir Dis* 1983;64 (Suppl 128):16-20.
3. Mygind N, Naclerio RM. Intranasal corticosteroids. In: Naclerio MN, Durham SR, Mygind N (Eds.). *Rhinitis mechanisms and management. Lung biology in health and disease.* New York, Marcel Dekker; 1998:221-56.
4. Arvidsson M, Löwhagen O, Rak S. Effect of a two years placebo controlled immunotherapy on upper and lower airways symptoms and medication in patients with birch pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:777-83.
5. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis and randomized controls trials. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:969-74.
6. Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of immunotherapy in the management of allergic rhinitis. An analysis of prospective, randomized, double blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther* 2000;22:342-50.
7. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. Geneva: January 27-29 1997. *Allergy* 1998;53 (Suppl 44):1-42.
8. Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W, Guerin B, Maasch HJ, Gdivert H et al., Double blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass pollens allergoids. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass pollens extract. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:591-8.
9. Varney VA, Gag M, Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR. Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by anti-allergic drugs. *BMJ* 1991;302:265-9.
10. Bousquet J, Lockett R, Mailing HJ. WHO Position paper: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558-62.
11. Mailling HJ. Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy* 1998;53:461-72.
12. Durham SR, Kay AB, Hamid Q. Changes in allergic inflammation associated with successful immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:282-4.
13. Projecto ARIA <http://www.whiar.com/>.
14. Rede Portuguesa de Aerobiologia – <http://www.rpaerobiologia.com/>.
15. Nunes Carlos, Ladeira Susel. Ensaio com imunoterapia de curta duração na rinoconjuntivite sazonal. *Rev Port Imunoalergologia* 2006;14:331-41.
16. WHO Europe – Environmental hazards trigger childhood allergic disorders. Fact Sheet Euro/01/03.
17. Azevedo L, Berenstein M, Junior F. Analysis of influence of climatic changes and atmospheric pollutants on respiratory diseases in children. *Alergia, Asma e Imunologia Pediátricas* 1999;8:78-84.
18. Emberlin J, Norris-Hill J. The influence of wind speed on the ambient concentrations of pollen from Gramineae, Platanus and Betula in the air of London, England. In: Muilenberg M, Burge H (Eds.). *Aerobiologia*, Lewis Publishers 1996.
19. Emberlin J, Mullins J, Corden J, Jones S, Millington W, Brooke M, et al. Regional variations in grass pollen seasons in the UK. Long term trends and forecast models. *Clin Exp Allergy* 1999;29:347-57.
20. Hajat S, Haines A, Atkinson RW, Bremmer SA, Anderson HR, Emberlin J. Association between air pollution and daily consultations with general practitioners for allergic rhinitis in London, United Kingdom. *Am J Epidemiol* 2001;153:704-14.
21. WHO Europe – EIONET – Air and climate changes. <http://www.health.fgov.be>.
22. Chieira C, Todo-Bom A, Loureiro C, Chieira L, Leitão T, Paiva J, et al. Polens alergénicos. *Via Pneumológica* 1988;1:51-7.
23. Balda BR, Wolf H, Baumgarten C, Klimek L, Rasp G, Kunkel G, et al. Tree-pollen allergy is efficiently treated by short-term immunotherapy (STI) with seven preseasonal injections of molecular standardized allergens. *Allergy* 1998;53:740-8.