

# Padrão de resposta à prova de provocação nasal específica em doentes alérgicos submetidos a imunoterapia específica

Graça Loureiro<sup>1</sup>, Carlos Loureiro<sup>1</sup>, Vera Alves<sup>2</sup>, Fátima Garção<sup>2</sup>, Manuel Santos Rosa<sup>2</sup>, Celso Chieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra

<sup>2</sup>Centro de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## Resumo

A monitorização da eficácia da imunoterapia (IT) incluirá idealmente a prova de provocação nasal específica (PPNE) para avaliação objectiva da reactividade específica. No entanto a reprodutibilidade da resposta à PPNE permanece por definir. Neste estudo pretendeu-se analisar o padrão de resposta à PPNE, com avaliação de parâmetros clínicos e imunológicos, em doentes submetidos a IT comparativamente a doentes alérgicos não submetidos a IT. Incluíram-se 17 doentes com rinite alérgica a *Parietaria judaica*, divididos em dois grupos: o grupo I constituído por 9 doentes submetidos a imunoterapia específica e o grupo II constituído por 8 doentes sem qualquer terapêutica, no período do estudo. 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 contagens celulares e doseamento de mediadores inflamatórios. Procedeu-se à monitorização da PPNE através de score de sintomas (pré-PPNE, 1º minuto, 30º minuto e hora-a-hora até às 6 horas). A PPNE foi positiva em todos os doentes. O grupo I apresentou, comparativamente ao grupo II, valores inferiores no score de sintomas (excepto à 6ª hora) e também no doseamento de ECP e RANTES. A triptase foi quantificável apenas em três amostras obtidas aos 30 minutos, enquanto que a eotaxina não foi quantificável em nenhuma das amostras. Verificou-se aumento das células CD3 e CD8 e descida de CD19 em ambos os grupos, após PPNE. O grupo II apresentou um aumento de CD4 e diminuição de CD125, enquanto que no grupo I estes tipos celulares não sofreram alterações. O padrão de resposta clínica à PPNE foi diferente nos dois grupos, admitindo-se a influência da terapêutica subjacente. As diferenças observadas nos resultados imunológicos obtidos na avaliação pré-PPNE também parecem reflectir a terapêutica específica subjacente ao grupo I. Quanto às alterações dinâmicas após a PPNE, os resultados obtidos não se enquadram no reconhecido tráfego celular decorrente da reacção alérgica. Tal poderá ser interpretado como uma discrepância do tempo de colheita de amostras celulares e a dinâmica celular de resposta à prova de provocação.

### Summary

*The specific nasal challenge test (SNCT) has been described as a method to monitoring specific immunotherapy (IT) efficacy, but the parameters to assess the allergic reaction are not defined. The aim of this study was to assess the parameters of response to SNCT in allergic patients treated with IT. We included 17 patients with allergic rhinitis to *Parietaria judaica*. Group I included 9 patients with specific IT and group II included 8 patients without medication. A SNCT was performed out of the pollen season. The SNCT was monitored by symptom (nasal and extra-nasal) scores: before, at 0, 1<sup>st</sup>, 30<sup>th</sup> minutes and on every hours till the 6<sup>th</sup> hour of SNCT. At 0 and the 6<sup>th</sup> hours after the SNCT, nasal lavages were performed to assess the inflammatory mediators and the cellular phenotypes. In this study the SNCT reproduced the clinical reactivity to the allergen. The symptom score and the measurement of ECP and RANTES were higher in the group II compared with group I. Tryptase was found in just three patients (30 minutes). Eotaxin was not found in any nasal lavage. The clinical response was different in group I and II, what could be explained by the different therapy in each group. It also could explain the immunological differences observed, before SNCT. The dynamic changes after SNCT were not the expected and this finding could be related to an early sampling before cellular trafficking occurred.*

## INTRODUÇÃO

A imunoterapia específica (IT)<sup>1</sup> tem sido uma das metodologias utilizadas para o tratamento das doenças alérgicas. Apesar de ter sido introduzida por Leonard Noon em 1911, permanece até hoje por esclarecer o seu mecanismo de acção. Reconhecem-se, no entanto, várias respostas clínicas a esta terapêutica, como a diminuição da reactividade do órgão, com redução da reactividade específica imediata e tardia, cutânea e das mucosas, e redução de reactividade à histamina. São também reconhecidas as respostas imunológicas ao tratamento de hipossensibilização específica, quer nos parâmetros humorais, com declínio da IgE específica e aumento da IgG específica, quer nos parâmetros celulares, nomeadamente a perda inespecífica de hiperreactividade dos basófilos e diminuição da proliferação dos linfócitos e células mononucleares periféricas, verificando-se a diminuição do IL-2R sérico, a produção de células supressoras específicas, a percentagem aumentada de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a produção de linfócitos T

CD8<sup>+</sup> específicos, a produção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com perfil Th1 e diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> com perfil Th2, a diminuição de RceII/CD23 nos linfócitos B, a diminuição de várias citocinas (MIF, TNF, *Histamine releasing factors*, PAF, IL-4) e o aumento do RNAm de IL-2 e IFN- $\gamma$ .

No âmbito da prática clínica, a monitorização da IT, tem-se baseado na avaliação clínica. No entanto esta metodologia é insatisfatória devido à sua subjectividade inerente. Dentre os vários métodos para monitorização da IT, a prova de provocação nasal específica (PPNE) constitui o método de eleição para a reprodutibilidade da reacção alérgica<sup>2-5</sup>. A cavidade nasal constitui o segmento das vias aéreas respiratórias de directo acesso, permitindo uma fácil aplicação do extracto alergénico, bem como a monitorização da reacção alérgica subsequente<sup>3</sup> que é clinicamente avaliada numa forma directa e simples, quer através da utilização de *scores* de sintomas, quer através da avaliação funcional da obstrução nasal, seja por rinomanometria ou *peak flow* nasal. A análise dos parâmetros imunológicos também tem sido utilizada para a avaliação quantitativa de

mediadores e células inflamatórias<sup>2-4</sup>. A reacção alérgica<sup>6</sup> engloba uma fase imediata e uma fase tardia, compreendendo um complexo intercâmbio entre células e mediadores inflamatórios. Na fase imediata ocorre activação dos mastócitos, com consequente desgranulação e libertação de histamina, triptase (reconhecida como o marcador da fase imediata<sup>7-9</sup>), quimase e derivados araquidónicos sintetizados de novo. Os mastócitos, e outras células efectoras da reacção alérgica (basófilos, linfócitos, células epiteliais), também libertam citocinas multifuncionais que regulam a duração e a intensidade da resposta imune, promovendo a expressão de moléculas de adesão e recrutando células inflamatórias. Particularmente relevante para os eosinófilos é conhecida a influência da IL-5 e quimiocinas como a Eotaxina e RANTES<sup>10</sup>. A Eotaxina é uma quimiocina da família CC, produzida por vários tipos celulares, designadamente células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células epiteliais brônquicas, células do músculo liso e eosinófilos<sup>11</sup>. A quimiocina denominada RANTES também pertence à família CC. É produzida pelas células T, células epiteliais das vias aéreas, fibroblastos, células endoteliais e eosinófilos, sendo reconhecida a sua importância na quimiotaxia dos monócitos, células T e eosinófilos<sup>12,13</sup>. Tem sido demonstrado que ambas exercem uma potente e selectiva acção de quimiotaxia sobre os eosinófilos, nomeadamente durante a inflamação alérgica. O infiltrado celular decorrente, caracteriza a fase tardia da reacção alérgica e é a marca da inflamação alérgica, distinguindo-a de outros processos inflamatórios. Outros mediadores inflamatórios são formados contribuindo para a perpetuação da reacção alérgica. Nesta fase tardia destaca-se a ECP como marcador da actividade dos eosinófilos<sup>7,8</sup>.

Apesar de actualmente a triptase ser reconhecida como o marcador de activação dos mastócitos, característico da fase imediata, e a

ECP ser o marcador da actividade dos eosinófilos, células características da fase tardia da reacção alérgica, não estão padronizados os parâmetros de resposta à PPNE, quer clínicos quer imunológicos, além de não estar definida a sua reprodutibilidade, e eventual correlação com as alterações imunológicas subjacentes. À medida que se vão esclarecendo os eventos imunopatológicos e o complexo intercâmbio entre células e mediadores inflamatórios intervenientes na reacção alérgica, melhor se definem os parâmetros clínicos e imunológicos na caracterização da reacção alérgica e consequentemente na monitorização de tratamentos específicos da doença alérgica.

Concretamente, a monitorização da eficácia da IT, incluirá idealmente a PPNE antes, durante e após o tratamento, com avaliação da reactividade específica. Devido à diversidade inter e intraindividual, e à ausência de padronização dos parâmetros de resposta à PPNE, a reprodutibilidade da resposta à PPNE permanece por definir.

Neste estudo pretendeu-se analisar o padrão de resposta à PPNE, com avaliação de parâmetros clínicos e imunológicos, em doentes submetidos a IT comparativamente a doentes alérgicos não submetidos a IT.

## METODOLOGIA

### 1. Doentes

Após consentimento informado, foram englobados 17 doentes com o diagnóstico de Rinite alérgica a parietaria, documentado por *prick* teste (pápula  $\geq 3$ mm) e IgE específica (classe  $\geq 2$ ). De ambos os sexos, com idade compreendida entre os 15 e os 52 anos, foram distribuídos por dois grupos. O Grupo I era constituído por 9 doentes submetidos a terapêutica de hipossensibilização a *Parietaria judaica* e o Grupo II era constituído

por 8 doentes sem qualquer terapêutica, no período do estudo. 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  $\beta$ , 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 figura 1 ilustra a abordagem utilizada.

**2.1 Prova de provocação nasal específica** A PPNE com extractos comerciais de *Parietaria judaica* para prova de provocação nasal (Leti), realizou-se de acordo com os consensos da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica<sup>2</sup>.

**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 Naclerio<sup>14</sup>. Com o doente sentado e flexão do pescoço a 60°<sup>15</sup>, foram introduzidos 10 ml de solução salina (NaCl a 0,9%) pré aquecida a 30° C. Recolheu-se o líquido de lavado nasal em recipiente de plástico, registando-se o volume assim obtido. 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. As células obtidas após centrifugação foram quantificadas por citometria de fluxo.

**2.3 Monitorização da PPNE<sup>4</sup>** A resposta à PPNE foi monitorizada através de *score* de sintomas nasais (prurido nasal, estertores, 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 1°, 5°, 10°, 15°, 30° e 60° minutos e depois a cada hora até às 6 horas após a PPNE.

A PPNE foi considerada positiva se *score* de sintomas  $\geq 3$ .

**2.4 Contagem celular** As células obtidas após centrifugação dos lavados nasais obtidos antes e 6 horas após a PPNE, foram submetidas a contagem por citometria de fluxo (CD3, CD4, CD8, CD19, CD125).

**2.5 Doseamento de mediadores inflamatórios** No sobrenadante dos lavados nasais, obtidos antes, aos 30 minutos e às 6 horas após a PPNE, procedeu-se ao doseamento de mediadores inflamatórios, os quais foram quantificados, por método ELISA (Análise imunológica por ligação enzimática). A triptase foi determinada segundo os procedimentos do kit UniCAP (Pharmacia). A ECP foi determinada segundo os procedimentos

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

**Figura 1** – Metodologia de provocação específica, monitorização e lavados nasais.

do Kit AlaSTAT Microplate ECP (DPC – Diagnostic Procedures Corporation, USA). As quimiocinas Eotaxina e RANTES foram determinadas segundo os procedimentos dos Kits QuantiKine®, human Eotaxin Immunoassay e human RANTES Immunoassay, respectivamente (R&D Systems, USA).

**2.6 Análise estatística** De acordo com as variáveis existentes foram realizadas as seguintes análises estatísticas: distribuição de frequências, cálculo da média geométrica e aritmética, bem como a variância/desvio-padrão, teste *t* de Student, análise do intervalo de confiança para a diferença entre a média dos dois grupos. Foi considerado o nível de significância a 95% para a rejeição da hipótese nula. Para analisar as tendências temporais foi realizada uma ANOVA para medidas repetidas e um factor (grupo), ajustada para o sexo e idade.

## RESULTADOS

**Dados demográficos** Os dados demográficos e respeitantes às características da doença, nos

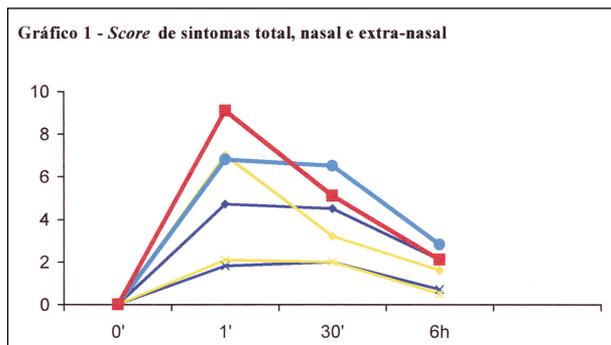
dois grupos de doentes são apresentados no Quadro I.

**Score de sintomas** A prova de provocação específica com parietaria foi positiva em todos os doentes, como avaliado por *score* de sintomas. Quanto à resposta clínica, os dois grupos apresentaram um padrão de resposta diferente. No 1º minuto, o grupo I apresentou um *score* total de sintomas inferior ao grupo II, respectivamente  $6,8 \pm 4,1$  e  $9,1 \pm 2,8$  (gráfico 1). Registou-se para o grupo I e II um *score* de sintomas nasais de  $4,7 \pm 2,7$  e  $7 \pm 1,8$ , respectivamente, enquanto que o *score* de sintomas extra-nasais para o grupo I e II foi respectivamente  $1,8 \pm 1,9$  e  $2 \pm 1,5$ . Aos 30 minutos o *score* de sintomas foi superior no grupo I comparativamente ao grupo II, respectivamente: *score* total  $6,5 \pm 5,3$  e  $5,1 \pm 3,9$ ; *score* nasal  $4,5 \pm 3,5$  e  $3,1 \pm 2,5$ ; *score* extra-nasal  $2 \pm 2,4$  e  $2 \pm 1,5$ . Também à 6ª hora, o *score* de sintomas foi superior no grupo I comparativamente ao grupo II, respectivamente: *score* total  $2,8 \pm 4,1$  e  $2,1 \pm 2,2$ ; *score* nasal  $2,1 \pm 3,4$  e  $1,6 \pm 1,3$ ; *score* extra-nasal  $0,7 \pm 1,3$  e  $2,1 \pm 2,2$ .

Quanto aos sintomas predominantes, em cada um dos tempos avaliados e em cada um dos

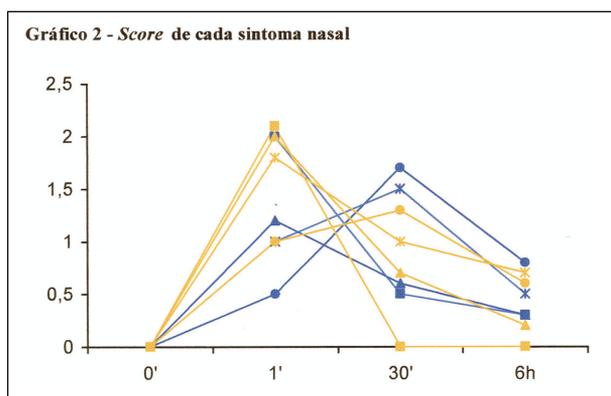
**Quadro I** – Dados demográficos e características da doença

		<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>
M:F		6:3	5:3
Idade	(média ± ds)	$40 \pm 7,9$ anos	$32,3 \pm 13,4$ anos
Tempo de evolução da doença	(média ± ds)	$11 \pm 3$ anos	$5,4 \pm 2,8$ anos
IgE total	(média ± ds)	$301 \pm 150,2$ UI/L	$129,8 \pm 109,6$ UI/L
IgE específica a parietaria	(média ± ds)	$65,8 \pm 26,2$ KU/L	$36,5 \pm 31,8$ KU/L
TC - Ø pápula	(média ± ds)	$7,8 \pm 1,9$ mm	$7,8 \pm 1,9$ mm
Duração da IT	(média ± ds)	$3,9 \pm 1,6$ anos	Ø

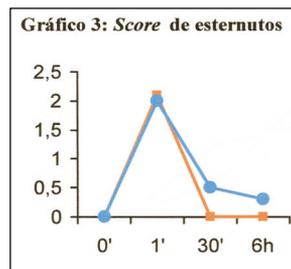


**Legenda do gráfico 1:** Score de sintomas - total, nasal e extra-nasal: grupo I versus grupo II (● score total do grupo I; ● score total do grupo II; ■ score nasal do grupo I; x score extra-nasal do grupo I; ● score nasal do grupo II; x score extra-nasal do grupo II).

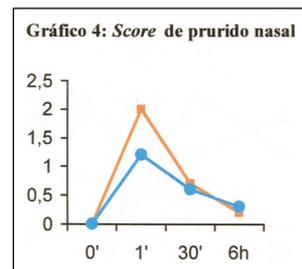
grupos, estão esquematizados no gráfico 2. Em ambos os grupos, verificou-se que os estertuos foram o sintoma predominante no 1º minuto, enquanto que a obstrução nasal, seguida da rinorreia, foram os sintomas predominantes no 30º minuto. Na avaliação à 6ª hora, o padrão de resposta clínica foi diferente nos dois grupos, verificando-se que no grupo I a obstrução nasal foi o sintoma predominante, enquanto que no grupo II se verificou o predomínio da rinorreia.



**Legenda do gráfico 2:** Score de cada sintoma nasal: grupo I versus grupo II (● obstrução do grupo I; x rinorreia do grupo I; ■ estertuos do grupo I; ▲ prurido do grupo I; ● obstrução do grupo II; x rinorreia do grupo II; ■ estertuos do grupo II; ▲ prurido do grupo II).

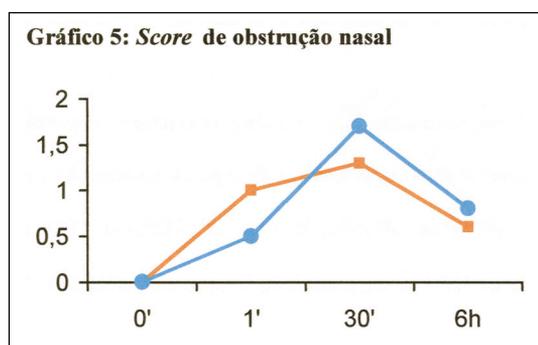


**Legenda do gráfico 3:** Score de estertuos: grupo I versus grupo II (● score do grupo I; ■ score do grupo II).



**Legenda do gráfico 4:** Score de prurido nasal: grupo I versus grupo II (● score do grupo I; ■ score do grupo II).

A análise da evolução temporal de cada um dos sintomas nasais também apresentou algumas diferenças no padrão de resposta, nos dois grupos. Quanto aos estertuos (gráfico 3), a evolução temporal deste sintoma caracterizou-se em ambos os grupos por um pico ao 1º minuto, com scores muito semelhantes (ainda que superior no grupo II), seguido de um acentuado decréscimo até ao 30º minuto, com posteriores diferenças entre os dois grupos. O grupo II apresentou um score nulo no 30º minuto que se manteve até a 6ª hora, enquanto que o grupo I manteve este sintoma até à 6ª hora, ainda que em decrescendo. Quanto ao prurido nasal (gráfico 4) e obstrução nasal (gráfico 5), as suas evoluções temporais foram semelhantes ao longo das seis horas, comparando os dois grupos entre si, apresentando apenas

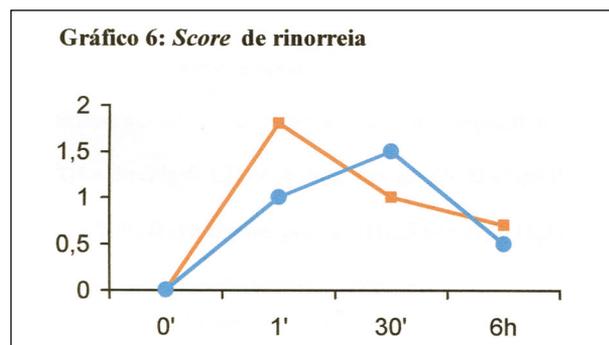


**Legenda do gráfico 5:** Score de obstrução nasal: grupo I versus grupo II (● score do grupo I; ■ score do grupo II).

diferenças no *score* em cada avaliação. Verificou-se, para o prurido nasal, que em ambos os grupos, o *score* apresentou um pico ao 1º minuto (embora mais elevado no grupo II), seguido de um decréscimo progressivo até à 6ª hora em ambos os grupos, com *scores* muito aproximados nas avaliações dos 30 minutos e das 6 horas, ainda que sendo discretamente superior no grupo I. Quanto à evolução temporal do *score* da obstrução nasal verificou-se, em ambos os grupos, um discreto *score* no 1º minuto (superior no grupo II) com um progressivo aumento até atingir o pico aos 30 minutos (nesta avaliação o *score* foi superior no grupo I). Observou-se posteriormente um discreto decréscimo, paralelo em ambos os grupos. Quanto à rinorreia (gráfico 6), tratou-se do sintoma com evolução temporal mais discrepante, comparando os dois grupos. Assim, o pico do *score* da rinorreia ocorreu em tempos diferentes em cada um dos grupos, designadamente, ao 1º minuto no grupo II e ao 30º minuto no grupo I. O posterior decréscimo do *score* até à 6ª hora verificou-se em ambos os grupos com valores discretamente superiores no grupo II.

**Lavados nasais** A recolha de lavado nasal foi de  $70 \pm 5\%$  em ambos os grupos.

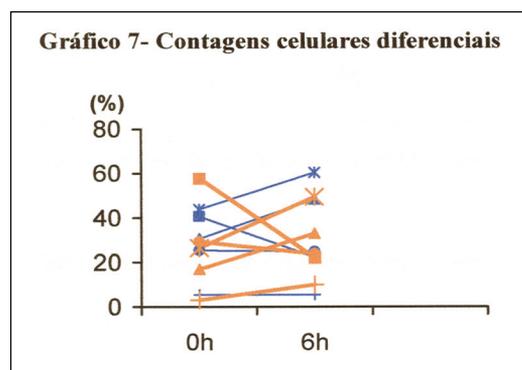
**Contagens celulares** O gráfico 7 representa a contagem diferencial de células antes (0h) e 6 horas após a prova de provocação específica. Antes da provocação nasal, observou-se no grupo I, o predomínio celular de CD3 ( $43,5 \pm 37,1\%$ , com  $30,3 \pm 35,3\%$  de CD8) e CD19 ( $40,3 \pm 29,5\%$ ), seguido de CD125 ( $25,1 \pm 12,4\%$ ). No grupo II predominaram os CD19 ( $57,6 \pm 27,2\%$ ) e CD125 ( $29,1 \pm 11,5\%$ ), seguido dos CD3 ( $26,3 \pm 26\%$  com  $16,6 \pm 17,8\%$  de CD8). Após a prova de provocação (6 horas), ambos os grupos apresentaram um predomínio celular de CD3 ( $60,3 \pm 28,6\%$  no grupo I e  $49,2 \pm 26,8\%$  no grupo II) e CD8 ( $48,2 \pm 36,3\%$  no grupo I e  $32,8 \pm 29,7\%$  no grupo II). Em ambos os grupos e nos dois tempos avaliados, a contagem de CD4 revelou os valores



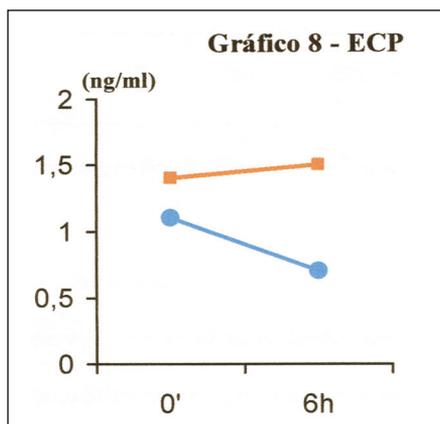
**Legenda do gráfico 6:** Score de rinorreia: grupo I versus grupo II (● score do grupo I; ■ score do grupo II).

mais baixos. Nomeadamente, antes da PPNE, o grupo I apresentou  $5,1 \pm 4,2\%$  e o grupo II  $2,8 \pm 2,1\%$  de CD4, enquanto que 6 horas após a PPNE o doseamento foi de  $5,1 \pm 9\%$  e  $9,8 \pm 10,7\%$ , respectivamente.

A dinâmica celular, após prova de provocação específica, caracterizou-se por um aumento de células CD3 e CD8 e descida de CD19 em ambos os grupos. O grupo II apresentou um aumento de CD4 (de  $2,8 \pm 2,1\%$  para  $9,8 \pm 10,7\%$ ) e diminuição de CD125 (de  $29,1 \pm 11,5\%$  para  $23,6 \pm 14,3\%$ ), enquanto que no grupo I estes tipos celulares não sofreram alterações.



**Legenda do gráfico 7:** Contagens celulares diferenciais: grupo I versus grupo II (x CD3 do grupo I; + CD4 do grupo I; ▲ CD8 do grupo I; ■ CD19 do grupo I; ● CD125 do grupo I; x CD3 do grupo II; + CD4 do grupo II; ▲ CD8 do grupo II; ■ CD19 do grupo II; ● CD125 do grupo II).



**Legenda do gráfico 8:** Doseamento de ECP: grupo I versus grupo II (● grupo I; ■ grupo II).

### Doseamento de mediadores inflamatórios

**Triptase** O doseamento deste mediador inflamatório só foi quantificável em três doentes, no lavado nasal dos 30 minutos: em dois doentes do grupo I (4,5 e 1,9  $\mu\text{g/ml}$ ) e num doente do grupo II (1,7  $\mu\text{g/ml}$ ). Nos restantes, os valores não atingiram o valor de doseamento ( $<1\mu\text{g/ml}$ ). Em todas os lavados nasais, obtidos antes e 6 horas após a PPNE, apresentaram valores  $<1\text{pg/ml}$ , como esperado.

**ECP** O gráfico 8 apresenta os valores de ECP obtidos nos lavados dos dois grupos de doentes. Verificou-se que estes valores foram inferiores no grupo I comparativamente ao grupo II, nos lavados nasais obtidos antes e 6 horas após PPNE. Analisando a evolução temporal após a PPNE, verificou-se ainda que a ECP nos lavados do grupo I sofreu um progressivo decréscimo, de  $1,1\pm 1,5\text{ng/ml}$  para  $0,7\pm 0,8\text{ng/ml}$ . No grupo II, verificou-se um discretíssimo aumento, de  $1,4\pm 1,4\text{ng/ml}$  para  $1,5\pm 2\text{ng/ml}$ .

**Eotaxina** Em nenhum dos doentes foram obtidos valores mensuráveis de eotaxina.

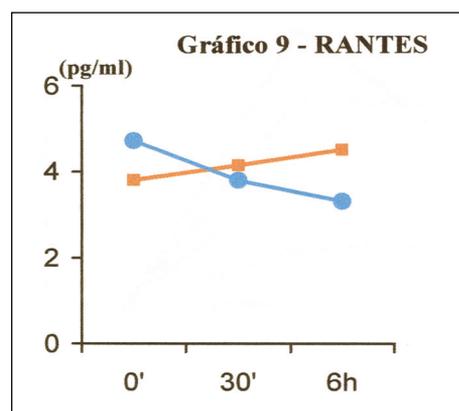
**RANTES** No gráfico 9 apresentam-se os doseamentos de RANTES. Nos lavados nasais

basais registaram-se níveis superiores no grupo I comparativamente ao grupo II, nomeadamente  $4,7\pm 2,7\text{pg/ml}$  e  $3,8\pm 1,1\text{pg/ml}$ . Nos lavados nasais após a PPNE, os valores foram inferiores no grupo I comparativamente ao grupo II. Assim, aos 30 minutos, no grupo I os valores de RANTES foram de  $3,8\pm 0,9\text{pg/ml}$  enquanto que no grupo II foram de  $4,1\pm 1,1\text{pg/ml}$ . Os doseamentos à 6ª hora após PPNE foram de  $3,4\pm 0,7\text{pg/ml}$  no grupo I e  $4,5\pm 0,9\text{pg/ml}$  no grupo II.

Quanto à análise da evolução temporal dos níveis de RANTES observou-se um padrão de resposta inverso comparando os grupos I e II. Ou seja, no grupo I os doseamentos aos 30 minutos e às 6 horas registaram valores em decréscimo, enquanto que no grupo II, se registaram valores crescentes.

### Análise estatística

A comparação dos resultados obtidos em cada grupo pelo teste *t* revelou que as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, nomeadamente o *score* de sintomas, as contagens celulares e a ECP. Apenas a comparação entre o



**Legenda do gráfico 9:** Doseamento de RANTES: grupo I versus grupo II (● grupo I; ■ grupo II).

resultado do RANTES às 6 horas, nos dois grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A análise do intervalo de confiança para a diferença entre a média dos dois grupos, revelou que as diferenças observadas no *score* nasal, bem como no *score* total de sintomas são significativas. Também, utilizando a mesma análise comparativa, entre os dois grupos, as diferenças nas contagens celulares foram significativas, excepto os resultados do CD19 e CD125 dos dois grupos às 6 horas.

Quanto à análise das tendências temporais, nem os factores considerados, nem as suas interações, nem o efeito temporal foram significativos.

## DISCUSSÃO

Os grupos I e II apresentaram características similares, tanto demográficas como respeitantes à doença alérgica (quadro I). Distinguem-se pelo facto de o grupo I cumprir IT, enquanto que o grupo II, durante o período do estudo interrompeu a terapêutica com corticóide e/ou antihistamínicos que cumpria previamente.

Verificou-se ainda que ambos os grupos se encontravam assintomáticos antes da PPNE. Na avaliação basal (pré-PPNE), o doseamento de triptase e de eotaxina não foram mensuráveis, em ambos os grupos. Sendo reconhecido que a triptase é um marcador da actividade dos mastócitos era esperado que não fosse mensurável, o que se verificou. Quanto à eotaxina, seria de esperar que fossem encontrados níveis desta quimiocina, ainda que baixos, uma vez que é reconhecido o seu papel na manutenção do infiltrado inflamatório eosinofílico, o qual persiste em muitos doentes mesmo fora do período polínico. Neste mesmo contexto, justifica-se a mensuração de RANTES, outra quimiocina cujo efeito de quimiotaxia sobre células T, monócitos e eosinófilos, contribui para o infiltrado inflamatório alérgico.

Menos esperado foi que o doseamento basal de RANTES fosse superior no grupo I, comparativamente ao grupo II, designadamente  $4,7 \pm 2,6$  e  $3,8 \pm 1,1$ , atendendo à terapêutica subjacente ao grupo I. Akoum *et al*<sup>16</sup> demonstraram que a expressão de RANTES diminui durante a IT. Apesar de neste estudo não terem sido obtidas amostras pré-IT, de modo a analisar a eventual dinâmica decrescente do RANTES ao longo da IT nestes doentes, seria de esperar que o grupo I apresentasse valores inferiores comparativamente ao grupo II, pois os outros parâmetros imunológicos estudados (ECP e populações celulares) apresentaram esse padrão. Realmente, como esperado, o doseamento de ECP foi inferior no grupo I, na avaliação basal. Quanto à análise das populações celulares na mucosa nasal, observámos que foram diferentes nos dois grupos. O grupo I apresentou um predomínio de CD3 e CD19, enquanto que no grupo II predominaram as células CD19 e CD125. Para cada tipo celular quantificado, o grupo I comparativamente ao grupo II, apresentou maior número de CD3, CD8 e CD4, e menor número de CD19 e CD125. Apesar de estes resultados não terem significado estatístico, admite-se que estas diferenças na composição celular basal nos dois grupos serão reflexo da terapêutica subjacente ao grupo I. Ou seja, o predomínio de CD19 e CD125 no grupo II é característico do infiltrado celular alérgico, enquanto que o predomínio de CD3, CD19 e CD8 e menor quantidade de CD125 poderão corresponder às alterações que a imunoterapia induz no infiltrado celular<sup>1</sup>.

O estudo foi realizado fora do período polínico e verificou-se que a PPNE foi positiva em todos os doentes de ambos os grupos, como documentado pelo *score* de sintomas. Monitorizámos a PPNE com avaliação clínica, designadamente com *score* de sintoma. A monitorização funcional do compromisso nasal, através de rinometria acústica ou rinomanometria, não foi utilizada

porque apenas quantifica a obstrução nasal<sup>17</sup>. Observou-se que a resposta clínica imediata à PPNE foi diferente nos dois grupos. Apesar de em ambos os grupos se ter observado o *score* máximo ao 1º minuto, verificaram-se algumas diferenças nos dois grupos, definindo padrões de resposta à PPNE diferentes. Enquanto que o grupo I apresentou uma evolução temporal do *score* de sintomas, que descreveu um patamar desse *score* nos 1º e 30º minutos, com posterior diminuição até à 6ª hora, o grupo II apresentou um acentuado pico no *score* de sintomas no 1º minuto com rápido decréscimo do *score* aos 30º minuto e 6ª hora. É classicamente reconhecido, que a fase imediata da reacção alérgica nasal se caracteriza clinicamente por esternutos, prurido nasal, rinorreia aquosa e obstrução nasal, que evoluem nos primeiros 30 minutos após a exposição alergénica, com um pico de sintomatologia a ocorrer aos 15-20 minutos<sup>18</sup>. Miadonna *et al*<sup>19</sup>, utilizando a PPNE, descrevem que nestas condições, o pico de sintomatologia nasal ocorre imediatamente após a PPNE com progressivo decréscimo até aos 30 minutos, excepto a evolução da obstrução nasal que descreve um aumento progressivo a partir dos 10-20 minutos. No presente estudo, verificámos que, no grupo II, a evolução temporal da sintomatologia nasal característica da fase imediata correspondeu ao descrito por esses autores. A evolução temporal do *score* de sintomas do grupo I, não correspondeu a este padrão de resposta à PPNE. Observámos que, além de o *score* de sintomas ter sido inferior ao do grupo II, não se observou um pico no 1º minuto, mas um patamar no *score* de sintomas que se manteve até aos 30 minutos. Atribuímos estas diferenças no padrão de resposta imediata à PPNE, como resultado da IT a que o grupo I estava submetido. Tem sido descrito que um dos efeitos da IT é a diminuição da reactividade específica da mucosa nasal, documentada concretamente em estudos

sequenciais comparando intra-individualmente a reactividade ao longo do tratamento. No nosso estudo, admitimos que o menor *score* de sintomas total da fase imediata, no grupo I, seja resultado da IT a que este grupo estava submetido. Admitimos também, que a diminuição da reactividade específica decorrente da IT, se traduza adicionalmente por uma modificação do padrão de resposta temporal ao alergénio, uma vez que observámos que, no grupo I, o *score* foi mais baixo mas foi prolongado nos 30 minutos.

A sintomatologia nasal acompanhou o padrão do *score* total de sintomas, observado em cada um dos grupos respectivamente. Quanto aos sintomas extra-nasais, registou-se um *score* inferior aos sintomas nasais, e ainda descrevendo uma evolução temporal semelhante em ambos os grupos. Atendendo a estes achados admitimos que quanto à resposta clínica à PPNE, em cada grupo o padrão de resposta clínica total reflecte o padrão de resposta clínica nasal, enquanto que a sintomatologia extra-nasal descreveu um padrão muito semelhante nos dois grupos. Deste, na análise do efeito de terapêutica específica na resposta clínica à PPNE o *score* de sintomas nasal será suficiente.

Analisando cada um dos sintomas da fase imediata, em ambos os grupos, verificámos que os esternutos foram o sintoma predominante no 1º minuto, enquanto que ao 30º minuto foi a obstrução nasal. Quanto à evolução temporal, de cada um dos sintomas nasais, verificámos algumas diferenças nos dois grupos. Assim, o *score* dos esternutos apresentou um pico acentuado ao 1º minuto, em ambos os grupos com um *score* muito semelhante, tornando-se nulo aos 30 minutos, no grupo I. O pico do *score* do prurido nasal também ocorreu ao 1º minuto, nos dois grupos, mas menos acentuado no grupo I. Quanto à rinorreia, os dois grupos apresentaram um padrão evolutivo diferente, ou seja o grupo I descreveu um pico aos 30 minutos, enquanto que o grupo II

apresentou o pico do *score* ao 1º minuto. A obstrução nasal apresentou *scores* crescentes até ao 30º minuto, em ambos os grupos, como esperado. A análise comparativa destes dados, coloca a hipótese de que a IT poderá justificar as diferenças encontradas, nomeadamente a diminuição da reactividade específica traduzida pela inferioridade do *score* do prurido, rinorreia e obstrução nasal, no grupo I, ao 1º minuto. Avaliando os esternutos, nesse tempo, não parece haver diferenças entre os dois grupos, pelo que este será um parâmetro clínico de resposta à PPNE, com menor interesse na avaliação da fase imediata.

É reconhecido que a expressão clínica da reacção alérgica, característica da fase imediata, traduz eventos imunológicos que se caracterizam pela activação dos mastócitos, resultante da ligação do alérgeno à IgE específica que reveste a superfície destas células, e culminando na sua desgranulação com libertação de mediadores inflamatórios. A triptase é reconhecida como o marcador da activação dos mastócitos, logo o mediador imunológico característico da fase imediata. No presente estudo, este mediador apenas foi doseável em três doentes, nos lavados nasais obtidos aos 30 minutos, não correspondendo ao esperado. Estes resultados poderão justificar-se por uma cinética diferente do que tem sido descrito, nomeadamente apresentando um pico aos 30 minutos<sup>9</sup>. De facto, outros autores<sup>7</sup> admitem que o pico do doseamento de triptase poderá ocorrer aos 10-15 minutos. Outro factor a ter em conta corresponde a diferentes diluições do lavado nasal adequadas ao doseamento de triptase. No estudo de Raulf-Heimsoth *et al*<sup>20</sup> foi utilizada a mesma técnica laboratorial do nosso estudo (UniCAP), mas os autores concentraram as amostras 5 vezes, e ainda assim apenas obtiveram determinações de triptase em 7 das 15 amostras.

No presente estudo, além de não se reconhecer

eventuais diferentes padrões de resposta imunológica à PPNE, fica por esclarecer uma eventual correlação entre este parâmetro imunológico e os achados clínicos.

A fase tardia da reacção alérgica<sup>18,21</sup> ocorre 4 a 5 horas após a fase imediata, com um máximo entre as 6 e as 12 horas. Clinicamente é caracterizada predominantemente por obstrução nasal e ainda por rinorreia e esternutos.

Neste estudo, a fase tardia foi estudada com a avaliação às 6 horas após a PPNE. Verificámos que os dois grupos apresentaram um padrão de resposta clínica à PPNE diferente, caracterizada por um *score* de sintomas superior no grupo I comparativamente ao grupo II. Observámos ainda, que a resposta clínica à PPNE, no grupo II, correspondeu ao descrito por outros autores, designadamente o predomínio da obstrução nasal. Quanto ao grupo I, predominou a rinorreia ainda que com um *score* muito semelhante à obstrução nasal. Outra diferença importante é que o grupo II ainda apresentou esternutos 6 horas após a PPNE, enquanto que o grupo I apresentou um *score* nulo logo aos 30 minutos que mantém ao longo da observação até à 6ª hora.

Os eventos imunológicos subjacentes à fase tardia<sup>6</sup> são decorrentes da libertação de mediadores inflamatórios por células efectoras da reacção alérgica (mastócitos, basófilos, linfócitos, células epiteliais), nomeadamente citocinas multifuncionais que regulam a duração e a intensidade da resposta imune, promovendo a expressão de moléculas de adesão e recrutamento de células inflamatórias. O infiltrado celular decorrente, composto predominantemente por eosinófilos, é responsável pela libertação de mediadores inflamatórios característicos da fase tardia da reacção alérgica, destacando-se a ECP como marcador da actividade dos eosinófilos.

As alterações observadas e decorrentes da dinâmica celular, em resposta à PPNE, revelaram um aumento de CD3 e CD8 e diminuição de

CD19 em ambos os grupos. Quanto às células CD4 o grupo II apresentou um aumento enquanto que o grupo I demonstrou uma discreta diminuição. As células CD125 sofreram uma diminuição no grupo II e mantiveram-se inalteradas no grupo I. Este padrão da dinâmica da celularidade em resposta à PPNE não se enquadra no reconhecido tráfego celular decorrente da reacção alérgica. Neste estudo, tal poderá ser analisado como uma discrepância do tempo de colheita de amostras celulares e a dinâmica celular de resposta à prova de provocação. Como referido anteriormente, a fase tardia da reacção alérgica tem início às 4-5 horas após exposição alérgica, com pico máximo às 6-12 horas. Realmente outros autores descrevem outros tempos de infiltrado máximo de eosinófilos, nomeadamente às 2-4 horas (Kuna *et al*<sup>12</sup>), às 8 horas (Hanazawa *et al*<sup>22</sup>), às 10 horas (Terada *et al*<sup>23</sup>), enquanto que Miadonna *et al*<sup>19</sup> verificaram um aumento significativo de eosinófilos 6 horas após PPNE, mas com aumento crescente até às 24 horas. Admitimos ainda, que a avaliação das 6 horas, neste estudo, não corresponde ao pico da fase tardia, atendendo à observação da evolução do *score* de sintomas. Especificamente, qualquer um dos *scores* analisados, quer total, quer de cada sintoma *per se*, à 6<sup>a</sup> hora além de serem inferiores ao *scores* registados ao 30<sup>o</sup> minuto, evoluíram em decrescendo, pelo que a avaliação à 6<sup>a</sup> hora, nestes doentes, não corresponderá ao 2<sup>o</sup> pico, característico da fase tardia, o qual se manifestaria com certeza mais tardiamente. Um aspecto adicional que poderá justificar os resultados celulares deste estudo, será o facto de a metodologia de colheita utilizada para caracterização celular não se adequar, ainda que vários autores utilizem o lavado nasal para colheita de células nasais, mesmo em crianças<sup>15</sup>. Lim *et al*<sup>24</sup> concluíram que este método é comparável à biópsia nasal quanto à obtenção de eosinófilos.

Quanto à análise da ECP, marcador da

actividade dos eosinófilos e principal mediador inflamatório da fase tardia, verificou-se que o grupo I revelou valores de ECP inferiores ao grupo II, tanto basais como 6 horas após a PPNE. Apesar de esta diferença não ter significado estatístico, estes resultados reflectirão o efeito da IT. A evolução dos doseamentos de ECP no tempo foi diferente em cada grupo, com um discreto aumento no grupo II e um decréscimo no grupo I. Os resultados do grupo II parecem esboçar a activação de eosinófilos após PPNE. No entanto, seria de esperar que esse aumento fosse mais acentuado. Como é reconhecido que a ECP se correlaciona com os eosinófilos, as hipóteses colocadas para justificar a não correlação entre os achados celulares e a dinâmica celular que era esperada após a PPNE, justificarão de igual modo os eventos evolutivos da ECP observados neste estudo. Adicionalmente, a cinética da ECP não está definida, dificultando o esclarecimento dos resultados de ECP observados. Por outro lado, permanece por definir a importância do ECP e/ou eosinófilos como parâmetro de resposta imunológica à PPNE. Em alguns estudos, o aumento da ECP após PPNE, em lavados nasais, correlacionou-se com a magnitude da reacção alérgica. No entanto, Terada *et al*<sup>23</sup> demonstraram que a contagem de eosinófilos não se correlaciona com a sintomatologia. Outros autores<sup>20</sup> embora complementassem o estudo da reacção alérgica nasal com lavado nasal para doseamento de ECP e escovado nasal para quantificação de eosinófilos, não encontraram correlação entre estes parâmetros justificando-o com o facto de terem sido obtidos por métodos de colheita diferentes. Também DiLorenzo *et al*<sup>8</sup> obtiveram eosinófilos por escovado nasal e ECP no lavado nasal, e verificaram que o ECP mas não os eosinófilos, se correlacionaram com o *score* de sintomas.

Neste contexto de resultados discrepantes, o doseamento de quimiocinas neste estudo

enquadra-se na tentativa de esclarecimento de outros mediadores inflamatórios envolvidos na reacção alérgica, a considerar na avaliação da resposta à PPNE. Concretamente, as quimiocinas Eotaxina e RANTES, sendo mediadores responsáveis por uma potente e selectiva quimiotaxia de eosinófilos, é de relevante interesse o seu exacto envolvimento na reacção alérgica, nomeadamente a sua eventual correlação com a clínica ou com o infiltrado celular, particularmente como parâmetro imunológico de resposta à PPNE.

No entanto, o doseamento de eotaxina neste estudo não demonstrou valores mensuráveis em nenhuma das amostras obtidas. Estes resultados poderão ser justificados pela técnica de colheita utilizada. Alam<sup>25</sup> descreve um método específico para a colheita de citocinas. No entanto, esta técnica é exclusiva para o doseamento de citocinas, não permitindo a obtenção de amostras para contagem celular, cuja metodologia poderá implicar excessivas diluições, e contribuindo para o esclarecimento dos baixos níveis de quimiocinas encontrados. Outro aspecto que poderá justificar a ausência de níveis mensuráveis de Eotaxina poderá relacionar-se com tempos de colheita não coincidentes com a cinética da Eotaxina. Terada *et al*<sup>23</sup> demonstraram que o doseamento de Eotaxina em lavados nasais após PPNE apresenta uma resposta bifásica, com um pico na 1ª hora ( $23 \pm 5$  pg/ml) e níveis crescentes após a 6ª hora ( $11 \pm 1$  pg/ml) até a 10ª hora ( $17 \pm 2$  pg/ml) de monitorização do estudo. Parece-nos que a esta 2ª hipótese poderá justificar melhor os resultados encontrados, uma vez que o doseamento de RANTES demonstrou níveis mensuráveis desta quimiocina, ainda que em valores inferiores aos encontrados por outros autores. No presente estudo, observámos que o padrão de resposta da quimiocina RANTES foi diferente nos dois grupos. Nos lavados nasais basais o doseamento de RANTES foi superior no grupo I, compara-

tivamente ao grupo II. Como referido anteriormente, seria esperado que os valores fossem inferiores, admitindo que a IT diminui o infiltrado celular basal e mediadores, podendo também admitir-se, como referido previamente, que os valores pré-IT fossem superiores aos actuais valores basais. Também a dinâmica do RANTES ao longo do estudo, foi diferente nos dois grupos. No grupo I verificou-se uma descida progressiva desses valores, ao longo da avaliação temporal após PPNE, enquanto que no grupo II se verificou um aumento. A diferença entre os resultados às 6 horas dos dois grupos foi estatisticamente significativa. O aumento progressivo do RANTES após a PPNE, observado no grupo II, foi concordante com o esperado, ainda que este aumento crescente não auxilie no esclarecimento da cinética do RANTES, a qual não é conhecida. Alguns autores<sup>13</sup> caracterizam a cinética do RANTES com um pico 3h após PPNE, enquanto outros<sup>26</sup> descrevem que o pico de RANTES varia entre as 1 e 5 h após PPNE. No estudo de Sim *et al*<sup>13</sup> os níveis de RANTES correlacionaram-se com o *score* da fase tardia.

A análise conjunta dos resultados observados na avaliação das 6 horas apontará para a precocidade desta avaliação em relação à fase tardia, nomeadamente ao grupo de doentes alérgicos submetidos a IT. Ou seja, se analisarmos clinicamente a sua evolução temporal, estes doentes apresentaram um *score* de sintomas nasal, que apesar do predomínio da obstrução, mais característica da fase tardia, apresentavam também rinorreia, prurido e esternutos, que são sintomas mais característicos da fase imediata. Associadamente verificou-se que estes doentes apresentaram um decréscimo de RANTES, ECP e não se observou alteração nas contagens de CD125. Admitimos que neste grupo de doentes, esta discrepância entre os resultados obtidos e esperados, bem como comparados com o grupo II, sejam resultado da terapêutica subjacente ao

grupo I. A diminuição da reactividade específica condicionada pela IT, poderá traduzir-se a nível da fase tardia, não só pela diminuição dos parâmetros avaliados, mas também pelo seu aparecimento mais tardio.

## CONCLUSÕES

Neste estudo foram estudados dois grupos de doentes alérgicos, um dos quais submetido a IT. Apesar de se tratarem de dois grupos com características homogéneas, apresentaram algumas diferenças na avaliação basal, nomeadamente o infiltrado celular descrito, o que poderá corresponder ao esperado para cada um dos grupos relativamente ao seu *status* alérgico, com e sem IT.

Apesar de não se tratar de um estudo prospectivo, com realização de PPNE sequenciais no tempo, de modo a averiguar a evolução da reactividade específica nos dois grupos de doentes, as diferenças encontradas poderão contribuir para o esclarecimento da padronização da monitorização da resposta à PPNE, tanto clínica como imunológica.

A PPNE foi monitorizada com avaliação clínica, enquanto que os lavados nasais foram utilizados para caracterização da resposta imunológica à PPNE. Verificou-se, relativamente a alguns parâmetros analisados, que os dois grupos apresentaram um padrão de resposta à PPNE diferente. Particularmente relevante, e de acordo com o esperado, foi o padrão de resposta clínica à PPNE, em doentes submetidos a IT ser diferente, comparativamente aos doentes alérgicos não submetidos a essa terapêutica. Na monitorização da fase imediata, de acordo com os nossos resultados, a avaliação clínica apresenta-se mais relevante. Quanto à caracterização da fase tardia, quer clínica quer imunológica, na nossa opinião a avaliação às 6 horas após PPNE não parece útil, pela sua precocidade, particularmente no grupo

dos doentes alérgicos submetidos a IT. A diferença estatisticamente significativa do doseamento de RANTES observada às 6 horas, parece fundamentar a necessidade de avaliações posteriores para a caracterização da fase tardia, pois tem sido descrito que a cinética do RANTES apresenta um pico prévio aos eventos imunológicos da fase tardia.

À medida que se vão esclarecendo os eventos imunopatológicos e o complexo intercâmbio entre células e mediadores inflamatórios que caracterizam a reacção alérgica, tanto na sua fase imediata como tardia, melhor se definem os parâmetros de resposta, clínicos e imunológicos, à PPNE com reflexos importantes na monitorização de tratamentos específicos da doença alérgica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nelson HS. *Immunotherapy for inhalants allergens*. In: Allergy Principles & Practice, Middleton E, Reed C *et al.* Eds. St Louis, CV Mosby, 5th edition, 1998: 1050-62.
2. Mellilo G. *Provocation tests with allergens*. Allergy. 1997; 52 (Suppl 35): 5-35.
3. 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: 440-53.
4. Litvyakova LI, Baraniuk JN. *Nasal provocation testing: a review*. Annals of Allergy, Asthma & Immunology. 2001; 86(4): 355-65.
5. Loureiro G. *Provocação nasal específica no controlo da imunoterapia*. Rev Port Imunoalergol. 2001; 9: 123-5.
6. Barnes P. *Pathophysiology of Allergic Inflammation*. In: Allergy Principles & Practice, Middleton E, Reed C *et al.* Eds. St Louis, CV Mosby, 5th edition, 1998: 356-65.
7. Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML, Branco-Ferreira M, Spinola A, Santos MC, Lopes-Pregal A. *Nasal allergen challenge and immunotherapy control*. Allergie et Immunologie, Paris, 1998, 30(5): 153-6.
8. DiLorenzo G, Mansueto P, Melluso M *et al.* *Allergic rhinitis to grass pollen: measurement of inflammatory mediators of mast cell and eosinophils in native nasal fluid lavage and inserum out and durng pollen season*. J Allergy Clin Immunol. 1997; 100: 832-7.
9. Jacobi HH, Skov PS, Kampen GT *et al.* *Histamine and tryptase in nasal lavage fluid following challenge with methacoline and allergen*. Clin Exp Allergy. 1998; 28: 83-91.

10. Gleich GJ. *Mechanisms of eosinophil-associated inflammation*. J Allergy Clin Immunol. 2000; 105: 651-63.
11. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. *Chemokines and allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104: 723-42.
12. 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: 873-9.
13. 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: 927-33.
14. 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.
15. 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: 173-80.
16. Akoum H, Duez C, Vorng H *et al*. *Early modifications of chemokine production and mRNA expression during rush venos immunotherapy*. Cytokine. 1998; 10 (9): 706-12.
17. 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: 468-77.
18. Bousquet and the ARIA workshop group. *Allergic rhinitis and its impact on asthma*. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108: S147-S333.
19. Miadonna A, Milazzo N, Gibelli S, Salmaso C, Lorini M, Tedeschi A. *Nasal response to a single antigen challenge in patients with allergic rhinitis – inflammatory cell recruitment persists up to 48 hours*. Clin Exp Allergy. 1999; 29: 941-9.
20. Raulf-Heimsoth M *et al*. *Nasal lavage mediator profile and cellular composition of nasal brushing material during latex challenge tests*. Clinical and Experimental Allergy. 2000; 30: 110-21.
21. Naclerio RM, Proud D, Togias AG *et al*. *Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis*. N Engl J Med. 1985; 313: 65-70.
22. 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.
23. 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): 575-9.
24. Lim MC, Taylor RM, Naclerio RM. *The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage*. Am J Respir Crit Care Med. 1995; 151: 136-44.
25. 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: 25-9.
26. RajaKulasingham 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.