



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

**Eficácia clínica e alterações na resposta de anticorpos
sistêmicos e de mucosa após imunoterapia sublingual em
crianças alérgicas a ácaros: um estudo randomizado
duplo-cego, controlado com placebo**

MEIMEI GUIMARÃES JUNQUEIRA DE QUEIRÓS

UBERLÂNDIA

Dezembro - 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

**Eficácia clínica e alterações na resposta de anticorpos
sistêmicos e de mucosa após imunoterapia sublingual em
crianças alérgicas a ácaros: um estudo randomizado
duplo-cego, controlado com placebo**

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor

MEIMEI GUIMARÃES JUNQUEIRA DE QUEIRÓS

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Orientador

Dra. Deise Aparecida do Oliveira Silva

Co-orientadora

UBERLÂNDIA

Dezembro - 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

Q3e Queirós, Meimei Guimarães Junqueira de, 1962 -
Eficácia clínica e alterações na resposta de anticorpos sistêmicos e
de mucosa após imunoterapia sublingual em crianças alérgicas a
ácaros: um estudo randomizado duplo-cego, controlado com placebo
/ Meimei Guimarães Junqueira de Queirós. -- 2011.
109 f.: il.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Co-orientadora: Deise Aparecida de Oliveira Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Rinite alérgica - Teses. 2. Dermatophagoides pteronyssinus –
Teses I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Silva, Deise Aparecida de
Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.211-002.193

Aos Meus Pais, Genésio e Milica.

Ao Meu Esposo e Companheiro, Nilvany Queirós.

A todas as crianças, adolescentes e seus pais que participaram deste estudo, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida dos pacientes alérgicos.

“Quando as pessoas em uma grande cidade se sentem sós, isso não quer dizer que lhes faltam companhia humana, mas sim que lhes faltam afeto humano. Conseqüentemente, sua saúde mental acaba sendo enfraquecida. Por outro lado, as pessoas que cresceram em uma atmosfera de afeto humano têm um desenvolvimento muito mais positivo e delicado do corpo, da mente e do comportamento.”

Autor: Sua Santidade, o Dalai – Lama

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, grande mestre, meu orientador, pelo exemplo de luta, de ideal, de esforço e por me incentivar sempre ao estudo e pesquisa.

À Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira e Silva, minha co-orientadora, grande incentivadora da produção científica, pelos ensinamentos, dedicação incansável, dinamismo e amizade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, coordenador e professor do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelo brilhantismo, organização e didática ao ensinar.

À Prof^a. Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena pelos ensinamentos em Biologia Molecular, pelo profissionalismo, mais ainda, pela sincera amizade.

À Prof^a. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro pela incansável dedicação, organização e competência diante de tão relevante tarefa nos anos que esteve à frente deste Programa de Pós - Graduação.

À Prof^a. Dra Myrthes Toledo Barros, por ter me introduzido à iniciação científica. Sempre a admirei diante de sua sabedoria, humildade e amizade perante os pacientes. Muito obrigada por aceitar o convite para minha defesa de doutorado. Serei- lhe sempre grata por este gesto.

Ao Prof. Dr. Régis de Albuquerque Campos, Prof. Dr. Fábio de Oliveira, Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo, Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior, Prof^a. Dra. Neide Maria da Silva, pelo aceite em compor a banca examinadora, colaborando com correções e sugestões para o aprimoramento deste estudo.

À Profa. Dra. Júlia Maria Costa Cruz, Gesmar Rodrigues Silva Segundo e Fábio de Oliveira, que aceitaram participar do exame de Qualificação, pelas valiosas e importantes orientações apresentadas.

À Dra. Maria Letícia Chavarria e Dr. Glauco Baiocchi Jr, vocês foram simplesmente o início de tudo, o impulso de minhas vitórias. A força de um pequeno gesto é o caminho para alcançar uma conquista final, onde com certeza muitos já se beneficiaram.

À Prof^a. Dra. Maria Aparecida de Souza pelo exemplo de sabedoria e o contínuo seguir em frente na luta pelo saber.

Ao professor Dr. Manoel Medeiros Junior (in memoriam) a quem devo o aprendizado de um exemplo de vida e dedicação.

Aos sinceros amigos da Alergia, em suas incansáveis vindas à Itumbiara em prol deste trabalho, pela amizade, pelo apoio ao acervo bibliográfico e pelas importantes contribuições: Leandro Hideki Ynoue e Isabella Lima Siman.

Aos dedicados amigos companheiros da Imunologia, pela grande colaboração nesta pesquisa: Fernando Lourenço Pereira, Jorge Fernando Carísio Fernandes, Juliana Silva Miranda, Karine Cristina de Almeida, Núbia da Silva Araújo e Priscila Ferreira de Sousa Moreira.

Aos amigos dos laboratórios de Alergia e Imunoparasitologia: Ana Cláudia Pajuaba, Bia Acerbi, Cristiane Teixeira, Cristina Rostkowska, Diego Miranda, Ronaldo Alves, Tiago Mineo, pelo exemplo de companheirismo, momentos de alegria e amizade que compartilhamos juntos.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia Marley Dantas Barbosa, Zilda Mendonça da Silva Rodrigues, que diariamente contribuíram para o bom andamento desse estudo.

À equipe de profissionais do NABS (Núcleo de Ações Básicas de Saúde de Itumbiara–GO) pela importantíssima colaboração e levantamento de dados junto aos pacientes: Alana Ribeiro dos Santos, Alessandra Alves de Oliveira, Carlos José Muzzi, Eliamar Flávio, Fany Anne Araújo Ferreira, Dr. Hamilton Fukuhara Chiba,

Hilton Monteiro Borghi, Maria Odete de Lima, Neivane Léia Gonçalves dos Santos Gomes, Núbia Rosirlane Freire Da Costa, Suyen May Chaves Nunes.

Às crianças, adolescentes, mães, pais e avós que incansavelmente ajudaram com sua presença, informações, bem como interesse em participar e contribuir com o bom andamento deste estudo.

Aos pacientes que souberam compreender as minhas falhas e me apoiaram durante o tempo de seguimento clínico, contribuindo de maneira fundamental para que o andamento deste trabalho prosseguisse adiante.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai Genésio Borges Andrade (in memoriam), que como médico dedicado e incansável nos deu seu exemplo de vida, de esforço, de luta, de paciência e humildade, jamais se queixando do exercício da medicina. Abnegado com todos seus pacientes, familiares e filhos, soube nos deixar o seu exemplo. Obrigada.

À minha mãe Maria Abadia Ribeiro Andrade (Milica), que durante toda a sua vida nos exemplificou com sua luta em favor dos excluídos pela sociedade, com o seu dinamismo e sua coragem de vencer; sempre em busca de um ideal – o de servir. Ela nos ensinou que com o nosso esforço é possível vencer. Muito Obrigada.

Ao meu dedicado companheiro Nilvany Junqueira de Queirós, pelo seu apoio incondicional, incentivo, paciência e colaboração durante toda a nossa jornada nestes vinte e quatro anos de luta. Não há realmente palavras que completem toda a vontade de agradecer, mais uma vez o meu muito obrigada.

Às minhas queridas filhas Luiza Emília Guimarães de Queirós, Camila Andrade Ribeiro, Lia Guimarães de Queirós e Mariela Guimarães de Queirós, que sempre apoiaram todas as minhas iniciativas. Obrigada pelo carinho de vocês, dedicação e pela alegria que me proporcionam. Vocês realmente são o meu maior motivo de luta e determinação.

Às minhas irmãs Priscila e Moabe, ao meu irmão Murilo, aos meus sobrinhos e sobrinhas Yana, Natália, César, Gabriela, Genésio Neto, Bernando, Isabela, Guilherme, Lara, Renato, Samara e Marília, pela oportunidade de compartilhar com vocês a minha existência.

Agradeço a Jesus, que com o seu exemplo nos trouxe tantos ensinamentos. Sem eles se tornaria impossível entender os conflitos atuais de nossa humanidade. Com suas lições encontramos a razão de sempre prosseguirmos adiante.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (<i>2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid</i>)
ARIA	Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma (<i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>)
BSACI	Sociedade Britânica de Alergia e Imunologia Clínica (<i>British Society for Allergy and Clinical Immunology</i>)
CD	Marcador de Grupo de Diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DC	Células dendríticas
Der f	Alérgeno de <i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p 1	Alérgeno principal do grupo 1 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p 2	Alérgeno principal do grupo 2 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DO	Densidades ópticas
Dpt	Extrato total de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Dpt+MRB	Extrato de Dpt associado à suspensão de bactérias respiratórias (<i>Dpt allergen plus mixed respiratory bacterial extracts</i>)
EEACI	Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica (<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>)
F	Feminino
Fc	Fragmento cristalizável
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade do Tipo I
FDA	Laboratório FDA Allergenic Ltda, Rio de Janeiro, Brasil
GINA	Global Initiative for Asthma
GM-CSF	Fatores estimuladores de colônias de granulócitos e macrófagos
HDM _s	Ácaro da poeira domiciliar (<i>House dust mites</i>)
IDO	Acetato dioxigenase de indeolamine
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G

IgM	Imunoglobulina de classe M
IL-10	<i>Interleucina-10</i>
ISAAC	Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância (<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>)
M	Masculino
mcg	Micrograma
mg	Miligramas
µg	Microgramas
MGJQ	Meimei Guimarães Junqueira de Queirós
ml	Mililitros
MRB	<i>Mixed Respiratory Bacterial Extracts</i> (Bactérias Mistas do Trato Respiratório)
PFE	Pico de Fluxo Expiratório
PSFs	Programas de Saúde da Família
RA	Rinite Alérgica
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Express (Quimiocina CCL5)
SCIT	Imunoterapia subcutânea (<i>Subcutaneous immunotherapy</i>)
SIT	Imunoterapia Específica
SLIT	Imunoterapia sublingual (<i>Sublingual immunotherapy</i>)
SPT	Skin Prick Test
SUS	Sistema Único de Saúde
TCP	Teste Cutâneo de Puntura
TGF-β	Transforming Growth Factor (Fator de transformação de crescimento)
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TLRs	Receptores Toll-like
Tr1	Células T reguladoras tipo 1
Treg	Células T reguladoras
UI	Unidades internacionais
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Demonstrativo da classificação da gravidade da asma	26
Tabela 2 – Esquema da imunoterapia sublingual, com as fases, concentrações, volume e intervalo de administração.	53
Tabela 3 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do estudo dos pacientes que completaram a imunoterapia sublingual.....	61
Tabela 4 – Efeitos adversos e razões de desistências da SLIT.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da classificação atual da rinite alérgica, de acordo com sua duração e gravidade. Adaptado de: Bousquet; Van Cauwenberge, et al. (2001); Bousquet, J; Khaltaev, et al. (2008).....24

Figura 2 – Mecanismo fisiopatológicos de rinite e asma alérgica. GM- CSF, Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos; PAF, Fator Ativador de Plaquetas. Os pacientes sensibilizados, na Rinite e Asma Alérgica, têm anticorpos IgE para alérgenos específicos que se ligam aos receptores na superfície de mastócitos. Ocorre uma ligação cruzada das moléculas adjacentes à IgE com ruptura e degranulação de mastócitos na re-exposição ao alérgeno específico. Neste momento os mastócitos liberam uma variedade de mediadores químicos que podem ser pré-formados ou neoformados e que darão origem aos sintomas típicos da reação de fase imediata e/ou de reação de fase tardia. (SCADDING, DURHAM, et al., 2008).....30

Figura 3 – Dinâmica de células T reguladoras em alergia. *Adaptado de: Moingeon et al, (2006).* As Treg produzem IL-10 e/ou TGF- β e são induzidas em imunoterapia bem sucedida em pacientes atópicos e durante a exposição natural ao alérgeno em pessoas saudáveis. Células T reguladoras podem controlar e regular mecanismos efetores ativados na alergia e respostas Th2, por meio da produção de IL-10/TGF- β e/ou contato célula-célula. IL-10 é um potente supressor da produção de IgE total e específica ao alérgeno por induzir a mudança de isotipo de anticorpo para IgG4. TGF- β diminui a produção de IgE e induz mudança de isotipo para IgA. IL-10 e TGF- β atuam direta ou indiretamente nas vias aéreas por diminuírem a produção de muco e hiperreatividade nas vias aéreas. 31

Figura 4 – Mecanismos imunes humoral e celular envolvidos na alergia do tipo I e imunoterapia: uma visão integrada. *Adaptado de: Moingeon, Batard, et al, (2006).* Células T helper CD4 + Th1, Th2 ou T reg estimuladas após a exposição alérgica ou após dessensibilização são fundamentais no controle de diversos componentes do sistema imunológico. Isto ocorre através da produção de citocinas distintas. IL-4 e IL-13 induzem a mudança de isotipo de IgE, IL-5 estimula recrutamento e ativação de eosinófilos e IL-13 aumenta a produção de muco. T regs inibem tanto Th1 e Th2 por meio da produção de IL-10 e TGF β . Enquanto pacientes atópicos apresentam desvio de resposta Th2 CD4 + alérgeno-específicas, pessoas saudáveis quando expostas a alérgenos, desviam seu eixo para uma resposta de células T reg. Assim, o objetivo da imunoterapia alérgeno-específica é restaurar a tolerância mudando de respostas de Th2 para resposta de células T Reg. 39

Figura 5 – Mecanismos Imunológicos da Imunoterapia Sublingual Alérgeno Específica. Adaptado de: Novak; Bieber; Allam, (2011). Proposta de mecanismos locais e sistêmicos da imunoterapia sublingual alérgeno-específica (SLIT).....41

Figura 6 – Diagrama de fluxo nas fases de imunoterapia sublingual (SLIT) para alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em pacientes randomizados em três grupos de tratamento: DPT (extrato de alérgeno Dpt), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias), e Placebo. Um total de 70 pacientes completaram o estudo, devido à desistência de 32 participantes pertencentes aos grupos DPT (N = 8), DPT+MRB (N = 11) e Placebo (N = 13). As análises de seguimento foram conduzidas de forma duplo-cega e a revelação dos grupos foi realizada apenas após a conclusão de todas as análises clínicas e imunológicas.....60

Figura 7 – Avaliação clínica dos pacientes submetidos à imunoterapia sublingual (SLIT) para alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em três grupos randomizados de tratamento: DPT (pacientes que receberam alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (pacientes que receberam alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (pacientes que receberam somente diluente das vacinas; n = 19). Escores de sintomas de rinite (A) e de asma (B); Escores de medicação para rinite (C) e asma (D). As barras horizontais (preto) indicam as medianas e linhas verticais (cinza) indicam o intervalo (min a max) para cada grupo. Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001).....64

Figura 8 – Avaliação da reatividade cutânea dos pacientes submetidos à imunoterapia sublingual (SLIT) para alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em três grupos randomizados de tratamento: DPT (pacientes que receberam alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (pacientes que receberam alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (pacientes que receberam somente diluente das vacinas; n = 19). Os resultados do teste cutâneo de puntura (TCP) estão demonstrados pelo tamanho da pápula (mm). As barras horizontais (preto) indicam as medianas e linhas verticais (cinza) indicam o intervalo (min a max) para cada grupo. A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade do TCP (>3 mm). 65

Figura 9 – Níveis de IgE aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (A, D) e a seus alérgenos principais Der p 1 (B, E) e Der p 2 (C, F) em soros de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em *box plot* (A, B, C) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (*p < 0,05). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (D, E, F). Diferenças significativas entre os grupos em cada tempo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (# p < 0.05 em relação ao placebo).....67

Figura 10 – Níveis de IgG4 aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (A, D) e a seus principais alérgenos Der p 1 (B, E) e Der p 2 (C, F) em soros de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (A, B, C) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (D, E, F). Diferenças significativas entre os grupos em cada tempo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (# p < 0.05 em relação ao placebo; ## p < 0.05 em relação aos grupos DPT+MRB e placebo).....68

Figura 11 – Níveis de IgG1 aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (A, D) e a seus principais alérgenos Der p 1 (B, E) e Der p 2 (C, F) em soros de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (A, B, C) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (D, E, F). Diferenças significativas entre os grupos em cada tempo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (## p < 0.05 em relação aos grupos DPT+MRB e placebo). 69

Figura 12 – Níveis de IgA aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (A, D) e a seus principais alérgenos Der p 1 (B, E) e Der p 2 (C, F) em amostras de saliva de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (A, B, C) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (D, E, F). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05). 71

Figura 13 – Níveis de IgA aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (A, D) e a seus principais alérgenos Der p 1 (B, E) e Der p 2 (C, F) em amostras de fluido do lavado nasal de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (A, B, C) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (D, E, F). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05). 72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1.	Aeroalérgenos	22
1.2.	Rinite Alérgica	22
1.3.	Asma	24
1.4.	Imunopatogenia da Alergia - Rinite e Asma	28
1.5.	Relação Clínica: Asma e Rinite alérgica	32
1.6.	Diagnóstico de Alergia	33
1.6.1.	Testes Cutâneos e IgE Sérica	33
1.6.2.	Alergia e Dosagem de IgG e IgA Específicas	33
1.7.	Educação Ambiental no Manejo da Asma e Rinite Alérgica	34
1.8.	Tratamento de Rinite e Asma	35
1.9.	Imunoterapia	36
1.10.	Programa de Educação em Asma e Rinite em Itumbiara/Go	42
1.11.	Informações Adicionais	44
2	OBJETIVOS	46
2.1.	Objetivo Geral	47
2.2.	Objetivos Específicos	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1.	Aspectos Éticos	49
3.2.	Pacientes	49
3.3.	Desenho do Estudo	50
3.4.	Avaliação Clínica e Medidas de Segurança	53
3.5.	Teste Cutâneo de Punctura	54
3.6.	Amstras de Sangue, Saliva e Fluido de Lavado Nasal	54

3.7.	Determinação dos Níveis de Anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 Específicos a Alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i> em Amostras de Soro	55
3.8.	Determinação dos Níveis de Anticorpos IgA Específicos a Alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i> em Amostras de Saliva e Fluido de Lavado Nasal	57
3.9.	Quantificação de IgE Sérica Total	58
3.10.	Análise Estatística.....	58
4	RESULTADOS	59
4.1.	Caracterização dos Pacientes no Início do Estudo	60
4.2.	Efeitos Adversos da SLIT	62
4.3.	Avaliação Clínica e da Reatividade Cutânea	63
4.4.	Resposta de Anticorpos Séricos IgE, IgG4 e IgG1 Específicos a <i>D. pteronyssinus</i> após SLIT	65
4.5.	Resposta de Anticorpos IgA Salivares e de Fluido de Lavado Nasal Específicos a <i>D. pteronyssinus</i> Após SLIT	70
5	DISCUSSÃO	73
5.1.	Discussão.....	74
6	CONCLUSÃO	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8	ANEXOS	101
	ANEXO 1 – Aprovação do Projeto de Pesquisa CEP	102
	ANEXO 2 – Termo de Consentimento	103
	ANEXO 3 – Plano de Ação.....	105
	ANEXO 4 – Questionário Rinite	106
	ANEXO 5 – Questionário Asma	108
	ANEXO 6 – Efeitos Colaterais.....	110

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia clínica e alterações da resposta de anticorpos sistêmicos e de mucosa após a imunoterapia sublingual (SLIT), utilizando alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt), com ou sem extratos bacterianos em crianças alérgicas a ácaros. Cento e dois pacientes com rinite alérgica com ou sem asma foram selecionados para um estudo randomizado duplo-cego, controlado por placebo e distribuídos em três grupos: DPT (extrato alergênico de Dpt, n=34), DPT+MRB (extrato alergênico de Dpt associado com extrato de bactérias mistas do trato respiratório, n=36), e Placebo (n=32). Avaliação clínica e análises imunológicas foram realizadas antes do tratamento e após 12 e 18 meses, incluindo a pontuação de escores de sintomas e medicamentos de rinite/asma, teste cutâneo (SPT) ao extrato Dpt, e medidas de anticorpos específicos IgE, IgG4 e IgG1 para Dpt, Der p 1, Der p 2 no soro e IgA específicos na saliva e no lavado nasal. Os resultados clínicos mostraram uma redução significativa nos escores de sintomas de rinite/asma em todos os grupos, mas o uso de medicamentos diminuiu apenas no grupo DPT após 12 meses. Resultados de SPT não mostraram mudanças significativas e SLIT foi geralmente segura, sem reação sistêmica grave. SLIT usando somente alérgeno Dpt induziu aumento dos níveis de IgG4 para Dpt, Der p 1 e Der p 2 no soro, e aumentou os níveis de IgG1 no soro e salivares de IgA para Dpt e Der p 1. SLIT usando DPT+MRB foi capaz de diminuir os níveis de IgE para Der p 2, aumentar os níveis salivares de IgA para Der p 1, mas não tiveram alterações nos níveis de anticorpos específicos de IgG4 e IgG1. Em conclusão, foi observado melhora clínica tanto no grupo da SLIT como do controle, porém somente na SLIT com alérgeno foi capaz de modular as respostas de anticorpos sistêmicos e de mucosa. Estes achados reforçam o papel de anticorpos IgG4 e IgG1 séricos específicos, além de IgA salivar, como prováveis anticorpos bloqueadores ou biomarcadores de tolerância que podem ser úteis para monitoramento da imunoterapia alérgeno-específica.

PALAVRAS-CHAVE: IgA, IgE, IgG4, IgG1, rinite alérgica, *Dermatophagoides pteronyssinus*, imunoterapia sublingual (SLIT); saliva.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the clinical efficacy and systemic/mucosal antibody response changes after sublingual immunotherapy (SLIT) using *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) allergens with or without bacterial extracts in mite-allergic children. One-hundred and two patients presenting allergic rhinitis with or without asthma were selected for a randomized double-blind, placebo-controlled trial and distributed into three groups: DPT (Dpt allergen extract, n=34), DPT+MRB (Dpt allergen plus mixed respiratory bacterial extracts, n=36), and Placebo (n=32). Clinical evaluation and immunological analyses were carried out before and after 12 and 18 months of treatment, including rhinitis/asthma symptom and medication scores, skin prick test (SPT) to Dpt extract, and measurements of Dpt, Der p 1, Der p 2 specific IgE, IgG4, and IgG1 in serum and specific IgA in saliva and nasal lavage fluid. Clinical results showed a significant decline in rhinitis/asthma symptom scores in all groups, but medication use decreased only in DPT group after 12 months. SPT results showed no significant changes and SLIT was generally safe, with no severe systemic reactions. SLIT using Dpt allergen alone induced increased serum IgG4 levels to Dpt, Der p 1 and Der p 2, and increased serum IgG1 and salivary IgA levels to Dpt and Der p 1. SLIT using DPT+MRB was able to decrease IgE levels to Der p 2, to increase salivary IgA levels to Der p 1, but had no changes on specific IgG4 and IgG1 levels. In conclusion, clinical improvement was observed both in the SLIT group and the control, but only active SLIT was able to modulate the mucosal/systemic antibody responses. These findings support the role of specific serum IgG4 and IgG1, in addition to salivary IgA, as probable blocking antibodies or biomarkers of tolerance that may be useful for monitoring the allergen specific immunotherapy.

KEYWORDS: IgA, IgE, IgG4/IgG1 subclasses, allergic rhinitis, *Dermatophagoides pteronyssinus*, sublingual immunotherapy (SLIT), saliva.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Aeroalérgenos

O papel da exposição alergênica a ácaros da poeira domiciliar (HDMs) na sensibilização e desenvolvimento da rinite alérgica e asma, especialmente em pacientes pediátricos, tem sido reconhecida em todo o mundo (PLATTS-MILLS; THOMAS, et al., 1992; TOVEY, 2004).

O exame dos extratos de ácaros da poeira domiciliar indicou que mais de 30 proteínas diferentes podem induzir anticorpos IgE nestes pacientes alérgicos. Entre estes ácaros, *Dermatophagoides* spp é a principal fonte de alérgenos para a indução de alergia respiratória mediada por IgE em pacientes pediátricos. Vários ensaios clínicos randomizados envolvendo alérgenos de ácaros da poeira domiciliar foram realizados em crianças (BUSH; SWENSON, et al., 2011) (YONEKURA; OKAMOTO, et al., 2010). Existem alérgenos específicos dominantes especialmente o grupo 1 e 2 de alérgenos que podem ser responsáveis por grande parte da alergenicidade de extratos. Dentre os alérgenos já caracterizados, os principais que se ligam a IgE tem sido aqueles dos grupos de alérgenos 1, 2, 3, 9, 11, 14 e 15 (THOMAS; SMITH, et al., 2002).

Os alérgenos do grupo 1 (por exemplo, Der p 1 e Der f 1) estão associados na membrana peritrópica das bolotas fecais (TOVEY; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1981) e os alérgenos do grupo 2 (Der p 2 e Der f 2) estão relacionados a componentes do corpo desses animais (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001).

A dosagem de alérgenos principais é relevante para controle de qualidade e padronização do diagnóstico e terapêuticas com extratos de alérgenos. Os alérgenos de ácaros na poeira estão associados com a prevalência, sensibilização e controle da doença (MATHESON, 2005).

1.2. Rinite Alérgica

A Rinite Alérgica é definida como inflamação da mucosa de revestimento nasal, mediada por IgE, após exposição a alérgenos, cujos sintomas (obstrução nasal, rinorréia aquosa, espirros e prurido nasal) são reversíveis espontaneamente ou com tratamento. A rinite alérgica em geral acompanha-se de prurido e de lacrimejamento ocular, podendo ocorrer também prurido no conduto auditivo externo, palato e faringe. Esses sintomas ocorrem durante dois ou mais dias consecutivos e por mais

de 1 hora na maioria dos dias (BOUSQUET; KHALTAEV, et al., 2008). É freqüente encontrarmos co-morbidades na rinite alérgica como o respirador bucal, otite, rinossinusite e asma (SOLÉ; WECKX, et al., 2006).

A rinite alérgica é uma doença respiratória crônica importante devido à sua frequência e impacto na qualidade de vida, impacto no trabalho, escola desempenho, produtividade, ônus econômico e inter-relações com a asma. Além disso, a rinite alérgica está associada com sinusite e outras co-morbidades como conjuntivite. Ela deve ser considerada como um fator de risco para a asma, juntamente com outros fatores de risco conhecidos (BOUSQUET; KHALTAEV, et al., 2008).

A classificação e diagnóstico da Rinite Alérgica foram realizados pelo ARIA (Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma) conforme Bousquet, Van Cauwenberge e colaboradores (2001) e posteriormente validados por Demoly, Allaert e colaboradores (2003) e Bousquet, J; Khaltaev e colaboradores (2008) e se encontra na figura 1. Segundo esta classificação da rinite alérgica, deve-se levar em consideração a duração e a gravidade dos sintomas, incluindo aspectos da qualidade de vida. De acordo com a duração ela pode ser classificada em intermitente ou persistente. De acordo com a gravidade dos sintomas e do seu impacto na vida social como escola, trabalho, lazer, esporte e sono; ela pode ser classificada como leve ou moderada/grave.

A prevalência de rinite e sintomas relacionados entre escolares brasileiros, com faixa etária de 6 a 14 anos e participantes do ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Chidhood) concluiu que os sintomas nasais no último ano sem estar resfriado (rinite) variaram de 26,6 % a 34,2 % e com diagnóstico de rinite realizado por médico teve uma variação de 19,9 % a 25,7 % (SOLÉ, WECKX, et al., 2006).

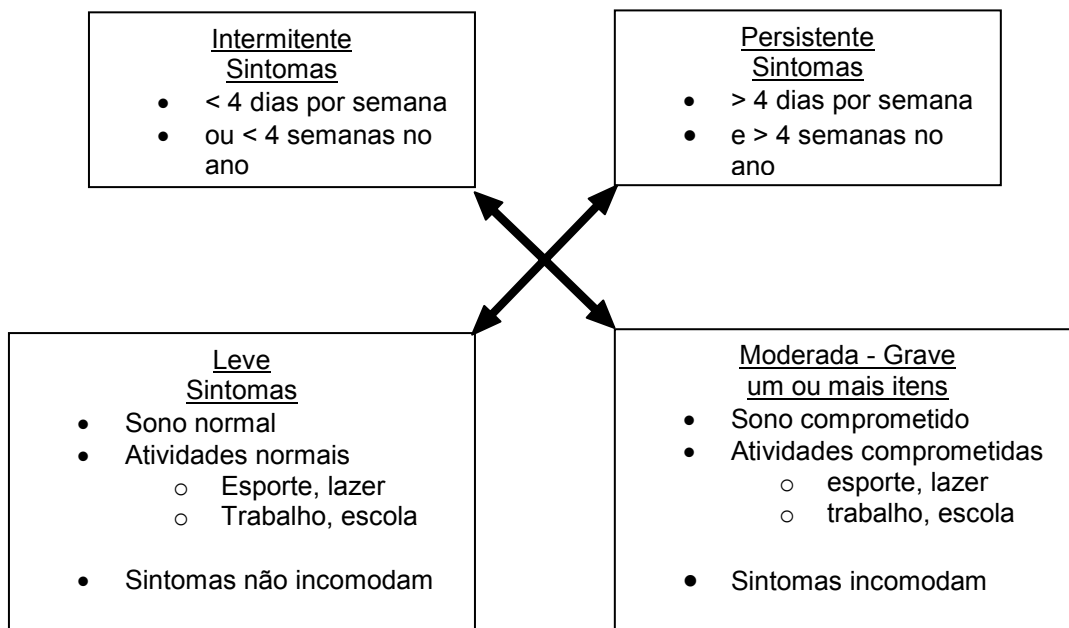


Figura 1 – Representação esquemática da classificação atual da rinite alérgica, de acordo com sua duração e gravidade. Adaptado de: Bousquet; Van Cauwenberge, et al. (2001); Bousquet, J; Khaltaev, et al. (2008)

1.3. Asma

A asma é uma doença heterogênea causada por diferentes fenótipos, podendo se manifestar tanto na infância quanto na vida adulta. O conceito mais atual de asma foi formulado pelo Consenso Internacional do GINA (Global Initiative for Asthma) (BATEMAN; HURD, et al., 2008): “Doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares estão envolvidos. A inflamação crônica causa aumento da hiperreatividade brônquica levando a episódios recorrentes de sibilância, opressão torácica, dispnéia e tosse, principalmente a noite e ao despertar; usualmente associados a obstrução variável ao fluxo aéreo, parcialmente reversível de forma espontânea ou com tratamento (O'BYRNE; BATEMAN, et al., 2007).

A asma em crianças pode ser definida como crises que se repetem de obstrução respiratória e sintomas intermitentes de aumento da reatividade das vias aéreas a fatores desencadeantes, tais como o exercício físico, exposição a alérgenos e infecções virais (BACHARIER; BONER, et al., 2008; ILLI; VON MUTIUS, et al., 2006). No entanto, a definição se torna mais difícil de aplicar em lactentes e pré-escolares, pois é uma fase em que as crianças apresentam episódios

recorrentes de tosse e/ou sibilância. Embora estes sintomas sejam comuns neste período, eles são freqüentemente transitórios, e 60% destas crianças com sibilância estarão saudáveis na idade escolar (MORGAN; STERN, et al., 2005). Assim, é importante excluir diagnósticos além de asma, e estar ciente da história de sibilância recorrente na infância. A asma é um grave problema de saúde global. Pessoas de todas as idades nos países em todo o mundo são afetadas por essa desordem crônica das vias aéreas que, quando não controlada, pode colocar sérios limites sobre a rotina do dia a dia e às vezes ela é fatal. A prevalência da asma está aumentando em muitos países, especialmente entre as crianças. (O'BYRNE; BATEMAN, et al., 2007).

Hoje entre as enfermidades da infância, a asma infantil é certamente a doença crônica que mais merece atenção do ponto de vista da morbidade e pode ser considerada a principal doença respiratória crônica da criança e do adolescente. (MAIA; MARCOPITO, et al., 2004; SOLÉ; CAMELO-NUNES, et al., 2004).

A asma afeta aproximadamente de 7 a 10% da população. A estimativa de prevalência média mundial da asma mostrou ser de 11,6% entre escolares (seis e sete anos) e de 13,7% entre adolescentes (treze e catorze anos). No Brasil encontram-se índices elevados, em torno de 20% para as duas faixas etárias, segundo dados do International Study for Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; SOLÉ, 2005).

A classificação e o diagnóstico de asma foi realizado conforme o GINA (*Global Initiative for Asthma*) (BATEMAN; HURD, et al., 2008), e está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Demonstrativo da classificação da gravidade da asma

Demonstrativo da classificação da gravidade da asma.

Classificação da gravidade da asma

Características Clínicas Antes do Tratamento

Intermitente

Sintomas menos uma vez por semana
Exacerbações Breves
Sintomas Noturnos não mais do que duas vezes por mês
VEF1¹ ou PFE $\geq$ 80% do previsto
PFE² ou VEF1 variabilidade <20%

Persistente leve

Os sintomas mais de uma vez por semana, mas menos de uma vez por dia
Exacerbações podem afetar a atividade e o sono
Sintomas noturnos mais de duas vezes por mês
VEF1 ou PFE $\geq$ 80% do previsto
PFE ou VEF1 Variabilidade <20-30%

Persistente moderada

Sintomas diários
Exacerbações podem afetar a atividade e o sono
Sintomas noturnos mais de uma vez por semana
O uso diário de inalação curta-agonista β 2
VEF1 ou PFE 60-80% do previsto
PFE ou VEF1 variabilidade > 30%

Grave e persistente

Sintomas diários
Exacerbações freqüentes
Freqüentes sintomas de asma noturna
Limitação de atividades físicas
VEF1 ou PFE $\leq$ 60% do previsto
PFE ou VEF1 variabilidade > 30%

¹ VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo

² PFE: pico de fluxo expiratório

Fonte: Bateman; Hurd, et al. (2008).

Diagnóstico Clínico

No diagnóstico clínico, a história do paciente é muito importante. Os sintomas que sugerem este diagnóstico de asma são dispnéia episódica, sibilos, tosse e obstrução torácica (LEVY; FLETCHER, et al., 2006). Sintomas episódicos podem ocorrer após uma exposição incidental a alérgenos. A variabilidade sazonal dos

sintomas e história familiar positiva para asma e doença atópica são também úteis no diagnóstico. O comportamento desses sintomas que sugerem fortemente um diagnóstico da asma são: variabilidade e precipitação por irritantes inespecíficos, tais como o fumo, cheiros fortes ou exercício; piora à noite, e responde bem à terapia adequada para asma. Em alguns indivíduos sensibilizados, a asma pode ser exacerbada por aumentos sazonais de aeroalérgenos específicos, como fungos, grama, e pólenes (YSSEL; ABBAL, et al., 1998). A asma pode ser manifestada em alguns pacientes, com o sintoma único de tosse crônica, sendo comum em crianças e muitas vezes é pior no período noturno. A criança pode estar normal durante o dia. A atividade física é uma importante causa de sintomas de asma e para alguns é a única causa. No exame físico, o achado anormal mais frequente são sibilos na ausculta, uma descoberta que confirma a presença de limitação do fluxo aéreo. No entanto, em alguns indivíduos com asma, a sibilância pode estar ausente (BATEMAN; HURD, et al., 2008).

Testes Funcionais

Os testes funcionais para diagnóstico e monitoramento atualmente mais utilizados são: Espirometria, PFE (Pico de Fluxo Expiratório) e Teste de Broncoprovocação.

Espirometria

Embora o diagnóstico da asma seja normalmente baseado na presença de sintomas característicos, os pacientes com asma, freqüentemente, têm pobre reconhecimento de seus sintomas e má percepção da gravidade dos mesmos, especialmente se a asma é de longa data (KILLIAN; WATSON, *et al.*, 2000). A avaliação de sintomas como dispnéia e sibilância por médicos também podem ser imprecisos. Para pacientes com mais de 5 anos de idade, medidas de função pulmonar para confirmar a limitação do fluxo aéreo e, em especial a demonstração de reversibilidade das alterações da função pulmonar, fortalecem a confiança no diagnóstico. (EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY BY MANEY PUBLISHING, 1993; PELLEGRINO; VIEGI, et al., 2005).

Pico de fluxo expiratório (PFE)

O pico de fluxo expiratório (PFE) é o conjunto de medições realizadas usando um medidor de pico de fluxo e também pode ser um importante auxílio no diagnóstico e no acompanhamento da asma. Medidas do PFE são também muito dependentes do esforço e a qualidade pode ser pobre. Portanto, as medidas devem ser sempre comparadas com as medidas anteriores do próprio paciente (REDDEL; MARKS; JENLINS, 2004) usando cada qual o seu próprio medidor de pico de fluxo.

Broncoprovocação

É a medida da reatividade das vias aéreas para pacientes com sintomas compatíveis com asma, mas a função pulmonar normal. São realizadas medidas de reatividade das vias aéreas à metacolina, histamina, manitol, monofosfato de adenosina ou a esforços físicos, e com isto podem ajudar a estabelecer um diagnóstico mais preciso de asma (COCKCROFT, 2003).

1.4. Imunopatogenia da Alergia - Rinite e Asma

Embora existam diferenças imunopatológicas, as reações que ocorrem após a exposição antigênica são as mesmas para a asma e a rinite alérgica. Caracterizam-se por uma reação alérgica imediata, tipo I, podendo ocasionar reação de fase imediata e/ou reação de fase tardia (figura 2); inflamação crônica do epitélio e da submucosa. Estão envolvidas neste processo células epiteliais, células de Langerhans, células dendríticas (DCs) e outras células apresentadoras de antígenos. A medula óssea participa ativamente na produção de células inflamatórias por meio do aumento do número de células precursoras, diante da provocação antigênica (DENBURG, 1999). O envolvimento da medula óssea neste processo revela ainda o caráter sistêmico da asma e do binômio asma-rinite alérgica. Ocorre também recrutamento e ativação de linfócitos CD4+ do perfil Th2 e de células efectoras, tais como, eosinófilos, basófilos e mastócitos, e aumenta a expressão de citocinas, especialmente IL-4 (interleucina 4) e IL-13, que atuam na produção local de IgE e têm inegável papel neste processo. A expressão de outras

citocinas também está aumentada, como é o caso de GM-CSF, RANTES, IL-3 e da IL-5, que atua prolongando a meia-vida dos eosinófilos.

A produção de mediadores inflamatórios pré-formados, como a histamina, triptase, quinases, responsáveis pelo desencadeamento dos sintomas da fase imediata, e de proteases neoformadas, como leucotrienos, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária e de neurotransmissores responsáveis pelos sintomas da fase tardia, tem perfil de ação semelhante nas vias aéreas superiores e inferiores, embora a atuação de cada um deles no órgão-alvo pareça ter um caráter diferente. A reação de fase tardia se desenvolve horas após (4 a 6 horas) a provocação antigênica, dependendo do grau de exposição e da sensibilidade individual. É responsável pela persistência da sintomatologia, sendo que o recrutamento das células inflamatórias diminui o limiar de resposta aos estímulos antigênicos, fazendo com que a exposição contínua a baixas concentrações de aeroalérgenos provoque inflamação persistente da mucosa nasal e/ou brônquica (figura 2). (WENZEL, 2006; HOLGATE; DAVIES, 2009).

Na asma e rinite alérgica, a inflamação nasal e brônquica é mediada principalmente pelo linfócito T helper 2 (Th2) que secreta citocinas envolvidas na inflamação alérgica, além de estimuladores de linfócito B, que são responsáveis pela produção de IgE, e de outros anticorpos. Os linfócitos T helper 1 (Th1) produzem predominantemente IFN γ (interferon gama) e IL-2. As citocinas Th1 inibem as células Th2 e vice-versa e o desequilíbrio neste balanço de compostos pode explicar a fisiopatologia da rinite e asma. Existem evidências experimentais de que, quando os linfócitos Th2 estão livres da influência restritiva do IFN γ , eles provocam inflamação nas vias aéreas (SCHWARTZ, 2002; RAUTAVA; RUUSKANEN, et al., 2004).

As células chamadas de células T reguladoras (Treg), são heterogêneas. Elas incluem tanto aquelas que ocorrem naturalmente, que são as células T CD4 + CD25+ (Treg constitutivas) e aquelas células induzidas na periferia após exposição ao antígeno (células T reguladoras induzidas, Tr1). Estes vários subconjuntos de células T reguladoras podem ser distinguidos com base em seus marcadores de superfície e do padrão de citocinas que produzem. DCs apresentadoras de antígenos de alérgenos desempenham um papel crítico na indução de tolerância mediada por células T, na medida em que DCs imaturas na ausência de sinais pró-inflamatórios e, possivelmente, subpopulações de DCs especializadas podem

ambas estimular a diferenciação da células T regulatórias (WAKKACH; FOURNIER, et al., 2003).

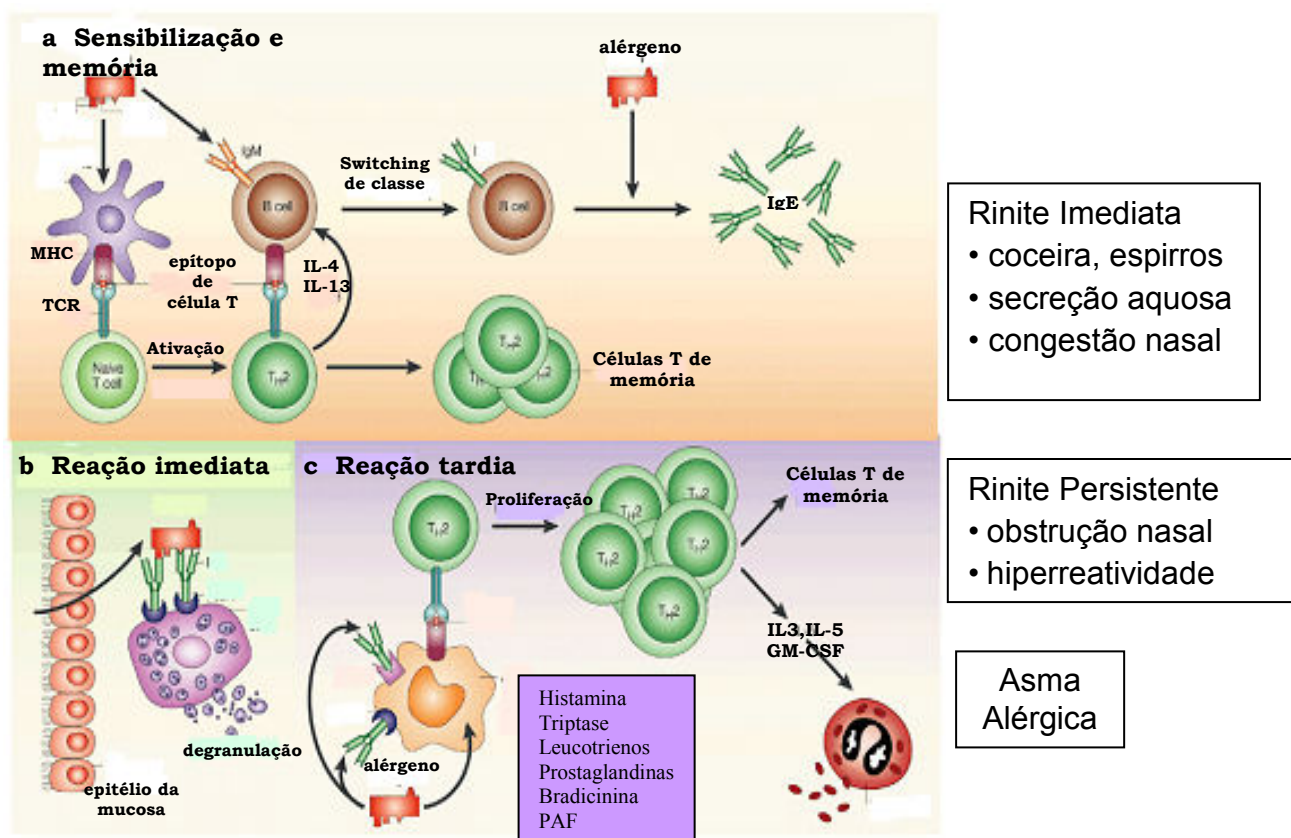


Figura 2 – Mecanismo fisiopatológicos de rinite e asma alérgica. GM- CSF, Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos; PAF, Fator Ativador de Plaquetas. Os pacientes sensibilizados, na Rinite e Asma Alérgica, têm anticorpos IgE para alérgenos específicos que se ligam aos receptores na superfície de mastócitos. Ocorre uma ligação cruzada das moléculas adjacentes à IgE com ruptura e degranulação de mastócitos na re-exposição ao alérgeno específico. Neste momento os mastócitos liberam uma variedade de mediadores químicos que podem ser pré-formados ou neoformados e que darão origem aos sintomas típicos da reação de fase imediata e/ou de reação de fase tardia. (SCADDING, DURHAM, et al., 2008).

Células T reguladoras são normalmente anérgicas com uma taxa de proliferação espontânea baixa, e são altamente dependentes de estímulos exógenos como IL-2. Elas podem inibir respostas imunes Th1 e Th2 contra vírus, bactérias, parasitas e alérgenos (SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, et al., 1995; UMETSU; AKBARI; DEKRUYFF, 2003), seja por contato célula-célula direto (envolvendo PD1, ligada à membrana ou moléculas CTLA4) ou através da produção de citocinas imunossupressoras, como TGF- β , ou IL-10 (BLASER; AKDIS, 2004; UMETSU; AKBARI; DEKRUYFF, 2003; AKDIS; BLESKEN, et al., 1998; YAMAGIWA; GRAY, et al., 2001).

INTRODUÇÃO

Atualmente, há crescente evidência do papel das células T reguladoras no controle do desenvolvimento de asma e doenças alérgicas.

A versão revisada da hipótese da higiene propõe que uma escassa exposição aos patógenos infecciosos, pode impedir o estabelecimento não só de uma resposta Th1, mas também um repertório de células Treg, explicando assim, em parte, o aumento observado na prevalência de alergias nos países desenvolvidos (YAZDANBAKHS; KREMSNER; VAN REE, 2002) (Figura 3).

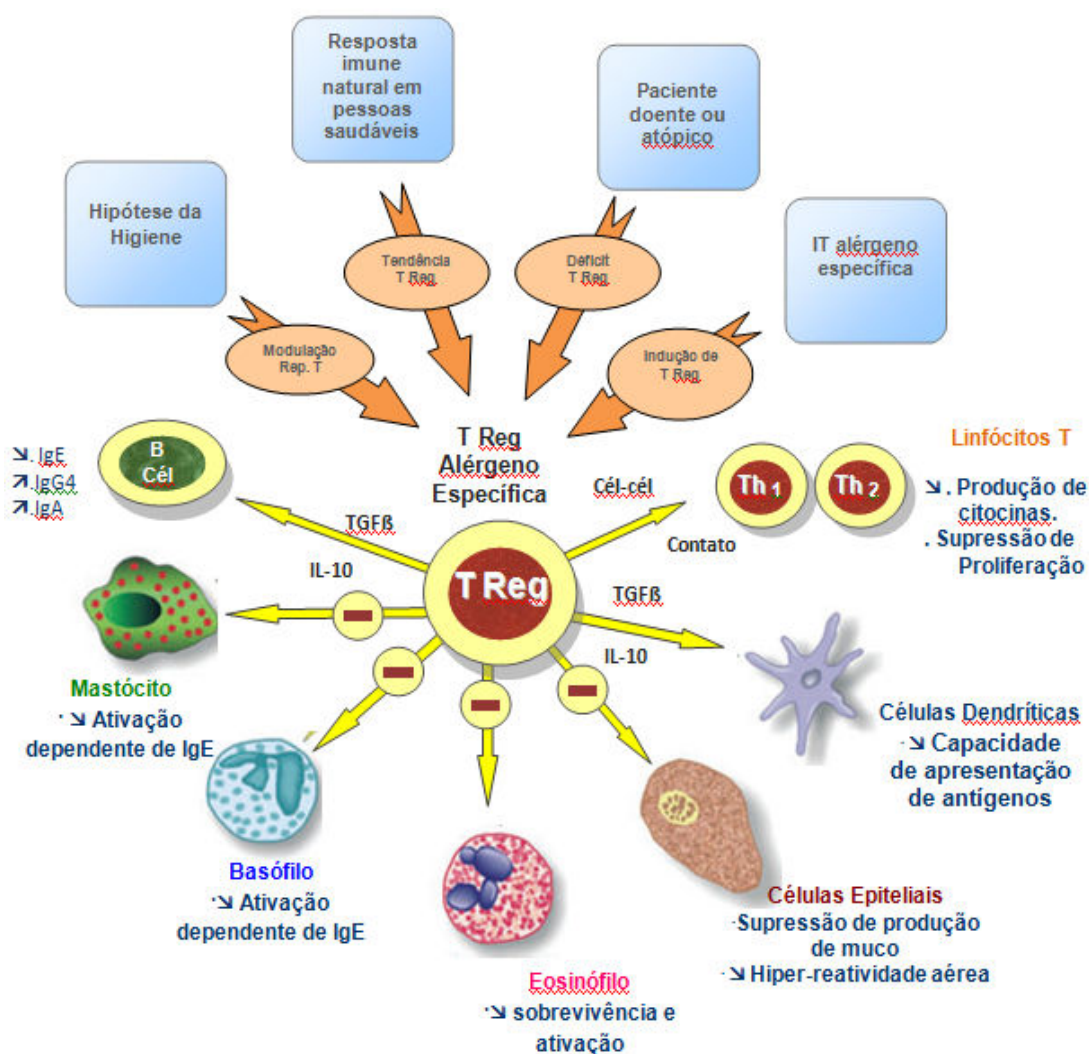


Figura 3 – Dinâmica de células T reguladoras em alergia. *Adaptado de: Moingeon et al, (2006).* As Treg produzem IL-10 e/ou TGF- β e são induzidas em imunoterapia bem sucedida em pacientes atópicos e durante a exposição natural ao alérgeno em pessoas saudáveis. Células T reguladoras podem controlar e regular mecanismos efetores ativadas na alergia e respostas Th2, por meio da produção de IL-10/TGF- β e/ou contato célula-célula. IL-10 é um potente supressor da produção de IgE total e específica ao alérgeno por induzir a mudança de isotipo de anticorpo para IgG4. TGF- β diminui a produção de IgE e induz mudança de isotipo para IgA. IL-10 e TGF- β atuam direta ou indiretamente nas vias aéreas por diminuírem a produção de muco e hiperreatividade nas vias aéreas.

Em suma, a inflamação tem um papel crítico na patogênese da asma e da rinite. Como já relatado acima, alguns fatores desencadeantes da reação inflamatória local sendo comuns a ambas, após a exposição ao alérgeno, em toda mucosa respiratória, haverá indução tanto de rinite quanto de asma.

1.5. Relação Clínica: Asma e Rinite alérgica

A rinite alérgica (RA) é um importante problema de saúde devido à sua prevalência e seu impacto sobre a vida social dos pacientes, desempenho escolar e produtividade no trabalho (BOUSQUET; KHALTAEV, et al., 2008). Epidemiologicamente estudos têm demonstrado com consistência que a asma e a rinite freqüentemente coexistem no mesmo paciente. (BOUSQUET, KHALTAEV, et al., 2008; AÏT-KHALED, PEARCE, et al., 2009). Devido à forte associação entre asma e rinite alérgica, a presença de doenças alérgicas, e em particular da rinite alérgica, aumenta a probabilidade de um diagnóstico de asma em pacientes com sintomas respiratórios (BATEMAN, HURD, et al., 2008; IBIAPINA, SARINHO, et al., 2006). Assim sendo, é importante conscientizar médicos e pacientes sobre a melhor maneira de conduzir a rinite alérgica, com base em evidências de pacientes com e sem asma concomitante. (BOUSQUET, LUND, et al., 2003). A primeira dessas orientações com base em evidências foram as recomendações na Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma (ARIA). (BOUSQUET; KHALTAEV, et al., 2008).

Vários estudos têm demonstrado a coexistência da rinite alérgica e da asma. (SIMONS, 1999; PASSALACQUA; CIPRANDI; CANONICA, 2001; ANNESI-MAESANO, 1999; KOH; KIM, 2003; ARIA, 2001) Estima-se que 60 a 78% dos asmáticos possuam rinite alérgica. (SIMONS, 1999; PASSALACQUA; CIPRANDI; CANONICA, 2001; ANNESI-MAESANO, 1999; KOH; KIM, 2003; ARIA, 2001). E a rinite alérgica tem sido reconhecida como fator de risco de desenvolvimento de asma em cerca de 20 a 38% dos casos (GROSSMAN, 1997).

1.6. Diagnóstico de Alergia

1.6.1. Testes Cutâneos e IgE Sérica

A presença de sensibilização alérgica em pacientes com rinite e asma pode ser identificada pelo teste cutâneo puntura (TCP) ou dosagem de imunoglobulina específica (IgE) no soro. Estes exames podem ajudar a identificar fatores de risco que causam os sintomas de rinite e asma dos pacientes (BOUSQUET; KHALTAEV, et al., 2001).

A pesquisa de IgE específica, *in vitro*, para aeroalérgenos individualizados, quando realizada com antígenos padronizados e técnica adequada, apresenta características operacionais (sensibilidade e especificidade) semelhantes às dos TCP: sensibilidade de 89% e especificidade de 91% (SOLÉ; WECKX; FILHO; et al., 2006).

A IgE exerce um papel muito importante na resposta alérgica. Indivíduos alérgicos apresentam níveis de IgE total que podem estar normais, mas os níveis de IgE específica a um ou mais alérgenos se encontram elevados (CORY; KHERADMAND, 1999). Ao contrário, os níveis de IgE específica estão baixos ou ausentes nos indivíduos considerados não alérgicos (GOULD; SUTTON, et al., 2003). A IgE está normalmente presente no plasma em concentração inferior a 1 µg/mL. Em condições patológicas, tais como na alergia e nas infecções helmínticas, esse nível pode aumentar para mais de 1.000 µg/mL (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os mastócitos podem permanecer sensibilizados pela IgE por muitos meses como resultado da ligação de alta afinidade aos receptores FcεRI.

1.6.2. Alergia e Dosagem de IgG e IgA Específicas

São conhecidas cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. As imunoglobulinas humanas da classe IgG são diferenciadas em quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Grande parte dos trabalhos publicados revelam substancialmente uma importância da subclasse IgG4 na resposta alérgica (AALBERSE; STAPEL, et al., 2009), pois existe uma relação entre os elevados níveis desta imunoglobulina e aqueles que também respondem por meio de IgE, apesar de seu papel ainda ser incerto (LAU; ILLI, et al., 2005). Jarvis, Zock e

colaboradores (2007), confirmaram que altos níveis de IgG4 em indivíduos alérgicos a ácaros da poeira domiciliar estão associados com níveis também elevados de IgE.

Vários pesquisadores têm atribuído uma atividade protetora às subclasses de IgG, principalmente, IgG4, que é produzida como resultado de uma longa exposição antigênica e atuaria como um fator inibitório da reação de hipersensibilidade mediada por anticorpos IgE. Desta forma, acredita-se que IgG4 poderia neutralizar o antígeno ou bloquear o anticorpo IgE, melhorando, deste modo, o quadro da reação alérgica (MÖBS; SLOTOCH, et al., 2008).

Nos dois primeiros anos de vida, os níveis de IgA são geralmente bem reduzidos. Valores de adultos são alcançados por volta de 8 anos de idade. A avaliação quantitativa da IgA secretora (IgAs) em saliva, por métodos extremamente sensíveis, tem demonstrado a sua presença em nível de mucosa já a partir da segunda semana de vida. Entretanto só atinge níveis semelhantes aos de adulto por volta de sete a oito anos de idade (BOTTCHEER et al., 2002). Anticorpos da classe IgA desempenham um papel essencial na proteção das mucosas. Na maioria dos indivíduos atópicos, os níveis de IgA sérica estão diminuídos e não aumentam no decorrer dos anos, como ocorreria em crianças não alérgicas. Indivíduos não atópicos respondem com produção normal de IgA frente à exposição a alérgenos ambientais, impedindo que essas partículas sensibilizem as células responsáveis pela produção de IgE. Em pessoas com deficiência de IgA esse mecanismo deixa de ocorrer, propiciando o contato do antígeno com plasmócitos produtores de IgE e, dessa forma, desencadeando os mecanismos de hipersensibilidade tipo I (BOTTCHEER et al., 2002; AGHAMOHAMMADI; CHERAGHI et al., 2009).

1.7. Educação Ambiental no Manejo da Asma e Rinite Alérgica

A educação ambiental é muito importante no manejo do paciente alérgico. Algumas recomendações importantes são encorajadas em uma recente revisão do ARIA (Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma) realizada por Brozek; Bousquet, et al., 2010. De um modo simplificado: Evitar ambientes com presença de tabaco. Combater o mofo e a umidade, principalmente no quarto de dormir. Em pacientes com asma e rinite ocupacional, evitar o contato com o provável agente desencadeador. O quarto de dormir deve ser preferentemente bem ventilado e ensolarado. Evitar travesseiro e colchão de pena ou pena. Usar os travesseiros de

espuma, fibra ou látex, sempre que possível envolto em material plástico (vinil) ou em capas impermeáveis aos ácaros. Evitar tapetes, carpetes, cortinas e almofadões. Dar preferência a pisos laváveis e cortinas do tipo persianas ou de material que possa ser limpo com pano úmido. Camas e berços não devem ser justapostos à parede. Evitar bichos de pelúcia, estantes de livros, revistas e caixas de papelão no quarto de dormir. Evitar o uso de vassouras, espanadores e aspiradores de pó comuns. Passar pano úmido diariamente na casa ou usar aspiradores de pó com filtros especiais. Evitar animais de pêlo e penas. Evitar inseticidas e produtos de limpeza com forte odor. Evitar talcos, perfumes, desodorantes, principalmente na forma de sprays. Roupas e cobertores devem ser lavados e secados ao sol antes do uso. Esportes podem e devem ser praticados (BROZEK; BOUSQUET *et al.*, 2010).

1.8. Tratamento de Rinite e Asma

O tratamento da rinite alérgica compreende as seguintes modalidades: medidas preventivas no sentido de evitar o(s) alérgeno(s) (quando possível), farmacoterapia, imunoterapia e educação. Pacientes com rinite alérgica persistente devem ser avaliados para asma com história, exame físico e, se possível e quando necessário, a avaliação de obstrução ao fluxo aéreo, antes e após broncodilatador (Prova de Função Pulmonar - Espirometria). Pacientes com asma devem ser adequadamente avaliados (história e exames físico) para rinite. A estratégia combinada de tratamento deveria idealmente ser utilizada para tratar as vias aéreas superiores e inferiores em termos de eficácia e segurança (BOUSQUET, KHALTAEV, *et al.*, 2008). Na Rinite Alérgica o uso de medicamentos auxilia na diminuição da inflamação, porém, não tem capacidade de influir na modificação da resposta imune, isto é, no curso natural da doença (ROGALA, 1998). São indicados na terapia da rinite alérgica os medicamentos, tais como antihistamínico oral, nasal e ocular tipo anti-H1; glicocorticosteróides intranasais; cromonas de uso local (intranasal e ocular) (BROZEK; BOUSQUET, *et al.*, 2010).

O tratamento da asma envolve a prevenção do desencadeamento das crises e sintomas de broncoespasmo, e quando estes ocorrem, o tratamento é direcionado para controlar as crises. As medidas preventivas buscam evitar os fatores de risco, assim como o uso de medicações diárias, quando necessário (O'BYRNE; BATEMAN, *et al.*, 2007). O tratamento medicamentoso envolve geralmente

esteróides inalatórios, broncodilatadores de longa duração, xantinas e leucotrienos para manutenção; nas crises em geral, empregam-se corticóides sistêmicos e broncodilatadores de curta duração (O'BYRNE; BATEMAN, et al., 2007; DOUGHERTY, 2007).

1.9. Imunoterapia

Imunoterapia específica (SIT), geralmente administrada por via subcutânea (SCIT), é atualmente considerada como o único tratamento direcionado ao alérgeno e modificador da resposta biológica, e é considerada essencial na abordagem terapêutica para alergia respiratória. SIT pode modificar o curso da doença alérgica, reduzindo o risco de novas sensibilizações alérgicas e inibindo o desenvolvimento de asma em crianças tratadas clinicamente da rinite alérgica (BOUSQUET, KHALTAEV, et al., 2008).

SIT continua a ser o tratamento de escolha para pacientes com reações alérgicas sistêmicas a picadas de vespa e de abelha e deve ser considerado como uma opção em pacientes com rinite alérgica, asma, ou ambos. A relevância da imunoterapia no tratamento de doenças respiratórias alérgicas é ainda mais acentuada pelo fato de que ela pode exercer um efeito preventivo sobre a progressão da alergia respiratória em crianças (MÖLLER, DREBORG, et al., 2002). É já bem conhecido que a imunoterapia subcutânea (SCIT) é eficaz para o tratamento da rinite alérgica e tem efeitos a longo prazo, mesmo após a descontinuação (BUFE; ROBERTS, 2011). Ela envolve a administração gradativamente mais concentrada de extratos de alérgenos até alcançar a tolerância clínica desses alérgenos que causam sintomas em pacientes alérgicos. A imunoterapia é eficaz em pacientes com formas leves e moderadas da doença alérgica e também naqueles que não respondem bem ao tratamento convencional medicamentoso. Os complexos mecanismos de imunoterapia diferem dependendo do alérgeno e da via de imunização (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998). Este tratamento, no entanto, não é atraente para a população pediátrica, pois requer múltiplas injeções e pode ocorrer efeitos colaterais graves locais ou sistêmicos (LOCKEY, et al., 2001). Alternativamente, a imunoterapia sublingual (SLIT) pode oferecer uma via de administração segura e eficaz e tem uma influência positiva

sobre a tolerância, a confiabilidade e adesão dos pacientes ao tratamento (PENAGOS; COMPALATI, et al., 2006; FERRÉS; JUSTICIA, et al., 2011).

Nos últimos cem anos de imunoterapia alérgeno-específica muitos esforços clínicos e científicos têm sido realizados para estabelecer alternativas de estratégias de aplicação de vacinas com alérgenos de forma não invasiva. O uso da imunoterapia sublingual (SLIT) foi proposta há 20 anos com a principal razão de minimizar o risco de eventos adversos graves, possivelmente relacionados com a via de administração injetável (NOVAK; BIEBER; ALLAM, 2011). Depois de alguns anos e muitos ensaios clínicos controlados realizados em adultos e crianças, a SLIT foi finalmente aceita como uma alternativa viável para substituir a via tradicional (SCIT) (PASSALACQUA; GUERRA, *et al.*, 2004).

Um estudo realizado em crianças sensíveis a ácaros da poeira domiciliar indicaram que, apesar da melhora clínica similar, os regimes SCIT e SLIT exercem influências imunológicas e respostas imunes diferentes das células T e B. Alguns estudos não mostraram alterações na resposta das células T após SLIT, enquanto outros descreveram alterações da proliferação de células T, produção de citocinas e alterações sorológicas de IgG1 e IgG4 (DEHLINK; EIWEGGER, et al., 2006; VALOVIRTA; JACOBSEN, et al., 2006). Quanto aos parâmetros imunológicos, alguns relatos sugerem que a indução de anticorpos IgG pode ser importante para o sucesso da imunoterapia com alérgeno (TSENG; FU, et al., 2008; KUO; WANG, et al., 2009; BUSH; SWENSON, et al., 2011). Geralmente, há um aumento significativo nos níveis de IgG4 específicos e na relação IgG4/IgE comparado ao tratamento com placebo (TSENG; FU, et al., 2008). Existe um consenso geral de que o aumento da IgG4 observado com o emprego de protocolos com altas doses e tratamento prolongado durante a imunoterapia fornecem evidências de que pelo menos qualitativamente SLIT induz alterações semelhantes de imunorredirecionamento e imunorregulação que SCIT (JAMES; DURHAM, et al., 2008; INCORVAIA; FRATI, et al., 2008). Mesmo que as alterações celulares e humorais foram mais pronunciadas em SCIT, as alterações imunológicas da SLIT e sua eficácia foram dependentes da dose e duração do tratamento (ANTÚNEZ, MAYORGA, et al., 2008); (SMITH, WHITE, et al., 2004).

Em um artigo de meta-análise e revisão sistemática sobre IT sublingual para rinite alérgica de Wilson, Lima e Durahm (2005) foi demonstrado que houve redução significativa nos escores de sintomas e de uso de medicamentos nos estudos

envolvendo crianças e adultos. Nesta mesma revisão, em todos os estudos houve ausência completa de efeitos colaterais sistêmicos. Os efeitos locais leves, consistindo de prurido e edema leve da mucosa oral, foram descritos em vários estudos, mas raramente com significância. Isto foi discutido neste estudo como sendo uma grande vantagem em relação a SCIT que em alguns pacientes pode levar a graves reações sistêmicas.

Há um importante artigo de revisão sobre a eficácia da imunoterapia sublingual na asma em uma revisão sistemática de estudos clínicos randomizados para adultos e crianças em que 1706 pacientes foram incluídos e avaliados por escore de sintomas, medicamentos, prova de função pulmonar e broncoprovocação. Nesta meta-análise concluiu-se que a IT sublingual foi benéfica para o tratamento da asma embora a magnitude dos efeitos não tenha sido muito grande, e não foram observados efeitos colaterais importantes (CALAMITA; SACONATO, et al., 2006).

Enquanto a eficácia e tolerância de dessensibilização sublingual estão hoje sendo bem documentadas, a exploração de seus mecanismos imunológicos subjacentes encontra-se em fase inicial. O contato do alérgeno com as células apresentadoras de antígenos da mucosa oral parece ser crítico. Esta mucosa é rica em células dendríticas que atuam como células de Langerhans, expressando constitutivamente o receptor de alta afinidade para IgE (FcεR1)(AKDIS; BARLAN, et al., 2006). Durante a dessensibilização sublingual, estas células também podem capturar o alérgeno e transportá-lo para linfonódios de drenagem proximais, o que pode favorecer a indução de linfócitos com função supressiva (MOINGEON; BATARD, et al., 2006). No entanto, tem sido demonstrado que células Langerhans ativadas da cavidade oral aumentam a produção de citocinas tolerogênicas como a interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformador-beta (TGF-β) e de indoleamina dioxigenase (IDO), levando a uma diminuição na proliferação de células T (MOINGEON; BATARD, et al., 2006; ALLAM; NEIEDERHAGEN, et al., 2006). A produção de quimiocinas envolvidos no recrutamento de células T reguladoras (T-regs) também estão aumentadas (ALLAM; NEIEDERHAGEN, et al., 2006). Além disso, a mucosa oral contém um número limitado de mastócitos, o que explica o perfil de segurança bem estabelecida de SLIT (ALLAM; PENG, et al., 2008) (Figura 4).

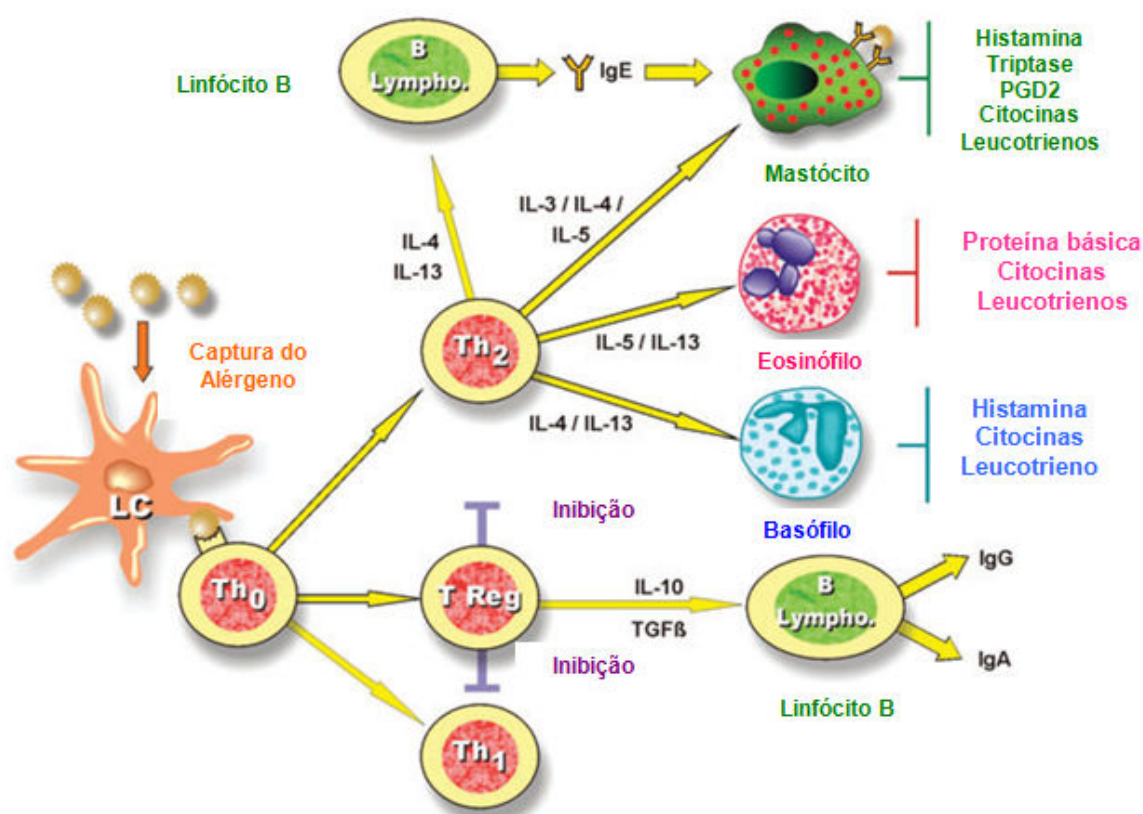


Figura 4 – Mecanismos imunes humoral e celular envolvidos na alergia do tipo I e imunoterapia: uma visão integrada. *Adaptado de: Moingeon, Batard, et al, (2006)*. Células T helper CD4 + Th1, Th2 ou T reg estimuladas após a exposição alérgica ou após dessensibilização são fundamentais no controle de diversos componentes do sistema imunológico. Isto ocorre através da produção de citocinas distintas. IL-4 e IL-13 induzem a mudança de isotipo de IgE, IL-5 estimula recrutamento e ativação de eosinófilos e IL-13 aumenta a produção de muco. T regs inibem tanto Th1 e Th2 por meio da produção de IL-10 e TGFβ. Enquanto pacientes atópicos apresentam desvio de resposta Th2 CD4 + alérgeno-específicas, pessoas saudáveis quando expostas a alérgenos, desviam seu eixo para uma resposta de células T reg. Assim, o objetivo da imunoterapia alérgeno-específica é restaurar a tolerância mudando de respostas de Th2 para resposta de células T Reg.

Estudos têm investigado se SLIT, como SCIT, induz tolerância clínica por influenciar respostas imunes de célula B e T (SCADDING e DURHAM, 2009; ANTÚNEZ, MAYORGA, et al., 2008; FREW, 2007; MOINGEON, BATARD, et al., 2006).

A figura 5 ilustra um modelo hipotético da via dos efeitos da SLIT. Neste modelo, o alérgeno é absorvido pelas células dendríticas da submucosa (células de Langerhans), que migram para tecidos linfóides locais regionais incluindo os linfonodos submandibulares e cervicais. Lá, as células dendríticas apresentam fragmentos de peptídeos às células T alérgeno-específicas de uma forma pré-tolerogênica, resultando na inibição da ativação e proliferação de células Th2 e

estimulação do Th1 e / ou células T reguladoras. Posteriormente, estas células T influenciam células B a produzir respostas protetoras de anticorpos, incluindo a secreção alérgeno-específica de IgG4 e IgA, e, mais tarde, inibição de IgE. Devido à agregação entre si de células apresentadoras de antígenos e linfócitos em algumas áreas da mucosa oral, a possibilidade de apresentação alérgeno localmente ignorando tecidos linfóides regionais, pode ser considerada (ALLAM; STOJANOVSKI, et al. 2008; SCADDING; SHAMJI, et al. 2010).

Extratos bacterianos como adjuvantes da imunoterapia sublingual agiriam hipoteticamente como os antígenos microbianos apresentados na figura 5. Estes antígenos bacterianos são capturados pelos receptores FcεRI e/ou outras estruturas expressas pelas células dendríticas (DCs) da mucosa oral. Estas DCs da mucosa oral são concomitantemente estimuladas por antígenos microbianos presentes em condições fisiológicas na mucosa oral ou como adjuvantes em imunoterapia. Eles induziriam as DCs a mecanismos tolerogênicos como estimulação da expressão de moléculas co-inibitória (B7H1 e B7H3) ou a liberação de IL-10 (NOVAK; BIEBER; ALLAM, 2011).

Estas propriedades tolerogênicas podem ser alvo de substituição de alérgenos com adjuvantes, que empregam as mesmas estruturas em DCs orais para aumentar o efeito da SLIT. Além do contato clássico com células T do tecido linfóide, depois da ingestão de antígenos, a maturação e estimulação mais lenta de CD83 e CCR7 de DCs da mucosa oral durante a migração para o tecido linfóide podem fornecer evidências para o contato local de DCs da mucosa oral com células T. Durante a SLIT, DCs da mucosa oral são capazes de privilegiar subtipos de células T regulatórias, incluindo células T expressando (Foxp3) que estão aumentadas na mucosa oral. Além disso, as interleucinas IL-10, IL-18 e expressão da molécula de ativação linfocítica de células mononucleares do sangue periférico (PBMC- SLAM), bem como os níveis séricos de IgG4 e quantidade de células T no sangue expressando Foxp3 se encontram aumentadas durante a SLIT. Assim também, a expressão do ligante de morte celular programada (PD-L1) é estimulado em células B e monócitos no sangue periférico de pacientes tratados com SLIT enquanto diminui a produção de IL-4. Somando todos os mecanismos retratados seguem unidos a indução de tolerância específica para os alérgenos e efeito clínico da SLIT, conforme a figura 5 (NOVAK; BIEBER; ALLAM, 2011).

INTRODUÇÃO

Níveis de IgA, IgG1, IgG4 e IgE foram comparados em um estudo de Bahceciler; Arikan, et al. (2005) em crianças asmáticas alérgicas para HDM e um grupo de crianças não atópicas saudáveis com idade e gêneros comparáveis. No tempo zero, antes do início do tratamento com SLIT para HDM, os níveis de IgA foram significativamente menores e os de IgG1 e IgE significativamente maiores do que as crianças do grupo controle. Ao final de 6 e 12 meses de tratamento com SLIT de HDM, IgA específicas a Derp 1 nos atópicos não foram significativamente menores do que os controles saudáveis. Estes dados demonstraram que asma alérgica foi caracterizada por aumento de IgE e IgG1 específicos e diminuição da resposta de IgA alérgenos específicos e que SLIT a HDM poderia ter um efeito estimulante sobre a produção de IgA.

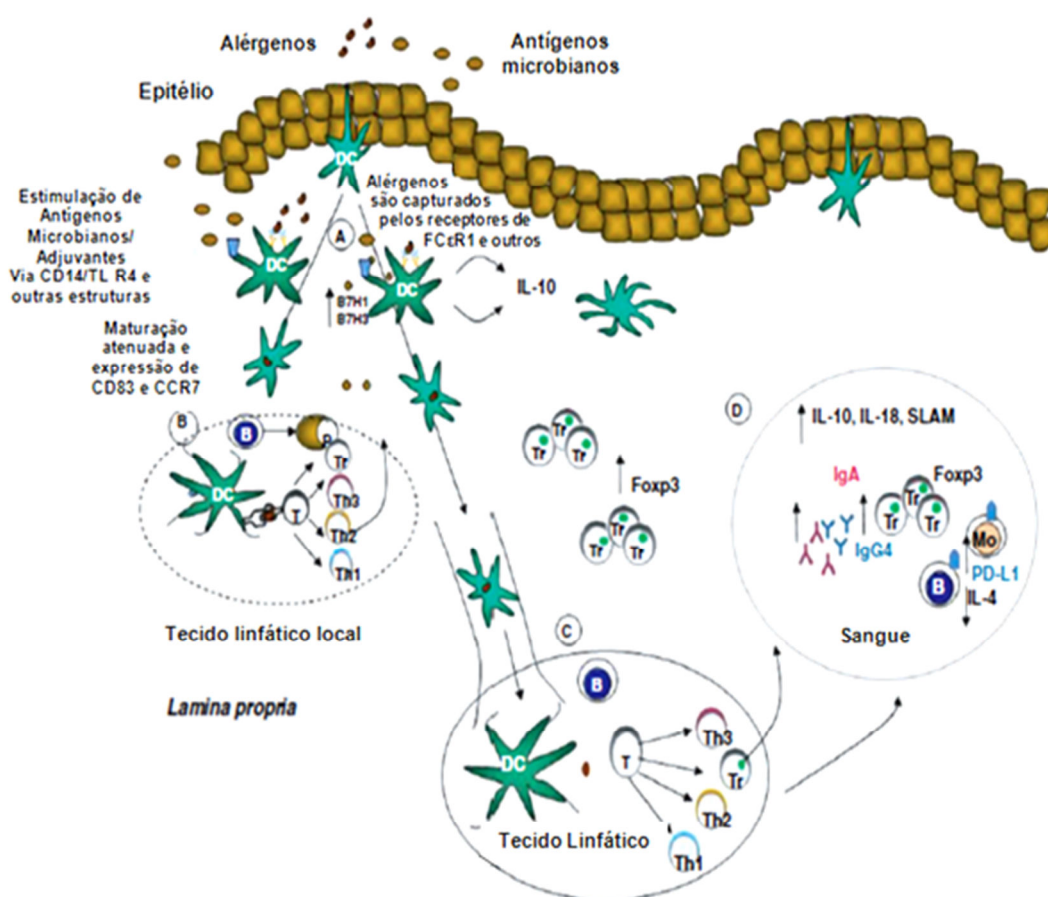


Figura 5 – Mecanismos Imunológicos da Imunoterapia Sublingual Alérgeno Específica. Adaptado de: Novak; Bieber; Allam, (2011). Proposta de mecanismos locais e sistêmicos da imunoterapia sublingual alérgeno-específica (SLIT).

Estudos anteriores utilizaram extratos bacterianos como adjuvantes para prevenir ou tratar doenças alérgicas. Estes adjuvantes eram constituídos de espécies de bactérias comuns patogênicas do trato respiratório envolvidos nas infecções das vias aéreas superiores e inferiores (MATRICARDI, BJORKSTEN, et al., 2003). O uso de produtos derivados de bactérias como adjuvante em imunoterapia para evitar alergia ganhou impulso com o desenvolvimento da "hipótese da higiene", que propõe que a exposição microbiana na infância protege contra o desenvolvimento de alergia (EDER; EGE; VON MUTIUS, 2006; HORNER; REDECKE; RAZ, 2004). Posteriormente, a descoberta de que vários produtos bacterianos molecularmente definidos são reconhecidos por diferentes receptores toll-like (TLRs) expressos por células do sistema imune inato deram um impulso para estudar se esses produtos bem definidos de bactérias poderiam ser usados como imunomoduladores no tratamento de alergia (HORNER; REDECKE; RAZ, 2004; KRIEG, 2006).

1.10. Programa de Educação em Asma e Rinite em Itumbiara/Go

O controle da rinite e asma através de educação em saúde tem sido considerado um ponto de vital importância com resultados positivos, sendo essencial no manejo destas patologias (LEMIÈRE; BAI, et al., 2004; LÓPEZ-VIÑA; DEL CASTILLO-ARÉVALO, 2000). Realizadas em longo prazo (HUANG; LI; WANG, 2009; ANGELINI; ROBLES-RIBEIRO, et al., 2009; ELZEN; SLAETS, et al., 2007), a adesão e o auto-manejo na asma e rinite são melhorados por meio de medidas educativas efetivas (TREBUCHON; DURACINSKY, et al., 2009).

É de suma importância salientar que a educação em saúde deve envolver uma equipe multidisciplinar com vários tipos de profissionais. Estes podem ser educadores em asma e rinite, incluindo médicos, fisioterapeutas, enfermeiras, psicólogos, farmacêuticos, assistente social, técnicos em enfermagem e agentes de saúde (JONES, 2008). O objetivo da educação em rinite e asma é permitir que os pacientes obtenham confiança, conhecimento, disciplina e competência necessárias para assumirem seu papel no manejo de suas próprias patologias.

O Programa de Educação em Asma e Rinite do SUS de Itumbiara/GO teve início em 1999. A meta inicial foi tentar diminuir o número de internações por asma.

Este objetivo foi alcançado e confirmado por meio de estudo realizado um ano e meio após o início deste programa (QUEIRÓS; ABDALLA; PEPPE, 2000). Neste programa existe uma educação continuada e repetida de profissionais de saúde e pacientes. Isto é essencial para discutir e decidir metas do tratamento e desenvolver um plano de ação por escrito, individualizado, incentivando os pacientes a serem responsáveis por seu tratamento (JONES, 2008).

Estão sendo realizados treinamentos periódicos de profissionais dos 14 PSFs (Programas de Saúde da Família) existente na cidade de Itumbiara. Na unidade central e na maioria dos PSFs, o Programa de Asma e Rinite está sendo desenvolvido em dias determinados para atendimento dos pacientes.

O paciente é agendado duas horas antes do horário do atendimento pelo médico para que ele passe pela enfermeira e técnica em enfermagem para responder a uma ficha de pré-consulta e colocar as dúvidas referentes ao tratamento e medidas de educação do ambiente. Na consulta inicial, o paciente recebe informações simples sobre o diagnóstico e os tipos de tratamentos disponíveis na unidade central NABS e nas unidades de PSFs distribuídas nos diferentes bairros da cidade (GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA, 2006). Diferentes dispositivos inalatórios são demonstrados para avaliar as habilidades e custos, e para incentivar o paciente a participar na decisão do seu tratamento (GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA, 2006). Além disso, é realizado um exame de função pulmonar com o medidor de PFE (Pico de Fluxo Expiratório) e uma ausculta pulmonar pela enfermeira da unidade.

Naquelas situações quando o paciente se apresenta em crise de asma, é iniciada a conduta para retirar o paciente daquela crise. Não sendo a primeira consulta dele, tendo já o seu plano de ação e iniciado o tratamento em casa, será realizada a continuidade do tratamento da crise até o seu atendimento pelo médico. Neste período de duas horas ele também assiste a fitas educativas do programa. O uso de material audiovisual é uma alternativa muito utilizada no programa para manter a uniformidade da informação (STELMACH; CUKIER, 2009). Na primeira consulta é realizada a informação verbal que é complementada por materiais escritos (folhetos) contendo informações sobre rinite e asma, medidas educativas na alergia e seu tratamento. Os pacientes e familiares são incentivados a anotar quaisquer dúvidas que possam surgir para serem respondidas na próxima consulta (GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA, 2006). Após a consulta médica, o paciente

volta na sala onde foi a pré-consulta, para ser realizada a pós-consulta. Neste momento é revisto junto com ele o plano de ação que foi prescrito pelo médico como também incentivada a educação direcionada para o auto-manejo da asma e rinite. É enfatizada a participação do paciente na auto-monitorização da gravidade da doença através de medidas e registros regulares do PFE e/ou sintomas diários (GIBSON; POWELL, et al., 2003) e no ajuste da terapia medicamentosa. É solicitado que ele volte à unidade para nova orientação caso ele apresente alguma dificuldade e não tenha recebido a visita dos agentes de saúde durante aquela fase.

O auto-manejo diminui visitas ao serviço de emergência (HUANG; LI; WANG, 2009) (WOLF; GRUM; CLARK, 2008), admissões hospitalares (WOLF; GRUM; CLARK, 2008), sintomas (TAPP; LASSERSON; ROWE, 2007), uso de medicação de resgate (TOELLE; RAM, 2004), cursos de corticóide oral (TOELLE; RAM, 2004), visita médica não agendada e falta no trabalho e/ou escola (HUANG; LI; WANG, 2009). O auto-manejo com técnica inalatória adequada (TAPP; LASSERSON; ROWE, 2007) e aderência da medicação (JONES, 2008) também melhoram a função pulmonar (TOELLE; RAM, 2004), pico de fluxo expiratório (GIBSON; POWELL, et al., 2003), e qualidade de vida relacionada à saúde (JONES, 2008).

1.11. Informações Adicionais

A imunoterapia sublingual específica com alérgenos associados ou não com extratos bacterianos não se trata de pesquisa com novas vacinas ou fármacos, uma vez que encontra-se no mercado nacional alérgenos similares distribuídos por diferentes companhias brasileiras para serem indicados por médicos, em especial pelos alergistas, para aplicação em imunoterapia de pacientes com alergia respiratória, particularmente aqueles sensibilizados com ácaros da poeira domiciliar.

Para esclarecimentos adicionais, informamos que o objetivo do presente projeto foi estudar alguns mecanismos de ação em nível celular e molecular para podermos comparar com a melhora clínica dos sintomas alérgicos entre os diferentes grupos de estudo. A realização do teste cutâneo de puntura (TCP) é comumente utilizado em outros estudos similares. Assim, para comprovarmos a melhora na resposta imunológica, necessitávamos de um grupo controle, o qual recebeu somente placebo, pois devido a inúmeras variáveis, qualquer diferença encontrada seria de difícil aceitação pela comunidade científica, particularmente os editores da revista de

bom fator de impacto, caso não tivéssemos optado por um estudo duplo cego controlado por placebo. Este grupo controle assim como os demais pacientes receberam tratamento medicamentoso e, portanto, foram também beneficiados. Estes pacientes ao final do estudo, após terem sido revelados todos os grupos iniciaram a vacina sublingual biologicamente ativa que contém o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* em concentração semelhante à utilizada no estudo e estão atualmente recebendo o tratamento de Imunoterapia até completarem o mesmo período dos grupos ativos na pesquisa, sem ônus algum para os mesmos.

Há inúmeros trabalhos demonstrando a eficácia da utilização da imunoterapia sublingual com alérgenos específicos como fundamentados na introdução do presente projeto, porém há pobre comprovação de que a adição de extratos bacterianos produza efeito benéfico adicional.

Quanto aos riscos, foram tomadas todas as devidas precauções possíveis, a começar pela inclusão de pacientes com diagnóstico de rinite alérgica e/ou com asma leve, não incluindo asma moderada ou grave, para minimizar o risco de desencadeamento dos sintomas com o uso da imunoterapia. Uma precaução rigorosamente a ser seguida foi a utilização de suspensões de ácaros diluídas apropriadamente. Outro fator que diminuiu em muito o risco de desencadeamento dos sintomas alérgicos consequente à aplicação da imunoterapia com alérgenos específicos foi a administração crescente de alérgenos. Estas precauções são tomadas rotineiramente em clínicas de alergia, sejam aqui no Brasil ou exterior.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia clínica e alterações imunológicas sistêmicas e de mucosa induzidas pela imunoterapia sublingual com alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* em pacientes com rinite alérgica e ou asma.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a ocorrência e intensidade dos sintomas clínicos de rinite alérgica e/ou asma bem como a necessidade de medicação sintomática antes e após imunoterapia sublingual específica.
- Avaliar o tamanho médio da pápula ao teste cutâneo de puntura antes e após imunoterapia sublingual específica.
- Determinar os níveis de anticorpos IgE, IgA, IgG1 e IgG4 específicos a *D. pteronyssinus* e aos seus alérgenos principais Der p 1 e Der p 2 em amostras de soro, fluido nasal e saliva, antes e após imunoterapia sublingual específica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido para apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo aprovado, sem restrições, em 13 de abril de 2007, sob processo número 130/2007 (Anexo 1), protocolo registro CEP/UFU: 262/06.

A concordância em participar do estudo foi confirmada pela assinatura de um Termo de Consentimento (Anexo 2) pelo responsável legal dos participantes, pois todos eram menores de 18 anos, de acordo com as normas da Resolução 196/96. Neste Termo de Consentimento foi informado o nome da pesquisa, seus objetivos, os procedimentos a que seriam submetidos como coleta de sangue, saliva, fluido do lavado nasal, teste cutâneo de punctura e imunoterapia sublingual com alérgenos. Todo paciente teria o direito de se retirar em qualquer momento do estudo sem necessidade de explicação ou prejuízo ao seu atendimento atual ou futuro.

3.2. Pacientes

Crianças com rinite alérgica persistente leve ou moderada/grave, com ou sem asma leve, intermitente ou persistente, foram recrutadas no Núcleo de Ações Básicas de Saúde (NABS) do Programa de Controle de Asma e Rinite do Sistema Único de Saúde de Itumbiara, GO, Brasil. A classificação e o diagnóstico de rinite alérgica foram realizados conforme descrito previamente no ARIA (Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma), conforme anteriormente descrito (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE, et al., 2001). A classificação e o diagnóstico de asma foram realizados conforme o protocolo de GINA (Estratégia global para o manejo e prevenção da asma) (BATEMAN; HURD, et al., 2008).

Estas classificações de rinite alérgica e asma foram propostas e validadas com base na frequência e gravidade dos sintomas pois são estes os principais fatores envolvidos na determinação do tratamento.

Os pacientes foram selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão como relatado anteriormente (ALVAREZ-CUESTA; BOUSQUET, et al., 2006).

Critérios de inclusão :

- (1) Sexo masculino ou feminino e idade entre 5 a 15 anos;
- (2) História clínica de rinite alérgica persistente leve ou moderada-grave há 2 ou mais anos relacionada à exposição ao pó domiciliar, podendo ou não ter associado asma leve intermitente ou persistente;
- (3) Teste cutâneo de puntura (TCP) positivo para extrato de alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dpt), com um diâmetro médio de pápula maior que 3 mm que aquele do controle negativo;
- (4) Níveis séricos de IgE específicos ao alérgeno Dpt determinados por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) com índice Elisa (EI) > 1,2 para excluir valores de reatividade limítrofe;

Critérios de exclusão:

- (1) Indivíduos com prévia imunoterapia específica a alérgenos;
- (2) Pacientes com asma moderada a grave, doenças malignas, cardiovasculares ou autoimunes, fazendo uso de drogas quimioterápicas ou imunossupressoras;
- (3) Presença de infecções das vias aéreas nos últimos 30 dias anteriores ao estudo;
- (4) Pacientes em uso de antihistamínicos na semana anterior ao teste;
- (5) Uso de corticóides tópicos nas últimas 2 a 3 semanas, corticosteróides sistêmicos por tempo prolongado (>20 mg/dia por mais de 7 dias);
- (6) Tabagistas;
- (7) Tratamento com agentes quimioterápicos ou imunossupressores mais de uma semana antes do teste;
- (8) Presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo;
- (9) Recusa em participar do estudo;

3.3. Desenho do Estudo

Este foi um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo e conduzido em um único centro. Os participantes foram recrutados por um período de 24 meses (outubro de 2008 a outubro de 2010). Como apresentado no diagrama de fluxo nas fases do ensaio clínico randomizado (Figura 6), após a triagem inicial de

122 pacientes elegíveis para o estudo, foi solicitado que eles anotassem seus sintomas respiratórios e uso de medicamentos em cartões semanais por um período de 12 semanas antes da randomização.

Vinte pacientes foram excluídos devido a não preencherem os critérios de inclusão, e um total de 102 participantes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, como segue:

- (1) DPT, um grupo de 34 pacientes que receberam o extrato de alérgeno Dpt em glicerol a 50% (preparado por FDA Allergenic Ltda, Rio de Janeiro, Brasil);
- (2) DPT+MRB, um grupo de 36 pacientes que receberam o extrato de alérgeno Dpt associado a extratos bacterianos de germes respiratórios (MRB) em glicerol a 50%, contendo antígenos da parede celular de diferentes microorganismos do trato respiratório (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) em contagem total de 20-50 milhões de cada cepa bacteriana/mL) (FDA Allergenic Ltda);
- (3) Placebo, um grupo de 32 pacientes que receberam glicerol a 50% em solução salina.

Um único lote de cada uma das preparações foi utilizado ao longo do estudo. Todos os tratamentos foram administrados por via sublingual de acordo com o esquema estabelecido pela EEACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) (ZUBERBIER; BACHERT, et al., 2010) com algumas modificações. Pacientes receberam doses crescentes através de gotas sublinguais, uma vez por dia, atingindo em aproximadamente dois meses e meio, uma dose de manutenção mensal de 36 µg de Der p 1 e 30 µg de Der p 2 , três vezes por semana em dias alternados (Tabela 2).

As doses de vacinas sublinguais foram entregues em frascos acompanhados com um conta-gotas dosimetrado (FDA Allergenic LTDA). Foi solicitado que a vacina fosse mantida na parte superior do refrigerador e que fosse administrada em jejum. Os indivíduos foram instruídos a manter a solução sob a língua durante 2 minutos e a não comer ou beber durante 60 minutos após receberem a dose da vacina. Os pais ou responsáveis administraram as doses de vacinas aos seus filhos em suas próprias casas.

Foram realizados ajustes no cronograma, porém sempre de acordo com normas padronizadas para a imunoterapia específica (SCADDING; DURHAM, et al., 2008). Os pacientes foram orientados a usarem o antihistamínico loratadina todos os dias na noite que precedeu a ingestão da vacina durante o período de indução nas fases 4 e 5, e na primeira semana da fase de manutenção, totalizando 31 dias de tratamento com antihistaminico. Esta medida foi adotada para reduzir a frequência de reações locais e sistêmicas que haviam aumentado durante a fase 3.

Se os pacientes manifestassem episódios de crises de rinite, eles seguiam as orientações de um plano prévio de ação (Anexo 3) para usar a loratadina oral (5 ou 10 mg) e budesonida spray nasal (32 mcg), uma vez por dia, durante 3 a 7 dias. Da mesma forma, se os pacientes apresentassem crises de asma leve, fariam uso de salbutamol inalatório (200 mcg) como medicação de resgate durante 2 dias e beclometasona inalada (50 ou 250 mcg), dependendo da idade, durante 3 a 7 dias de tratamento. Os pacientes eram instruídos que durante a fase da coleta de exames eles deveriam estar no mínimo com uma semana sem uso dos medicamentos acima (exceção ao salbutamol spray oral que não interfere com os exames realizados). Portanto, se por necessidade urgente usassem na semana prévia à data da coleta, os exames deles eram adiados para a semana seguinte, somente para os pacientes que receberam a medicação.

Além disso, os pacientes retornaram mensalmente para avaliar os efeitos adversos e para receberem novos suprimentos da vacina. Caso os pacientes apresentassem efeitos adversos relacionados com o tratamento (por exemplo, coceira na boca, coriza, espirros ou tosse) durante a fase de indução, a dose era mantida no mesmo nível até que o efeito adverso fosse resolvido (geralmente dentro de alguns dias) e depois a dose era novamente aumentada.

O médico e seus colaboradores paramédicos que dispensavam as vacinas (MGJQ) não tinham conhecimento do código da randomização, o qual foi criado e mantido oculto pelo fabricante (FDA Allergenic LTDA). O código somente foi revelado após todos os dados clínicos e laboratoriais terem sido coletados e preparados para análise estatística.

Tabela 2 – Esquema da imunoterapia sublingual, com as fases, concentrações, volume e intervalo de administração.

Fases (duração em dias)	Concentrações			Volume (gotas de 50 µL)	Intervalo
	Extrato Dpt		Extrato MRB (milhões de org/mL)		
	(µg/mL)				
	Der p 1	Der p 2			
1 (12)	0,0012	0,0010	20-50	1-1-2-2-3-3-4-4-5-5-5-5	Diário
2 (12)	0,012	0,010	20-50	1-1-2-2-3-3-4-4-5-5-5-5	Diário
3 (12)	0,12	0,10	20-50	1-1-2-2-3-3-4-4-5-5-5-5	Diário
4 (12)	1,2	1,0	20-50	1-1-2-2-3-3-4-4-5-5-5-5	Diário
5 (12)	12	10	20-50	1-1-2-2-3-3-4-4-5-5-5-5	Diário
Manutenção (até o final)	12	10	20-50	5-5-5	3x/semana

Dose de manutenção: 9 µg de Der p 1/semanal e 36 µg de Der p 1/mensal; 7,5 µg de Der p 2/semanal e 30 µg de Der p 2/mensal; Dpt: extrato de alérgenos *Dermatophagoides pteronyssinus*; MRB: extrato misto de bactérias do trato respiratório

3.4. Avaliação Clínica e Medidas de Segurança

A avaliação clínica foi realizada antes e após 12 e 18 meses de tratamento por meio de escore de sintomas e de medicação, como descrito anteriormente (CIPRANDI; CIRILLO, et al., 2004) com algumas adaptações.

Um questionário de sintomas e uso de medicação para rinite (Anexo 4) e asma (Anexo 5) foi obtido por uma enfermeira. Sintomas de rinite e asma (prurido nasal, espirros, coriza, obstrução, tosse, sibilos e prurido ou hiperemia conjuntival) foram analisados com base nestes registros e foram classificados da seguinte maneira: 0: nada; 1: pouco; 2: moderado ; 3: importante; 4: muito importante (CIPRANDI; CIRILLO, et al., 2004).

Pontos foram adicionados para o uso de qualquer dos medicamentos permitidos durante a última semana da seguinte forma: 0: nunca; 1: uma vez, 2: duas vezes, 3: três vezes; 4: quatro vezes, 5: cinco vezes; 6: seis vezes.

A média dos escores em cada tempo de observação foi utilizada para análise estatística.

Foi orientado aos pais identificar e marcar em uma ficha (Anexo 6) os sintomas que por ventura apresentassem relacionados com os efeitos adversos locais e sistêmicos (urticária, angioedema, prurido generalizado, diarreia, vômitos, prurido oral ou inchaço e edema da língua). Qualquer outro evento foi escrito em texto livre. Esta ficha era entregue mensalmente quando os pacientes iam até o núcleo de saúde para adquirirem o frasco de SLIT.

Foi solicitado aos pais ou responsáveis que devolvessem o frasco anterior vazio, com a finalidade de melhor controle e avaliação se a vacina sublingual estava realmente sendo administrada no período exigido.

3.5. Teste Cutâneo de Punctura

Todos os participantes foram submetidos ao TCP com o extrato do alérgeno Dpt (FDA Allergenic LTDA) no início do estudo (T0) e após 12 (T12) e 18 (T18) meses de tratamento, de acordo com as diretrizes BSACI (*British Society for Allergy and Clinical Immunology*) (SCADDING; DURHAM, et al., 2008). Uma solução de histamina em concentração de 10 mg/mL e o diluente tamponado com glicerol a 50% utilizado na preparação do extrato alergênico foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente (FDA Allergenic). Foram realizadas leituras das reações cutâneas após 15-20 minutos e um diâmetro médio de pápula maior que 3 mm em relação ao controle negativo foi considerado um teste positivo.

3.6. Amostras de Sangue, Saliva e Fluido de Lavado Nasal

Em paralelo com o TCP, amostras de sangue foram coletadas de todos os pacientes em cada momento (T0, T12 e T18) do tratamento, e os soros obtidos após centrifugação do sangue a 700 x g por 10 minutos foram armazenados em alíquotas a -20 °C até a realização dos ensaios sorológicos.

Da mesma forma, amostras de saliva foram coletadas da região vestibular da boca que se situa na parte lateral entre a gengiva lateral e a bochecha, durante aproximadamente 3 minutos, por meio de Salivette (Sarstedt AG® & Co., Nümbrecht, Alemanha). As crianças estavam em jejum e não houve estimulação prévia do fluxo salivar como previamente descrito (SANDIN; BJÖRKSTÉN, et al., 2011). As amostras de saliva foram imediatamente colocadas em gelo e centrifugadas (3.000 x g por 10 minutos a 4 °C). Os sobrenadantes foram coletados (1-1,5 mL) e armazenados em alíquotas a -20 °C até os ensaios subseqüentes.

O fluido do lavado nasal também foi coletado de cada paciente, conforme descrito anteriormente (SILVA SEGUNDO et al., 2009). O paciente foi mantido com a cabeça estendida a ± 30 graus e a rinofaringe foi ocluída pelo palato mole. Um volume de aproximadamente 5 mL de solução salina foi instilado em cada narina e, após 10 segundos, o material foi coletado por flexão da cabeça em um tubo cônico estéril, que foi imediatamente mantido em gelo, homogeneizado por agitação, e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até análise posterior.

3.7. Determinação dos Níveis de Anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 Específicos a Alérgenos de *D. pteronyssinus* em Amostras de Soro

Amostras de soros foram analisadas para quantificar os níveis de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato total de Dpt por ELISA convencional e a seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, por ELISA reversa, como descrito anteriormente (SILVA; GERVÁSIO, et al., 2001), com algumas modificações. A otimização da reação foi estabelecida em experimentos preliminares através de titulação em bloco dos reagentes, utilizando soros controles positivo e negativo.

Para a determinação dos níveis de anticorpos ao alérgeno Dpt, placas de microtitulação de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram revestidas com extrato total de Dpt (4 µg/poço) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) a 1% por uma hora à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as placas foram incubadas com

amostras de soro diluído 1:2 (IgE) ou 1:5 (IgG4) ou 1:10 (IgG1) em PBS-T-BSA por 2 horas a 37 °C. Em paralelo, três soros controles negativos foram incluídos em cada placa.

Após um ciclo de seis lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgE humana (1:1000; Kierkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA), anticorpo anti-IgG4 humana (1:4000; Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) ou anti-IgG1 humana (1:3000; Sigma) durante 1 hora a 37 °C. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma) na diluição de 1:1000 em PBS-T-BSA e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático consistindo de 2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid (ABTS, Sigma) a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07 M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂.

As densidades ópticas (DO) foram determinadas em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus MKII - Flow Laboratories*, McLean, EUA) utilizando filtro de 405 nm até um valor máximo de absorbância de 1,5 para os soros controles positivos, a partir da qual a reação foi linear. Os níveis de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE) e determinado da seguinte forma: $IE = DO \text{ da amostra } / cutoff$, onde *cutoff* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos somado com três desvios-padrão, conforme já descrito (PEREIRA; SILVA, et al., 2005). Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos, a fim de excluir valores de reatividade limítrofe próximo a IE = 1,0.

Para a determinação dos níveis de anticorpos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, as placas foram revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (clone 5H8; Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, EUA) ou anti-Der p 2 (clone 1D8; Indoor Biotechnologies) a 1,0 µg/poço e, subsequentemente incubadas com extrato Dpt, amostras de soro, anticorpos biotilados secundários, conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático como descrito acima para ELISA convencional. Níveis de IgE, IgG4 e IgG1 aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 foram expressos em IE, conforme estabelecido acima.

3.8. Determinação dos Níveis de Anticorpos IgA Específicos a Alérgenos de *D. pteronyssinus* em Amostras de Saliva e Fluido de Lavado Nasal

As amostras de saliva e fluido de lavado nasal foram analisadas para quantificar os níveis de anticorpos IgA específicos ao extrato total de Dpt por meio de ELISA convencional e aos seus principais alérgenos, Der p 1 e Der p 2, por meio de ELISA reversa, como descrito anteriormente (SILVA; GERVÁSIO, et al., 2001), com algumas modificações. A otimização da reação foi estabelecida em experimentos preliminares por meio de titulação em bloco dos reagentes, utilizando soros controles positivo e negativo.

Para a determinação dos níveis de IgA ao alérgeno Dpt, placas de microtitulação de alta afinidade foram revestidas com extrato bruto de Dpt (4µg/poço), bloqueadas com PBS-T-BSA e incubadas com amostras de saliva (diluída 1:20) ou fluido de lavado nasal (diluído 1:50) por 2 horas a 37 °C. Após a lavagem, as placas foram incubadas com anticorpo biotinilado secundário anti-IgA humana (Kierkegaard and Perry Laboratories Inc.) diluído 1:5000 por 1 hora a 37 °C seguido de incubação com o conjugado estreptavidina-peroxidase (1:1000; Sigma). A reação foi revelada com ABTS e H₂O₂ e a absorbância foi determinada a 405 nm. Níveis de anticorpos IgA foram expressos como índice ELISA (IE), conforme determinado acima. Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos, a fim de excluir valores de reatividade limítrofe próximo a IE = 1,0.

Para a determinação dos níveis de anticorpos IgA aos alérgenos Der p 1 e Der p 2, as placas foram revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (clone 5H8) ou anti-Der p 2 (clone 1D8) a 1,0 µg/poço, bloqueadas e, em seguida, incubadas subsequentemente, com extrato de Dpt, amostras de saliva ou fluido de lavado nasal, anticorpo secundário biotinilado anti-IgA humana, conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático como descrito acima para ELISA convencional. Níveis de IgA específicos aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 foram expressos em IE, conforme estabelecido acima.

3.9. Quantificação de IgE Sérica Total

Os níveis de IgE sérica total foram avaliados por meio de ELISA tipo *sandwich* utilizando anticorpos monoclonais de captura e de detecção anti-IgE humana (SILVA; GERVÁSIO, et al., 2001). Placas de alta afinidade foram revestidas com anticorpo monoclonal de captura anti-IgE humana (clone GE-1; Sigma), na diluição de 1:5.000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas a 1:5, 1:50 e 1:500 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) na diluição de 1:4000 e incubado por 1 hora à temperatura ambiente.

As etapas subseqüentes (conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático) foram similares ao ELISA para detecção de IgE específica aos alérgenos. Os resultados foram expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de acordo com uma curva controle obtida por diluições duplas seriadas de um soro humano (LHY) sub-padronizado que continha 500 UI/mL de IgE sérica total.

3.10. Análise Estatística

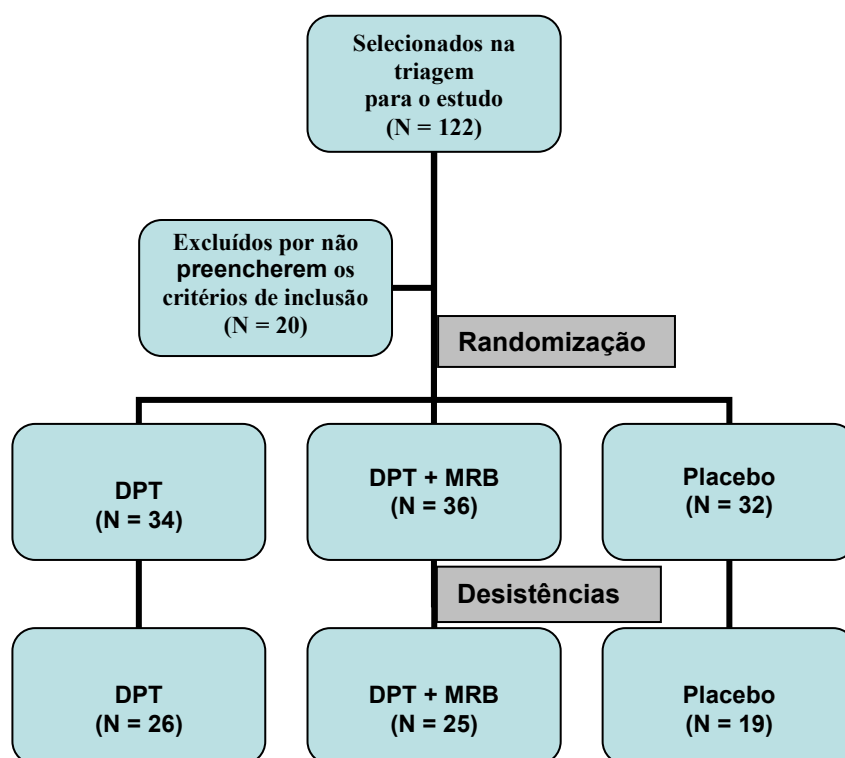
A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças nos parâmetros avaliados no início (tempo 0) e após 12 e 18 meses de tratamento foram analisadas dentro dos grupos pelo teste de Friedman com pós-teste de comparação múltipla de Dunn para examinar todas as possíveis comparações nos diferentes tempos. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn, quando apropriado. A comparação entre proporções foi analisada pelo teste de χ^2 . Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Caracterização dos Pacientes no Início do Estudo

De um total de 102 pacientes que iniciaram a SLIT, 70 (68,6%) completaram o estudo, após 18 meses de tratamento. De 32 desistências, o grupo Placebo apresentou a maior frequência (13 pacientes). As principais razões pelas quais os pacientes se retiraram da SLIT foram a inconveniência de frequentes visitas ao NABS (Núcleo de Ações Básicas de Saúde), a necessidade de afastamento do trabalho (pais) ou na escola (crianças) e a falta de tempo para acordar e aplicar a vacina em jejum uma hora antes do café da manhã. Assim, causas não relacionadas com o tratamento foram as razões para 20 pacientes desistirem da SLIT, principalmente no grupo Placebo (9 pacientes). Além disso, 9 pacientes não completaram o estudo por não comparecimento às entrevistas para responderem aos questionários em qualquer um dos tempos avaliados. No total, apenas 3 pacientes deixaram o estudo devido à presença de efeitos adversos (Figura 6)



Fonte: Elaborada pela pesquisadora deste estudo.

Figura 6 – Diagrama de fluxo nas fases de imunoterapia sublingual (SLIT) para alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em pacientes randomizados em três grupos de tratamento: DPT (extrato de alérgeno Dpt), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias), e Placebo. Um total de 70 pacientes completaram o estudo, devido à desistência de 32 participantes pertencentes aos grupos DPT (N = 8), DPT+MRB (N = 11) e Placebo (N = 13). As análises de seguimento foram conduzidas de forma duplo-cega e a revelação dos grupos foi realizada apenas após a conclusão de todas as análises clínicas e imunológicas.

RESULTADOS

Tabela 3 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do estudo dos pacientes que completaram a imunoterapia sublingual.

Variáveis	Grupos			Valor de p
	DPT	DPT+MRB	Placebo	
Número de pacientes	26	25	19	
Idade, anos				
Média (DP)	12.7 (2.8)	12.0 (3.2)	10.9 (2.9)	N.S. ^a
Min a max	7-18	6-17	6-16	
Sexo, M:F	12:14	16:9	13:6	N.S. ^b
Rinite, M:F	5:8	12:2	4:3	N.S. ^b
Rinite e Asma, M:F	7:6	4:7	9:3	N.S. ^b
Sintomas/rinite (escores)				
Mediana (min a max)	1,6 (0,4-4,4)	1,4 (0-3,6)	1,4 (0-4,3)	N.S. ^c
Sintomas/asma (escores)				
Mediana (min a max)	1,3 (0-2,8)	0,9 (0-2,6)	0,8 (0-3,0)	N.S. ^c
Uso medicação/rinite (escores)				
Mediana (min a max)	0,5 (0-2,0)	0,5 (0-2,5)	0,2 (0-1,5)	N.S. ^c
Uso medicação/asma (escores)				
Mediana (min a max)	0 (0-1,0)	0 (0-2,0)	0 (0-1,0)	N.S. ^c
Teste Cutâneo de punctura (tamanho da pápula, mm)				
Mediana (min a Max)	6.2 (3.3-10.2)	6.0 (3.5-12.2)	6.5 (3.6-14.9)	N.S. ^c
IgE sérica total, UI/mL				
Mediana (min a max)	1254 (286-8764)	2120 (324-8111)	2202 (190-8650)	N.S. ^c
IgE sérica específica, IE				
Mediana (min a max)				
Dpt	5.1 (1.2-9.7)	4.8 (1.2-8.9)	7.0 (2.2-10.3)	N.S. ^c
Der p 1	6.8 (0.8-9.3)	5.1 (0.7-8.0)	6.4 (0.8-9.0)	N.S. ^c
Der p 2	7.3 (0.8-11.3)	8.2 (0.7-10.6)	7.7 (0.9-11.4)	N.S. ^c
IgA salivar específica, IE				
Mediana (min a max)				
Dpt	2,9 (0,9-9,0)	2,5 (0,7-9,6)	2,3 (1,0-8,2)	N.S. ^c
Der p 1	1,5 (0,8-4,9)	1,6 (0,5-6,9)	1,3 (0,8-5,7)	N.S. ^c
Der p 2	1,5 (0,7-5,2)	5,4 (0,5-3,3)	1,3 (0,8-3,5)	N.S. ^c
IgA lavado nasal específica, IE				
Mediana (min a max)				
Dpt	2,3 (1,0-8,3)	2,2 (0,6-6,9)	2,2 (0,8-7,7)	N.S. ^c
Der p 1	1,8 (0,9-5,4)	1,4 (0,8-3,9)	1,6 (0,9-3,6)	N.S. ^c
Der p 2	1,5 (0,9-3,3)	1,4 (0,7-3,1)	1,3 (0,9-3,2)	N.S. ^c

Dpt: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der p 1: 1 alérgeno do grupo 1 de *D. pteronyssinus*; Der p 2: alérgeno do grupo 2 de *D. pteronyssinus*; MRB: extrato bacteriano misto do trato respiratório; UI/mL: unidades internacionais por mililitro; IE: índice ELISA; N.S.: não significativo;

^a ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni ;

^b Teste Qui-quadrado 3x2 ; ^c Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Os dados demográficos clínicos e laboratoriais no início do estudo dos pacientes que completaram a imunoterapia sublingual estão apresentados na Tabela 3. Todos os grupos eram comparáveis no início do estudo com relação à idade, sexo, diagnóstico clínico, escore de sintomas e uso de medicação, assim como relativo aos resultados de SPT, níveis de IgA sérica e lavado nasal, IgE total e IgE sérica específica a ácaros.

4.2. Efeitos Adversos da SLIT

Entre os 70 pacientes que completaram o estudo, 24 (34,3%) apresentaram efeitos adversos da SLIT (Tabela 4). Destes, 5/26 pacientes (19,2%) eram do grupo DPT, 9/25 (36,0%) eram do grupo DPT+MRB, e 10/19 (52,6%) eram do placebo.

Destes 24 pacientes com efeitos adversos 13 (54%) apresentavam Rinite isoladamente e 11(46%) apresentavam Rinite acompanhado de Asma. Seis dos 70 pacientes (8,6%) apresentaram efeitos adversos apenas antes de receber SLIT, 8/70 (11,4%) tiveram reações somente após receber a vacina, e 10/70 (14,3%) apresentaram efeitos antes e após receberem a vacina. Foi considerado efeitos adversos de vacina não somente após, mas também reações que ocorreram antes de receber as doses da SLIT. Isto ocorreu porque no tempo de indução da vacina ela foi ministrada diariamente e na fase de manutenção foi ministrada três vezes por semana e a maioria dos efeitos adversos ocorreram na fase de indução do tratamento que foram apresentados em 20/24 (83,4%) pacientes, enquanto uma minoria dessas reações ocorreram em pacientes durante a fase de manutenção, sendo apresentados em 4/24 pacientes (16,7%).

Os efeitos adversos locais relacionados a SLIT foram observados em 22/70 pacientes (31,4%) e consistiram de reações locais leves, tais como espirros, coriza, obstrução nasal, inchaço dos olhos, boca seca e coceira nos olhos, nariz, ouvidos, garganta e palato. Além disso, reações sistêmicas leves e moderadas tais como tosse, cefaléia leve e intensa, dispnéia e sibilância foram observadas em 15/70 (21,4%) pacientes. Nenhuma criança apresentou efeitos adversos graves ou anafilaxia.

Tabela 4 – Efeitos adversos e razões de desistências da SLIT.

Variáveis	Grupos		
	DPT	DPT+MRB	Placebo
Número de pacientes	26	25	19
Efeitos adversos, n (%)	5 (19.2)	9 (36.0)	10 (52.6)
Antes de receber SLIT	1 (3.8)	1 (4.0)	4 (21.0)
Depois de receber SLIT	2 (7.7)	3 (12.0)	3 (15.8)
Antes e depois de receber SLIT	2 (7.7)	5 (20.0)	3 (15.8)
Efeitos adversos locais	5 (19.2)	7 (28.0)	10 (52.6)
Efeitos adversos sistêmicos	5 (19.2)	4 (16.0)	6 (31.6)
Desistências, n	8	11	13
Não relacionadas ao tratamento	4	7	9
Não compareceu aos questionários	2	3	4
Efeitos adversos	2	1	0

SLIT: imunoterapia sublingual; DPT: grupo de pacientes que receberam extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus*; DPT+MRB: grupo de pacientes que receberam extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* e extrato bacteriano misto do trato respiratório.

4.3. Avaliação Clínica e da Reatividade Cutânea

Os resultados clínicos demonstraram diminuição significativa nos escores dos sintomas de rinite após 12 e 18 meses de SLIT em todos os grupos, notadamente no grupo DPT+MRB ($p < 0,0001$) (Fig. 7A). Da mesma forma, escores de sintomas de asma diminuíram após 12 meses de SLIT em todos os grupos ($p < 0,05$), e após 18 meses apenas no grupo DPT+MRB ($p < 0,01$) (Fig. 7B).

Por outro lado, os escores de uso de medicação para rinite foram reduzidos após 12 meses de SLIT no grupo DPT ($p < 0,05$) (Fig. 7C), enquanto que os escores de uso de medicação para asma não foram significativamente alterados em nenhum grupo (Fig. 7D). Não houve diferenças significativas nas análises entre os grupos em cada tempo de avaliação para estes parâmetros.

RESULTADOS

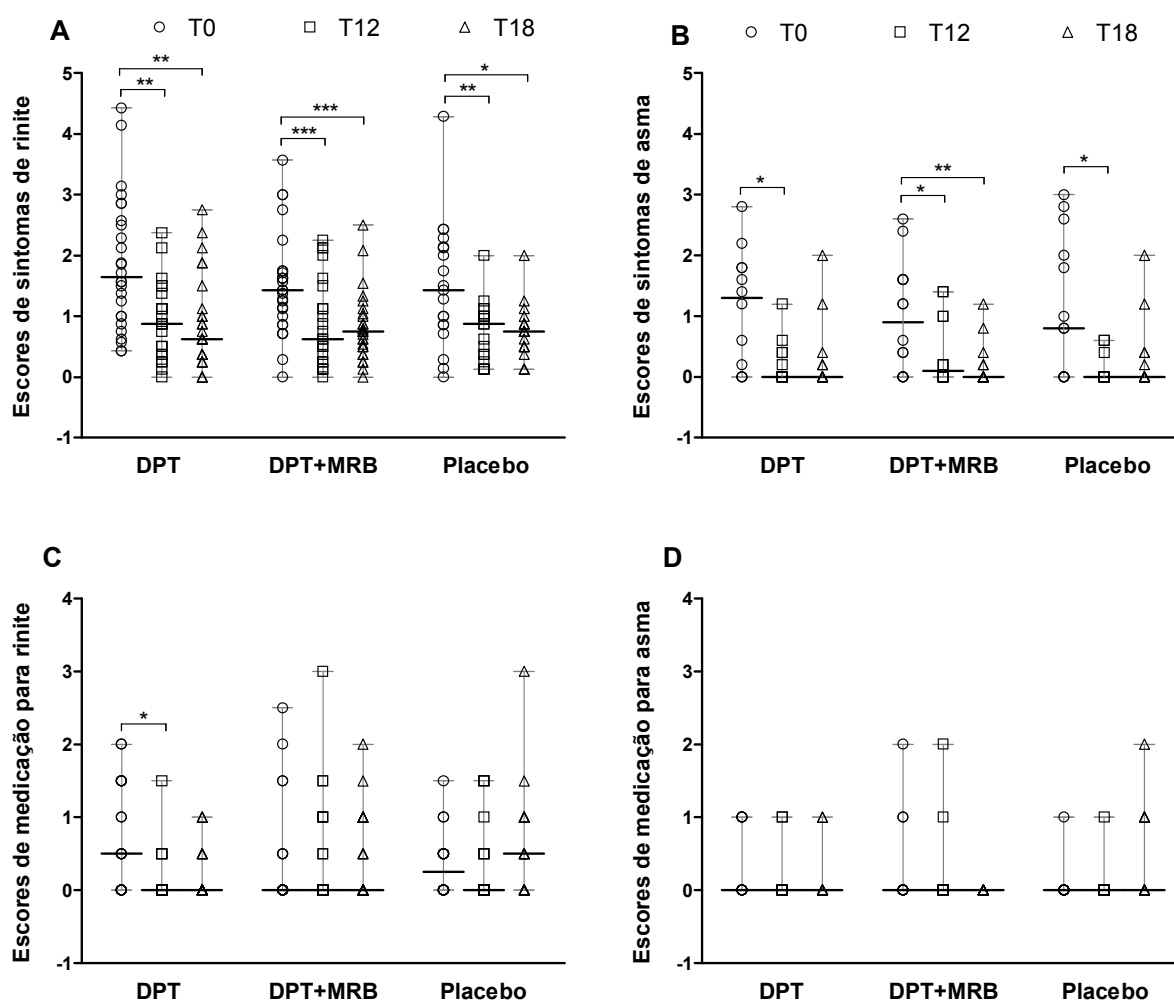


Figura 7 – Avaliação clínica dos pacientes submetidos à imunoterapia sublingual (SLIT) para alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em três grupos randomizados de tratamento: DPT (pacientes que receberam alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (pacientes que receberam alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (pacientes que receberam somente diluente das vacinas; n = 19). Escores de sintomas de rinite (A) e de asma (B); Escores de medicação para rinite (C) e asma (D). As barras horizontais (preto) indicam as medianas e linhas verticais (cinza) indicam o intervalo (min a max) para cada grupo. Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001).

RESULTADOS

Os resultados do teste cutâneo de puntura (TCP) também não apresentaram diminuição significativa no tamanho da pápula em resposta ao extrato de Dpt após 12 ou 18 meses de SLIT em nenhum grupo (Fig. 8). Da mesma forma, a reatividade cutânea não apresentou diferenças significativas na análise entre os grupos no início e após 12 ou 18 meses de SLIT.

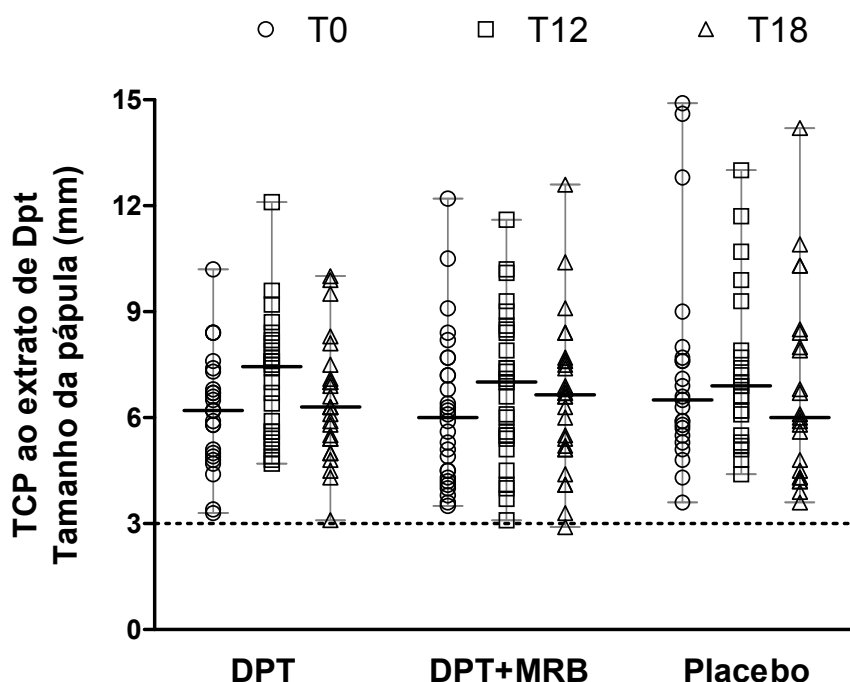


Figura 8 – Avaliação da reatividade cutânea dos pacientes submetidos à imunoterapia sublingual (SLIT) para alergia ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) em três grupos randomizados de tratamento: DPT (pacientes que receberam alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (pacientes que receberam alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (pacientes que receberam somente diluente das vacinas; n = 19). Os resultados do teste cutâneo de puntura (TCP) estão demonstrados pelo tamanho da pápula (mm). As barras horizontais (preto) indicam as medianas e linhas verticais (cinza) indicam o intervalo (min a max) para cada grupo. A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade do TCP (>3 mm).

4.4. Resposta de Anticorpos Séricos IgE, IgG4 e IgG1 Específicos a *D. pteronyssinus* após SLIT

Os efeitos da SLIT na resposta de anticorpos sistêmicos específicos a *D. pteronyssinus* foram avaliados pela determinação dos níveis séricos de IgE, IgG4 e IgG1 ao extrato total Dpt e a seus principais alérgenos Der p 1 e Der p 2 antes e após 12 e 18 meses de imunoterapia.

Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis séricos de IgE ao alérgeno Dpt após 12 ou 18 meses de SLIT em nenhum grupo (Fig. 9A). Os níveis de IgE ao alérgeno Der p 1 também não foram significativamente alterados após SLIT (Fig. 9B), mas os níveis de IgE a Der p 2 aumentaram após 12 meses de SLIT no grupo DPT ($p < 0,05$) e diminuíram após 18 meses de tratamento no grupo DPT+MRB ($p < 0,05$) (Fig. 9C). Na análise entre os grupos, após 18 meses de SLIT, os níveis de IgE anti-Dpt foram menores em pacientes do grupo DPT+MRB comparado ao placebo ($p < 0,05$) (Fig. 9D), mas nenhuma diferença significativa foi encontrada para IgE aos alérgenos Der p 1 e Der p 2 entre os grupos em cada tempo de avaliação (Figs. 9E, F).

Em contraste, um aumento significativo nos níveis séricos de IgG4 para Dpt após 12 meses de SLIT foi demonstrado apenas no grupo DPT ($p < 0,05$) (Fig. 10A). Os níveis de IgG4 anti-Der p 1 (Fig. 10B) e Der p 2 (Fig. 10C) também foram significativamente maiores após 12 e 18 meses de SLIT apenas no grupo DPT ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas análises entre os grupos em cada tempo de avaliação para IgG4 ao alérgeno Dpt (Fig. 10D), mas os níveis de IgG4 anti-Der p 1 mostraram-se significativamente aumentados em pacientes do grupo DPT após 12 e 18 meses de SLIT em relação aos outros dois grupos ($p < 0,05$) (Fig. 10E). Além disso, os níveis de IgG4 anti-Der p 2 também mostraram-se aumentados no grupo DPT após 18 meses de SLIT comparado ao placebo ($p < 0,05$) (Fig. 10F).

De forma similar, os níveis séricos de IgG1 para Dpt aumentaram após 12 e 18 meses de SLIT somente no grupo DPT ($p < 0,05$) (Fig. 11A), enquanto que as respostas de IgG1 mostraram aumento significativo apenas para Der p 1 (Fig. 11B) após 12 e 18 meses de SLIT no grupo DPT ($p < 0,05$). Por outro lado, o grupo placebo apresentou diminuição dos níveis de IgG1 anti-Der p 1 após 18 meses de SLIT ($p < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas para os níveis de IgG1 anti-Der p 2 em nenhum grupo após SLIT (Fig. 11C). Além disso, não houve diferenças significativas nas análises entre os grupos em cada tempo de avaliação para IgG1 ao alérgeno Dpt e Der p 2 (Figs. 11D, F), mas os níveis de IgG1 anti-Der p1 foram significativamente maiores em pacientes do grupo DPT após 12 e 18 meses de SLIT comparado aos outros dois grupos (Fig. 11E).

RESULTADOS

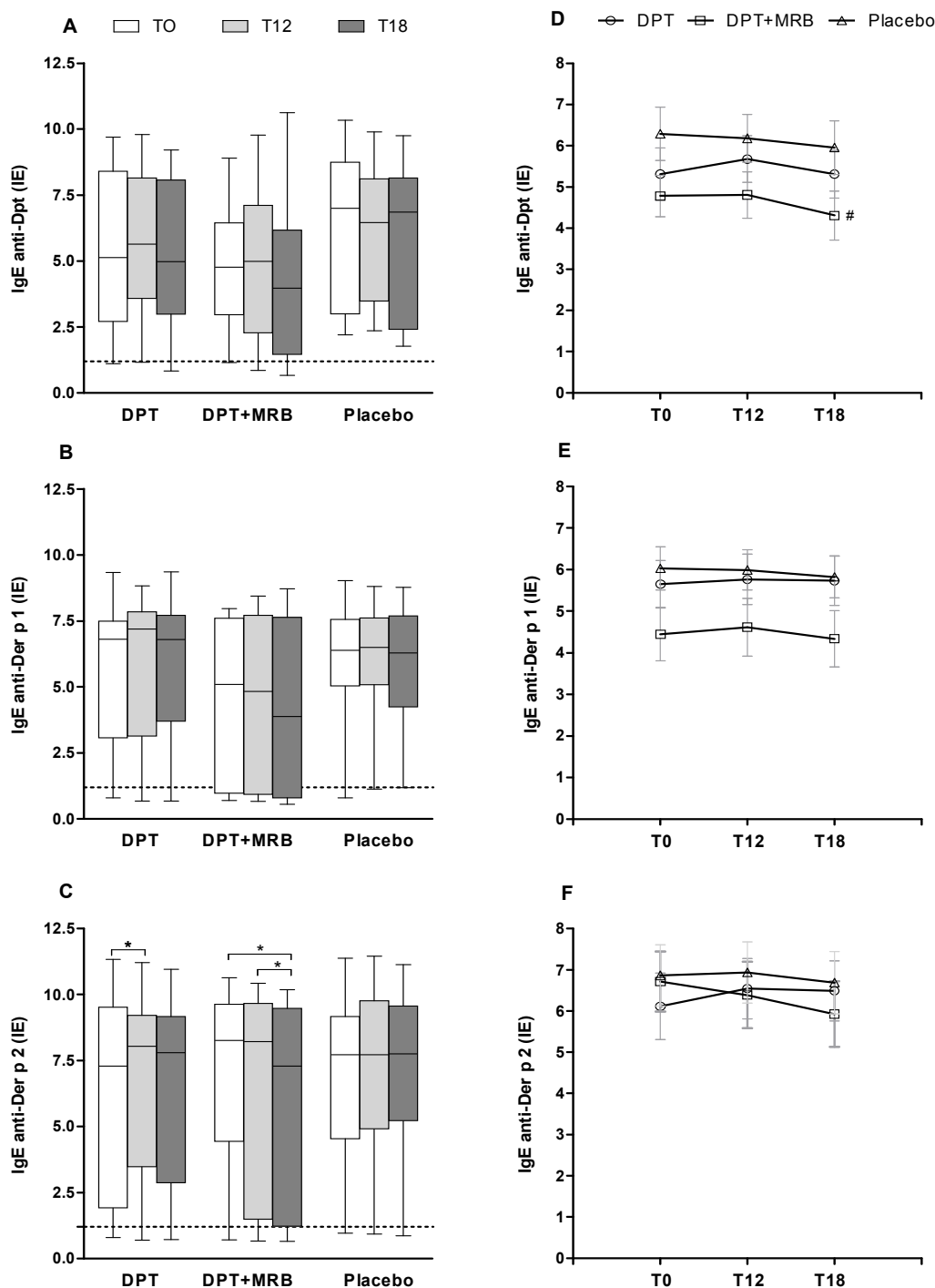


Figura 9 - Níveis de IgE aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (**A, D**) e a seus alérgenos principais Der p 1 (**B, E**) e Der p 2 (**C, F**) em soros de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em *box plot* (**A, B, C**) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (*p < 0,05). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (**D, E, F**). Diferenças significativas entre os grupos em cada tempo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (# p < 0,05 em relação ao placebo).

RESULTADOS

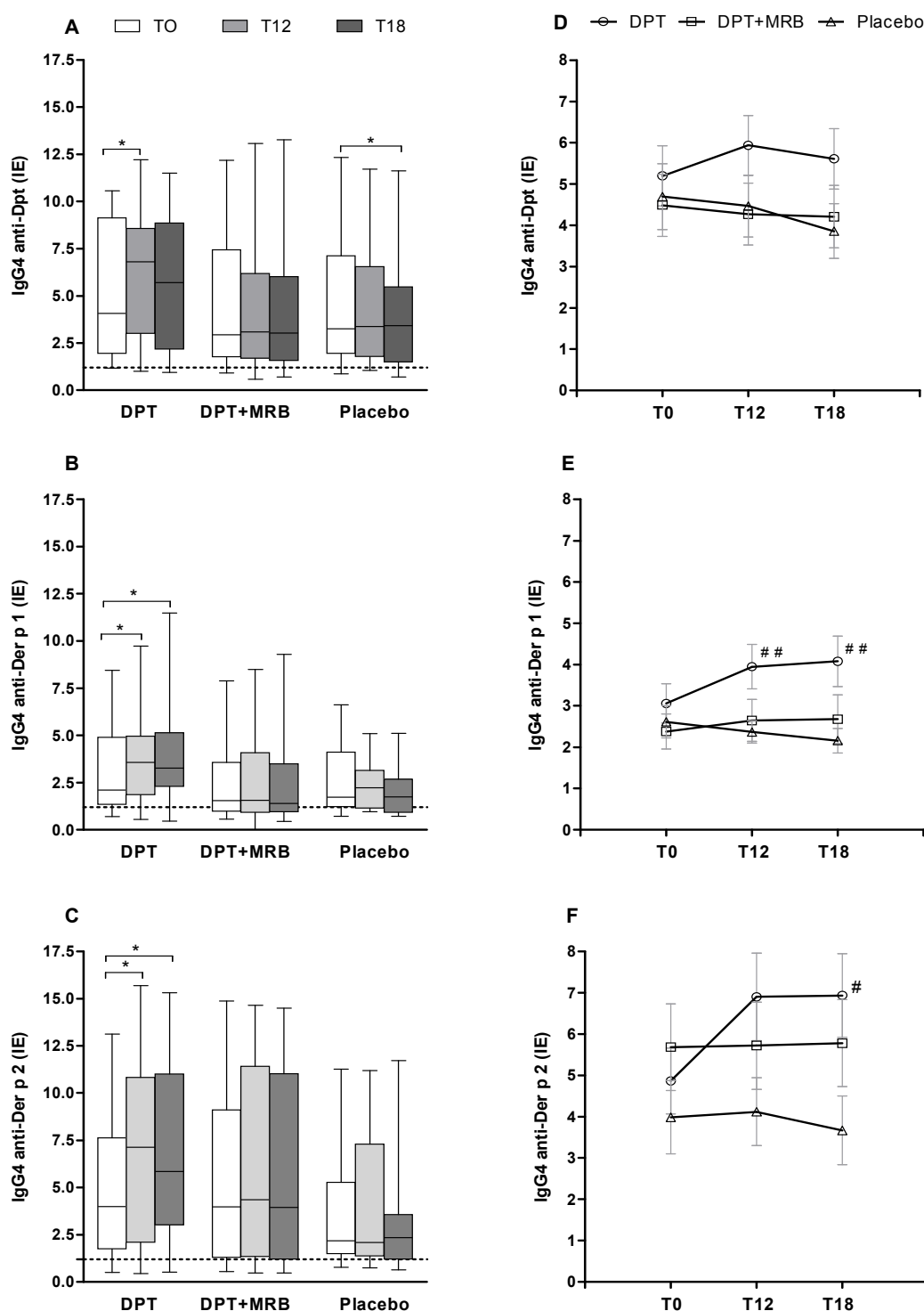


Figura 10 - Níveis de IgG4 aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (**A, D**) e a seus principais alérgenos Der p 1 (**B, E**) e Der p 2 (**C, F**) em soros de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (**A, B, C**) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (**D, E, F**). Diferenças significativas entre os grupos em cada tempo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (# p < 0,05 em relação ao placebo; ## p < 0,05 em relação aos grupos DPT+MRB e placebo).

RESULTADOS

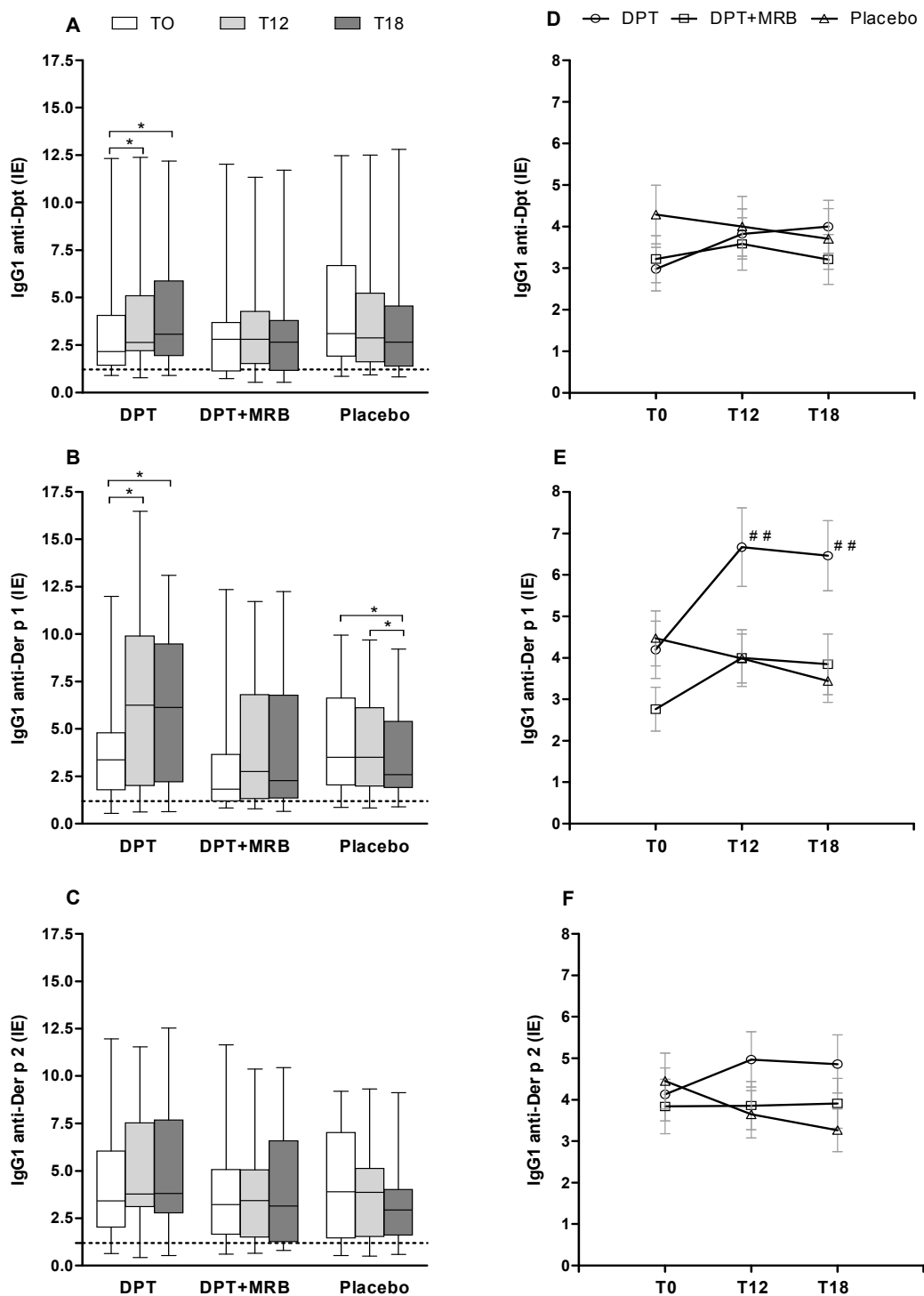


Figura 11 - Níveis de IgG1 aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (**A, D**) e a seus principais alérgenos Der p 1 (**B, E**) e Der p 2 (**C, F**) em soros de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (dilúente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (**A, B, C**) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (**D, E, F**). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05). Diferenças significativas entre os grupos em cada tempo foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (## p < 0.05 em relação aos grupos DPT+MRB e placebo).

4.5. Resposta de Anticorpos IgA Salivares e de Fluido de Lavado Nasal Específicos a *D. pteronyssinus* Após SLIT

Os efeitos da SLIT na resposta de anticorpos locais específicos a *D. pteronyssinus* foram avaliados pela determinação dos níveis de IgA ao extrato total Dpt e aos seus alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2, em amostras de saliva e de fluido de lavado nasal, antes e após 12 e 18 meses de imunoterapia.

Os níveis de IgA salivares ao alérgeno Dpt aumentaram após 12 meses de SLIT somente no grupo DPT ($p < 0,05$) (Fig. 12A), enquanto que a resposta de IgA salivar aos alérgenos principais foi alterada apenas para o alérgeno Der p 1 em ambos os grupos ativos, DPT ($p < 0,05$) e DTP+MRB ($p < 0,01$) após 12 meses de SLIT (Fig. 12B). Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de IgA salivares ao alérgeno Der p 2 após SLIT (Fig. 12C). Além disso, não houve diferenças significativas nas análises entre os grupos em cada tempo de avaliação para estes parâmetros (Figs. 12D, E, F).

Por outro lado, os níveis de IgA no fluido de lavado nasal mostraram diminuição significativa após 18 meses de SLIT ($p < 0,05$) em ambos os grupos DPT e placebo (Fig. 13A). Não foram observadas alterações significativas nos níveis de IgA para os alérgenos principais Der p 1 (Fig. 13B) e Der p 2 (Fig. 13C) em amostras de fluido de lavado nasal após quaisquer tempos de avaliação em cada grupo. Além disso, nenhuma diferença significativa foi encontrada nas análises entre os grupos em cada tempo de avaliação para estes parâmetros (Figs. 13D, E, F).

RESULTADOS

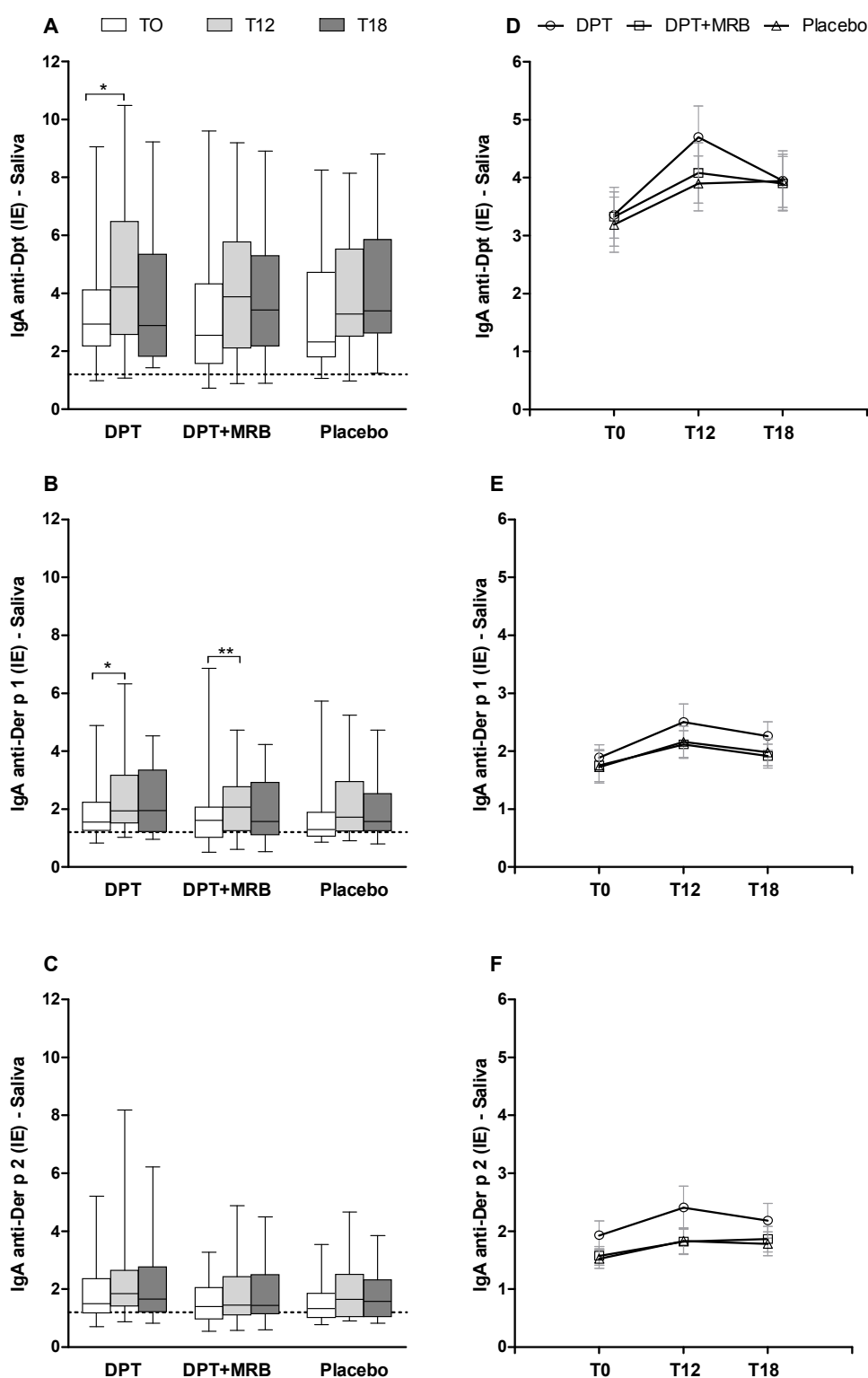


Figura 12 - Níveis de IgA aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (**A, D**) e a seus principais alérgenos Der p 1 (**B, E**) e Der p 2 (**C, F**) em amostras de saliva de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (dilúente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (**A, B, C**) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (**D, E, F**). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05).

RESULTADOS

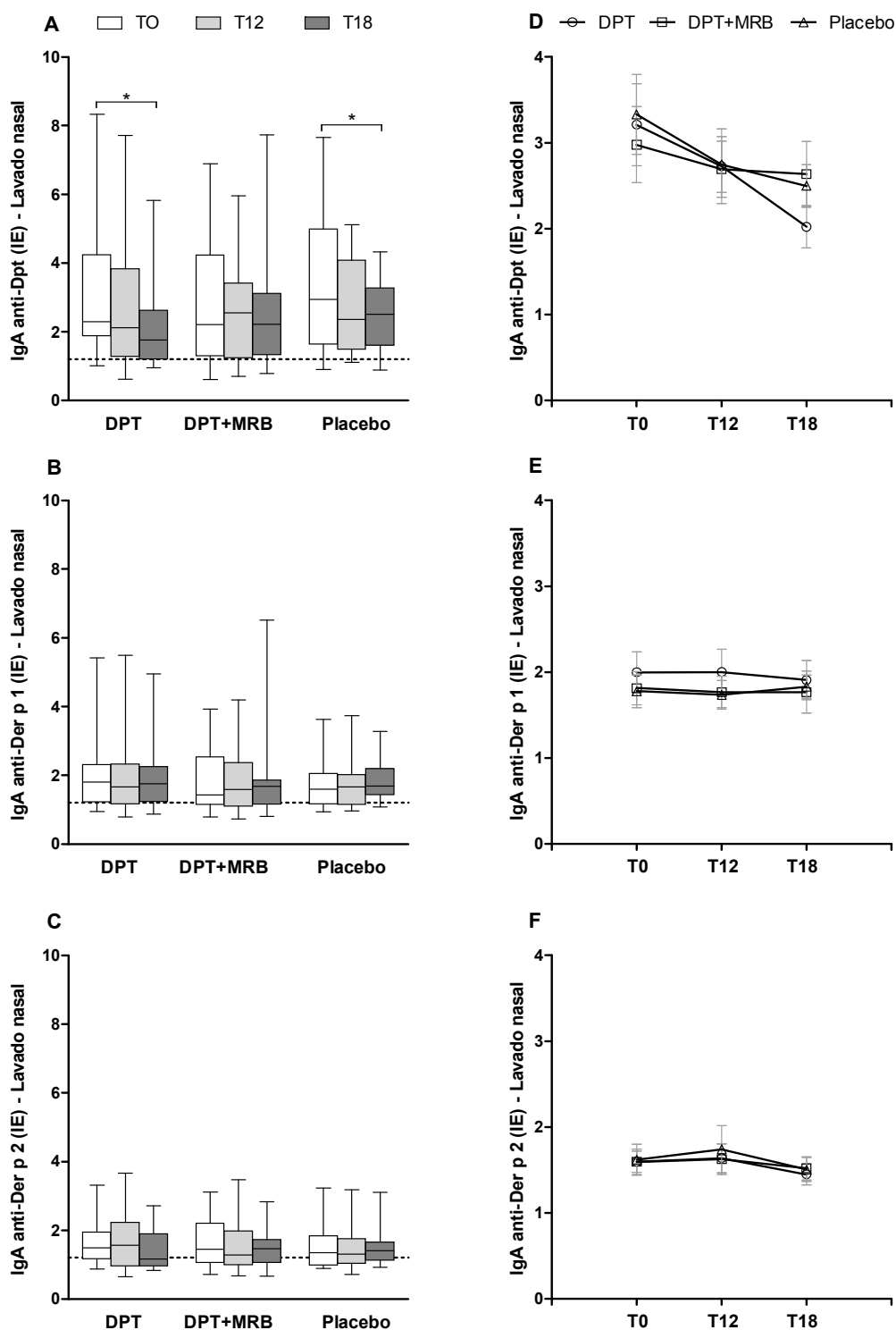


Figura 13 - Níveis de IgA aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (**A, D**) e a seus principais alérgenos Der p 1 (**B, E**) e Der p 2 (**C, F**) em amostras de fluido do lavado nasal de pacientes randomizados em três grupos de imunoterapia sublingual: DPT (alérgeno Dpt; n = 26), DPT+MRB (alérgeno Dpt e extratos de bactérias mistas das vias respiratórias; n = 25), e Placebo (diluyente das vacinas; n = 19). Níveis de anticorpos são expressos em índice ELISA (IE) e os dados são representados em box plot (**A, B, C**) com mediana e percentis 25-75%, e linhas verticais que indicam o intervalo dos valores (min a max). A linha pontilhada indica o valor do limite de positividade da reação (IE > 1.2). A cinética da resposta de anticorpo é também indicada e expressa em média e erro padrão da média (**D, E, F**). Diferenças significativas entre os valores iniciais (T0) e após 12 (T12) ou 18 (T18) meses de tratamento dentro de cada grupo foram determinadas pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn (* p < 0,05).

5 DISCUSSÃO

5.1. Discussão

Ácaros da poeira domiciliar como *D. pteronyssinus* representam fontes alergênicas importantes na indução de doenças alérgicas respiratórias. Para o tratamento dessas doenças, a imunoterapia sublingual (SLIT) constitui uma alternativa viável e eficaz à imunoterapia subcutânea (SCIT) aplicada à pacientes com asma e rinite alérgica (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE, et al., 2001). A SLIT é uma modalidade de imunoterapia específica com alérgenos ideal para tratar a população pediátrica devido ao seu excelente nível de segurança, pois seus efeitos colaterais são praticamente ausentes, custo, eficácia e boa adesão ao tratamento (KUO; WANG, et al., 2009). Além disso, vários estudos têm empregado SLIT na prática clínica de pacientes pediátricos alérgicos a ácaros da poeira domiciliar (HIRSCH; SÄHN; LEUPOLD, 1997; LUE; LIN, et al., 2006; TSENG; FU, et al., 2008), contudo há informações limitadas sobre o uso concomitante de extratos de ácaros associados a extratos de bactérias.

O presente trabalho foi um estudo com SLIT randomizado, duplo-cego e controlado com placebo usando alérgenos de Dpt padronizados associados ou não com extratos bacterianos em crianças brasileiras sensibilizadas a ácaros com rinite alérgica com ou sem asma. Um total de 70 pacientes, representando 70% da amostra do início do estudo, foram seguidos clínica e laboratorialmente por 18 meses para possibilitar a análise da ocorrência de alterações clínicas e imunológicas relevantes na evolução da doença alérgica respiratória. É importante salientar, que todos os pacientes dos três grupos estavam homogêneos após distribuição randômica antes do início da imunoterapia, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre eles para os dados demográficos e clínicos, bem como os parâmetros imunológicos como resultados de SPT, níveis de IgE sérica total e IgE específica para ácaros.

Embora não tenhamos detectado diferenças significativas entre os grupos de tratamento no escore de sintomas ou uso de medicação, resultados clínicos mostraram que houve um declínio significativo nos escores de sintomas de rinite e asma após SLIT em grupos ativos e placebo, particularmente no grupo DPT+MRB, o qual apresentou a redução mais expressiva nos escores de sintomas clínicos aos 18 meses de tratamento. Uma explicação proposta a nível celular e molecular sugerida para este efeito poderia ser explicado pela presença de antígenos microbianos na

composição da vacina deste grupo que induziriam as células dendríticas a mecanismos tolerogênicos, como estimulação da expressão de moléculas co-inibitórias (B7H1 e B7H3) ou a liberação de IL10. Estas propriedades tolerogênicas podem ser alvo de substituição de alérgenos com adjuvantes, que empregam as mesmas estruturas em DCs orais para aumentar o efeito da SLIT (NOVAK; BIEBER; ALLAM, 2011).

Quanto ao uso de medicação, foi observado que houve uma redução significativa nos escores para rinite no grupo DPT, após 12 meses de tratamento. Vários estudos duplo cego, randomizados, controlados por placebo também têm demonstrado uma redução significativa nos escores dos sintomas da rinite após SLIT em pacientes sensibilizados a ácaros usando somente alérgeno de ácaro (TARI; MANCINO; MONTI, 1990; WILSON; TORRES; DURHAM, 2003; WILSON; LIMA; DURHAM, 2005; MALLING, 2006). No entanto, dois outros estudos não encontraram nenhum benefício clínico consistente após o emprego de SLIT em comparação ao placebo após 12 ou 24 meses de tratamento (HIRSCH; SÄHN; LEUPOLD, 1997; GUEZ; VATRINET, et al., 2000). Em nosso estudo, a razão de não termos encontrado uma diferença significativa entre os grupos não está provavelmente relacionada com a dose de manutenção ou tempo de uso em nosso esquema de SLIT, pois acredita-se que essas variáveis tenham sido realizadas de forma adequada. Neste contexto, estudo recente envolvendo o uso de SLIT com extrato de ácaros da poeira domiciliar em pacientes com rinite alérgica a ácaros administrada por um período maior que 30 semanas mostrou-se segura, eficaz e bem tolerada (YONEKURA; OKAMOTO, et al., 2010). Apesar dos consensos atuais de imunoterapia referirem que a duração completa da imunoterapia seja subcutânea ou sublingual deveria encerrar somente após três a cinco anos, é esperado que após os primeiros seis meses de imunoterapia o paciente já deveria perceber melhora clínica. Assim, se o paciente não apresenta melhora clínica em dois anos, recomenda-se interromper a imunoterapia (ALVAREZ-CUESTA; BOUSQUET; et. al., 2006; JOINT TASK FORCE ON PRACTICE PARAMETERS; AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY; AMERICAN COLLEGE OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY; JOINT COUNCIL OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY, 2007). Um seguimento a longo prazo após o término da SLIT seria necessário para compararmos os sintomas e uso de medicação entre os três grupos de tratamento, dentro de um período de seguimento maior e assim

poderíamos observar a diferença entre os grupos estudados de uma forma mais consistente.

Em relação à dose de manutenção, Bush; Swensone e colaboradores (2011) em um recente estudo de SLIT controlado com placebo, comparando altas (70 µg de Der f 1/dia) *versus* baixas doses (1µg de Der f 1/dia) de *D. Farinae*, tem demonstrado melhora dos escores de sintomas e de uso medicação sem diferença estatística entre os três grupos estudados em pacientes adultos com rinite alérgica com ou sem asma, como encontrados em nosso estudo. Apesar de este estudo não fazer referência a participação em Programa Educativo para Asma, estes dados sugerem que outras variáveis de cuidados à saúde também devem ter influenciado na melhora dos escores de sintomas de rinite e uso de medicação observada durante o período de 12 a 18 meses de imunoterapia realizada neste estudo.

Neste presente estudo os pacientes faziam parte de um programa educacional aplicado na rotina de atendimento de rinite e asma. Este programa proporcionou um crescente e progressivo aprendizado dos conceitos sobre a fisiopatologia da rinite e asma, controle ambiental, e tratamento a longo e curto prazo. Acredita-se ter melhorado o conhecimento dos pacientes e/ou de seus responsáveis sobre a doença e sobre o tratamento medicamentoso em crise. Eles aprenderam a utilizar a medicação com auto-manejo, por meio da orientação de um plano de ação por escrito, para ser utilizado em caso de reaparecimento ou agravamento dos sintomas (ANEXO 3). Isto proporcionou melhor controle clínico e diminuição do uso de medicação pelos pacientes com rinite alérgica persistente moderada/grave com ou sem asma leve intermitente ou persistente. Para os pacientes deste estudo com SLIT não foi orientado o tratamento de manutenção em longo prazo fora de exacerbações dos sintomas, e não tiveram acesso ao plano de ação para medicamentos de longa duração, mas sim para curto prazo. Tivemos este cuidado para evitar a interferência pelos medicamentos de uso contínuo em nossos resultados. Foi orientado que a medicação fosse utilizada no máximo 7 dias em vigência de crise e/ou piora clínica. López-Viña e Del Castillo-Arévalo (2000) demonstraram que um programa de educação realizado em longo prazo e com visitas médicas regulares em nível ambulatorial tem mostrado impacto relevante sobre a melhora clínica de pacientes portadores de asma e rinite. O grupo auto-manejo apresentou melhor controle clínico quando comparado com o grupo que recebeu somente educação e grupo controle.

Neste presente estudo, os pacientes e seus pais ou responsáveis participaram deste programa de educação em rinite e asma, visitaram mensalmente um médico e outros profissionais da saúde como enfermeiras, assistentes sociais e psicólogos. Esta equipe os auxiliou a agregarem conhecimentos sobre a doença, incluindo o uso adequado de dispositivos inalatórios orais e nasais bem como apoio psicossocial adequado. Assim sendo, eles alcançaram boa adesão ao tratamento, seguindo devidamente as orientações fornecidas para a realização de medidas preventivas para evitar a inalação de alérgenos, uso correto de medicamentos. Como consequência, houve melhora dos aspectos psicossomáticos associados com doenças alérgicas e da qualidade de vida relacionada à rinite persistente e asma leve, além de atenuar os sintomas de ansiedade tanto das crianças quanto de seus pais possivelmente pela boa relação profissional-paciente devido ao constante apoio e orientações dadas pela equipe multidisciplinar (QUEIRÓS; OLIVEIRA, et al., 2008).

As medidas de educação em doenças alérgicas no programa eram realizadas no mesmo dia em que os pacientes compareciam à unidade de saúde NABS para receberem as vacinas, coleta de exames, realização de entrevistas (questionários) e consultas médicas. Sendo assim os resultados aqui obtidos de melhora clínica em todos os grupos foi principalmente relacionado à melhor qualidade de assistência multiprofissional dada ao paciente alérgico. Em duas revisões sistemáticas, sobre medidas educacionais em asma, em crianças, adolescentes e adultos, fica evidente que quanto mais individualizado for o programa de educação, maior será sua efetividade na evolução da doença (GIBSON; POWELL et al., 2003; GUEVARA; WOLF, et al., 2003). Estudos clínicos baseados na educação do paciente e auto-manejo da asma apresentam resultados positivos na melhora da qualidade de vida (JONES, 2008), sendo um componente essencial para o manejo da asma e parece ter maior benefício aos portadores de comorbidades associadas à asma (LEMIÈRE; BAI, 2004).

Acreditamos que no presente estudo o conhecimento das doenças alérgicas, particularmente rinite e asma, identificando sinais e sintomas de piora clínica ministrados no programa tem beneficiado os pacientes melhorando os sintomas clínicos dessas doenças, contribuindo para a redução das visitas aos serviços de emergência, hospitalizações, utilização de broncodilatadores inalatórios orais de resgate, corticóides inalatórios orais e nasais e, corticóides sistêmicos. Em nosso

estudo anterior, sobre o “Programa de Alergia Respiratória em Unidade do SUS X Diminuição do Número de Internações por Asma e Pneumonia”, concluímos que programas de educação em saúde encorajam o paciente a assumir maior responsabilidade no manejo da sua própria doença, com adequação do tratamento pelo auto-ajuste da medicação conduzida por um plano de ação por escrito e visita médica sequencial, resultando em aumento de aderência ao tratamento e em redução na morbidade por rinite e asma e diminuição de hospitalizações (QUEIRÓS; ABDALLA; PEPPE, 2000).

O emprego de Imunoterapia com extratos bacterianos nas doenças alérgicas tem sido descrito há décadas, mas os seus efeitos não tem sido convincentes, pois nem todos destes estudos foram controlados por placebo. Estudos duplo-cegos usando injeções subcutâneas com extratos de bactérias não demonstraram eficácia clínica na asma (FRANKLAND; HUGHES; GORRILL, 1955; KOIVIKKO, 1973) por provável curto período de tratamento e concentração insuficiente de bactérias (MUELLER; LANZ, 1969). No entanto, um estudo realizado em pacientes com asma evidenciou uma redução dos sintomas em 75% dos pacientes estudados (OEHLING; JEREZ, et al., 1979) e em outro, 86% das crianças tratadas com imunoterapia bacteriana oral foi evidenciada uma redução na frequência e na gravidade das crises de asma em relação aos episódios de infecção (OEHLING, 1996). Estes achados reforçam que os extratos bacterianos têm um papel importante na redução do perfil Th2 dominante nas respostas imunológicas e, conseqüentemente, devam contribuir para a melhora clínica desses pacientes alérgicos (ZUBERBIER; BACHERT, et al., 2010).

Ao analisarmos a reatividade cutânea aos extratos alergênicos observada por meio do teste cutâneo (SPT), não foram encontradas diferenças significativas entre o início e após 12 e 18 meses de SLIT dentro de cada grupo e não houve diferenças significativas entre os grupos. Estes dados concordam com outros estudos que também não demonstraram diminuição significativa no diâmetro da pápula obtido por meio do SPT em grupos ativos ou placebo após SLIT em pacientes com alergia a ácaros (GUEZ; VATRINET, et al., 2000; OZDEMIR; YAZI, et al., 2007). No entanto, estudos anteriores, controlados por placebos, mostraram reatividade cutânea reduzida após SLIT em crianças com asma e rinite sensibilizados a ácaros da poeira domiciliar (BAHCECILER; IŞIK, et al., 2001; EIFAN; AKKOC, et al., 2010). Isto reafirma que a reatividade ao teste cutâneo

alérgico utilizando uma única diluição bem como os níveis de anticorpos IgE específicos *in vitro* nem sempre estão intimamente relacionados com uma resposta clínica do paciente (JOINT TASK FORCE ON PRACTICE PARAMETERS; AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY; AMERICAN COLLEGE OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY; JOINT COUNCIL OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY., 2007). Dessa forma, a melhora clínica parece estar relacionada não com a diminuição dos anticorpos específicos da classe IgE e sim pela formação de outras classes de anticorpos bloqueadores capazes de impedirem a degranulação mastocitária mediada por IgE por mecanismo de competição, o qual será discutido adiante com mais detalhe.

A fase de indução como citado anteriormente foi realizada diariamente durante dois meses e meio e a fase de manutenção administrada três vezes por semana durante toda a imunoterapia. Assim sendo, os prováveis efeitos adversos da vacina foram considerados antes (devido a vacina estar sendo administrada diariamente na fase de indução e em dias alternados na manutenção) e depois dos pacientes terem recebido as doses da vacina. A SLIT foi considerada geralmente segura, sem reações sistêmicas graves, apresentando apenas reações locais e sistêmicas leves. Reações locais foram mais frequentes (31%) do que os efeitos sistêmicos (21%). Tais reações têm sido relatadas em outros estudos de SLIT com ácaros e foram associados a uma alta potência do extrato alérgico (BUSH; SWENSON, et al., 2011). Em nosso atual estudo, a dose de manutenção de SLIT teve que ser ajustada para 36 µg de Der p 1 por mês e 30 µg de Der p 2 por mês. Quando foi tentado ultrapassar esta dose, observou-se aumento da ocorrência de reações locais e risco de reações sistêmicas mais graves. Sendo assim, foi decidido fixar nesta dosagem como a dose de manutenção até o final do estudo.

No presente trabalho, crianças com rinite alérgica com ou sem asma apresentaram níveis elevados de IgE sérica para Dpt e a seus principais alérgenos, Der p 1 e Der p 2, no início do estudo, sendo que durante os 18 meses de imunoterapia os níveis de IgE anti Der p 2 se mantiveram maiores que os níveis de IgE anti Der p 1. Após 18 meses de SLIT, os níveis de IgE a Der p 2 diminuíram significativamente no grupo DPT+MRB, o qual também mostrou níveis de IgE anti-Dpt menores que aqueles apresentados pelo grupo placebo neste tempo de avaliação. Resultados semelhantes foram obtidos em nosso estudo anterior quando foi empregada a SCIT que mostrou diminuição dos níveis de IgE para Dpt e Der p 2,

após 1 ano de tratamento no grupo DPT+MRB (QUEIRÓS; OLIVEIRA, et al., 2008), reforçando o efeito adjuvante de extratos de bactérias em modular as respostas IgE específicas a ácaros. Em contraste, o aumento dos níveis de IgE ao alérgeno Der p 2, mas não a Der p 1 e ao extrato total de Dpt, foram encontrados apenas no grupo ativo DPT, demonstrando que as crianças eram mais sensíveis ao alérgeno Der p 2 que ao alérgeno Der p 1. Esses achados discordam com o nosso estudo anterior de SCIT que demonstrou uma diminuição significativa dos níveis de IgE a Der p 2 no grupo DPT (QUEIRÓS; OLIVEIRA, et al., 2008), sustentando que a SCIT tem se mostrado ser mais eficaz do que a SLIT para a redução da síntese de IgE alérgeno-específica. Neste contexto, estudos prévios demonstraram que os níveis de IgE específicos para Der p 2 foram superiores aos níveis de IgE anti-Der p 1 no soro dos pacientes, reforçando que Der p 2 é uma molécula imunologicamente mais ativa do que Der p 1 na indução de síntese de IgE (TAKETOMI ; OLIVEIRA. et al., 2005).

Na avaliação de respostas de subclasses de IgG alérgeno-específicos no soro, foi notável o aumento significativo dos níveis de IgG4 para os alérgenos de Dpt, Der p 1 e Der p 2 após 12 ou 18 meses de tratamento no grupo DPT, que fundamenta o efeito da SLIT ativa sobre a resposta de anticorpos bloqueadores. Esses achados foram mais evidenciados ao alérgeno Der p 1 uma vez que níveis de IgG4 anti-Der p 1 foram significativamente maiores no grupo DPT em relação aos grupos DPT+MRB e placebo após 12 e 18 meses de SLIT. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram aumento significativo dos níveis de IgG4 específico a ácaros após SLIT (TARI; MANCINO; MONTI, 1990; LUE; LIN, et al., 2006) (TSENG; FU, et al., 2008). A associação de IgG4 com atividade protetora está relacionada à sua função como anticorpo de bloqueio ou marcador de indução de tolerância (ALBERSE; STAPEL, 2009).

Imunoterapia alérgeno específica (SIT) também influencia a atividade de bloqueio exercidas pelos anticorpos IgG4 sobre as respostas mediadas por anticorpos IgE, especialmente a apresentação de alérgenos às células T facilitada pelo receptor Fcε de IgE (VAN NEERVEN, WIKBORG, et al., 1999). Anticorpos IgG específicos também podem interferir com a secreção de citocinas dependente da IgE em mastócitos. IgG4 exibe uma característica única estrutural de sua região de dobradiça que resulta em uma menor afinidade para determinados receptores Fc, levando a IgG4 apresentar atividade anti-inflamatória; particularmente, a capacidade de mudança dinâmica do braço Fab, o que leva a anticorpos bi-específicos que são

funcionalmente monoméricos, diminuindo significativamente a possibilidade de ligações cruzadas dos anticorpos IgE com alérgenos em mastócitos e aumenta a capacidade de bloqueio a alérgenos (AALBERSE; SCHUURMAN, 2002; VAN DER NEUT KOLFSCHOTEN; SCHUURMAN, et al., 2007).

A mensuração de anticorpos IgG4 pode ser particularmente valiosa porque o aumento considerável de seus níveis pode ser um forte indicador da ativação dos mecanismos de indução de tolerância (GUEZ, VATRINET, et al., 2000). Portanto, acredita-se que esta atividade de proteção possa constituir em um mecanismo importante para a obtenção da eficácia clínica da imunoterapia específica com alérgenos. Resultados similares foram observados para IgG1 específicos no soro, com um aumento significativo dos níveis IgG1 para Dpt e Der p 1, mas não aos alérgenos Der p 2, no grupo ativo DPT após 12 e 18 meses de SLIT. No entanto, um estudo anterior com SLIT em pacientes asmáticos sensíveis a ácaros não foi capaz de demonstrar alterações nos níveis séricos de IgG1 específica durante todo o período de tratamento (BAHCECILER; ARIKAN, et al., 2005). Nossos resultados também divergem de outro estudo de SIT com gramíneas (PENG; NACLERIO, 1992) que demonstrou que IgG1 era dominante na resposta no primeiro ano, ou seja, no início da imunoterapia, enquanto IgG4 aparece em quantidades significativas somente após tratamento prolongado (3 anos).

No presente estudo, respostas induzidas por IgG1 anti-Dpt foram aumentadas após 12 e 18 meses de SLIT e predominantemente ao alérgeno Der p 1, no grupo ativo DPT bem como em relação aos grupos DPT+MRB e placebo, reforçando a nossa idéia de que Der p 1 deve ser mais imunogênico do que Der p 2 na indução de síntese de IgG1 (QUEIRÓS; OLIVEIRA, et al., 2008). Alternativamente, pode ser interpretado que o conteúdo do alérgeno Der p 2 no extrato Dpt tivesse sido insuficiente para estimular a produção desses anticorpos IgG1 específicos, uma vez que o extrato de alérgenos Dpt contém metade da quantidade de Der p 2 (5.100 µg/ml) em relação a Der p 1 (10.900 µg/ml). Estes dados sugerem que a SLIT utilizando extrato bruto de Dpt pode modular o equilíbrio de resposta imune no eixo Th1/Th2 estimulando predominantemente a síntese de IgG1 em resposta ao alérgeno Der p 1, mas não a Der p 2 devido as suas características moleculares próprias. Por outro lado, os grupos que receberam DPT+MRB ou placebo não mostraram aumento significativo nas respostas IgG específicas a ácaros, reforçando a premissa de que o alérgeno Dpt administrado

isoladamente possa ser capaz de induzir aumento destes anticorpos IgG específicos.

Embora níveis aumentados de IgE sérica específica aos alérgenos possam ser facilmente demonstrados em crianças com rinite alérgica sensibilizadas aos ácaros, a presença de diferentes isotipos de anticorpos salivares, como IgA, IgE e subclasses de IgG, bem como a relação entre anticorpos séricos e salivares ainda não estão bem estabelecidas. Nesse sentido, com o crescente avanço nas abordagens dos efeitos da imunoterapia sublingual para rinite alérgica, incluindo a mensuração de anticorpos IgA específicos aos alérgenos em outras amostras biológicas como a saliva e o lavado nasal, podem ser uma ferramenta útil para o acompanhamento das alterações imunológicas durante o tratamento.

Ao analisar as respostas de IgA na saliva e amostras de lavado nasal alérgeno-específicos a ácaros, encontramos um aumento dos níveis de IgA salivares para Dpt e Der p 1, mas não a Der p 2, no grupo ativo DPT. No grupo que recebeu DPT+MRB houve aumento significativo de IgA anti-Derp1 e não a Dpt e Derp 2. Dessa forma, anticorpos IgA parecem ser produzidos localmente, e não passivamente transferidos do soro. Assim, há mais de três décadas é conhecido que a maioria desses anticorpos estão presentes nas secreções em sítios de mucosas associados a órgãos ou tecidos específicos (NAKAJIMA; GILLESPIE, 1975; PLATTS-MILLS, 1979). Neste contexto, plasmócitos produtores de IgA podem migrar para superfícies distantes das mucosas e, como resultado, o local de produção de anticorpos IgA não indicaria o sítio da resposta ao alérgeno (PLATTS-MILLS, 1979). É interessante reforçar que a presença de altos níveis de anticorpos IgA específicos, particularmente no soro de crianças não-alérgicas podem ser responsáveis por prevenir sensibilização a alérgenos. Tem sido relatado que a deficiência de anticorpo IgA pode estar associado com o desenvolvimento de atopia no primeiro ano em pacientes alérgicos, reforçando a importância da síntese de anticorpos IgA para prevenir o desenvolvimento de doenças atópicas (TAYLOR; NORMAN, 1973). Além disso, nossos estudos recentes, têm mostrado que anticorpos IgA específicos à alérgenos de ácaros predominam no soro e saliva de crianças não-alérgicas enquanto que anticorpos IgE específicos e anticorpos IgG4 são comuns em crianças alérgicas (Miranda, Silva, et al., 2011). Portanto, a presença de IgA específica parece ter um papel fundamental para a resposta imune saudável aos alérgenos presentes na mucosa. Portanto, medidas de IgA específica no soro e/ou saliva podem ser úteis

para monitorar a ativação de mecanismos de indução de tolerância durante a imunoterapia sublingual.

Curiosamente, em amostras de lavado nasal, no entanto, o efeito oposto foi observado, com diminuição dos níveis de IgA para Dpt no grupo DPT ativo e placebo, sugerindo uma estimulação preferencial da resposta imune após SLIT ativo da região oral, ao invés de uma resposta da mucosa nasal. Um fator importante para a eficácia da SLIT pode ser o tempo de contato prolongado com a mucosa sublingual destas moléculas alergênicas que são imunologicamente ativas na indução não somente de IgE mas também de síntese de anticorpos IgG4, IgG1 e IgA. O alérgeno sublingual é capturado dentro da mucosa oral pelas células dendríticas de Langerhans, e estas são propensas a induzir tolerância pois elas expressam FcεRI, e produzem citocinas reguladoras como IL-10 e TGF-β (MOINGEON; BATARD, et al., 2006; ALLAM; STOJANOVSKI, et al., 2008). Provavelmente, os baixos níveis de IgA salivares estão associados com o desenvolvimento de alergia (VAN ASPEREN; GLEESON, et al., 1985; BÖTTCHER; HÄGGSTRÖM, et al., 2002). Em modelos murinos de sensibilização das vias aéreas, verificou-se que o pré-tratamento com IgA alérgeno-específicos antes da inalação de aeroalérgenos foi capaz de impedir o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas, inflamação eosinofílica pulmonar, produção de IgE específicos e de citocinas Th2 locais (SCHWARZE; CIESLEWICZ, et al., 1998). Assim, os anticorpos IgA alérgeno-específicos foram capazes de modificar as consequências respiratórias e imunológicas das vias aéreas em camundongos sensibilizados a ácaros devido a exposição a estes alérgenos. Desta forma, em modelos murinos houve produção de IgA salivar induzida por *D. pteronyssinus* e supressão da inflamação das vias aéreas após imunoterapia nasal local (LIU; TSAI, 2005).

É interessante notar que há estudos onde foi demonstrado que indivíduos não-atópicos saudáveis têm produção aumentada de IgA no soro específica a Der p 1, mas não a anticorpos IgE específicos (JUTEL; AKDIS, et al., 2003; AYDOGAN; METE, et al., 2007). Estes autores notaram que este aumento de anticorpos IgA específicos no soro coincidiu com o aumento de TGF-β, denotando a importância da atuação das células T reguladoras na elaboração da resposta imune de mucosa periférica aos alérgenos em indivíduos saudáveis. Em adição, vários investigadores têm demonstrado que pacientes com rinite alérgica produzem IgA tanto no soro quanto na saliva por meio da ativação das células T reguladoras produtoras de TGF-

β na tentativa de normalizar as reações alérgicas (JUTEL; AKDIS, et al., 2003; AYDOGAN; METE, et al., 2007). Estes dados suportam que anticorpos IgA específicos podem inibir a ligação de IgE aos alérgenos em células que possuem receptores para o fragmento Fc de IgE (BÖTTCHER; HÄGGSTRÖM, et al., 2002). Assim sendo, estes estudos nos sugerem que o aumento dos níveis de anticorpos IgA específicos após SLIT parece ter um papel fundamental na modulação da resposta imune aos alérgenos de mucosa, evitando a ocorrência das reações alérgicas. Em nosso estudo, o aumento de IgA, IgG4 e IgG1 somente ocorreu nos grupos que receberam o alérgeno DPT associado ou não a extratos bacterianos enquanto no grupo placebo não foi detectado aumento dos níveis destes anticorpos. No entanto, todos os três grupos estudados melhoraram clinicamente, inclusive o placebo. Sendo assim, seria interessante realizar o acompanhamento clínico desses pacientes por um período adicional após a interrupção da SLIT para possibilitar a análise dos grupos que irão permanecer com esta melhora de sintomas e de uso de medicação. Assim, possibilitaria a obtenção de novas conclusões a respeito das alterações imunológicas que observamos neste nosso estudo, avaliando a contribuição para a melhora clínica de nossos pacientes estudados com rinite e asma alérgicas.

Concluimos que de uma maneira geral, a SLIT sugere ser eficaz na melhora dos sintomas clínicos, porém apenas os grupos ativos foram capazes de modular a resposta imunológica local e sistêmica. Assim, a SLIT usando alérgeno Dpt puro, ou seja, do grupo DPT na ausência de extrato bacteriano foi capaz de induzir aumento dos níveis séricos de IgG4 para Dpt, Der p 1 e Der p 2, bem como o aumento de IgG1 no soro e dos níveis salivares de IgA para alérgenos Dpt e Der p 1. A SLIT usando DPT + MRB foi capaz de diminuir os níveis de IgE, especialmente para Der p 2, e aumentar os níveis salivares de IgA Der p 1, mas não tiveram alterações nos níveis de IgG4 e IgG1 específicas. Esses resultados reforçam o papel de IgG4 e IgG1 específicos no soro, além de IgA salivar, como anticorpos possivelmente protetores ou de bloqueio, bem como biomarcadores de tolerância que podem ser úteis para monitorar a ativação de mecanismos de indução de tolerância durante a imunoterapia.

No entanto, várias perguntas ainda precisam ser respondidas antes que o papel da SLIT no tratamento das doenças alérgicas possa ser totalmente definido (MOINGEON; BATARD, et al., 2006; ALLAM; STOJANOVSKI, et al., 2008).

Sugerimos que mais estudos consistentes devam ser realizados para responder os pontos ainda não totalmente definidos, dentre eles são a real concentração efetiva dos alérgenos, a duração do tratamento (BUSH; SWENSON, et al., 2011; MALLING, 2006; WILSON; TORRES; DURHAM, 2003; WILSON; LIMA; DURHAM, 2005) e se a SLIT deve ou não ser administrada com ou sem adjuvantes de extratos bacterianos (ROSASCHINO; CATTANEO, 2004).

6 CONCLUSÃO

Concluimos que:

- a) A SLIT foi considerada geralmente segura, sem reações sistêmicas graves, apresentando apenas reações locais e sistêmicas leves.

- b) A SLIT não demonstrou diminuição significativa no diâmetro da pápula obtido por meio do SPT em grupos ativos ou placebo em pacientes com alergia a ácaros.

- c) Foi observado melhora clínica tanto no grupo da SLIT como do controle, porém somente na SLIT com alérgeno foi capaz de modular as respostas de anticorpos sistêmicos e de mucosa. Estes achados reforçam o papel de anticorpos IgG4 e IgG1 séricos específicos, além de IgA salivar, como prováveis anticorpos bloqueadores ou biomarcadores de tolerância que podem ser úteis para monitoramento da imunoterapia alérgeno-específica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹ SILVA, A. M.; PINHEIRO, M. S. F.; FREITAS, N. E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos científicos**: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 4. ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 157p

AALBERSE, R C; STAPEL, S O; SCHUURMAN, J; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 469-477, Apr 2009.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. **Saunders**, Philadelphia, n. 6, p. 562, 2008.

AÏT-KHALED, N; PEARCE, N; ANDERSON, H R; ELLWOOD, P; MONTEFORT, S; SHAH, J; GROUP, ISAAC PHASE THREE STUDY. Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. **Allergy**, Copenhagen, v. 64, n. 1, p. 123-148, Jan 2009.

AKDIS, C A; BLESKEN, T; AKDIS, M; WÜTHRICH, B; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **J Clin Invest**, New Haven, v. 102, n. 1, p. 98-106, Jul 1998.

AKDIS, C A; BARLAN, I B; BAHCECILER, N; AKDIS, M. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 61, p. 11-14, 2006.

ALLAM, J.; NEIEDERHAGEN, B.; et al.. 62nd Annual Congress of the AAAAI, Miami (United States), Mar 2006.

ALLAM, J P; PENG, W M; APPEL, T; WENGHOEFER, M; NIEDERHAGEN, B; BIEBER, T; BERGÉ, S; NOVAK, N. Toll-like receptor 4 ligation enforces tolerogenic properties of oral mucosal Langerhans cells. **J Allergy Clin Immunol**. 368-374 2008a.

ALLAM, J P; STOJANOVSKI, G; FRIEDRICHS, N; PENG, W; BIEBER, T; WENZEL, J; NOVAK, N. Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 6, p. 720-727, Jun 2008.

ALVAREZ-CUESTA, E; BOUSQUET, J; CANONICA, G W; DURHAM, S R; MALLING, H J; VALOVIRTA, E; EAACI, IMMUNOTHERAPY TASK FORCE. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 61, p. 1-20, Oct 2006.

ANGELINI, L; ROBLES-RIBEIRO, P G; CARVALHO-PINTO, R M; RIBEIRO, M; CUKIER, A; STELMACH, R. Two-year evaluation of an educational program for adult outpatients with asthma. **J Bras Pneumol**, Brasilia, v. 35, n. 7, p. 618-627, Jul 2009.

ANTÚNEZ, C; MAYORGA, C; CORZO, J L; JURADO, A; TORRES, M J. Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. **Pediatr Allergy Immunol**, Copenhagen, v. 19, n. 3, p. 210-218, May 2008.

ANNESI-MAESANO, I. Epidemiological evidence of the occurrence of rhinitis and sinusitis in asthmatics. **Allergy**, Copenhagen, v. 54, p. 7-13, 1999.

ARIA. Workshop Report Allergic rhinitis and its impact on asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 108, p. 147-334, 2001.

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 107, n. 3, p. 406-413, Mar 2001.

AYDOGAN, M; METE, N; YAZI, D; AKKOC, T; OZDEMIR, C; BLASER, K; AKDIS, M; AKDIS, C; BAHCECILER, N; BARLAN, I. Comparison of Der p 1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls. **Pediatr. Allergy Immunol.**, Copenhagen, v. 18, n. 4, p. 320-325, Jun 2007.

BACHARIER, L B; BONER, A; CARLSEN, K H; EIGENMANN, P A; FRISCHER, T; GÖTZ, M; HELMS, P J; HUNT, J; LIU, A; PAPADOPOULOS, N; PLATTS-MILLS, T; POHUNEK, P; SIMONS, F E; VALOVIRTA, E; WAHN, U; WILDHABER, J; GROUP., EUROPEAN PEDIATRIC ASTHMA. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. **Allergy**, Copenhagen, v. 63, n. 1, p. 5-34, Jan 2008.

BAHCECILER, N N; ARIKAN, C; TAYLOR, A; AKDIS, M; BLASER, K; BARLAN, I B; AKDIS, C A. Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mite. **Int Arch Allergy Immunol**, Switzerland, v. 136, n. 3, p. 287-294, Mar 2005.

BATEMAN, E D; HURD, S S; BARNES, P J; BOUSQUET, J; DRAZEN, J M; FITZGERALD, M; GIBSON, P; OHTA, K; O'BYRNE, P; PEDERSEN, S E; PIZZICHINI, E; SULLIVAN, S D; WENZEL, S E; ZAR, H J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **The European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 143-178, Jan 2008.

BLASER, K.; AKDIS, C. A. Interleukin-10, T regulatory cells and specific allergy treatment. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 328-331, Mar 2004.

BÖTTCHER, M F; HÄGGSTRÖM, P; BJÖRKSTÉN, B; JENMALM, M C. Total and allergen-specific immunoglobulin A levels in saliva in relation to the development of allergy in infants up to 2 years of age. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 32, n. 9, p. 1293-1298, Set 2002.

BOUSQUET, J; VAN CAUWENBERGE, P; KHALTAEV, N; GROUP, ARIA WORKSHOP; ORGANIZATION, WORLD HEALTH. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **J. Allergy Clin. Immunol**, St Louis, v. 108, n. 5, p. S147-334, Nov 2001.

BOUSQUET, J; LUND, V J; VAN CAUWENBERGE, P; BREMARD-OURY, C; MOUNEDJI, N; STEVENS, M T; EL-AKKAD, T. Implementation of guidelines for seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. **Allergy**, Copenhagen, v. 58, n. 8, p. 733-741, Ago 2003.

BOUSQUET, J; KHALTAEV, N; CRUZ, A A; DENBURG, J; FOKKENS, W J; TOGIAS, A; ZUBERBIER, T; BAENA-CAGNANI, C E; CANONICA, G W; VAN WEEL, C; AGACHE, I; AÏT-KHALED, N; BACHERT, C; BLAISS, M S; BONINI, S;

BOULET, L P; BOUSQUET, P J; CAMARGOS, P. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). **Allergy**, Copenhagen, v. 63, p. 8-160, Apr 2008.

BROZEK, J L; BOUSQUET, J; BAENA-CAGNANI, C E; BONINI, S; CANONICA, G W; CASALE, T B; VAN WIJK, R G; OHTA, K; ZUBERBIER, T; SCHÜNEMANN, H J; NETWORK, GLOBAL ALLERGY AND ASTHMA EUROPEAN; ASSESSMENT, GRADING OF RECOMMENDATIONS. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 126, n. 3, p. 466-476, Sep 2010.

BUFE, A.; ROBERTS, G. Specific immunotherapy in children. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford : Blackwell Scientific Publications, Apr 2011.

BUSH, R K; SWENSON, C; FAHLBERG, B; EVANS, M D; ESCH, R; BUSSE, W W. House dust mite sublingual immunotherapy: Results of a US trial. **J. Allergy Clin. Immunol**, St Louis, v. 127, n. 4, p. 974-981 e1-7, Apr 2011.

CALAMITA, Z; SACONATO, H; PELÁ, A B; ATALLAH, A N. Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. **Allergy**, Copenhagen, v. 61, n. 10, p. 1162–1172, Oct 2006.

CIPRANDI, G; CIRILLO, I; VIZZACCARO, A; TOSCA, M A. Levocetirizine improves nasal obstruction and modulates cytokine pattern in patients with seasonal allergic rhinitis: a pilot study. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 958-964, Jun 2004.

COCKCROFT, D. W. Bronchoprovocation methods: direct challenges. **Clin Rev Allergy Immunol**, Totowa, v. 24, n. 1, p. 19-26, Feb 2003.

CORRY, D. B.; KHERADMAND, F. Induction and regulation of the IgE response. **Nature**, London, v. 402, p. B18–23, Nov 1999.

DEMOLY, P; ALLAERT, F A; LECASBLE, M; BOUSQUET, J; PRAGMA. Validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). **Allergy**, Copenhagen, v. 58, n. 7, p. 672–675, Jul 2003.

DENBURG, J. The nose, the lung and the bone marrow in allergic inflammation. **Allergy**, Copenhagen, v. 54 , n. 57, p. 73-80, 1999.

DOUGHERTY, D. Expert Panel Report 3:Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma, 2007.

EDER, W; EGE, M J; VON MUTIUS, E. The asthma epidemic. **N Engl J Med**, Boston, v. 355, n. 21. p. 2226-2235, Nov 2006.

EIFAN, A O; AKKOC, T; YILDIZ, A; KELES, S; OZDEMIR, C; BAHCECILER, N N; BARLAN, I B. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust

mite: an open randomized controlled trial. **Clin. Exp. Allergy.**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 922-932, Jan 2010.

ELZEN, H; SLAETS, J P; SNIJDERS, T A; STEVERINK, N. Evaluation of the chronic disease self-management program (CDSMP) among chronically ill older people in the Netherlands. **Soc Sci Med.**, Oxford; New York, v. 64, n. 9, p. 1832-1841, May 2007.

EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY BY MANEY PUBLISHING. Standardized lung function testing. Official statement of the European Respiratory Society. **Eur Respir J Suppl**, v. 16, p. 1–100, Mar 1993.

FERRÉS, J; JUSTICIA, J L; GARCÍA, M P; MUÑOZ-TUDURÍ, M; ALVÀ, V. Efficacy of high-dose sublingual immunotherapy in children allergic to house dust mites in real-life clinical practice. **Allergol. Immunopathol.**, Madrid : Elsevier España, v. 39, n. 3, p. 122-127, May-Jun 2011.

FRANKLAND, A. W.; HUGHES, W. H.; GORRILL, R. H. Autogenous bacterial vaccines in the treatment of asthma. **Br Med J.**, London, v. 2, n. 4945, p. 941–944, Oct 1955.

FREW, A. J. How does sublingual immunotherapy work?. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 120, n. 3, p. 533-536, Sep 2007.

GLOBAL INICIATIVE FOR ASTHMA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention: update 2007. **National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute**, Bethesda, 2006.

GOULD, H J; SUTTON, B J; BEAVIL, A J; BEAVIL, R L; MCCLOSKEY, N; COKER, H A; FEAR, D; SMURTHWAITE, L. The biology of IGE and the basis of allergic disease. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 21, p. 579–628, 2003.

GROSSMAN, J. One airway, one disease. **Chest**, Chicago, v. 111, p. 11-16, 1997.

GUEVARA, J P; WOLF, F M; GRUM, C M; CLARK, N M. Effects of educational interventions for self management of asthma in children and adolescents: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, London, v. 326, n. 7402, p. 1308-1309, Jun 2003.

GUEZ, S; VATRINET, C; FADEL, R; ANDRÉ, C. House-dust-mite sub-lingual swallow immunotherapy in perennial rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. **Allergy**, Copenhagen, v. 55, n. 4, p. 369-375, Apr 2000.

HIRSCH, T.; SÄHN, M.; LEUPOLD, W. Double-blind placebo-controlled study of sublingual immunotherapy with house dust mite ex-tract (D. pt.) in children. **Pediatr. Allergy. Immunol.**, Copenhagen, v. 8, n. 1, p. 21-27, Feb 1997.

HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. Rethinking the pathogenesis of asthma. **Immunity**, Cambridge, v. 31, n. 3, p. 362-367, Sep 2009.

HORNER, A. A.; REDECKE, V.; RAZ, E. Toll-like receptor ligands: hygiene, atopy and therapeutic implications. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, Hagerstown, v.4, n.6, p. 555-561, Dec 2004.

HUANG, T. T.; LI, Y. T.; WANG, C. H. Individualized programme to promote selfcare among older adults with asthma: randomized controlled trial. **J Adv Nurs**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 348-358, Feb 2009.

IBIAPINA, C C; SARINHO, E S C; FILHO, A A S C; CAMARGOS, P A M. Rinite, sinusite e asma: indissociáveis? **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 4, p. 357-366, 2006.

ILLI, S; VON MUTIUS, E; LAU, S; NIGGEMANN, B; GRÜBER, C; WAHN, U; GROUP, MULTICENTRE ALLERGY STUDY (MAS). Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. **Lancet**, London, v. 368, n. 9537, p. 763-770, Aug 2006.

INCORVAIA, C; FRATI, F; PUCCINELLI, P; MARCUCCI, F; DI CARA, G; SENSI, L; SCURATI, S; YACOUB, M R; MOINGEON, P. Effects of sublingual immunotherapy on allergic inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008. **Inflamm Allergy Drug Targets**, Saif Zone, v. 7, n. 3, p. 167-172, Sep 2008.

JAMES, L. K.; DURHAM, S. R. Clin Exp Allergy. **Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 1074-1088, Jul 2008.

JARVIS, D; ZOCK, J P; HEINRICH, J; SVANES, C; VERLATO, G; OLIVIERI, M; VILLANI, S; PONZIO, M; LEYNAERT, B; SUNYER, J; DAHLMAN-HOGLUND, A; CHINN, S; LUCZYNSKA, C; NORBÄCK, D; BURNEY, P. Cat and dust mite allergen levels, specific IgG and IgG4, and respiratory symptoms in adults. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 119, n. 3, p. 697-704, Mar 2007.

JOINT TASK FORCE ON PRACTICE PARAMETERS; AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY; AMERICAN COLLEGE OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY; JOINT COUNCIL OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY. Allergen immunotherapy: a practice parameter second update. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 120, n. 3 Suppl, p. S25-85, Sep 2007.

JONES, M. A. Asthma self-management patient education. **Respir Care**, Philadelphia, v. 53, n. 6, p. 778-784, Jun 2008.

JUTEL, M; AKDIS, M; BUDAK, F; AEBISCHER-CASAULTA, C; WRZYSZCZ, M; BLASER, K; AKDIS, C A. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 33, n. 5, p. 1205-1214, May 2003.

KILLIAN, K J; WATSON, R; OTIS, J; ST AMAND, T A; O'BYRNE, P M. Symptom perception during acute bronchoconstriction. **Am J Respir Crit Care Med**, American Thoracic Society, v. 162, n. 2, p. 490-496, Ago 2000.

KOH, Y. Y.; KIM, C. K. The development of asthma in patients with allergic. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, Hagerstown, v. 3, n. 3, p. 159-64, Jun 2003.

KOIVIKKO, A. Bacterial vaccine in childhood asthma. A double-blind study. **Acta Allergol**, København, v. 28, n. 3, p. 202-210, Set 1973.

KRIEG, A. M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. **Nat Rev Drug Discov**, London, v. 5, n. 6, p. 471-484, Jun 2006.

KUO, C H; WANG, W L; CHU, Y T; LEE, M S; HUNG, C H. Sublingual Immunotherapy in children: an updated review. **Pediatr. Neonatol**, [Singapore] : Elsevier, v. 50, n. 2, p. 44-49, Apr 2009.

LAU, S; ILLI, S; PLATTS-MILLS, T A; RIPOSO, D; NICKEL, R; GRÜBER, C; NIGGEMANN, B; WAHN, U; STUDY, GROUP MULTICENTRE ALLERGY. Longitudinal study on the relationship between cat allergen and endotoxin exposure, sensitization, cat specific IgG and development of asthma in childhood: report of the German Multicentre Allergy Study (MAS 90). **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 6, p. 766-773, Jun 2005.

LEMIÈRE, C; BAI, T; BALTER, M; BAYLIFF, C; BECKER, A; BOULET, L P; BOWIE, D; CARTIER, A; CAVE, A; CHAPMAN, K; COWIE, R; COYLE, S; COCKCROFT, D; DUCHARME, F M; ERNST, P; FINLAYSON, S; FITZGERALD, J M; HARGREAVE, F E; HOGG, D; KAPLAN, A. Adult asthma consensus guidelines update 2003. **Can Respir J**, Oakville, v. 11, p. 9A-18A, May-Jun 2004.

LEVY, M L; FLETCHER, M; PRICE, D B; HAUSEN, T; HALBERT, R J; YAWN, B P. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care. **Prim Care Respir J**, v. 15, n. 1, p. 20-34, Feb 2006.

LIU, Y. H.; TSAI, J. J. Production of salivary immunoglobulin A and suppression of Dermatophagoides pteronyssinus-induced airway inflammation by local nasal immunotherapy. **Int Arch Allergy Immunol**, Basel ; New York, v. 138, n. 2, p. 161-168, Oct 2005.

LÓPEZ-VIÑA, A.; DEL CASTILLO-ARÉVALO, E. Influence of peak expiratory flow monitoring on an asthma self management education programme. **Respir Med**, London, v. 94, n. 8, p. 760-766, Aug 2000.

LUE, K H; LIN, Y H; SUN, H L; LU, K H; HSIEH, J C; CHOU, M C. Clinical and immunological effects of sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, randomized, placebo controlled study. **Pediatr. Allergy. Immunol.**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 408-415, Sep 2006.

MAIA, J G S; MARCOPITO, L F; AMARAL, A N; TAVARES, B F T; SANTOS, F A N L. Prevalência de asma e sintomas asmáticos em escolares de 13 e 14 anos de idade. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 292-299, 2004.

MALLING, H. J. Sublingual immunotherapy: efficacy-methodology and outcome of clinical trials. **Allergy**, Copenhagen, v. 61, p. 24-28, 2006.

MATHESON, M C; ABRAMSON, M J; DHARMAGE, S C; FORBES, A B; RAVEN, J M; THIEN F C, WALTERS, E H. Changes in indoor allergen and fungal levels predict changes in asthma activity among young adults. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 907-913, Jul 2005.

MATRICARDI, P M; BJORKSTEN, B; BONINI, S; BOUSQUET, J; DJUKANOVIC, R; DREBORG, S; GEREDA, J; MALLING, H J; POPOV, T; RAZ, E; RENZ, H; WOLD, A; FORCE, EAACI TASK. Microbial products in allergy prevention and therapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 58, n. 6, p. 461-471, Jun 2003.

MIRANDA, D O; SILVA, D A O; FERNANDES, J F C; QUEIRÓS, M G J; CHIBA, H F; YNOUE, L H; RESENDE, R O; PENA, J D O; SUNG, S J; SEGUNDO, G R S; TAKETOMI, E A. Serum and salivary IgE, IgA and IgG4 antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* and its major allergens, Der p 1 and Der p 2, in allergic and non-allergic children. **Federal University of Uberlandia**, Uberlandia, Jul 2011.

MÖBS, C; SLODOSCH, C; LÖFFLER, H; PFUTZNER, W; HERTL, M. Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. **International Archives of Allergy and Immunology**, New York, v. 147, n. 3, p. 171-178, 2008.

MOINGEON, P; BATARD, T; FADEL, R; FRATI, F; SIEBER, J; VAN OVERTVEL, T L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 61, n. 2, p. 151-165, Feb 2006.

MÖLLER, C; DREBORG, S; FERDOUSI, H. A; HALKEN, S; HØST, A; JACOBSEN, L; et al. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v.109, n.2, p. 251-256, fev. 2002.

MORGAN, W J; STERN, D A; SHERRILL, D L; GUERRA, S; HOLBERG, C J; GUILBERT, T W; TAUSSIG, L M; WRIGHT, A L; MARTINEZ, F D. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 172, n. 10, p. 1253–1258, Nov 2005.

MUELLER, H. L.; M, L. Hyposensitization with bacterial vaccine in infectious asthma. A double-blind study and a longitudinal study. **JAMA**, Chicago, v. 208, n. 8, p. 1379-1383, Mai 1969.

NAKAJIMA, S.; GILLESPIE, D. N.; GLEICH, G. J. Differences between IgA and IgE as secretory proteins. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 306-312, 1975.

NOVAK, N.; BIEBER, T.; ALLAM, J. P. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 66, n. 6, p. 733-739, Jun 2011

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

O'BYRNE, P; BATEMAN, E D; BOUSQUET, J; CLARK, T; OHTA, K; PAGGIARO, P; PEDERSEN, S E; SOTO-QUIROZ, M. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, 2007.

OEHLING, A. Importance of bacterial infection in the ethiopathogenesis of bronchial asthma. **The optimal treatment and management of asthma**. In: ChanezP, BousquetJ, MichelFB, GodardP (editors). From genetics to quality of life. p. 119-126, 1996.

OEHLING, A; JEREZ, J; NEFFEN, H; SÁNCHEZ PALACIOS, A. Bacterial immunotherapy in bronchial asthma. **Allergol Immunopathol (Madr)**, Madrid : Elsevier España, v. 7, n. 1, p. 47-54, Jan-Feb 1979.

OZDEMIR, C; YAZI, D; GOCMEN, I; YESIL, O; AYDOGAN, M; SEMIC-JUSUFAGI, C A; BAHCECILER, N N; BARLAN, I B. Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma. **Pediatr Allergy Immunol**, Copenhagen, v. 18, n. 6, p. 508-515, Sep 2007.

PASSALACQUA, G.; CIPRANDI, G.; CANONICA, W. C. The nose-lung interaction in allergic rhinitis and asthma: united airways disease. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, Hagerstown, v. 1, n. 1, p. 7-13, Feb 2001.

PASSALACQUA, G; GUERRA, L; PASQUALI, M; LOMBARDI, C; CANONICA, G W. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy. **Ann Allergy Asthma Immunol**, McLean, v. 93, n. 1, p. 3-12, Jul 2004.

PELLEGRINO, R; VIEGI, G; BRUSASCO, V; CRAPO, R O; BURGOS, F; CASABURI, R; COATES, A; VAN DER GRINTEN, C P; GUSTAFSSON, P; HANKINSON, J; JENSEN, R; JOHNSON, D C; MACINTYRE, N; MCKAY, R; MILLER, M R; NAVAJAS, D; PEDERSEN, O F; WANGER, J. Interpretative strategies for lung function tests. **Eur Respir J.**, Copenhagen, v. 26, n. 5, p. 948-968, Nov 2005.

PENAGOS, M; COMPALATI, E; TARANTINI, F; BAENA-CAGNANI, R; HUERTA, J; PASSALACQUA, G; CANONICA, G W. Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. **Ann. Allergy Asthma Immunol**, McLean, v. 97, n. 2, p. 141-148, Aug 2006.

PEREIRA, E A; SILVA, D A; CUNHA-JÚNIOR, J P; ALMEIDA, K C; ALVES, R; SUNG, S J; TAKETOMI, E A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, Mar 2005.

PLATTS-MILLS, T. A. E. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 122, n. 6, p. 2218-2225, 1979.

PLATTS-MILLS, T A; THOMAS, W R; AALBERSE, R C; VERVLOET, D; CHAMPMAN, M D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **J. Allergy Clin. Immunol**, St Louis, v. 89, n. 5, p. 1046-1060, May 1992.

QUEIRÓS, M G J; OLIVEIRA, D A S; ALVES, R; FUKUHARA, H C; SOARES, V B A; DE ALMEIDA, K C; YNOUE, L H; DE OLIVEIRA, R R; SOPELETE, M C C; SEGUNDO, G R S; MOREIRA, P F S; SUNG, S J; TAKETOMI, E A. Mite-specific immunotherapy using allergen and/or bacterial extracts in atopic patients in Brazil. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, Barcelona, Spain, v. 18, n. 2, p. 84-92, 2008.

QUEIRÓS, M. J. G.; ABDALLA, M.; PEPPE, M. Programa de Alergia Respiratória em unidade do SUS X Diminuição do número de internações por Asma e Pneumonia. **XXVII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, 2000.

RAUTAVA, S; RUUSKANEN, O; OUWEHAND, A; SALMINEN, S; ISOLAURI, E.. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, [New York, N.Y.] , v. 38, n. 4, p. 378-388, Apr 2004.

REDDEL, H. K.; MARKS, G. B.; JENLINS, C. R. When can personal best peak flow be determined for asthma action plans? **Thorax**, London, v. 59, n. 11, p. 922-924, Nov 2004.

ROGALA, B. Risk and safety of immunotherapy. **Allergy**, Copenhagen, v. 53, n. 5, p. 473-476, 1998.

ROSASCHINO, F; CATTANEO, L. Strategies for optimizing compliance of paediatric patients for seasonal antibacterial vaccination with sublingually administered Polyvalent Mechanical Bacterial Lysates (PMBL). **Acta Biomed**. Parma, v.75, n.3, p. 171-178, Dec 2004.

SAKAGUCHI, S; SAKAGUCHI, N; ASANO, M; ITOH, M; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, Baltimore, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, Aug 1995.

SANDIN, A; BJÖRKSTÉN, B; BÖTTCHER, M F; ENGLUND, E; JENMALM, M C; BRÅBÄCK, L. High salivary secretory IgA antibody levels are associated with less late-onset wheezing in IgE-sensitized infants. **Allergy Immunol. Pediatr.**, Copenhagen, Feb 2011.

SCADDING, G K; DURHAM, S R; MIRAKIAN, R; JONES, N S; LEECH, S C; FAROOQUE, S; RYAN, D; WALKER, S M; CLARK, A T; DIXON, T A; JOLLES, S R; SIDDIQUE, N; CULLINAN, P; HOWARTH, P H; NASSER, S M; CLINICAL, IMMUNOLOGY BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND. BSACI guidelines for the management of allergic and non-allergic rhinitis. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 19-42, Jan 2008.

SCADDING, G.; DURHAM, S. Mechanisms of sublingual immunotherapy. **J Asthma**, [Ossining, N.Y.], v. 46, n. 4, p. 322-334, May 2009.

SCADDING, G W; SHAMJI, M H; JACOBSON, M R; LEE, D I; WILSON, D; LIMA, M T; PITKIN, L; PILETTE, C; NOURI-ARIA, K; DURHAM, S R Sublingual grass pollen immunotherapy is associated increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B Cell. **Clin Exp Allergy**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 598-606, Apr 2010.

SCHWARTZ, R. S. A new element in the mechanism of asthma. **N Engl J Med**, Boston, v. 346, n. 11, p. 857-858, Mar 2002.

SCHWARZE, J; CIESLEWICZ, G; JOETHAM, A; SUN, L K; SUN, W N; CHANG, T W; HAMELMANN, E; GELFAND, E W. Antigen-specific immunoglobulin-A prevents increased airway responsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, NY, v. 158, n. 2, p. 519-525, Aug 1998.

SEGUNDO, G R; GOMES, F A; FERNANDES, K P; ALVES, R; SILVA, D A; TAKETOMI, E A. Local cytokines and clinical symptoms in children with allergic rhinitis after different treatments. **Biologics**, Auckland, v. 3, p. 469-474, Oct 2009.

SILVA, D A O; GERVÁSIO, A M; SOPELETE, M C; ARRUDA-CHAVES, E; ARRUDA, L K; CHAPMAN, M D; SUNG, S S; TAKETOMI, E A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major Dermatophagoides pteronyssinus allergen. **Ann Allergy Asthma Immunol**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545-550, May 2001.

SIMONS, F. E. R. Allergic rhinobronchitis: the asthma-allergic rhinitis link. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 104, n. 3, p. 534-540, Sep 1999.

SMITH, H; WHITE, P; ANNILA, I; POOLE, J; ANDRE, C; FREW, A. Randomized controlled trial of high-dose sublingual immunotherapy to treat seasonal allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 114, n. 4, p. 831-837, Oct 2004.

SOLÉ, D. International Study for Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): o que nos ensinou? **J Bras Pneumol**, v. 31, n. 2, p. 93-94, 2005.

SOLÉ, D; CAMELO-NUNES, I C; WANDALSEN, G F; NASPITZ, C K; VANNA, N A; AMORIM, A; PRESTES, E X; YAMADA, E; WERNECK, G; MAIA, J G; RIOS, J L M; MORANDI, J L B; FREITAS, L S; SOLOGUREN, M J; FELIZOLA, M L B; BRITTO, M; ROSÁRIO, N A; CAMARGOS, P A. A asma em crianças brasileiras é problema de saúde pública? **Rev Bras Alergia Immunopatol**, v. 27, n. 5, p. 185-188, 2004.

SOLÉ, D; WECKX, L L M; FILHO, N A R; JÚNIOR. II Consenso Brasileiro sobre Rinites 2006. **Rev. bras. alerg. Immunopatol**, v. 29, n. 1, p. 29-58, 2006.

STELMACH, R.; CUKIER, A. Uso de inaladores asma e DPOC. **Site da Incor**, 2009. Disponível em: <<http://www.incor.usp.br>>. Acesso em: 12 Junho 2011.

TAKETOMI, E A ; OLIVEIRA, D A S; QUEIRÓS, M G J; FUKUHARA, H C; ALVES, R; DE ALMEIDA, K C; YNOUE, L H; SOPELETE, M C C; SUNG, S J.

Heterogeneidade da resposta de anticorpos IgE aos alérgenos principais de *Dermatophagoides pteronyssinus* entre pacientes com alergia respiratória: Implicações para a imunoterapia específica com alérgenos. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, São Paulo, Brasil, v. 05, n. 28, p. 298-303, 2005.

TAPP, S.; LASSERSON, T. J.; ROWE, B. Education interventions for adults who attend the emergency room for acute asthma. **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford, v. CD003000, n. 3, Jul 2007. ISSN 1469-493X (Electronic);1361-6137 (Linking).

TARI, M. G.; MANCINO, M.; MONTI, G. Efficacy of sublingual immunotherapy in patients with rhinitis and asthma due to house dust mite. A double-blind study. **Allergol Immunopathol**, Madrid : Elsevier España, v. 18, n. 5, p. 277-284, Sep 1990.

TAYLOR, B.; NORMAN, A.P.; ORGEL, H.A.; TURNER, M.W.; STOKES, C.R.; SOOTHILL, J.F. Transient IgA deficiency and pathogenesis of infantile atopy. **Lancet**, London, v. 2, n. 7821, p. 111-113, Jul 1973.

THOMAS, W R; SMITH, W A; HALES, B J; MILLS, K L; O' BRIEN, R M. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 129, n. 1, p. 1-18, Sep 2002.

TOELLE, B. G.; RAM, F. S. Written individualised management plans for asthma in children and adults. **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford, v. CD002171, n. 2, 2004.

TOVEY, E. Effect of Voorhorst's work on the current understanding of the role of house dust mites in allergic diseases. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 113, n. 3, p. 577-580, Mar 2004.

TOVEY, E. R.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. E. Mite faeces are a major source of house dust allergens. **Nature**, London, v. 289, n. 5798, p. 592-593, 1981.

TREBUCHON, F; DURACINSKY, M; CHASSANY, O; DELAIRE, C; EYDOUX, E; LONGIN, J; DEMOLY, P. Validation of a questionnaire for assessment of asthma patient knowledge and behaviour. **Allergy**, Copenhagen, v. 64, n. 1, p. 62-71, Jan 2009.

TSENG, S H; FU, L S; NONG, B R; WENG, J D; SHYUR, S D. Changes in serum specific IgG4 and IgG4/ IgE ratio in mite-sensitized Taiwanese children with allergic rhinitis receiving short-term sublingual-swallow immunotherapy: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. **Asian Pac. J. Allergy Immunol**, [Bangkok : Bangkok Medical Publishers], v. 26, n. 2-3, p. 105-112, Jun-Sep 2008.

UMETSU, D. T.; AKBARI, O.; DEKRUYFF, R. H. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 112, n. 3, p. 480-487 quiz 488, Sep 2003.

VALOVIRTA, E; JACOBSEN, L; LJØRRING, C; KOIVIKKO, A; SAVOLAINEN, J. Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children. **Allergy**, Copenhagen, v. 61, n. 10, p. 1177-1183, Oct 2006.

VAN ASPEREN, P P; GLEESON, M; KEMP, A S; CRIPPS, A W; GERAGHTY, S B; MELLIS, C M; CLANCY, R L. The relationship between atopy and salivary IgA deficiency in infancy. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 753-757, Dec 1985.

VAN DER NEUT KOLFSCHOTEN, M. et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. **Science**, New York, v. 317, n. 5844, p. 1554-1557, Sep 2007.

WAKKACH, A; FOURNIER, N; BRUN, V; BREITTMAYER, J P; COTTREZ, F; GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. **Immunity**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 605-617, May 2003.

WENZEL, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. **Lancet**, London, v. 368, p. 804-813, Aug 2006.

WILSON, D. R.; LIMA, M. T.; DURHAM, S. R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systemic review and meta-analysis. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 1, p. 4-12, Jan 2005.

WILSON, D. R.; TORRES, L. I.; DURHAM, S. R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, n. 2, p. CD002893, 2003.

WOLF, F. M.; GRUM, C. M.; CLARK, N. M. Educational interventions for asthma in adults (protocol for a Cochrane Review). **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford, 2008.

YAMAGIWA, S; GRAY, J D; HASHIMOTO, S; HORWITZ, D A. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. **J Immunol**, Baltimore, v. 166, n. 12, p. 7282-7289, Jun 2001.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, New York, v. 296, n. 5567, p. 490-494, Apr 2002.

YONEKURA, S; OKAMOTO, Y; SAKURAI, D; HORIGUCHI, S; HANAZAWA, T; NAKANO, A; KUDOU, F; NAKAMARU, Y; HONDA, K; HOSHIOKA, A; SHIMOJO, N; KOHNO, Y. Sublingual immunotherapy with house dust extract for house dust-mite allergic rhinitis in children. **Allergol. Int.**, Carlton, v. 59, n. 4, p. 381-388, Dez 2010.

YSSEL, H; ABBAL, C; PÈNE, J; BOUSQUET, J. The role of IgE in asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 28, n. 5, p. 104-109, Nov 1998.

ZUBERBIER, T; BACHERT, C; BOUSQUET, P J; PASSALACQUA, G; WALTER CANONICA, G; MERK, H; WORM, M; WAHN, U; BOUSQUET, J. GA2LEN/EAACI pocket guide for allergen-specific immunotherapy for allergic rhinitis and asthma. **Allergy**, Copenhagen, v. 65, p. 1525-1530, Dec 2010.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Projeto de Pesquisa CEP**Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Av. João Naves de Ávila, nº 2160 – Bloco J. Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG
CEP 38400-089 – FONE/FAX (34) 3230-4531**ANÁLISE FINAL Nº 130/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU: 262/06**

Projeto Pesquisa “Imunoterapia sublingual com alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* associados ou não a extratos bacterianos em pacientes com rinite alérgica com ou sem asma leve”

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a – segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b – poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c – a aprovação do protocolo pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do **Relatório parcial:** julho/2008

Data para entrega do **Relatório final:** março/2010

13 de abril de 2007.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

Coordenadora do CEP/UFU

Orientação ao pesquisador

Orientações ao pesquisador

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega

de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO 2 – Termo de Consentimento

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA Instituto de Ciências Biomédicas Disciplina de Imunologia Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica Fone: (034)3218-2195 TeleFax: (034)3218-2333 Av. Pará 1720 – Bloco 4C – Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG
---	---

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Imunoterapia sublingual com *Dematophagoides pteronyssinus* associados a extratos bacterianos em pacientes com asma leve e ou rinite alérgica” sob a responsabilidade dos pesquisadores, Dra. Meimei Guimarães Junqueira Queirós e Dr. Ernesto Ernesto Taketomi.

Nesta pesquisa, nós estamos buscando entender o efeito da vacina sublingual de alergia sobre os sintomas de rinite alérgica ou asma e as mudanças nos resultados dos exames de sangue. Será coletado 10 mL sangue a cada 6 meses durante o período de 4 anos. Nesta pesquisa cada paciente será distribuído em 3 grupos diferentes de tratamento, a saber: I = Extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*; II – Extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* e bacterianos; III - Placebo. Nem o médico assistente e nem você vai saber em qual tipo de tratamento você estará recebendo.

Durante o estudo, você será submetido à realização de testes alérgicos e exames de sangue para verificar o andamento do seu tratamento com a vacina de alergia.

Durante esta pesquisa, o atendimento médico será realizado no NABS (Núcleo de Ações Básicas de Saúde de Itumbiara, Goiás) e os exames de sangue serão realizados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, MG.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados desta pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar desta pesquisa.

Os riscos são mínimos, mas podem ocasionar as próprias crises alérgicas. Caso isso aconteça, você será imediatamente examinado por médicos assistentes e receberá tratamento adequado. Os benefícios serão a diminuição das crises alérgicas mesmo após o término do tratamento.

Você é livre para parar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você ou responsável do paciente.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você ou o responsável poderá entrar em contato com:

Meimei G.J. Queirós
Praça da Bandeira, 345B
Itumbiara, GO
Tel.: (064)3431-6550

Dr. Ernesto A. Taketomi e Dra. Deise A.O. Silva
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, Campus Umuarama
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, MG
Tel.: (034)3218-2195 / Telefax: (034) 3218-2333

Comitê de Ética em Pesquisa/UFU
Tel.: (34) 3239-4531/4131

Itumbiara, GO, ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente ou do responsável legal

ANEXOS

ANEXO 3 – Plano de Ação

PROGRAMA DE ASMA E ALERGIA RESPIRATÓRIA ADULTOS E CRIANÇAS

Fundo Municipal de Saúde / Secretaria Municipal de Saúde / PMI

Plano de Ação para Rinite Alérgica e Asma

Paciente:

Alergista:

Local de Atendimento:

Ø Horário de Atendimento:

*** Enfermeiras- Agentes de Saúde e pacientes: Com este Plano de Ação vocês poderão fazer as medicações para crise mesmo antes do atendimento pelo médico .**

– Somente Modelo:

No modelo original, o Plano de Rinite vem separado do Rinite e Asma e os medicamentos são com o nome genérico encontrado na rede pública.

Medicação de Alívio para crise de Asma e/ou Rinite:

Uso Oral

01 - β_2 inalatório spray oral - 1 U

Fazer _____ puffs de 4/4 horas por _ 2 a 3 _____ dias.

Se crise, Fazer _____ puffs de 20/20 minutos, 3 vezes e depois 4/4 horas.

Se somente falta de ar, Fazer _____ puffs e não prosseguir.

02 - Corticosteróide comp ou Solução Oral

Tomar _____ cps ou -----ml 8 horas da manhã com leite _____ dias.

03 - Antihistamínico comp ou solução oral

Dar --- ml ou 1 comp ao dia por -- dias e sempre que crise de rinite, até no máximo 7 dias.

Uso Externo

01 - Corticosteróide spray nasal (_____) - IUD.

Fazer 01 puff em cada narina 01 vez ao dia por __3 a 7 ____ dias.

Medicação Preventiva:

Uso Oral - somente aos pacientes portadores de Asma Leve

01 - Corticosteróide inalatório (_____) – IUD

Fazer 1 puff de 12/12 horas por no máximo 7 dias. Escovar toda a boca, bochechar e gargarejar após.

ANEXO 4 – Questionário Rinite

RINITE

Nome: _____ Data: ____/____/____

Código: _____

SINTOMAS NASAIS

Como foram meus sintomas nesta semana?

1. Obstrução nasal

- 0 respiração livre
- 1 discreta dificuldade em respirar pelo nariz
- 2 moderada dificuldade em respirar pelo nariz
- 3 acentuada dificuldade em respirar pelo nariz
- 4 respiração nasal impossível

2. Prurido nasal (Coceira nasal)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

3. Espirros

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

4. Coriza Nasal

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

SINTOMAS EXTRA-NASAIS

Como foram meus sintomas nesta semana?

5. Prurido Ocular (Coceira nos olhos)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

6. Hiperemia Ocular (olhos vermelhos)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

7. Lacrimejamento nos olhos

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

8. Prurido no ouvido (Coceira no ouvido)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

9. Prurido no palato (Coceira no céu da boca)

- 0 nenhum
- 1 pouco
- 2 moderado
- 3 importante
- 4 muito importante

USO DE MEDICAMENTOS

Quantos dias é que, durante a última semana, você usou os seguintes medicamentos para rinoconjuntivite alérgica?

	Nunca	1xs	2xs	3xs	4xs
	0	1	2	3	4
10. Loratadina					

**11. Spray nasal
(budecort/busonid)**

ANEXO 5 – Questionário Asma

ASMA

PACIENTE: _____
CÓDIGO: _____ **DATA:** _____

Por favor, responda as questões de 1 a 6.

Circule o número da resposta que melhor descreve como você tem estado durante os últimos sete dias.

1. Em média, durante os últimos sete dias, o quão frequentemente você acordou, por causa de sua asma, durante a noite?

- 0 nenhuma vez
- 1 uma vez
- 2 raras vezes
- 3 poucas vezes
- 4 muitas vezes
- 5 muitíssimas vezes
- 6 incapaz de dormir devido a asma

2. Em média, durante os últimos sete dias, o quão ruins foram os seus sintomas da asma quando você acordou de manhã?

- 0 sem sintomas
- 1 sintomas muito leves
- 2 sintomas leves
- 3 sintomas moderados
- 4 sintomas um tanto graves
- 5 sintomas graves
- 6 sintomas muito graves

3. Em média, durante os últimos sete dias, o quão limitado/a você esteve em suas atividades por causa de sua asma?

- 0 nada limitado/a
- 1 muito pouco limitado/a
- 2 pouco limitado/a
- 3 moderadamente limitado/a
- 4 muito limitado/a
- 5 extremamente limitado/a
- 6 totalmente limitado/a

4. Em média, durante os últimos sete dias quando de falta de ar você teve?

- 0 nenhuma
- 1 muito pouca
- 2 alguma
- 3 moderada
- 4 bastante
- 5 muita
- 6 muitíssima

5. Em média, durante os últimos sete dias, quanto tempo você teve chiado?

- 0 nunca
- 1 quase nunca
- 2 pouco tempo
- 3 algum tempo
- 4 bastante tempo
- 5 quase sempre
- 6 sempre

6. Em média, durante os últimos sete dias, quantos jatos/ inalações da bombinha de broncodilatador de curta – ação (ex.: Aerolin/Aerogold) você usou por dia? (Se você não tiver certeza em como responder esta questão, por favor, solicite auxílio)

- 0 Nenhuma
- 1 1-2 inalações na maioria dos dias
- 2 3-4 inalações na maioria dos dias
- 3 5-8 inalações na maioria dos dias
- 4 9-12 inalações na maioria dos dias

EFEITOS COLATERAIS

Nome do Paciente _____

[illegible]