

Análise de citocinas pela RT-PCR em pacientes com rinite alérgica

RT-PCR cytokine study in patients with allergic rhinitis

Tarcimara Moreira da Silva¹, Roberto Eustáquio Santos Guimarães², Evaldo Nascimento³, Helena Maria Gonçalves Becker⁴, Ricardo Nascimento Araújo⁵, Flávio Barbosa Nunes⁶

Palavras-chave: alérgenos, citocinas/imunologia, hipersensibilidade, rinite/alérgica/perene, rinite/alérgica/sazonal, testes/cutâneos.

Keywords: allergen, cytokines/immunology, hypersensitivity, rhinitis/allergic/perennial, rhinitis/allergic/seasonal, skin/tests.

Resumo / Summary

Rinite alérgica é uma doença que decorre de um processo inflamatório da mucosa nasal conseqüente à reação de hipersensibilidade a alérgenos inalatórios e, eventualmente, alimentares. É mediada por IgE, envolvendo diferentes células, mediadores e citocinas. **Objetivo:** Avaliar as transcrições para as seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-8 e IFN-gama, particularmente importantes no processo alérgico nasal, principalmente IL-4 e IL-5. Neste estudo, optou-se por avaliar os pacientes atópicos fora das crises alérgicas, com a finalidade de se conhecer as expressões das citocinas neste período. **Material e Método:** Realizou-se um estudo transversal e prospectivo, selecionando-se 30 pacientes, sendo 13 pacientes portadores de rinite alérgica paucissintomáticos e 17 pacientes não-atópicos. Os grupos foram selecionados através da história, do exame clínico otorrinolaringológico e do teste alérgico cutâneo - Prick Test. O perfil das citocinas foi pesquisado nos fragmentos de mucosa nasal, através da RT-PCR semiquantitativa, escolhida por apresentar boa reprodutibilidade e especificidade, utilizando-se como referência o gene da Beta-actina. **Resultados:** Os valores de IL-5, IL-8, IFN-gama mantiveram-se homogêneos em relação ao grupo controle. A IL-4 apresentou diferença com significância estatística. **Conclusão:** Os pacientes alérgicos paucissintomáticos apresentaram normalização da expressão das citocinas na mucosa nasal à exceção de IL-4.

Allergic rhinitis is an inflammatory reaction of the nasal mucosa, in consequence of an IgE mediated hypersensitive reaction to inhaling allergens, involving different mediators and cytokine cells. **Aim:** The purpose of this study was to evaluate the transcriptions for IL-4, IL-5, IL-8 and IFN-gama, particularly important in the nasal allergy process, especially IL-4 and IL-5. For this study we decided to evaluate atopic patients who were free from allergic crises, with the purpose of knowing the cytokine expressions during this period. **Materials and Methods:** Another prospective and transversal study was carried out, selecting 30 patients, 13 of these patients were pauci-symptomatic and 17 were non atopic. The groups were selected by means of a medical interview, an otolaryngologic clinical exam and allergy skin tests - Prick Test. The cytokines were investigated in fragments of the nasal mucosa, using RT-PCR - chosen because it has good reproducibility and specificity. **Results:** IL-5, IL-8, IFN-gama cytokine values were kept homogeneous in relation to the control group. Only IL-4 presented significant statistic differences. **Conclusion:** Asymptomatic patients with allergic rhinitis presented with normalization of cytokine expression in the nasal mucosa, with exception of IL-4.

¹ Mestre em Medicina, Otorrinolaringologista Professora da FEAD Centro de Gestão Empreendedora.

² Doutor em Medicina, Prof. Livre-Docente Faculdade de Medicina USP de Ribeirão Preto e Prof. Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia, Fonoaudiologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da UFMG.

³ Doutor em Medicina, Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia do ICB UFMG.

⁴ Doutora em Medicina, Professora Adjunta do Departamento de Otorrinolaringologia, Fonoaudiologia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da UFMG.

⁵ Médico Veterinário Parasitologista.

⁶ Doutorando pelo curso de pós-graduação em cirurgia geral da Faculdade de Medicina da UFMG, Otorrinolaringologista.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 9 de julho de 2007. cod.4652

Artigo aceito em 3 de julho de 2008.

INTRODUÇÃO

As citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- γ , particularmente IL-4 e IL-5, medeiam e regulam as funções imunológicas e inflamatórias da rinite alérgica. Considerando estas informações e a linha de pesquisa desenvolvida no Serviço de Otorrinolaringologia da Instituição onde se realizou o trabalho, optou-se por investigar estas substâncias entre dois grupos: um grupo portador de rinite alérgica paucisintomático e outro grupo controle, não-alérgico.

A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) foi o método de análise laboratorial escolhido por apresentar boa reprodutibilidade e especificidade^{1,2}.

Esta pesquisa teve por finalidade analisar, quantificar e comparar as expressões das citocinas citadas acima em pacientes portadores de rinite alérgica paucissintomáticos, comparando-os com um grupo controle não-atópico, visando a obter a relevância destas substâncias naqueles indivíduos, fora do período de crise alérgica.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo transversal prospectivo realizado em uma amostra de pacientes portadores e não-portadores de rinite alérgica. Os pacientes escolhidos foram aqueles com indicação cirúrgica prévia para submeterem-se a septoplastia, adenoidectomia e/ou amigdalectomia que se associassem a turbinectomia parcial. Os fragmentos foram coletados no período de fevereiro de 2004 a abril de 2005.

Este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica (COEP) do serviço de referência deste trabalho e aprovado em 14 de outubro de 2004 sob o parecer nº ETIC 044/04. Todos os pacientes e seus acompanhantes receberam explicações sobre a pesquisa, seus objetivos e os métodos utilizados. Aqueles que concordaram assinaram o formulário de consentimento livre e esclarecido.

Estes pacientes foram submetidos a anamnese, exame clínico otorrinolaringológico e teste alérgico cutâneo, sendo, então, separados em dois grupos: um de portadores de rinite alérgica composto por 13 pacientes e outro grupo controle, não-atópico, composto por 17 pacientes.

Os fatores que influenciaram a amostragem foram: o alto custo do material utilizado, a carência de profissionais capacitados para a realização do exame (RT-PCR) em nosso meio e o longo tempo transcorrido para a importação dos primers e tempo definido para o término desta pesquisa.

A faixa etária variou entre três e 47 anos e eram crianças e adultos independentes de cor, sexo, etnia, religião ou classe social. Dentre estes pacientes, 16 foram submetidos à septoplastia, 12 à adenoidectomia e dois à adenoamigdalectomia. Todos estes pacientes foram

submetidos à turbinectomia, sendo então um total de 30 remoções parciais de conchas nasais inferiores, que foram enviadas para o estudo das citocinas.

Foram excluídos os pacientes em uso de anti-histamínicos e/ou corticóides por pelo menos trinta dias antes de se realizar a turbinectomia para coleta do fragmento da mucosa nasal, ou que não pudessem interromper o uso de medicamentos que influenciassem a resposta cutânea, pacientes com dermatite e eczema grave de pele e pacientes menores de três anos ou muito idosos (acima de 60 anos) devido à maior ocorrência de falsa negatividade em função da diminuição da reatividade ao teste alérgico nestas idades.

Os pacientes foram submetidos ao teste cutâneo por punctura Prick Test na face medial do antebraço em adultos e no dorso no caso de crianças pequenas.

Foram utilizados como antígenos: *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, poeira domiciliar, *Blatella* sp, gramínea, fungos, penas, gato e cão. Para o controle positivo foi utilizada a histamina e para o controle negativo, o soro fisiológico. Este material foi adquirido do laboratório farmacêutico Internacional Pharmaceutica Immunology do Brasil Ltda. (IPI) São Paulo.

Os fragmentos de mucosa nasal foram colocados em tubos de "Eppendorf" com capacidade para 1,5 ml, estéreis, identificados com as iniciais do nome do paciente e data da coleta. Em seguida estes tubos foram colocados em caixa de isopor com gelo e levados ao Laboratório de Imunologia do Hospital de referência deste trabalho. Neste local os fragmentos eram congelados a - 80°C.

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Os tecidos foram macerados, e a solução resultante transferida para tubos de 1,5 ml. Em cada amostra foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, e após misturar vigorosamente, a solução foi incubada em gelo por 15 minutos, seguida de centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A camada superior resultante da centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e o RNA precipitado com isopropanol (Sigma). O RNA foi então ressuscitado em 40 ml de água MiliQ (Millipore do Brasil) e tratado com 2,5 U de DNase: RNase free (Promega) por 20 minutos a 37°C. O RNA foi re-extraído utilizando 200 ml de reagente Trizol® (Invitrogen) e ressuscitado em 30 ml de água MiliQ. A concentração do RNA nas amostras foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm e a integridade foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de agarose a 0,8%.

O cDNA foi sintetizado a partir de 1,25 mg de RNA total utilizando iniciadores hexâmeros randômicos (Promega) e o sistema da transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada em um volume final de 20 ml,

na presença de 1ml do cDNA, 0,25mM de dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 1 U de Platinum TaqDNA polimerase (Invitrogen).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% corado pela prata. Os géis foram fotografados e os resultados analisados por densitometria utilizando o AlphaDigiDoc 1201TM (AlphaInotech).

Como não foi possível clonar os genes e obter a quantidade absoluta necessária para o RTPCR em tempo real, utilizou-se a RT-PCR semiquantitativa tendo como gene referência o da β -Actina ("housekeeping"). O coeficiente padrão foi então adquirido a partir da divisão do valor da β -Actina de cada paciente pela média dos 30 pacientes. Esta dosagem foi chamada de relativa porque se mediu a expressão do controle em relação ao teste padrão⁴⁻⁷.

Na análise estatística, entre as medidas de interesse, foram utilizados testes paramétricos e não-paramétricos, com nível de significância estatística fixado em 5% e intervalo de confiança de no mínimo 80% e no máximo de 95%.

As variáveis contínuas como a idade, IL-4, IL-5, IL-8, IFN- γ e β -Actina foram analisadas como tal, sendo calculadas as medidas de tendência central (média e mediana) e as medidas de dispersão (desvio padrão e amplitude)⁸⁻⁹.

As variáveis sexo, idade e as citocinas IL-4, IL-5, IL-8, IFN- γ foram comparadas para os dois grupos de pacientes: alérgicos e não-alérgicos e observou-se pelos testes estatísticos aplicados (qui-quadrado de Bartlett, ANOVA, teste t, teste de Kruskal Wallis e correlação de Pearson) não haver diferença estatística com significância exceto pela IL-4 que apresentou um $p < 0,05$.

RESULTADOS

A faixa etária dos pacientes desta pesquisa variou de três a 47 anos estando a média, a mediana, o desvio padrão e a amplitude detalhados na Tabela 1.

Tabela 1

	Grupo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Amplitude
Idade	Alérgico	13,4	11	7,4	3-26
	Não-Alérgico	19,2	19	13	3-47
Valor dep				0,21	

A distribuição das idades nos dois grupos foi assimétrica uma vez que os pacientes envolvidos nesta pesquisa foram aqueles com indicação para cirurgias que pudessem fornecer os fragmentos de mucosa nasal.

Não houve diferença estatística significativa das idades nos dois grupos, $p=0,21$.

Na Tabela 2 é apresentado o coeficiente de correlação de Pearson para a comparação da β -Actina, IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- γ com a variável idade. Não foi observada nenhuma correlação com significância estatística entre as variáveis apresentadas.

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson entre idade e variáveis resposta.

Variável independente	r	r ²	Valor-p
b-actina	-0,264	0,070	0,158
IL-4	-0,178	0,032	0,348
IL-5	-0,341	0,116	0,065
IL-8	-0,236	0,056	0,210
IFN-g	-0,182	0,033	0,337

r: o coeficiente de correlação de Pearson.

r²: o coeficiente de determinação.

No grupo alérgico, 23% do pacientes eram do sexo feminino e 77% do sexo masculino. No grupo não-alérgico 53% eram do sexo feminino e 47% do sexo masculino. Observou-se não haver preferência por sexo ou raça nesta doença¹⁰⁻¹².

Todos os pacientes tinham em comum a queixa de obstrução nasal por apresentarem patologias que também obstruíam as vias aéreas superiores, como hipertrofia de tecido adenoideo e/ou hipertrofia de amígdalas palatinas, desvios septais obstrutivos e hipertrofia de conchas nasais.

Os pacientes do grupo atópico ao serem avaliados no pré-operatório imediato se encontravam paucissintomáticos em relação a seu quadro alérgico, no entanto, a história pregressa de hiperreatividade mucosa estava presente, característica clínica marcante da rinite alérgica. No teste alérgico observou-se o predomínio de sensibilidade ao D. farinae(100% dos pacientes) seguido pelo D. pteronyssinuse poeira doméstica (84%). As gramíneas foram antígeno-sensibilizantes em 46% dos pacientes e a sensibilidade à Blatella sp, cão e fungos foram semelhantes (23%). Nenhum paciente foi sensível às penas.

A comparação das variáveis IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- γ foram ajustadas pelo valor da β -Actina entre os pacientes alérgicos e não-alérgicos (Tabela 3). A IL-4 foi a única citocina a ter um aumento estatístico significativo ($p=0,03$). A IL-5 apresentou uma forte tendência a aumentar, porém ainda sem diferença estatística significativa ($p=0,06$). Os valores de IL-8 e IFN- γ foram semelhantes nos dois grupos: IL-8 com $p=0,17$ e IFN- γ com $p=0,72$.

Tabela 3. Comparação das interleucinas e interferon corrigidos pela actina entre os pacientes alérgicos e não-alérgicos.

Variável	Alérgicos				Não-alérgicos				Valor de p
	Média	DP	Mediana	Amplitude	Média	DP	Mediana	Amplitude	
b-actina	80209	10221	75909	66332-96794	80552	11467	77443	64111-99882	0,98
IL-4	37894	38998	24133	2838-126110	13396	15577	4624	119-51296	0,03
IL-5	39966	29899	30124	3013-92463	18714	17334	11382	2875-71402	0,06
IL-8	44515	23349	40622	17418-95491	37491	33518	27079	6887-129924	0,17
IFN- γ	123144	72907	99817	29679-184417	102575	42430	95574	29679-184417	0,72
Idade	13,2	7,8	11,0	3,0-26,0	21,2	15,5	19,0	3,0-58,0	0,21

DISCUSSÃO

Não foi evidenciada diferença estatística significativa ($p=0,21$) para a variável idade entre os grupos. A idade foi comparada com cada citocina e nenhuma correlação de significância estatística foi encontrada. Em relação ao sexo, no grupo alérgico, 23% dos pacientes eram do sexo feminino e 77% do sexo masculino. Como a amostra deste estudo foi pequena, confirma os relatos do II Consenso Brasileiro sobre Rinites¹⁵, que apesar de a rinite alérgica ser uma doença freqüente, não encontramos dados epidemiológicos reais, porque a maioria dos estudos sobre a sua ocorrência e a diversidade de relações estudadas referem-se a dados obtidos uma única vez, e geralmente em pequenos grupos populacionais.

Todos os pacientes tinham em comum a queixa de obstrução nasal, por apresentarem também associação com doenças que obstruíam as vias aéreas superiores como: hipertrofia de tecido adenoideano e/ou hipertrofia de tonsilas palatinas, desvios septais e hipertrofia de conchas nasais, causas já conhecidamente obstrutivas de vias aéreas superiores¹⁴.

Os portadores de rinite alérgica apresentavam-se paucissintomáticos no pré-operatório. A história pregressa destes pacientes alérgicos era compatível com rinite persistente de intensidade leve a moderada segundo a recomendação da iniciativa Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) e da Organização Mundial da Saúde¹³.

De acordo com Mion e Mello Jr.³, os antígenos sensibilizantes da rinite alérgica de maior ocorrência em nosso meio são originários de ácaros e outros componentes da poeira domiciliar. Assim, no Brasil, os sintomas clínicos de pacientes portadores de rinite alérgica são freqüentes durante todo o ano, mas se exacerbam nos períodos de outono/inverno, porque as condições climáticas favorecem a proliferação do ácaro, apesar deste ectoparasita estar presente nomeio domiciliar durante todo o ano. Os resultados desta pesquisa concordam com os dados desta literatura^{3,13}.

Os valores de IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- γ foram analisados, quantificados e padronizados através dos dados obtidos e ajustados pelo coeficiente da β -actina, semelhante

ao padrão utilizado por Mamoni e M.H. Botta². A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa foi um método potencialmente útil, trazendo subsídios aos estudos das citocinas em pacientes alérgicos, visto que esta doença é um bom modelo para o estudo destas substâncias segundo Nagggar et al.¹⁵.

Os resultados de IL-8 e IFN- γ foram semelhantes nos dois grupos, à exceção de IL-4e da forte tendência ao aumento dos níveis de IL-5.

Em 1997, um estudo realizado por Lee et al.¹⁶ em 20 pacientes (10 portadores de rinite alérgica perene não submetidos a provocação nasal e 10 pacientes controle demonstrou que a IL-4 e IL-5 se encontravam expressas universalmente na mucosa nasal dos pacientes atópicos. Assim, apóia o nosso estudo, onde a IL-4 foi a citocina a ter um aumento significativo ($p=0,03$), indicando que há diferença entre os grupos alérgico paucissintomático e não-alérgico. Esta citocina, por apresentar maior envolvimento com a sensibilização alérgica, foi encontrada em níveis elevados, mas não associada a manifestações clínicas, contribuindo para manter a inflamação nasal.

Os níveis de IL-5 apresentaram tendência a aumentar, mas não houve diferença estatística significativa ($p=0,06$). Ohashi et al.¹⁷ compararam os níveis de IgE, IL-5 e IFN- γ em três grupos: não-atópico, atópico assintomático e atópico sintomático. Observaram que não houve diferença significativa dos níveis de IL-5 nos grupos não-atópico e atópico assintomáticos. Semelhantemente, os pacientes alérgicos paucissintomáticos desta pesquisa, apresentaram os níveis de IL-5 similares aos dos pacientes não-atópicos. Por outro lado, estes autores observaram uma significativa relação entre os níveis aumentados de IL-5, a infiltração eosinofílica nasal e as manifestações clínicas da rinite alérgica. Asakura et al.¹⁸ bloquearam os efeitos da IL-5 com anticorpo monoclonal (anti-IL-5), inibindo conseqüentemente a eosinofilia, a hipersensibilidade histamínica e os sintomas nasais. Estes valores podem estar aumentados persistentemente em indivíduos alérgicos, o que mereceria maiores estudos¹⁶.

Para autores como Benson et al.¹⁹ o IFN- γ exerce uma importante função na doença alérgica. É uma cito-

cina produzida por células Th1 inibindo a resposta Th2. Segundo seus estudos, a liberação deficiente de IFN- γ , hipoteticamente o traço básico da atopia, facultaria o desenvolvimento da rinite alérgica, permitindo que a resposta Th2 induza ao aumento dos níveis de IgE intranasal nos pacientes atópicos. Bottcher et al.²⁰, estudando um grupo de crianças, observou que aquelas que desenvolveram o quadro de rinite alérgica foram as que apresentaram diminuição dos níveis de IFN- γ . Em nossa pesquisa constatamos que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de IFN- γ entre os dois grupos pesquisados. De acordo com Naggar et al.,¹⁵, a produção de IgE, está intimamente relacionada com o balanço entre IL-4 (resposta Th2) e IFN- γ (resposta Th1). Em sua pesquisa, nos ratos sensibilizados houve predomínio da resposta Th2 e aumento dos níveis de IL-4 com diminuição dos níveis de IFN- γ (Th1) o que concorda com nossos resultados.

A IL-8 é uma das váriascitocinas²¹ cuja função é a de induzir a migração de leucócitos²² e a produção de leucotrienos. É uma citocina importante na fase tardia da reação alérgica, especialmente na liberação de histamina²³. De acordo com Ohkubo et al.²⁴, os níveis, as fontes e o mecanismos de liberação desta citocina podem variar, mas é importante nas manifestações da rinite alérgica.

Em nosso estudo, com a amostra de 30 pacientes não foi possível afirmar que havia diferença na comparação de IL-8 e IFN- γ entre os pacientes alérgicos e não-alérgicos, pois o poder na comparação dos valores de média e desvio padrão foi sempre menor que 80%. Se o estudo fosse composto por 133 pacientes alérgicos e 133 pacientes não-alérgicos para os valores de IFN- γ , e 266 pacientes alérgicos e 266 pacientes não-alérgicos para IL-8, atingir-se-ia um poder de 80%, e, então, poder-se-ia afirmar se os grupos eram semelhantes ou não. Mesmo assim, sem diferença estatística, esta pesquisa concorda com a literatura, não havendo expressão significativa de IFN- γ , pois se encontra diminuída em pacientes atópicos e IL-8, relacionada mais freqüentemente com as manifestações clínicas da fase tardia da doença alérgica, o que não caracterizava o grupo em estudo.

CONCLUSÃO

Na comparação do perfil das citocinas entre pacientes não-alérgicos e pacientes portadores de rinite alérgica perene, paucissintomáticos, durante a exposição natural a alérgenos, sem provocação observou-se aumento da expressão de IL-4, tendência ao aumento da expressão de IL-5, citocinas tipo Th2, ausência de diferença estatística significativa na expressão de IFN- γ , citocina tipo Th-1, sugerindo que a resposta tipo Th2 é crucial para a fisiopatologia da rinite alérgica in vivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbutto JAM. Imunidade celular, in Imunologia. Rio de Janeiro: VLG Calich & CAC Vaz: Revinter; 2001. p.179-93.
2. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes Paracoccidoides brasiliensis infection from disease. Cytokine 2005;32(1):20-9.
3. Mion O, Mello Jr JF. Up-to-date em Rinite. Diagnóstico das Rinites. In: Respire. com São Paulo (magazine by Biosintética) 2006;2-12.
4. Mygind N, Bretlau P. Scanning electron microscopic studies of the human nasal mucosa in normal persons and in patients with perennial rhinitis. II. Secretion. Acta Allergol Denmark 1974;29(4):261-80.
5. Mygind N, Winther B. Light and scanning electron-microscopy of the nasal mucosa. Acta Otorhinolaryngol Belg 1979;33(4):591-602.
6. Tengowski MW, Feng D, Sutovsky M, Sutovsky P. Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of the ophylline or 1,3-dinitrobenzene-exposed rats. Biol Reprod 2007;76(1):149-63.
7. Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. Cytokine 2005;31(6):429-38.
8. Fonseca JS, Martins GA. Curso de estatística. 6ª ed. São Paulo: Jairo S da Fonseca, Gilberto A Martins;1996.
9. Goulart EMA. Metodologia e Informática na Pesquisa Médica. Belo Horizonte: Eugênio MA Goulart; 2000. p.161.
10. Araújo CAF, Barros LF, Miranda Jr MAB, Fontes RS. Rinopatia alérgica: Conduta terapêutica adaptada para países em desenvolvimento, in Revista da Sociedade de Otorrinolaringologia do Estado do Rio de Janeiro 2003;80-2.
11. Van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Allergy 2000;55(2):116-34.
12. Van Hoesche H, Vastesaeer N, Dewulf L, De Bacquer D, van Cauwenberge P. Is the allergic rhinitis and its impact on asthma classification useful in daily primary care practice? J Allergy Clin Immunol 2006;118(3):758-9.
13. Solé D, Mello Jr JF, Weckx LLM, Rosário Filho NA, Cruz AA, Campos CAH et al. II Consenso Brasileiro sobre Rinites 2006. In Rev Bras Alerg Immunopatol 2006;29(1):29-58.
14. Cruz OL, Costa SS. Rinite alérgica. In: Otorrinolaringologia: princípios e prática. Porto Alegre: Sady Selaimen da Costa, et al. Ed. Artes Médicas; 1994. p. 314-21.
15. Naggar MM, K Ukai K, Takeuchi & Sakakura Y. Expression of Interferon-gamma, Interleukin-4 and Interleukin-5 mRNA in the Nasal Mucosa Membrane of Rats with Allergic Rhinitis. Scand J Immunol 1998;47:554-60.
16. Lee CH, Rhee CS, Oh SH, Min YG, Lee MS. Increase in expression of IL-4 and IL-5 mRNA in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis during natural allergen exposure. Ann Otol Rhinol Laryngol 1997;106(3):215-9.
17. Ohashi Y, Nakai Y, Tanaka A, Kakinoki Y, Masamoto T, Kato A et al. Allergen-induced synthesis of interleukin-5, but not of IgE, is a key mechanism linked to symptomatic episodes of seasonal allergic rhinitis in sensitized individuals. Scand J Immunol 1998;47(6):596-602.
18. Asakura K, Saito H, Watanabe M, Ogasawara H, Matsui T, Kataura A. Effects of anti-IL-5 monoclonal antibody on the murine model of nasal allergy. Int Arch Allergy Immunol 1998;116(1):49-52.
19. Benson M, Strannegard IL, Wennergren G, Strannegard O. Low levels of interferon-gamma in nasal fluid accompany raised levels of T-helper 2 cytokines in children with on going allergic rhinitis. Pediatr Allergy Immunol 2000;11(1):20-8.
20. Bottcher MF, Jenmalm MC, Bjorksten B. Immune responses to birch in young children during their first 7 years of life. Clin Exp Allergy 2002;32(12):1690-8.
21. Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, Noer K, Kutvirt S, Van Epps D. Leucocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. J Immunol 1990;144:1323-30.

-
22. Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M. Theneutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med* 1989;170(5):1787-92.
23. Bischoff SC, Brunner T, De Weck AL, Dahinden CA. Interleukin modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonist. *J Exp Med* 1990;172(9):1577-82.
24. Ohkubo K, Ikeda M, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T, Okuda M. Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology* 1998;36(4):156-61.