



## Imunoterapia específica - avaliação dinâmica e cinética *in vivo* do extrato terapêutico em doentes alérgicos\*

### *Specific immunotherapy - in vivo dynamic and kinetic evaluation of a therapeutic extract in allergic patients*

Celso Pereira<sup>1</sup>, Filomena Botelho<sup>2</sup>, Beatriz Tavares<sup>1</sup>, Cândida Lourenço<sup>3</sup>,  
Cristina Baeta<sup>3</sup>, AG Palma-Carlos<sup>4</sup>, João Lima<sup>3</sup>, Celso Chieira<sup>1</sup>

#### Resumo

**Introdução:** A imunoterapia específica (IT) é uma forma comum de tratamento da doença alérgica. O mecanismo preciso desta terapêutica não é conhecido, embora a eficácia clínica esteja plenamente documentada. O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética da IT, aplicando uma técnica de Medicina Nuclear, marcação de leucócitos com <sup>99m</sup>Tc-HMPAO, em doentes em fase de manutenção e com excelente eficácia clínica à terapêutica.

**Pacientes e métodos:** Foram estudados 14 doentes alérgicos agrupados de acordo com o tipo de extrato e via de administração: extratos aquosos subcutâneos (látex= 4 doentes; veneno de abelha= 2 doentes), extrato *depot* subcutâneo (ácaros= 2 doentes; gramíneas= 2 doentes); extrato modificado subcutâneo (gramíneas= 1 doente; Parietária= 1 doente); extrato sublingual (ácaros= 2 doentes). O grupo controle foi constituído por dois doentes alérgicos a ácaros, submetidos respectivamente a: injeção subcutânea de soluto salino e injeção de extrato bacteriano por via subcutânea (controle positivo).

Simultaneamente à administração do extrato alergênico terapêutico, procedeu-se à re-injeção de leucócitos marcados com <sup>99m</sup>Tc-HMPAO, em veia periférica contralateral. A aquisição dinâmica decorreu durante 60 minutos, com matriz de 64x64, 2 imagens/ minuto em projecção torácica anterior. As aquisições estáticas, com matrizes 256x256, durante 5 minutos cada foram adquiridas aos 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos, em projecção torácica (anterior e posterior) e abdominal (anterior).

**Resultados:** A atividade inflamatória no local de administração da IT para os extratos subcutâneos aquosos e *depot* iniciou-se na primeira hora e manteve um aumento ao longo do tempo de estudo. Para os extratos sublinguais a atividade inflamatória foi observada logo nos primeiros minutos. Todos os extratos subcutâneos condicionaram drenagem linfática ascendente para áreas axilares homolaterais nos primeiros minutos após a administração do extrato e, posteriormente, para tecido linfóide do mediastino superior e anterior, e áreas cervicais. As focalizações torácicas estiveram presentes em todos os doentes estudados, o mesmo não acontecendo para a atividade intestinal. A via sublingual não induziu focalizações axilares ou intestinais, mesmo tendo havido deglutição do alérgeno.

Foram calculados coeficientes corrigidos de captação em áreas individualizadas (ROIs- region of interest) em relação aos coeficientes de captação das áreas de *background*.

#### Abstract

**Background:** Specific immunotherapy (SIT) is frequently used in the treatment of allergic diseases. However, the mechanisms by which SIT achieves clinical improvement remained unclear. We decided to study the *in vivo* kinetics of this therapy, using a nuclear medicine approach (leukocytes labelled with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO) in patients on maintenance doses of specific immunotherapy with confirmed clinical efficacy.

**Material and methods:** We studied 14 allergic patients grouped according to different treatment schedules: subcutaneous aqueous allergenic extract (4 latex and 2 hymenoptera venom), subcutaneous depot extract (2 house dust mite and 2 pollens), subcutaneous modified allergens (2 pollens), sublingual extract (2 house dust mites). The control group included two allergic patients submitted to subcutaneous injections of bacterial extract (1 patient - positive control), and aqueous solution (1 patient).

At the same time that the therapeutic allergen was administered subcutaneously, the autologous labelled white cells were injected intravenously in a peripheral vein in the contralateral arm. A thoracic dynamic acquisition of 60 mins, 64x64 matrix, 2 frame/min, in anterior view was performed. Static acquisition for 256x256 matrix, during 5 mins each at 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 mins after the administration of the radiolabelled leukocytes, in thoracic (anterior and posterior), and abdominal view were performed. During the examination, the local erythema was monitored. A similar procedure was undertaken for sublingual administration of immunotherapy.

**Results:** The inflammatory activity at the site of SIT injection (aqueous depot extract) started in the first hour and the increase was time related. For modified allergen extract and sublingual SIT the activity was present since the beginning of the administration. The ascendant lymphatic drainage, which was directed to the homolateral axillary region, to the lymphoid tissue of the upper mediastinum and to the anterior region of the neck began earlier. Thoracic focalisations were present for all the patients, whereas bowel focalisations were only observed for the subcutaneous route of administration. Sublingual SIT did not induce axillary or intestinal inflammatory focalisations, even though the patients had swallowed the allergenic extract. The uptake coefficient in individualized areas corrected to the uptake coefficient background was also studied.

\* Prêmio Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica - UCB 2004 / UCB Pharma 2004

**Conclusões:** A IT subcutânea condiciona atividade inflamatória no local de administração do extrato terapêutico que se estende aos planos profundos e a sua magnitude aumenta com o tempo decorrido, sem correlação com os sinais cutâneos a esse nível. O extrato modificado com glutaraldeído não revelou atividade inflamatória local. Em todos os doentes do estudo foi observada envolvimento inflamatório sistêmico que ocorre muito precocemente e se localiza a áreas dependentes do sistema imune.

Existem óbvias diferenças entre os diferentes tipos de doença alérgica em estudo, o tipo de extrato alergênico e a via de administração.

*Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(1):9-19* imunoterapia específica; imunoterapia subcutânea; imunoterapia sublingual; inflamação alérgica; células radiomarcadas; cintilografia, <sup>99m</sup>Tc-HMPAO

**Conclusions:** For the subcutaneous route of administration, except for glutaraldehyde modified allergen, the local inflammatory activity at the allergenic injection site was significantly higher in depth and was time dependent, maintaining activity even after complete disappearance of the erythema and/or wheal. These results express a prompt inflammatory involvement of the immune system with this allergenic therapy, which was unexpected until now. We also observed differences concerning allergic diseases, the type of allergenic extracts and routes of administration.

*Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(1):9-19* specific immunotherapy; subcutaneous immunotherapy; sublingual immunotherapy; allergic inflammation; radio labelled cells; scintigraphy, <sup>99m</sup>Tc-HMPAO

- 
1. Serviço de Imunoalergologia, Hospitais da Universidade de Coimbra; Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra, PT.
  2. Serviço de biofísica, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, PT.
  3. Serviço de Medicina, Hospitais da Universidade de Coimbra, PT.
  4. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, PT.
- 

## Introdução

Nos doentes alérgicos, a imunoterapia específica (IT) a par de uma implementação de medidas de evicção restritivas face aos alérgenos sensibilizantes, constituem as únicas intervenções que influenciam de fato, a longo prazo, a própria doença<sup>1,2</sup>. Esta terapêutica tem tido uma demonstração clínica de eficácia bem documentada sendo, atualmente, a única forma de tratamento curativo para formas de extrema severidade clínica, nomeadamente a anafilaxia a veneno de himenópteros e ao látex<sup>1-4</sup>. Relativamente a outros alérgenos, como ácaros, pólenes, fâneros e fungos, um conjunto diversificado de estudos DBPC (double-blind, placebo-controlled) têm demonstrado a eficácia clínica desta terapêutica, traduzida na redução de escores de sintomas ou na medicação necessária ao controle, de outras patologias alérgicas como a asma, a rinite e a conjuntivite<sup>5</sup>.

A designação de vacina antialérgica têm sido paulatinamente introduzida, uma vez que constitui, de fato, a única forma de tratamento que modifica a história natural da doença, previne o desenvolvimento de asma em doentes com rinite alérgica, reduz a severidade da própria doença, a medicação de apoio e tem um claro benefício na qualidade de vida dos doentes<sup>1</sup>. Por outro lado, um conjunto bem definido de estudos clínicos tem permitido reconhecer um efeito prolongado e é defendido que esta terapêutica deverá ser iniciada de forma precoce, porém alguns estudos são contraditórios uma vez que alguns doentes vêm a desenvolver novas sensibilizações no decurso do tratamento, particularmente em doentes monossensibilizados<sup>6-8</sup>.

A doença alérgica é, naturalmente, um distúrbio muito complexo e heterogêneo dependendo muito do perfil individual de cada doentes. A eficácia e a tolerância à IT são pois condicionadas por muitos fatores, nomeadamente: o uso de pré-medicação<sup>1</sup>, a fonte alergênica, o grau de purificação do alérgeno, a standardização e a estabilidade do próprio extrato e a forma de apresentação farmacológica do alérgeno (nativo ou modificação química; aquoso ou *depot*). Também, a severidade clínica anterior ou durante o tratamento, a via de administração terapêutica, o esquema e incremento de doses e a própria dose de manutenção, são outros fatores condicionantes da eficácia clínica<sup>9</sup>.

Os extratos aquosos são muito efetivos, mas condicionam mais frequentemente efeitos adversos (locais e sistêmicos) que os alérgenos administrados em extratos *depot*

ou em extratos modificados. Estes últimos foram desenvolvidos tendo em conta a redução da alergenicidade do extrato, mas preservando ou mesmo aumentado a sua capacidade imunogênica. No entanto, os extratos aquosos são, atualmente, o *gold standard* no tratamento da alergia a himenópteros, apesar de constituir *per se* uma situação de enorme severidade clínica. Os extratos alergênicos *depot* têm larga documentação científica na alergia respiratória e, apesar, de alguns estudos DBPC com extratos alergênicos quimicamente modificados demonstrarem benefício terapêutico, não existem estudos comparativos entre ambas as formas de tratamento<sup>10</sup>.

A imunoterapia local é uma modalidade mais recente e que tem ganho uma importância crescente face à comodidade de aplicação. Apesar do benefício terapêutico observado em alguns estudos, não existe consenso no uso da via nasal, brônquica ou oral<sup>1,2,11</sup>. No extremo oposto, a imunoterapia por via sublingual (SLIT) e deglutida ao fim de 2-3 minutos, quando se utilizam doses elevadas de alérgeno tem, atualmente, um nível A de evidência no tratamento da rinite alérgica sazonal e perene em adultos e na rinite alérgica sazonal em crianças<sup>1,11,12</sup>.

Diversos estudos DBPC têm demonstrado a eficácia clínica da SLIT e tem sido possível, à semelhança da IT subcutânea, confirmar repercussões imunológicas sistêmicas quando se aplicam doses elevadas de alérgeno<sup>12,13</sup>. Também, o efeito clínico a longo prazo tem sido demonstrado<sup>14</sup>, particularmente com a publicação recente de Khinchi MS *et al*<sup>15</sup>.

A enorme diversidade de estudos em imunoterapia disponíveis na literatura têm possibilitado um conhecimento mais preciso da modificação e intervenção imunológica desta terapêutica, mas os mecanismos e locais precisos dessa atuação permanecem, ainda, desconhecidos. Para a IT subcutânea a imunomodulação na resposta da célula T é plenamente consensual, condicionando quer um desvio imune (favorecendo uma resposta Th0/Th1), anergia célula T (decréscimo da resposta Th2/Th0), ou por ambos os mecanismos<sup>1</sup>. Porém, esta imunomodulação nunca poderá ser enquadrada de uma forma tão simplista, uma vez que esta terapêutica não induz à *posteriori* patologia associada a um perfil de citocinas do tipo Th1 (granulomatoses), em doentes tratados a alergia respiratória a aero-alérgenos<sup>16</sup>.

O aumento de IgG bloqueantes, a indução de células CD8+ moduladores de IgE, redução da infiltração de mastócitos e eosinófilos nas mucosas inflamadas, o decréscimo de mediadores inflamatórios (citocínicos e quimiocinas) ou a modulação do tráfico celular por redução da expressão de VCAM-1, entre outros, são alterações imunológicas induzidas pela IT, bem documentadas na literatura<sup>1,5,17-23</sup>.

A tolerância imune depende de vários mecanismos que incluem: anergia da célula T, depleção T ou apoptose e a supressão imune ativa<sup>24</sup>. O mecanismo primordial e o ob-

jetivo primário da IT é a indução de tolerância ao alérgeno a que o doente previamente apresenta sensibilização<sup>25</sup>. A IL-10 tem uma enorme importância e a sua expressão é induzida por esta terapêutica. Esta citocina está claramente reportada às células T reguladoras (T-regs) as quais ativamente controlam ou suprimem a função de outras células, mas sempre condicionando um efeito imuno-inibidor<sup>5,25</sup>. Admite-se que as alterações do microambiente subsequentes à redução da libertação mastocitária de histamina e PgE2, associadas à libertação de IL-10 e TGF- $\beta$  por células dendríticas poderão condicionar a indução de células T-regs, responsáveis últimas pela tolerância terapêutica<sup>26</sup>. Este novo enquadramento corrobora o conhecimento atual imuno-regulador da IT, uma vez que não é credível um "switch" linear de um perfil celular Th2 a Th1<sup>25</sup>.

Muito do conhecimento apreendido acerca da IT baseia-se na análise dos resultados decorrentes da aplicação desta terapêutica por via subcutânea; no entanto um número crescente de estudos com extratos sublinguais tem disponibilizado informação adicional. A absorção do alérgeno através de uma mucosa íntegra (não inflamada) e a posterior interação com células dendríticas locais permitirá, seguramente, a indução de um mecanismo de tolerância. Para além do efeito local a posterior deglutição do alérgeno poderá, também, permitir um estímulo adicional dependente de uma estimulação GALT<sup>11,12</sup>. Com efeito a administração do alérgeno por via sublingual, mas não deglutida posteriormente, tem significativamente menor eficácia clínica e não deverá ser preconizada. A utilização de doses mais elevadas de alérgeno na SLIT tem, à semelhança da forma sistêmica, demonstrado os mesmos efeitos imunológicos<sup>1,27-31</sup>.

Se a investigação quanto ao efeito modulador e eficácia tem sido uma constante nos estudos em imunoterapia, a avaliação da cinética e os locais precisos de atuação desta terapêutica não têm merecido idêntico interesse. O estudo de Bagnasco et al é muitíssimo importante e representa um marco no conhecimento nesta temática<sup>32</sup>. Neste estudo em indivíduos saudáveis, a administração sublingual de Par-j-1 ligado a isótopo radiativo<sup>132</sup>I revelou a persistência local do alérgeno na região oral por um período muito prolongado. A radioatividade sistêmica só foi observada após a deglutição. Estes resultados pressupõem que no alérgico a SLIT o alérgeno só é degradado após deglutição, e apenas alguns peptídeos têm absorção gastroentérica<sup>33</sup>. Estes estudos não foram realizados com extratos administrados por via subcutânea que seguramente teriam um enorme interesse.

A marcação radioativa de células sanguíneas circulantes é uma técnica de medicina nuclear com enorme interesse no estudo de patologia inflamatória, particularmente na doença inflamatória crónica intestinal<sup>34-37</sup>. Tratando-se de uma técnica com enorme sensibilidade para detecção de locais de inflamação, presumimos pela sua aplicabilidade *in vivo* no estudo cinético/dinâmico da resposta à IT. De facto, a administração de um extrato alergénico condiciona sempre um efeito inflamatório local pelo que a administração simultânea de leucócitos periféricos autólogos marcados com um radiofármaco poderá permitir a posterior migração ao local da aplicação do alérgeno e a posterior observação da dinâmica dessa migração. Com esta metodologia poderá ser objetivada a resposta biológica à IT, os locais onde se processa maior atividade e que poderão traduzir, objetivamente, as localizações onde ocorre a resposta imuno-inflamatória. Neste estudo pretendeu-se estudar a resposta cinética desta terapêutica, em doentes alérgicos, com diferentes formas de expressão clínica, com diferentes extratos alergénicos e com diferentes vias de administração.

## Pacientes e Métodos

Este estudo teve aprovação da Comissão de Ética e da Comissão de Apoio à Investigação hospitalar. Todos os doentes participaram de forma voluntária e procederam a aceitação de Registo de Informação Consentida de acordo com os *consensus* éticos internacionais e aprovados pelas referidas entidades.

## Pacientes

Foram selecionados 14 doentes alérgicos, voluntários, adultos, com idades compreendidas entre os 20 e 51 anos. Todos os doentes estavam submetidos à IT por um período mínimo de dois anos e em todos eles tinha sido demonstrada eficácia clínica traduzida pela completa remissão dos sintomas, ausência de medicação antialérgica regular, redução da reatividade cutânea ao(s) alérgeno(s) e redução da concentração de IgE específica(s) em relação ao início da terapêutica. Nos doentes com história prévia de anafilaxia a ausência de reatividade alérgica com o tratamento foi demonstrada por provas de provocação e/ou estudos de *immunoblotting*.

Os doentes foram selecionados de acordo com o tipo de extrato alergénico e a via de administração da imunoterapia:

- Extrato aquoso subcutâneo (anafilaxia)
  - 4 doentes: extrato de látex
  - 3 doentes: extrato de veneno de abelha
- Extrato *depot* subcutâneo (alergia respiratória)
  - 2 doentes: extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*
  - 2 doentes: extrato de pólenes de gramíneas
- Extrato de alérgeno modificado subcutâneo (alergia respiratória)
  - 1 doente: extrato de pólenes de gramíneas
  - 1 doente: extrato de pólen de *Parietaria judaica*
- Extrato sublingual (alergia respiratória)
  - 2 doentes: extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*

O grupo controle foi constituído por dois doentes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* com patologia respiratória de asma e rinite não submetidos à IT e controlados com terapêutica inalatória.

Nenhum dos doentes selecionados apresentava outra patologia concomitante, nomeadamente inflamatória, a qual poderia condicionar dificuldades na interpretação dos resultados. Todas as doentes do sexo feminino foram submetidas a teste rápido urinário para exclusão de gravidez.

Todos os estudos foram realizados em estrita vigilância hospitalar, e o dia da administração da imunoterapia foi exatamente aquele que estava previamente definido no seu esquema terapêutico de manutenção.

## Método

### Marcação de leucócitos com Technetium-99m hexamethylpropyleneamineoxime (<sup>99m</sup>TC-HMPAO)

A marcação de leucócitos circulantes com <sup>99m</sup>Tc-HMPAO processou-se com a técnica estandardizada internacionalmente, baseada no método descrito por Peters et al<sup>34</sup>. Por punção venosa cubital foi recolhido 42cc de sangue com uma seringa plástica, contendo 6ml de ácido-citrato-dextrose (ACD) + 6 ml de hidróxi-etil-starch (HES) a 6%. O ACD previne a coagulação das células à parede plástica e o HES acelera a sedimentação eritrocitária por interferência das cargas dos grupos ácido siálico da mem-

brana. O sangue na seringa foi mantido na posição vertical durante 30 minutos para sedimentação eritrocitária.

Numa segunda seringa de 10cc com 1ml de ACD foram recolhidos 9cc de sangue que foram posteriormente centrifugados a 2000g durante dez minutos para obtenção de plasma livre de células (PLC)

Após 30 minutos de sedimentação na seringa, o sobrenadante foi centrifugado a 150g durante cinco minutos para obtenção de um novo sobrenadante, plasma rico em plaquetas (PRP) que foi dispensado. O "pellet" de leucócitos foi ressuspenso em 0.6cc de PLC e ligado a 99mTc-HMPAO (Ceretec®, Amersham, UK). Para a marcação leucocitária o HMPAO é marcado inicialmente. Para isso, 1110MBq de uma solução salina decantada de 5ml de 99mTc fresco foi adicionada ao kit de HMPAO contendo 0.5mg de exametazime, 7.6 mg of SnCl<sub>2</sub> e 4.5 mg de NaCl de acordo com as indicações.

Posteriormente, 3cc de 99mTc-HMPAO foi adicionado aos leucócitos ressuspenso em PLC, permanecendo a mistura à temperatura ambiente para incubação durante dez minutos, para que se proceda a radiomarcagem celular. Após este período, 10cc de PRP foi adicionado aos leucócitos para paragem do processo de marcação, seguida de nova centrifugação a 150g durante cinco minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e dispensado. O "pellet" de leucócitos marcados foi, finalmente ressuspenso em 5cc de PLC. Antes da reinjeção das células no doente que ocorreu num período sempre inferior a cinco minutos procedeu-se a contagem radioativa em câmara apropriada.

A marcação celular ocorreu entre 50 e 75% das células, tal como normalmente descrito e todas as populações de leucócitos são uniformemente ligadas ao radiofármaco.

A dose efetiva-equivalente para este procedimento foi de cerca de 0.021mSv/MBq.

### Extrato alérgico terapêutico

Os extratos alérgicos administrados foram dos laboratórios ALK-Abelló (Madrid, Spain) para todos os doentes, excepto para os extratos modificados, alérgóides. Estes últimos foram dos laboratórios BIAL/Arestegui (Bilbao, Spain) para pólenes de gramíneas modificados por glutaraldeído e dos laboratórios Leti (Barcelona, Spain) para pólen de *Parietaria judaica* modificado por método de despigmentação. A dose de manutenção a que os doentes foram submetidos no dia do estudo correspondia ao seu esquema de tratamento e administrada na data pré-estabelecida.

Relativamente ao grupo controle de doentes alérgicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* não submetidos a IT procedeu-se ao seguinte:

1 doente: 0.5cc de solução aquosa fenolada por via subcutânea, solução de diluição do laboratório ALK-Abelló (Madrid, Spain).

1 doente: 0.5cc por via subcutânea de extrato aquoso bacteriano (Ribomunyl™, Pierre Fabre Médicament, France) contendo fracções ribosomais de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* e fracções membranares *Klebsiella pneumoniae*, um imunostimulante indutor de uma resposta IgG.

### Procedimentos na administração

Os doentes foram posicionados em decúbito dorsal sob uma gama câmara. A punção da veia cubital com cateter de calibre 14 permitiu a reinjeção dos leucócitos autólogos marcados com radiofármaco em bólus rápido seguido de lavagem venosa com soro fisiológico.

Simultaneamente, o extrato alérgico foi administrado por via subcutânea, de acordo com técnica comum, na superfície externa do braço contralateral à administração das células marcadas.

Ambas as injeções ocorreram em um mesmo tempo dando início à aquisição cintilográfica.

Os dois doentes alérgicos submetidos à SLIT foram ambos posicionados em decúbito dorsal sob uma gama câmara e as gotas contendo o extrato alérgico foram administradas ao mesmo tempo que se procedeu à reinjeção dos leucócitos radiomarcados na veia cubital. Aos três minutos o alérgico foi deglutido.

Para o grupo controle foi adotado o mesmo método.

Em todos os estudos procedeu-se a contagens da atividade residual da seringa contendo as células autólogas reinjetadas para posterior determinação da dose radioativa administrada efetivamente.

Todos os procedimentos foram realizados sobre estrita vigilância de especialistas em Imunoalergologia e Medicina Nuclear.

### Aquisições cintilográficas

Os estudos cintilográficos foram realizados numa câmara de raios gama (GE XR, Milwaukee, USA) com colimador de baixa energia e de orifícios paralelos, acoplada a uma unidade de aquisição Camstar e a uma unidade de processamento eNTEGRA.

A aquisição dinâmica foi obtida em visão anterior para tórax e pescoço para matrizes de 64x64 elementos de resolução durante 60 minutos (120 imagens x 30 segundos) seguida de estudo estático aos 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração dos leucócitos marcados com 99mTc-HMPAO e o alérgico, durante cinco minutos cada aquisição (256 x 256 elementos de resolução). As imagens estáticas foram obtidas em vista anterior e posterior para a projeção torácica e em vista anterior para a projeção abdominal.

Durante as aquisições, os doentes foram solicitados a permanecer em repouso, de modo a manter a geometria das projeções, havendo simultaneamente o cuidado de minimizar a distância ao detector.

Durante as aquisições, o eritema e pápula induzida no local de administração da IT subcutânea foi monitorizado.

Para os resultados quantitativos procedeu-se de forma distinta em relação ao tipo de imagem em estudo. Para as imagens torácicas dinâmicas, foram desenhadas regiões de interesse (ROIs, region of interest) no local de administração do extrato alérgico e/ou controles, área de *background* (músculo), e em eventuais focalizações (cervicais, axilares e torácicas). Para o estudo torácico estático, foi calculada uma imagem correspondendo à média geométrica entre a vista anterior e posterior e as ROIs foram desenhadas nas focalizações torácicas, cervicais, axilares ou intrapulmonares. Para o estudo estático anterior abdominal, foram desenhadas ROIs para cada uma das eventuais focalizações.

Para cada ROI calcularam-se os valores das contagens totais, média das contagens por *pixel* e contagens máximas, corrigidos para o decaimento do 99mTc. Foi assim, calculado o coeficiente de captação (*uptake coefficient*) como a relação entre as contagens máxima de cada ROI e a média de contagens na área de *background*. Para maior aferição dos resultados, o coeficiente de captação foi corrigido (*corrected uptake coefficient ROI*) pela subtração do coeficiente de captação da ROI *background* ao coeficiente de captação da ROI para cada área analisada.

ROI	contagem máxima	média de contagens
ROI-back	contagem máxima	média de contagens
ROI	Coeficiente captação = contagem máxima ROI / média contagens background	
ROI-back	Coeficiente captação = contagem máxima / média contagens	
Coeficiente captação corrigido = $CC_{ROI} - CC_{BK}$		

## Análise dos dados

O perfil clínico anafilaxia/alergia respiratória, o extrato alergênico e a via de administração foram analisados de forma individual para cada doente e comparados os diferentes grupos em estudo.

A análise estatística foi realizada a partir de análise descritiva.

## Resultados

Não foram observados efeitos adversos determinados

pela reinjeção de células autólogas marcadas radioativamente, nem decorrentes da administração do extrato alergênico.

Foi observado eritema/pápula no local de administração dos extratos aquosos subcutâneos, mas com diâmetro sempre inferior a 40 mm. Não foi observada pápula nos restantes doentes submetidos a IT subcutânea ou efeitos locais nos doentes a quem foram administrados extratos sublinguais.

Nos quadros I e II apresentam-se aspectos clínicos e laboratoriais dos doentes estudados.

**Quadro I** - Aspectos clínicos.

Doente	Sexo	Idade (anos)	Duração doença (anos)	Doença	Alergia	IT Via	IT extrato	IT (anos)	IT (cc)	IT (dose)	Atividade administrada
1	F	34	7	A	L	sc	aquoso	6	0,35	0,35	272,0
2	F	39	6	A	L	sc	aquoso	5	0,35	0,35	240,5
3	F	28	7	A	L	sc	aquoso	5	0,35	0,35	149,6
4	F	31	3	A	L	sc	aquoso	3	0,35	0,35	269,4
5	M	49	5	A	VA	sc	aquoso	4	1,0	100	67,7
6	F	37	4	A	VA	sc	aquoso	4	1,0	100	316,3
7	F	53	14	AB+RA	Gram	sc	depot	4	0,60	1,5	337,2
8	F	24	10	AB+RA	Gram	sc	depot	4	0,60	1,5	255,5
9	M	22	12	AB+RA	Dpt	sc	depot	4	0,60	3,6	91,8
10	F	51	30	AB+RA	Dpt	sc	depot	5	0,60	3,6	170,3
11	M	33	28	AB+RA	Gram	sc	alergoide	5	0,70	36,72	476,7
12	F	49	34	AB+RA	Pj	sc	alergoide	3	0,50	12,0	132,7
13	M	20	10	AB+RA	Dpt	sl	aquoso	3	5*	1,2	126,3
14	F	27	19	AB+RA	Dpt	sl	aquoso	3	5*	1,2	254,6

Doença: A= anafilaxia; AB+RA= asma brônquica + rinite alérgica.

Alérgeno: L=latex; VA= veneno de abelha; Gram= pólen de gramíneas; Dpt= *Dermatophagoides pteronyssinus*; Pj= *Parietaria judaica*

IT via de administração: sc= subcutânea; sl= sublingual

IT extrato: depot= adsorvido em hidróxido de alumínio; alergoide= modificação por glutaraldeído (doente 11); modificação por despigmentação (doente 12)

IT (cc): volume de dose de manutenção administrado em ml. Aos doentes 13 e 14 foram administradas 5 gotas de dose de manutenção.

SIT dose: quantidade de alérgeno em mcg de proteína.

Atividade administrada: MBq

Quadro II - Grupo controle. Aspectos clínicos

Controles	Sexo	Idade (anos)	Duração da doença (anos)	Doença	Alérgeno	Injeção	Volume(cc)	Atividade administrada
1	F	41	20	AB+RA	Dpt	s. salina	0,50	306,4
2	F	45	20	AB+RA	Dpt	bacteriana	0,50	126,0

Doença: AB+RA= asma brônquica + rinite alérgica  
 Alérgeno: Dpt= *Dermatophagooides pteronyssinus*  
 Atividade administrada: MBq

Após o processamento cintilográfico, foram obtidos valores em ROIs nos locais de administração do extrato alérgico e/ou controles e em focalizações das áreas axilar, cervical, torácica e abdominal, bem como valor de ROI no "background". Foram, ainda, calculados os coeficientes corrigidos de captação para cada um dos ROIs nas diferentes focalizações em diferentes tempos ao longo de cada um dos estudos.

Os coeficientes corrigidos de captação para as diferentes focalizações em análise estão presentes nas figuras 1-5. Não foram consideradas as aquisições cintilográficas dinâmicas nos locais de administração do extrato alérgico (doente 1,2 e 10) e na área axilar (doente 1) por problemas técnicos (mobilização do membro superior em análise) que poderiam condicionar interpretações pouco fidedignas.

A atividade inflamatória iniciou-se precocemente nos doentes estudados e submetidos a extratos alérgicos aquosos para tratamento de anafilaxia, do que, nos doentes submetidos a IT subcutânea com extratos *depot* para tratamento de alergia respiratória (látex: 20-35 min; veneno de abelha: 15 min; pólen de gramíneas: 25 e 30 min; ácaros: 25 e 45 min).

Nos doentes submetidos a SLIT a atividade inflamatória inicia-se rapidamente aos cinco minutos em ambos os alérgicos e essa atividade aumenta, também, de forma célere e consistente ao longo do estudo.

Relativamente aos doentes em IT subcutânea com extratos alérgicos modificados o início de atividade é, também, muito rápido (primeiros minutos), mas tem um perfil divergente nos dois extratos analisados.

Quanto aos doentes com asma e rinite alérgicas, mas não submetidos à IT, observou-se atividade inflamatória residual aos 60 min na doente a quem se administrou solução salina, eventualmente dependente da presença de fenol que tem um potente efeito irritativo, mas que é fundamental para preservação biológica do extrato com múltiplas utilizações. Esta atividade observada, confirma a extrema sensibilidade desta técnica laboratorial no estudo da inflamação. Neste controle negativo não foram observadas focalizações durante o estudo em qualquer nível das projeções estudadas.

Relativamente ao controle positivo, doente alérgico submetido à injeção de extrato bacteriano a atividade inflamatória iniciou-se aos dez minutos com um aumento sustentado ao longo do estudo. Foi ainda observada atividade nas áreas axilares, cervicais e torácicas, mas sem focalizações intestinais, figura 6. No entanto existe uma clara divergência na intensidade da atividade inflamatória em todas as projeções estudadas quando comparados com os doentes alérgicos em IT.

A atividade inflamatória nas áreas axilares e cervicais esteve presente desde o início das aquisições nos doentes em IT subcutânea. Os coeficientes corrigidos de captação estabilizam aos 180 minutos. Outra observação peculiar é inexistência de focalizações axilares após administração de alérgeno terapêutico por via sublingual.

O "pool" de células marcadas circulantes nos primeiros

minutos poderá dificultar a interpretação dos resultados e as eventuais focalizações nas áreas pulmonares. Desta forma, decidiu-se apenas considerar ROIs intrapulmonares apenas após os primeiros 60 minutos, mesmo que estes se tenham expresso mais precocemente. Não existiram alterações significativas entre os diferentes grupos em estudo e as focalizações intrapulmonares são consistentes como resposta à IT.

Focalizações nas aquisições abdominais foram observadas em todas as formas de IT subcutânea. Os coeficientes corrigidos de captação de ROIs dependentes de focalizações abdominais/intestinais apenas foram calculados até aos 240 min uma vez que este tempo coincide com o início da excreção hepato-biliar e urinária do radiofármaco. Qualquer focalização dependente de áreas de intestino grosso não foi considerada, nem efetuados cálculos para coeficientes de captação, pela possibilidade de representar uma excreção/clearance. Curiosamente não foi observada atividade intestinal nos doentes submetidos a SLIT, outra das diferenças em relação à via subcutânea.

Nos doentes estudados são óbvias outras focalizações com atividade inflamatória de elevada densidade, nomeadamente a nível supra-esternal e mediastino anterior, mas foi decidido não serem consideradas áreas de interesse porque são regiões de grande confluência vascular e pode condicionar interpretações menos fidedignas. No entanto, existe um marcadíssimo aumento na intensidade do que é habitualmente observado nesta técnica e, mesmo em relação aos controles em estudo. As áreas medulares de ossos longos são outros dos locais com enorme intensidade inflamatória, mas foi também decidido não proceder a cálculos de coeficientes de captação nestas regiões.

Foram obtidos diferentes perfis de ROIs nas diferentes vias de administração e com os diferentes tipos de extratos em estudo nestes doentes. Todos eles descrevem uma atividade inflamatória dependente no tempo e relacionada a áreas dependentes do sistema imune.

Relativamente aos extratos alérgicos *depot* não foram observadas diferenças significativas entre os doentes alérgicos a pólenes e a ácaros.

Para os doentes alérgicos a ácaros houve claras diferenças entre a via subcutânea e sublingual. Esta última é responsável por uma muito potente atividade inicial com elevados coeficientes corrigidos de captação nos ROIs dependentes da administração do extrato do que para os extratos *depot*. Todavia, às seis horas é similar para ambos os grupos, mesmo quando se atinge a semivida do radiofármaco. A persistência destes valores nesta fase é consistente com a potência e capacidade de efeito continuado capaz de perpetuar o efeito terapêutico do extrato alérgico.

Outro dado relevante neste estudo é que a atividade inflamatória no local de administração do extrato alérgico subcutâneo é substancialmente superior do que o eritema e/ou pápula eventualmente presente e que essa atividade ocorre profundamente e que persiste mesmo após o desaparecimento dos sinais locais.

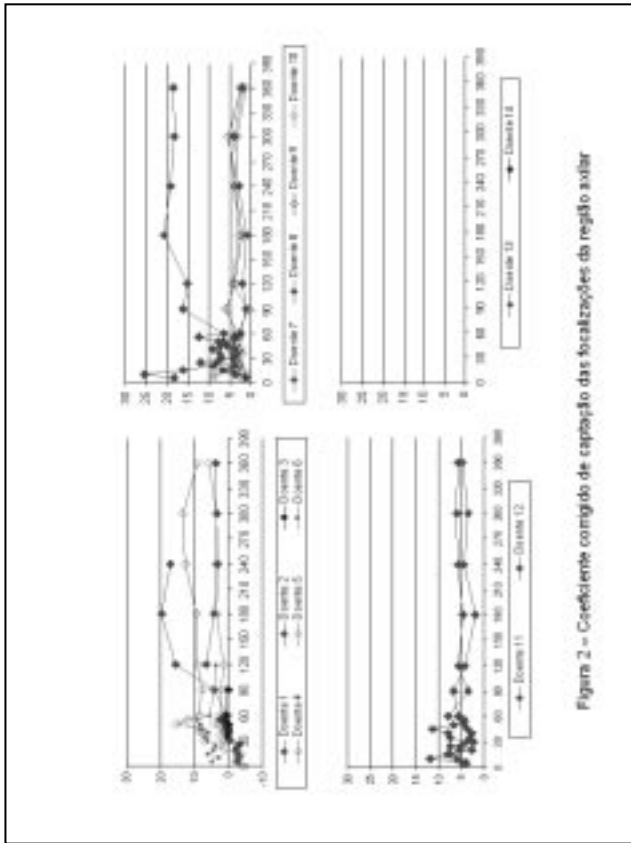


Figura 2 - Coeficiente corrigido de captação das focalizações da região axilar

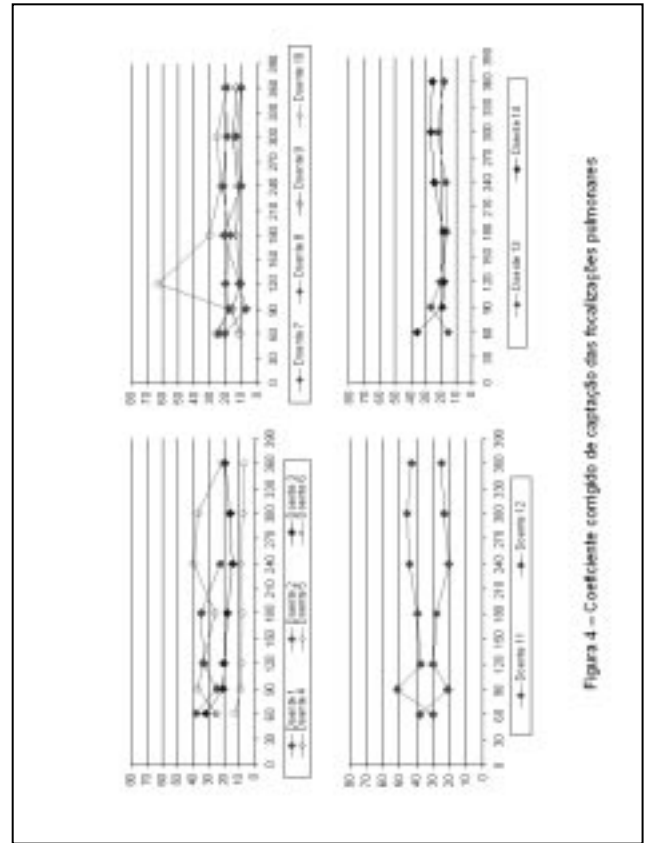


Figura 4 - Coeficiente corrigido de captação das focalizações pulmonares

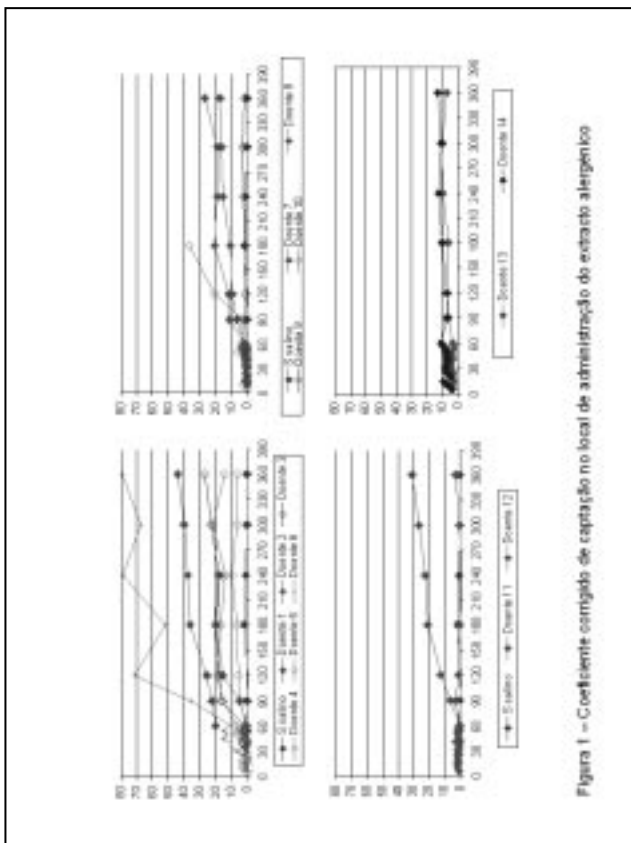


Figura 1 - Coeficiente corrigido de captação no local de administração do extrato alérgico

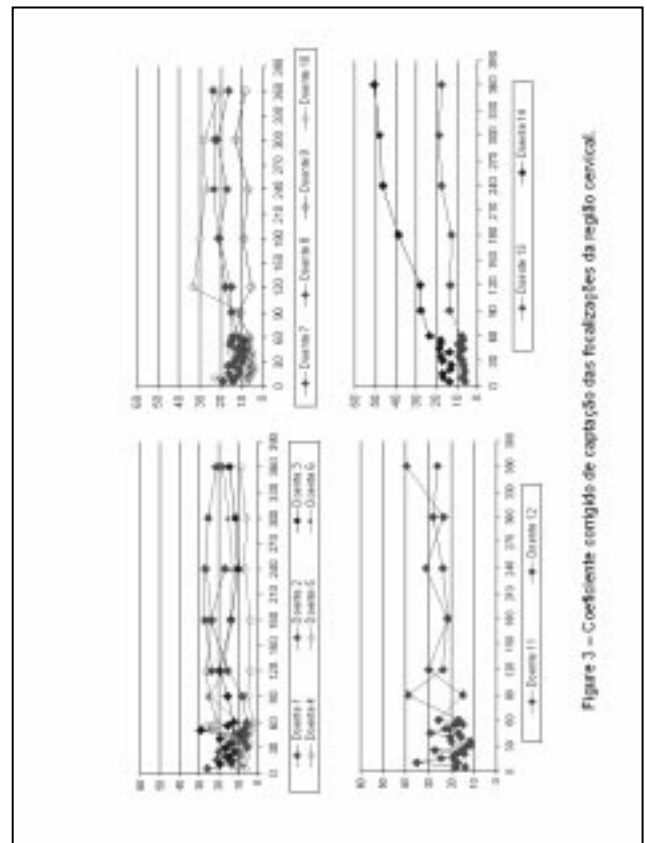


Figura 3 - Coeficiente corrigido de captação das focalizações da região cervical

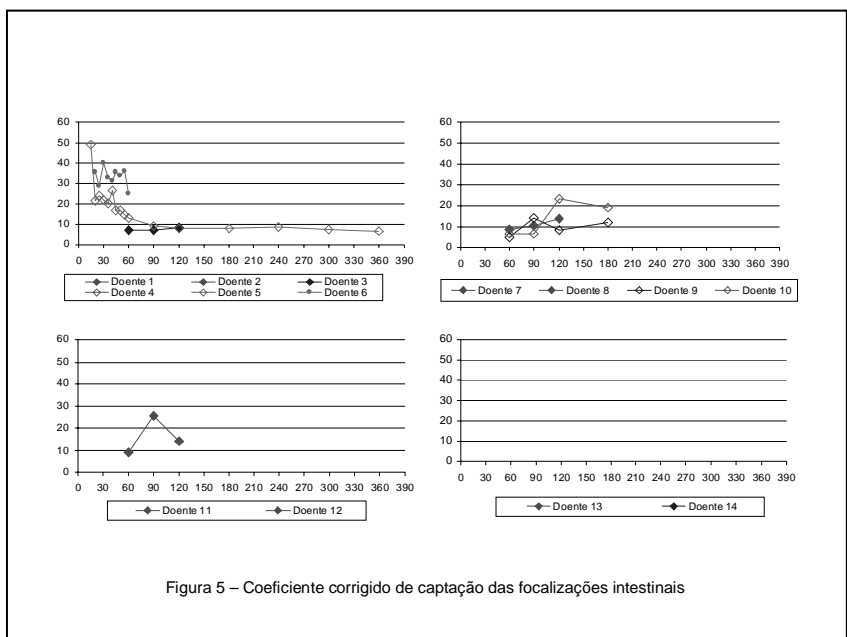


Figura 5 – Coeficiente corrigido de captação das focalizações intestinais

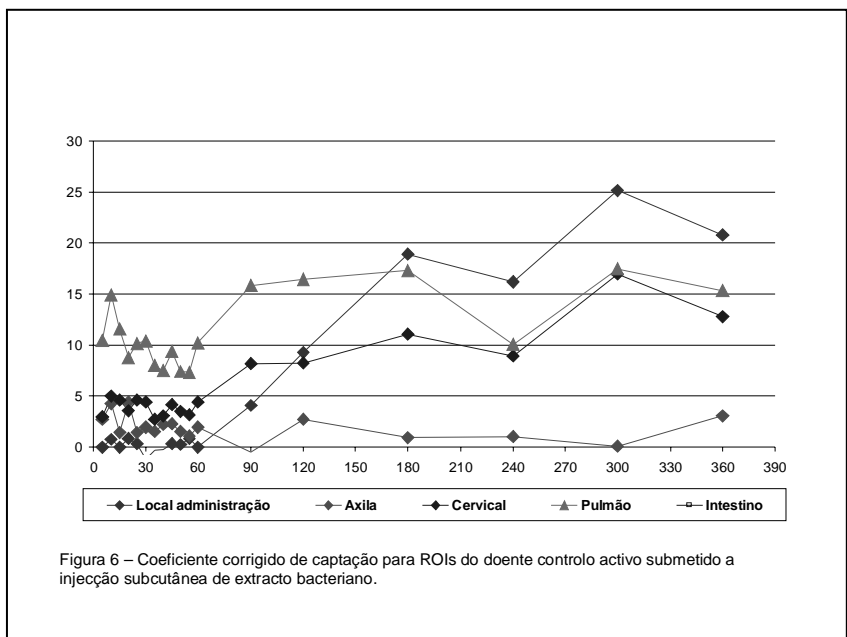


Figura 6 – Coeficiente corrigido de captação para ROIs do doente controlo activo submetido a injeção subcutânea de extracto bacteriano.

**Discussão**

A marcação radioativa de um alérgeno é possível, mas fica restrita, exclusivamente a uma só proteína do extrato terapêutico. Esta poderia ter sido uma estratégia para a avaliação dinâmica /cinética da resposta biológica à IT. No entanto, a exclusão de uma quantidade de epitopos alérgênicos presentes no extrato terapêutico, em manutenção nestes doentes, iria condicionar desde logo a interpretação dos resultados e poderia, eventualmente, alterar a própria estrutura imunogênica desse epitopo e a resposta imune induzida.

A utilização do extrato alérgênico tal como é administrado em terapêutica de manutenção e que, manifesta-

mente, se reputa elevada eficácia clínica, constitui o procedimento que minimiza um fator de erro crucial no desenho deste estudo.

A técnica que empreendemos neste estudo é, presente-mente, um procedimento de rotina para estudo de algumas patologias inflamatórias. Obviamente, que a determinação quantitativa da atividade inflamatória de ROIs, pela sua enorme complexidade, morosidade e disponibilidade de meios tecnológicos convenientes, está reservada ao campo de investigação em projetos bem definidos e específicos. Os riscos intrínsecos desta técnica de Medicina Nuclear são mínimos, uma vez que a exposição radioativa é muito reduzida e a dose absorvida pelo indivíduo (dose efetiva) corresponde a cerca de 3mSv, dose essa que é similar à



dose natural de exposição durante um ano em Portugal continental.

No desenho deste estudo, o nosso primeiro objetivo foi estudar a inflamação local condicionada pela própria administração do extrato alergênico subcutâneo. A demonstração de atividade inflamatória a esse nível era, pois, uma observação esperada, mas a demonstração de áreas de atividade em outras localizações e, particularmente, a celeridade com que se observaram focalizações foram, de fato, resultados que não suspeitávamos que pudessem ocorrer num período de tempo tão restrito.

A administração subcutânea de extrato alergênico terapêutico condiciona sempre alguma reatividade local, traduzida por eritema de maior ou menor intensidade, mesmo em doentes com excelente "compliance" e enorme eficácia clínica a esta terapêutica. Nos doentes estudados, a intensidade da inflamação foi mais elevada para os extratos aquosos, mas são estes que estão associados a formas clínicas de doença alérgica de maior gravidade, anafilaxia. A enorme intensidade de atividade nestes doentes não se traduz clinicamente por sinais clínicos locais muito exuberantes. As doentes em IT a látex apresentaram efeitos locais mais pronunciados que nos dois doentes alérgicos a veneno de abelha. No entanto, nestes últimos as ROIs definidas a esse nível têm áreas manifestamente superiores e profundas, mas a quantidade de proteína e o volume de extrato administrado, também, foi superior.

Relativamente aos extratos modificados verificou-se uma reduzida atividade inflamatória no local de administração, mais pronunciada para o alérgeno modificado com glutaraldeído. A menor reatividade cutânea, com minimização dos efeitos adversos locais com estes extratos descritos na literatura<sup>40</sup>, é confirmada pelos nossos resultados. No entanto, o extrato modificado com despigmentação apesar de não apresentar eritema durante toda a avaliação clínica, foi responsável por coeficientes de captação significativos com projeção para as áreas profundas adjacentes.

Nos dois doentes em SLIT o início de atividade ocorre nos primeiros minutos e não existiram efeitos secundários. A extensa vascularização presente a nível do pavimento oral poderá justificar este acontecimento.

Quanto ao doente controle a quem se administrou solução salina observou-se atividade vestigial aos 60 minutos. Consideramos que essa atividade poderá ser dependente da presença de fenol que como é sabido tem um efeito irritativo potente. Consideramos que o efeito observado constitui uma validação da própria técnica e a sua elevada sensibilidade. Quanto ao doente controle positivo, asmática alérgica a ácaros do pó doméstico submetida a injeção de extrato aquoso bacteriano, apresenta atividade inflamatória em locais reportados a estruturas linfóides. A indução de resposta dependente de IgG está bem documentada nesta terapêutica imunomoduladora<sup>41</sup>, pelo que não nos surpreendeu o resultado observado. A análise qualitativa das aquisições cintilográficas nesta doente apresenta óbvias diferenças relativamente aos restantes doentes alérgicos submetidos a administração de extratos alergênicos.

Quando analisados os doentes em IT por via subcutânea é patente a drenagem ascendente para as áreas axilares homolaterais, logo desde os primeiros minutos após a administração. As áreas linfóides cervicais e do mediastino superior são as estruturas envolvidas em seguida. Nas aquisições mais tardias, estáticas, observa-se um envolvimento paulatino e atividade inflamatória global, com focalizações em estruturas dependentes do sistema imune: áreas linfóides cervicais, supraesternais, mediastino, pulmão, intestino e áreas medulares ósseas. A precocidade do envolvimento de estruturas linfóides centrais foi, efetivamente, um acontecimento não esperado e que foi consistente em todos os doentes. Os valores máximos nos ROIs desenhados a esse nível, mantém um incremento

progressivo, mesmo quando se inicia a eliminação urinária e fecal do radio-isótopo e quando se atinge a semi-vida deste isótopo. Este perfil não é reprodutível para o estudo de outras patologias inflamatórias, não ocorreu nos dois doentes controles e pode refletir a magnitude do mecanismo terapêutico da IT com persistência de uma re-estimulação continuada desta terapêutica.

Relativamente à SLIT observa-se um início da atividade inflamatória substancialmente mais rápido do que para as formas subcutâneas. Ocorreu um perfil de atividade, claramente distinto. Os coeficientes mais elevados de captação situam-se nas áreas linfóides cervicais, na proximidade, pois, do local de aplicação do alérgeno. Não existiu, nestes doentes, atividade nas estruturas axilares e abdominais. Nesta modalidade, na avaliação qualitativa, existe menor intensidade da atividade inflamatória, em comparação com a IT injetável. Estes resultados poderão justificar a necessidade da administração repetida do extrato (3 vezes/semana), em comparação com a dose de manutenção na via subcutânea (cada quatro semanas), para permitir um efeito terapêutico semelhante.

Relativamente aos extratos polínicos quer os extratos *depot* quer os modificados tiveram um perfil de atividade inflamatória sistêmica semelhante. No entanto, estes últimos apresentaram imagens divergentes nos locais de administração. Estes resultados parecem não dar fundamento a muitos autores que desaconselham a utilização de alérgóides no tratamento do doente alérgico.

Nesta técnica o "pellet" de células marcadas radioativamente é uniforme e todas as linhas de leucócitos estão presentes proporcionalmente. Não é possível a marcação seletiva de um tipo celular em particular que mantenha a viabilidade biológica para se proceder a posterior re-injeção autóloga. A marcação seletiva de linfócitos poderia parecer extremamente aliciante e cumprir os objetivos do estudo. No entanto, recentemente, outras células têm merecido particular atenção no estudo da inflamação, da resposta imune e nos mecanismos de tolerância.

As células dendríticas (DC) têm sido objeto de estudo exaustivo nos últimos anos e são consideradas nucleares na inflamação e na tolerância imune. As células apresentadoras de antígeno (APC) por excelência estão divididas em dois sistemas: DC incluindo as DC sanguíneas e dos tecidos (como as células epidérmicas de Langerhans-LC); e as células do sistema monócito/macrófago<sup>42</sup>. Relativamente às DC consideram-se dois tipos distintos: DC1 ou mielóide DC, DC2 ou linfóide/plasmocitóide DC<sup>42,43</sup>.

As DC2 são células presentes fundamentalmente na medula tímica, amígdalas e nas áreas T de órgãos linfóides secundários; enquanto as DC1 estão localizadas em áreas não-T. Outra diferença biológica reside na incapacidade da DC2 em internalizar o Ag estranho. Por outro lado, DC1 podem migrar do sangue para os tecidos para captura de Ag estranhos, podem migrar por drenagem linfática para os órgãos linfóides e possibilitar a posterior indução e *priming* de linfócitos T quer no perfil citocínico Th1 ou Th2<sup>26,43,44</sup>. Têm, pois, uma efetiva função de indução de resposta imunitária e de vigilância imune. Em situações particulares e sob estímulos apropriados os monócitos sanguíneos periféricos podem diferenciar-se em DC1<sup>42</sup>.

As LC pertencem ao sistema DC1 e são as APC mais importantes na pele. Após um estímulo inflamatório local apropriado, a produção de MCP (monocyte-chemoattractant protein) induz um recrutamento de progenitores de LC da medula óssea à pele e a posterior migração aos nódulos linfáticos periféricos<sup>43</sup>. Outro dado importante e consensual na literatura é a relevância da IL-10 produzida pelas DCs na tolerância imune, por estimulação e *priming* de linfócitos T reguladores (Tregs)<sup>25,26,45</sup>.

A família de DCs da mucosa oral tem características distintas das LCs da pele. A TGF- $\beta$ , bem como a IL-10 são re-

levantes no microambiente oral<sup>43</sup>. Apresentam expressão de FcεRI à superfície, parcialmente ocupados com moléculas de IgE<sup>43</sup>. A ligação de alérgenos ao receptor FcεRI sob intervenção de IL-10 é um dos mecanismos de tolerância a este nível.

Os avanços no conhecimento destes aspectos na imunoinflamação levam-nos a propor, atendendo aos resultados deste estudo, a seguinte hipótese de atuação da imunoterapia específica:

A aplicação subcutânea de extrato alergênico condiciona uma ativação das LC, bem como recrutamento de DC/monócitos circulantes periféricos. Posteriormente, ocorrerá migração para áreas linfóides, cooperação com DC2 e, finalmente, indução de células Tregs por intervenção de IL-10. Estes mecanismos seqüenciais traduzem-se na tolerância imune para os alérgenos sensibilizantes. A ativação sistêmica de áreas relacionadas com o sistema imune, sustenta o mecanismo sistêmico e global da imunomodulação da IT.

Na via sublingual são aplicadas grandes quantidades de alérgeno região com estreita proximidade de estruturas linfóides, nomeadamente a amígdala lingual. É provável que as DC possam iniciar o processo tal como ocorre na pele, porém a presença de nódulos linfóides com outras populações, DC2, poderá condicionar uma saturação da atividade DC1, resultando numa incapacidade de uma resposta inflamatória sistêmica menos intensa. A indução de tolerância e a própria eficácia clínica com esta terapêutica seria, naturalmente, menos intensa e, por isso, requer uma administração freqüente e estimulação com doses de alérgenos em concentração superior. Por outro lado, a deglutição do alérgeno poderá proporcionar uma interação com a mucosa digestiva e induzir um mecanismo adicional de tolerância, por intervenção de TGF-β e Th3<sup>43,45</sup>, embora nos nossos doentes não observamos focalizações intestinais.

A IT é claramente uma terapêutica imunomoduladora com plena confirmação em múltiplos estudos científicos. Os nossos resultados mostram um claro efeito sistêmico, com focalizações em estruturas dependentes do sistema imune. Essa atividade inflamatória inicia-se de forma muito precoce, existem claras diferenças entre os diferentes extratos alergênicos terapêuticos em estudo, bem como na cinética da IT subcutânea e sublingual.

Os extratos aquosos são aqueles que apresentam maior potência na intensidade de atividade inflamatória sistêmica na IT subcutânea seguindo-se os alérgenos *depot* e os modificados, alergoides. Essa atividade, aumenta de forma paulatina no tempo, mesmo quando se atinge a semi-vida do radiofármaco, tal como se referiu anteriormente. Com efeito, tivemos a oportunidade de proceder a aquisições às 21 horas na doente 2, alérgica a látex. A intensidade da atividade está documentada na figura 17, com áreas muito ativas no local de administração do extrato alergênico, bem como focalizações mediastínicas, supraesternais, cervicais, torácicas e medula óssea. Nesta doente a eliminação intestinal/cólon é bem evidente.

Seria importante estudar a cinética e a dinâmica da IT durante a fase de incremento de doses alergênicas, para compreender, como se processa, ao longo do tratamento a atividade inflamatória e imunomodulação nesta terapêutica. Este procedimento, é impraticável no homem por motivos éticos óbvios. No entanto, seria relevante a realização destes estudos em modelos animais.

Consideramos, ainda, importante aplicar este método em doentes nos quais não existe eficácia clínica à IT, mesmo quando esta foi corretamente prescrita.

## Referências

1. Bousquet and ARIA Workshop Group. J Allergy Clin Immunol 2001; 108 suppl 5:S147-S336.
2. Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic disease. Allergy 1998; 53 suppl 44:1-42.
3. Rueff F, Przybilla B, Muller U, Mosbeck H. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Venom Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy 1996; 51:216-25
4. Pereira C, Pedro E, Tavares B. Specific immunotherapy for severe latex allergy. Eur Annals of Allergy Clin Immunol 2003; 35:217-25.
5. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy 2000; 55:522-30.
6. Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). J Allergy Clin Immunol. 2002;109:251-6.
7. Passalacqua G, Canonica GW. Long-lasting clinical efficacy of allergen specific immunotherapy. Allergy 2002; 57:275-6.
8. Tella R, Bartra J, San Miguel M. Effects of specific immunotherapy on the development of new sensitisations in monosensitized patients. Allergol Immunopathol (Madr) 2003; 31:221-5.
9. Parmiani S, Fernández-Távora L, Moreno C, Guardia P, Rico P. Clustered schedules in allergen-specific immunotherapy. Allergol et Immunopathol 2002; 30:283-91.
10. Garcia-Sellés J, Pascual A, Funes E, Pagán JA, Negro JM. Clinical efficacy of depigmented and glutaraldehyde polymerized therapeutic vaccines of Parietaria judaica. Allergol et Immunopathol 2003; 31:63-9.
11. Kagi MK, Wuthrich B. Different methods of local allergen-specific immunotherapy. Allergy 2002; 57:379-88.
12. Leonart R, Moñoz F, Eserverri JL. Inmunoterapia sublingual en niños. Position Paper. Allergol et Immunopathol 2003; 31:244-9
13. Passalacqua G, Canonica GW. Sublingual or injection immunotherapy: the final answer? Allergy 2004; 59:37-8.
14. Di Rienzo V, Marcucci F, Puccinelli P et al. Long-lasting effect of sublingual immunotherapy in children with asthma due to house dust mites: a 10-year prospective study. Clin Exp Allergy 2003; 33:206-10.
15. Khinchi MS, Poulsen LK, Carat F, Andre C, Hansen AB, Malling HJ. Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study. Allergy 2004; 59:45-53.
16. Durham SR, Till SJ. Immunological changes associated with allergen immunotherapy? J Allergy Clin Immunol 1998; 102:157-64
17. Durham SR, Ying S, Varney VA. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. J Allergy Clin Immunol 1996; 97:1356-65.
18. Hamid Q, Schotman E, Jacobson M, Walker S, Durham SR. Increases in interleukin-12 (IL-12) messenger RNA+ (mRNA+) cells accompany inhibition of allergen induced late skin responses following successful grass pollen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 1997; 99:254-60.
19. Ariano R, Merendino RA, Minciullo PL, Salpietro CD, Gangemi S. Specific immunotherapy effect on interleukin-18 and CD30 serum levels in monosensitized patients with rhinitis. Allergy Asthma Proc 2003; 24:179-83.
20. Lewis DB. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? Curr Opin Immunol. 2002; 14:644-51.
21. Gardner LM, O'Hehir RE, Rolland JM. High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-gamma+ T cells, apoptosis of CD4+IL-4+ cells and T cell anergy. Int Arch Allergy Immunol 2004.
22. Pereira C, Paiva A, Todo-Bom A. Expression of VCAM-1 during allergic reaction in asthmatic patients. Effects of specific immunotherapy. In XVI World Congress of Asthma. Ed HE Neffen, C Baena-Cagnani, A Yañez. Monduzzi Ed, Bologna, Italy, 113-8.
23. Palma Carlos AG, Pregal AL, Alonso E. Soluble adhesion molecule levels during immunotherapy for perennial allergic rhinitis and/or asthma. Acta-Asthma 2001; 2:116-7.
24. Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breittmayer JP, Groux H. A comparative study between T regulatory type 1

- and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 2003; 17:5018-26.
25. Akbari O, Stock P, Dekruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current Opinion in Immunol* 2003; 15:627-33
26. Schmit-Weber CB, Blaser K. T-cell tolerance in allergic response. *Allergy* 2002; 57:762-8.
27. Passalacqua G, Albano M, Riccio A. Clinical and immunological effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: a double-blind, placebo controlled study. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:964-8.
28. Guez S, Vatrinet C, Fadel R, André C. House dust-mite sublingual-swallow immunotherapy (SLIT) in perennial rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 2002; 55:369-75.
29. Clavel R, Bousquet J, André C. Clinical efficacy of sublingual-swallow immunotherapy: a double-blind, placebo controlled trial of standardized five-grass pollen extract in rhinitis. *Allergy* 1998; 53:493-8.
30. Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A. Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14:216-21.
31. Reich M, Zwacka G, Markert UR. Nonspecific plasma proteins during sublingual immunotherapy. *Chem Immunol Allergy* 2003; 82:99-108
32. Bagnasco M, Mariani G, Passalacqua G. Absorption and distribution kinetics of the major *Parietaria judaica* (Par j 1) administered by noninjectable routes in healthy human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:122-9.
33. Passalacqua G, Bagnasco M, Mariani G, Falagiani P, Canonica GW. Local immunotherapy: pharmacokinetics and efficacy. *Allergy* 1998; 53:477-84.
34. Peters AM, Danpure HJ, Osman S. Clinical experience with 99m Tc-hexamethyl propylene-amine oxime for labelling leucocytes and imaging inflammation. *Lancet* 1986; 2:946-9.
35. de Labriolle-Vaylet CL, Doloy MT, Salat-Trepas M, Petiet A, Colas-Linhart N. Radiobiology of 99m Tc-labelled lymphocytes. *Eur J Nucl Med* 1991; 18:556.
36. Frier M. Leucocyte radiolabelling techniques: practical aspects. *Scand J Gastroenterol* 1994; 203 (Suppl):32-5.
37. Charron M, Di Lorenzo C, Kocoshis SA. (99m) Tc antigranulocyte monoclonal antibody imaging for the detection and assessment of inflammatory bowel disease newly diagnosed by colonoscopy in children. *Pediatr Radiol*. 2001; 31:796-800.
38. Takur M, Seifert C, Madsen M. Neutrophil labelling: procedures and pitfalls. *Semin Nucl Med* 1984; 14:107-117.
39. International Commission on radiological protection. Radiation dose to patients from radiopharmaceuticals. ICRP Publication 53, New York. Pergamon Press 1988.
40. Ariano R, Kroon AM, Augeri G, Canonica GW, Passalacqua G. Long-term treatment with allergoid immunotherapy with *Parietaria*. Clinical and immunologic effects in a randomized, controlled trial. *Allergy* 1999; 54:313-9.
41. Clot J. Pharmacology of ribosomal immunotherapy. *Drugs*. 1997; 54 (Suppl 1):33-6.
42. von Bubnoff D, de la Salle H, Weßendorf J, Koch S, Hanau D, Bieber T. Antigen-presenting cells and tolerance induction. *Allergy* 2002; 57:2-8
43. Novak N, Allam JP, Betten H, Haberstock J, Bieber T. The role of antigen presenting cells at distinct anatomic sites: they accelerate and they slow down allergies. *Allergy* 2004; 59:5-14.
44. Lambrecht BN, Hammad H. Myeloid dendritic cells make it to the top. *Clin Exp Allergy* 2002; 3:805-10.
45. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171:6323-7.
46. Schmit-Weber CB, Blaser K. T-cell tolerance in allergic response. *Allergy* 2002; 57:762-8.

Correspondência:  
Serviço de Imunoalergologia  
Hospitais da Universidade de Coimbra  
Praceta Prof. Mota Pinto  
3000-075 - Coimbra - Pt