

Tarcimara Moreira da Silva

**PERFIL DAS CITOCINAS IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$   
ANALISADAS POR RT-PCR EM TECIDO DE MUCOSA  
NASAL DE PACIENTES PORTADORES DE RINITE  
ALÉRGICA**

Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2007

Tarcimara Moreira da Silva

**PERFIL DAS CITOCINAS IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$   
ANALISADAS POR RT-PCR EM TECIDO DE MUCOSA  
NASAL DE PACIENTES PORTADORES DE RINITE  
ALÉRGICA**

Tese apresentada e aprovada no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Cirurgia Geral

Orientador: Prof. Dr. Roberto Eustáquio Santos Guimarães  
Co-orientador: Prof. Dr. Evaldo Nascimento

Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2007

S586p Silva, Tarcimara Moreira da  
Perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  analisadas por RT-PCR em tecido de mucosa nasal de pacientes portadores de rinite alérgica/  
Tarcimara Moreira da Silva. Belo Horizonte, 2007.  
56 f., il.  
Dissertação. (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.  
Faculdade de Medicina.  
Área de concentração: Cirurgia Geral  
Orientador: Roberto Eustáquio Santos Guimarães  
Co-orientador: Evaldo Nascimento  
1.Rinite alérgica perene 2.Rinite alérgica sazonal 3.Citocinas/  
imunologia 4.Citocinas/análise 5.Reação em cadeia da polimerase via  
transcriptase reversa 6.Testes cutâneos 7.Hipersensibilidade/  
imunologia I.Título

NLM: WV 335

CDU: 616.211-002

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor

Prof. Ronaldo Tadeu Pena

Vice-Reitor

Prof<sup>a</sup>. Heloísa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Chefe do Departamento de Cirurgia Geral

Prof. Walter Antônio Pereira

Coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia Geral

Prof. Edson Samesina Tatsuo

Subcoordenador da Pós-Graduação em Cirurgia Geral

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Chefe do Departamento da Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia

Prof. Celso Gonçalves Becker

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Geral

Prof. Andy Petroianu

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Marcos Antônio Gonçalves Rodrigues

Juliano Alves Figueiredo (Rep. Discente)

Aos meus pais, Tarcizo e Dirce, por me ensinarem que é difícil ganhar sem saber perder; que é difícil andar sem saber cair; que é difícil acertar sem saber errar e, que é difícil viver, sem saber viver.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à participação de pessoas importantes, essenciais para o resultado final:

Ao **Prof. Dr. Roberto Eustáquio Santos Guimarães**, por ensinar que a dedicação é a essência do aprendizado, mas para se ter a sabedoria, é necessário ousar.

Ao **Prof. Dr. Evaldo Nascimento**, pelo apoio científico e laboratorial na realização deste trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Gonçalves Becker**, pelo carinho e estímulo.

Ao **Dr. Flávio Barbosa** e à **Dr<sup>a</sup>. Míriam Cabral**, pelo auxílio na realização desta tese.

Aos colegas do **Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais**, pelo estímulo, ajuda e atenção durante este estudo.

Aos amigos do **Centro de Diagnóstico Otorrinolaringológico**, pelo companheirismo.

À **Equipe de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UFMG**, em especial ao **Prof. Dr. Celso Gonçalves Becker**, pela grande disponibilidade.

Ao **Dr. Ricardo Nascimento Araújo**, pela análise das citocinas.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Militão Abrantes**, pelo apoio na realização dos dados estatísticos.

Ao **Laboratório de Imunologia da UFMG**, pela atenção e cuidados com as amostras.

A **Waldeir** que, com todas as dificuldades enfrentadas, se manteve

incondicionalmente a meu lado.

A **Guilherme e Júlia** que, no meio do incessante labor cotidiano do trabalho, das alegrias, do cansaço ou dos desalentos, sempre estiveram e continuam presentes cheios de vida e carinho.

A **Maria Josefina e André Luiz**, pelo apoio sincero e espontâneo nas diversas situações da vida.

À **família Santos e Silva** onde a amizade é a meta absoluta, sempre tentando construir a confiança, o respeito, a tolerância e o carinho.

A todos os **amigos e colegas** que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, sinceros agradecimentos.

Aos **pacientes** deste estudo, agradeço a cooperação nesta atividade de pesquisa.



## RESUMO

SILVA, T.M. **"Perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  analisadas por RT-PCR em tecido de mucosa nasal de pacientes portadores de Rinite Alérgica."** Belo Horizonte: UFMG, 2007. Tese (Mestrado em Medicina, área de Cirurgia) – Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina – UFMG.

A rinite alérgica é uma doença resultante de uma reação inflamatória da mucosa nasal em consequência à reação de hipersensibilidade a alérgenos inalatórios e, eventualmente, alimentares, mediada por IgE, envolvendo diferentes células, mediadores e citocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar as transcrições para as seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$ , particularmente importantes no processo alérgico nasal, seguindo uma das linhas de pesquisa do Serviço de Otorrinolaringologia da UFMG referente a rinossinusopatias. 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. 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 reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa, escolhida por apresentar boa reprodutibilidade e especificidade, utilizando-se como referência o gene da  $\beta$ -actina. Observou-se o aumento de IL-4 com significância estatística, uma forte tendência à elevação de IL-5 e valores de IL-8 e IFN- $\gamma$  homogêneos em relação ao grupo controle não-atópico.

Palavras-chave: Alérgenos. Citocinas/análise. Citocinas/imunologia. Hipersensibilidade/imunologia. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. Rinite alérgica perene. Rinite alérgica sazonal. Testes cutâneos.

## SUMMARY

SILVA, T.M. "Profile of IL-4, IL-5, IL-8 and IFN- $\gamma$  cytokines by the RT-PCR advanced technique in nasal mucosa of patients with allergic rhinitis. "Belo Horizonte: UFMG, 2007. Thesis (Mastering in Medicine, area of Surgery) - Post-Graduation Center of the College of Medicine - UFMG.

The allergic rhinitis is an inflammatory reaction of the nasal mucosa, in consequence of the hypersensitive reaction to inhaling allergens and, eventually, alimentary, mediated by IgE, involving different mediators and cytokines cells. The purpose of this study was to evaluate the transcriptions for the following cytokines: IL-4, IL-5, IL-8 and IFN- $\gamma$ , particularly important in the allergic nasal process, mainly IL-4 and IL-5, following one of the research lines of the Otorhinolaryngology Service of UFMG. In this study, it was opted to evaluate the atopic patients that were free from allergic crises, with the purpose of knowing the cytokines expressions in this period. Another prospective and transversal study was carried out, selecting 30 patients, 13 of these patients were paucisymptomatic and 17 non atopic patients. The groups were selected throughout the history, from the otorhinolaryngologic clinical exam and from the skin allergic test – Prick test. The cytokines profile was researched in fragments of the nasal mucosa, using the reverse transcription semi quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), wich has been chosen by the reason that it presented a good reproductivity and specificity, using beta-actin as its control. It was observed the increase of IL-4 with statistic significance, one strong trend to the IL-5 rise, while the values for IL-8, and IFN- $\gamma$  cytokines remained homogenous compared to the non atopic group control.

Keywords: Allergens. Cytokines/analysis. Cytokines/Immunology. Hypersensitivity/immunology. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. Rhinitis, Allergic, Perennial. Rhinitis, Allergic, Seasonal. Skin Tests.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fatores desencadeantes da rinite alérgica .....	4
FIGURA 2	Efeitos dos principais mediadores na rinite alérgica .....	6
FIGURA 3	Teste cutâneo .....	8
FIGURA 4	Classificação da rinite alérgica .....	10
FIGURA 5	Produtos de PCR analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata .....	24
FIGURA 6	Distribuição dos grupos por sexo.....	30
FIGURA 7	Sinais e sintomas clínicos mais freqüentes na história pregressa ...	30
FIGURA 8	Sensibilização dos pacientes alérgicos aos antígenos mais freqüentes .....	31
FIGURA 9	Cirurgias realizadas nos grupos alérgicos e não alérgicos .....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Seqüências dos primers utilizados na transcrição reversa – PCR para citocinas.....	24
TABELA 2	Distribuição das medidas de tendência central e medidas de dispersão das idades dos pacientes alérgicos e não alérgicos .....	29
TABELA 3	Comparação de idade e dos valores das citocinas corrigidos pela $\beta$ -actina entre os pacientes alérgicos e não-alérgicos .....	33
TABELA 4	Coeficiente de correlação de Pearson entre idade e variáveis resposta .....	34
TABELA 5	Tamanho amostral calculado a partir dos valores da média e desvio-padrão para IL-8 e IFN- $\gamma$ .....	37
TABELA 6	Poder na comparação das médias de IL-8 e IFN- $\gamma$ .....	38
TABELA 7	Dados dos grupos alérgico e não alérgico: idade, cirurgias, valores das citocinas e $\beta$ -actina .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ARIA	Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma
BIREME	Portal da Biblioteca Virtual em Saúde
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme linked immunossorbent assay
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócito e Macrófago
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 Rinite alérgica</b> .....	3
2.1.1 Fatores desencadeantes da rinite alérgica .....	4
2.1.2 Prevalência .....	5
2.1.3 Fases da rinite alérgica .....	5
2.1.4 Apresentação clínica da rinite alérgica .....	7
2.1.5 Exames complementares .....	7
2.1.5.1 Testes cutâneos .....	7
2.1.5.2 Outros exames complementares .....	9
2.1.6 Classificação da rinite alérgica .....	9
<b>2.2 Citocinas</b> .....	11
2.2.1 Produção das citocinas .....	11
2.2.2 Citocinas IL-4, IL-5, IL-8, e IFN- $\gamma$ .....	11
<b>2.3 RT-PCR: reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	18
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	18
<b>4. PACIENTES E MÉTODO</b> .....	19
<b>4.1 População estudada</b> .....	19
<b>4.2 Critérios de inclusão</b> .....	20
<b>4.3 Critérios de exclusão</b> .....	20
<b>4.4 Delineamento do estudo</b> .....	20
<b>4.5 Revisão da literatura</b> .....	20
<b>4.6 Teste cutâneo</b> .....	21
<b>4.7 Técnica laboratorial</b> .....	22
4.7.1 Preparo dos fragmentos de mucosa nasal para extração do RNA .....	22
4.7.2 Extração do RNA total .....	22
4.7.3 Síntese do DNA complementar, cDNA, e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa .....	23
<b>4.8 Perfil das citocinas</b> .....	24
<b>4.9 Métodos estatísticos</b> .....	25

4.9.1 Codificação das variáveis.....	25
4.9.2 Variáveis resposta e análise estatística dos dados .....	25
4.9.3 Cálculo do erro tipo I e tipo II das amostras .....	26
<b>4.10 Aspectos éticos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.11 Consentimento livre e informado de participação na pesquisa.....</b>	<b>28</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Idade.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Sexo.....</b>	<b>30</b>
<b>5.3 Sinais e sintomas nasais .....</b>	<b>30</b>
<b>5.4 Sensibilidade a alérgenos .....</b>	<b>31</b>
<b>5.5 Cirurgias realizadas .....</b>	<b>32</b>
<b>5.6 Perfil das citocinas.....</b>	<b>33</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Idade.....</b>	<b>34</b>
<b>6.2 Sexo.....</b>	<b>35</b>
<b>6.3 Sintomas nasais .....</b>	<b>35</b>
<b>6.4 Sensibilidade a alérgenos .....</b>	<b>35</b>
<b>6.5 Perfil das citocinas.....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS .....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICE A – Teste de cutâneo por punctura – "Prick test" .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE B – Protocolo clínico.....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE C – Teste cutâneo – Tabela de anotação.....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE D – Consentimento livre e esclarecido para a participação em pesquisa .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE E – Dados dos pacientes.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do SEDT Otorrinolaringologia do HC/UFMG.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO B – Aprovação do Departamento de Oftalmo/Otorrino e Fonoaudiologia da FM/UFMG.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO C – Aprovação do Departamento de Oftalmo/Otorrino e Fonoaudiologia da FM/UFMG.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG .....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A rinite alérgica é uma doença resultante de uma reação inflamatória que envolve diferentes células, mediadores e citocinas, com vários efeitos sobre a mucosa nasal [1-3]. É a expressão clínica de intensas mudanças no tecido das vias respiratórias superiores e estruturas adjacentes após a interação de IgE e alérgenos específicos [4]. Há o predomínio de células ativadas como linfócitos, mastócitos, eosinófilos, basófilos, células endoteliais e epiteliais, reguladas pela produção local de várias citocinas [5].

Na rinite alérgica, os sintomas podem ser desencadeados por fatores específicos (alérgenos) e inespecíficos (irritantes primários) que se acumulam no muco, sendo absorvidos pela mucosa nasal [1, 6]. Manifesta-se por prurido nasal, coriza hialina, esternutações e pela obstrução nasal, podendo ainda ocorrer sintomas oculares como hiperemia, prurido e lacrimejamento [7].

Esta doença destaca-se clinicamente de outras formas de rinites pelos seguintes fatos: normalmente inicia-se em jovens (1 a 20 anos); forte história familiar; propensão a ocorrer com outras formas de alergia (eczema, asma e conjuntivite); níveis séricos freqüentemente elevados de anticorpos IgE total; tendência a ter níveis séricos elevados de IgE específica [8]. Apresenta um forte caráter genético, com incidência maior em pessoas cujos pais são alérgicos. Não tem preferência por sexo ou raça e pode iniciar-se em qualquer idade [1].

As interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de Granulócito e Macrófago) e IFN- $\gamma$  (Interferon gama), 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 UFMG, optou-se por investigar estas substâncias entre dois grupos: um grupo portador de rinite alérgica paucissintomático e outro grupo não atópico.

A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) foi o método de análise laboratorial escolhido por apresentar boa reprodutibilidade e especificidade [9-17].

Esta pesquisa teve por finalidade analisar, quantificar e comparar as expressões das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  em pacientes portadores de rinite alérgica paucissintomáticos, comparando-os com um grupo controle não atópico, visando obter a relevância destas citocinas naqueles indivíduos, fora do período de crise alérgica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Rinite alérgica

Pode-se definir a rinite alérgica como uma doença inflamatória da mucosa nasal, em consequência à reação de hipersensibilidade a alérgenos inalatórios e, eventualmente, alimentares, mediada por IgE – reação tipo I de Gell e Coombs – em indivíduos com provável predisposição genética [1-3, 18].

A exposição alérgica induz a uma cascata de eventos inflamatórios [19], incluindo a produção de IgE, a aquisição de IgE pelos mastócitos e basófilos via  $Fc\epsilon RI$  (receptor de alta afinidade para IgE), resultando na liberação de citocinas e mediadores inflamatórios de quimiotaxia [20]. Estas substâncias causam um afluxo de leucócitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monócitos, linfócitos) que infiltram os tecidos afetados e liberam seus próprios mediadores e citocinas [19]. As células endoteliais das vias aéreas também contribuem com o processo inflamatório, gerando várias citocinas, incluindo GM-CSF, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e quimiocinas [21-23]. As citocinas, provenientes dos linfócitos Th2, especialmente a IL-4 e IL-5 comandam o processo inflamatório alérgico [24].

Ainda que exista evidência de associação entre atopia e inflamação das vias aéreas, a causa pela qual nem todo indivíduo atópico desenvolve um processo inflamatório das vias aéreas não está clara, mesmo quando há níveis elevados de IgE [3, 22, 25].

### 2.1.1 Fatores desencadeantes da rinite alérgica

Os alérgenos presentes no ar, em geral, são proteínas solúveis de baixo peso molecular, penetrando facilmente no epitélio respiratório. Discute-se que o desenvolvimento da doença alérgica é dependente de muitos outros fatores, incluindo os níveis de exposição aos alérgenos inalados, fatores genéticos (embora os genes ainda não sejam totalmente conhecidos) e a interação com irritantes das vias aéreas (e.g., cigarro e infecções) [3, 22, 25]. (FIG. 1).

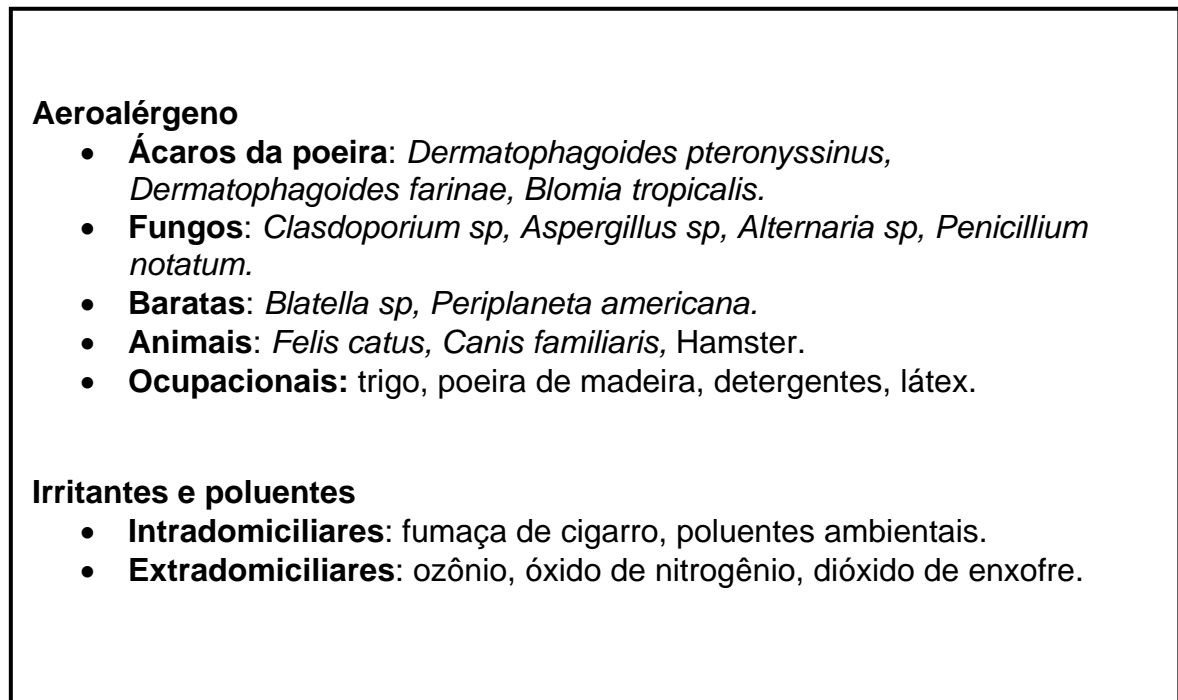


FIGURA 1 – Fatores desencadeantes da rinite alérgica [1]

No Brasil, a alergia ao pólen foi documentada nos estados da região Sul, onde as modificações climáticas e as estações do ano são mais bem definidas [1]. No restante do país, quando foram analisadas as relações geográficas e climáticas nas quais os pacientes estão inseridos, não houve predomínio da ocorrência de casos em determinados períodos do ano, conferindo um caráter perene à rinopatia alérgica, que

é a forma mais comum, geralmente causada por alérgenos domésticos [7].

### 2.1.2 Prevalência

A rinite alérgica acomete 10 a 20% da população geral [26-28]. A partir do ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) obtiveram-se, pela primeira vez, dados de prevalência de rinite entre crianças e adolescentes brasileiros. Os resultados foram variáveis e as maiores taxas de prevalência de rinite foram documentadas nos grandes centros urbanos. Nas cidades da região Sul, as rinites intermitentes são mais comuns, com as maiores prevalências de sintomas nasais ocorrendo nos meses mais frios do ano (maio a agosto). Nas outras cidades do país não houve diferença na prevalência dos sintomas nasais de acordo com os meses do ano. As rinites persistentes são as mais comuns nestas regiões [1, 3, 7].

### 2.1.3 Fases da rinite alérgica

A **fase de sensibilização** do processo alérgico inicia-se com o processamento e apresentação de fragmentos do alérgeno por células apresentadoras de antígenos (APC) ao linfócito T auxiliar. Este processo envolve a ativação de linfócitos, com produção de IL-4, ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE alérgeno-específico. Os anticorpos IgE ligam-se a receptores de IgE de alta afinidade localizados, principalmente, em mastócitos e basófilos e a receptores de IgE de baixa afinidade em eosinófilos, monócitos e plaquetas [1, 29].

Em subsequente exposição ocorre a **fase imediata** (minutos até uma hora após estimulação alérgica), onde moléculas do alérgeno ligam-se a anticorpos IgE fixados aos mastócitos da mucosa nasal, ocasionando degranulação com liberação de

mediadores químicos pré-formados (histamina) e recém-sintetizados (leucotrienos, prostaglandinas). A histamina estimula os receptores H1 nas terminações nervosas sensitivas e estimula fibras nervosas C, sendo responsável pelos sintomas cardinais da rinite alérgica: esternutos, prurido nasal e rinorréia [1, 29]. Esta fase ocorre em 90% dos pacientes (FIG. 2).

<p><b>Histamina</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Vasodilatação</li><li>• Aumento da permeabilidade vascular</li><li>• Secreção glandular</li><li>• Estimulação de terminações nervosas</li></ul> <p><b>Prostaglandinas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Aumento da permeabilidade vascular</li><li>• Prurido</li><li>• Agregação e ativação de plaquetas</li></ul> <p><b>Leucotrienos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Recrutamento e ativação de eosinófilos</li><li>• Redução da apoptose de eosinófilos</li><li>• Aumento da produção de citocinas IL-4, IL-5, e GM-CSF</li><li>• Vasodilatação e edema</li><li>• Aumento da secreção de muco pelas células caliciformes</li></ul>
--

FIGURA 2 – Efeitos dos principais mediadores na rinite alérgica [1]

Cerca de 4 a 6 horas após contato posterior à fase imediata, os sintomas retornam, e este novo período recebe o nome de **fase tardia**. Os sintomas reaparecem mesmo sem nova estimulação alérgica e ocorre porque, ainda na fase imediata, são liberados os chamados mediadores de quimiotaxia, que causam um afluxo de células inflamatórias (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos) para o local da reação. Estas células passam a liberar seus próprios mediadores [4, 29, 30]. A penetração destas células na mucosa nasal depende da sua

adesão a determinados receptores que são expressos no endotélio dos vasos: selectinas, E-selectina e P-selectina, ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular 1), VCAM-1 (Molécula de adesão à célula vascular 1) [31].

As vias neuronais envolvidas potencialmente na rinite alérgica incluem o sistema nervoso simpático, parassimpático e nervos sensitivos periféricos. Evidências recentes sugerem a participação adicional de neuropeptídeos. O tônus simpático mantém a contração dos sinusóides e as fibras parassimpáticas controlam a vasodilatação e a secreção glandular [24].

#### **2.1.4 Apresentação clínica da rinite alérgica**

O quadro clínico clássico inclui rinorréia aquosa, esternutações, prurido nasal e conjuntival, obstrução nasal e, eventualmente, hiposmia [32]. Os três primeiros sintomas são considerados fenômenos "irritativos", principalmente devido à histamina. A obstrução nasal é um fenômeno secundário à inflamação da mucosa, induzido pelo edema, pela grande produção de muco e vasodilatação dos vasos de capacitância sinusoidais [33]. Os sintomas sistêmicos mais associados são mal-estar geral, cansaço, irritabilidade, insônia, desinteresse nas atividades sociais e educacionais, fadiga e alterações do humor [3, 34].

#### **2.1.5 Exames complementares**

##### **2.1.5.1 Testes cutâneos**

Von Pirquet (*apud Santos et al.*, 1997, p. 50) estabeleceu os testes cutâneos como métodos diagnósticos, não direcionados apenas para doenças alérgicas. O Prick Test – epicutâneo – é o mais comumente empregado devido à

facilidade na sua realização, baixa ocorrência de efeitos adversos (risco de 0,04%), além de ser menos doloroso ao paciente. Os antígenos utilizados devem ser os mais comuns do meio em que o paciente vive, levando-se em conta seus hábitos e locais de moradia, trabalho, estudo e locais de lazer. Os extratos devem ser de boa qualidade e bem padronizados. O teste cutâneo pode ser positivo em 10% a 15% dos indivíduos sem sintomas, que, eventualmente, podem vir a apresentar sintomas da doença alérgica com o decorrer dos anos [8].

Alguns medicamentos podem bloquear esse teste, como, por exemplo, os corticóides sistêmicos e, mais freqüentemente, os anti-histamínicos. Portanto, o uso deve ser suspenso por um período de 5 a 10 dias anterior à realização do mesmo [1] (FIG. 3).



FIGURA 3 – Teste cutâneo (APÊNDICE A)

### **Causas de erros na avaliação do teste cutâneo:**

Proximidade entre os testes (< 2 cm); sangramento, levando a falso-positivo; insuficiente penetração da lanceta, levando a falso-negativo; contaminação dos testes vizinhos, quando da retirada do excesso da solução de extratos; extratos de baixa potência; dermatografismo, dermatite grave; drogas, principalmente anti-histamínicos [3].

#### **2.1.5.2 Outros exames complementares**

Determinação de IgE sérica específica, citologia nasal, exames hematológicos, dosagem de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgM e IgG), exames por imagem, testes objetivos para avaliar cavidades nasais pérvias, provocação nasal (alérgenos e aspirina), biópsia nasal [1].

#### **2.1.6 Classificação da rinite alérgica**

Em 2000, Van Cauwenberge *et al.* classificaram a rinite alérgica de acordo com o tempo de exposição ao alérgeno em: rinite alérgica perene, sazonal e doença ocupacional. Quando perene, os sintomas ocorrem ao longo de todo o ano; sazonal, durante as estações de liberação de pólen, e a ocupacional, quando o indivíduo se encontra exposto a substâncias alergênicas no meio profissional [26, 35, 36]

Segundo recomendação da ARIA (*Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma*) e da OMS (*Organização Mundial da Saúde*), a classificação da rinite alérgica deve levar em consideração a duração e a gravidade dos sintomas, incluindo aspectos de qualidade de vida como mostra a FIG. 4 [1, 35].



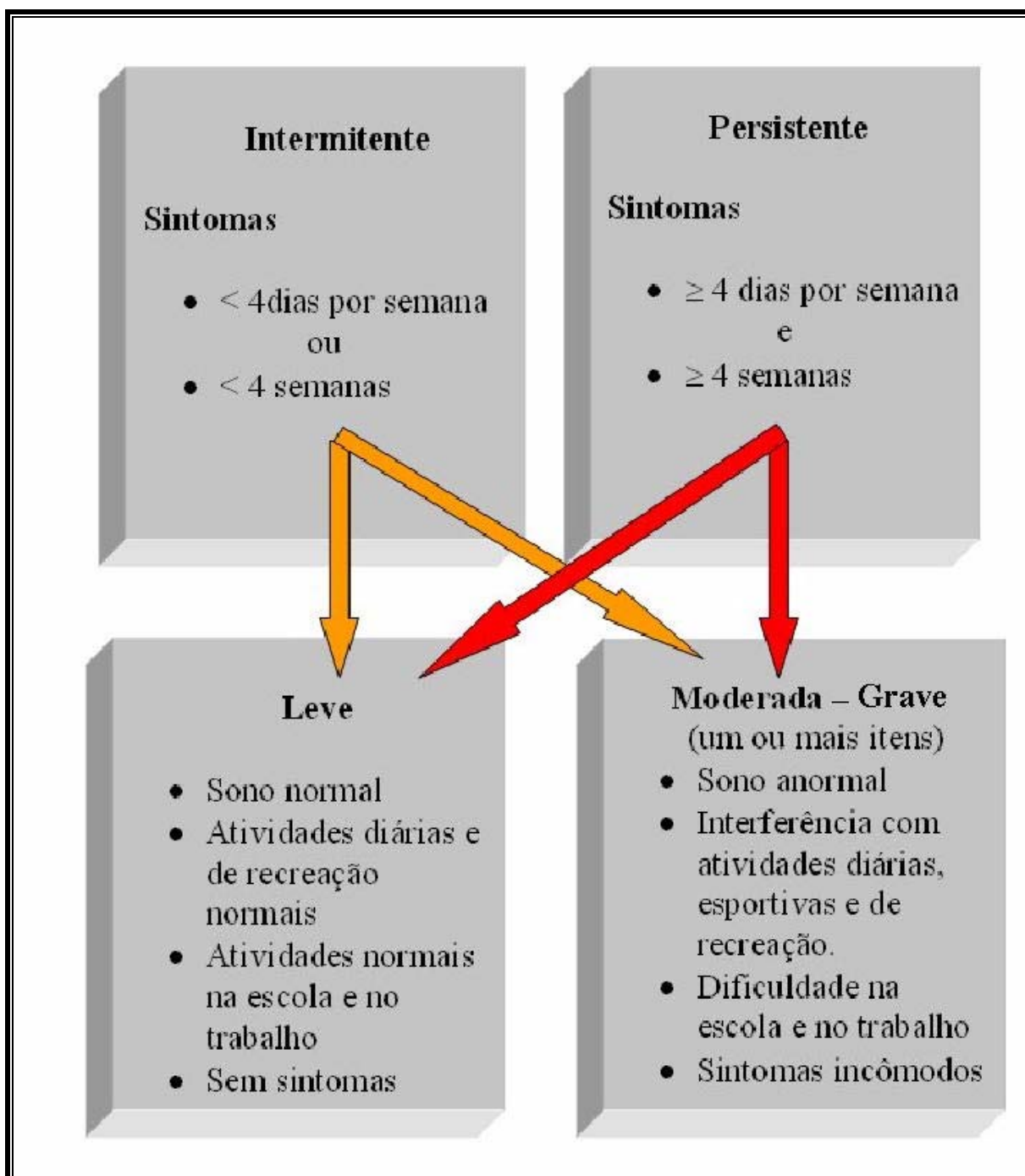


FIGURA 4 – Classificação da rinite alérgica – ARIA [1, 35].

## 2.2 Citocinas

São proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa que regulam muitas das funções dessas células. Diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação [37].

No processo inflamatório alérgico da mucosa nasal, há a presença de infiltrado celular, constituído predominantemente por mastócitos, linfócitos e eosinófilos ativados, e estas células são reguladas pela produção local de várias citocinas, particularmente IL-4 e IL-5 [5, 38].

### 2.2.1 Produção das citocinas

A produção de citocinas é um evento breve e autolimitado. Uma vez sintetizadas pela transcrição de genes codificados por RNA mensageiros, são rapidamente secretadas, resultando em uma explosão de liberação, quando necessário. [37]. As razões que determinam a secreção de determinado padrão de citocinas frente ao estímulo antigênico ainda não estão bem estabelecidas. As principais fontes de citocinas são: APC (células apresentadoras de antígenos), células endoteliais e epiteliais, linfócitos T, estroma da medula óssea, leucócitos, fibroblastos, queratinócitos, plaquetas, enfim, tanto células linfóides quanto não linfóides[39].

### 2.2.2 Citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$

A rinite alérgica é, particularmente, um bom modelo para o estudo das citocinas *in vivo*. Na rinite alérgica, há um padrão de citocinas tipicamente característico de linfócitos Th2, comprovando-se um aumento significativo de IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13 e GM-CSF durante os episódios alérgicos [40]. Estudos relatam o

baixo nível de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-4 e IL-5 em indivíduos atópicos durante estações polínicas [41].

Neste estudo foram pesquisadas as transcrições de IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$ .

A **IL-4** é o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T auxiliares CD4+. A IL-4 é a "assinatura" da subpopulação Th2 [37]. As principais fontes celulares de IL-4 são os linfócitos T CD4+, mastócitos e basófilos ativados [42-45]. Em análises laboratoriais, houve diminuição da síntese de IgE quando as células do sangue periférico foram incubadas *in vitro*, junto a IL-12 e IFN- $\gamma$ , as quais exercem efeito inibitório sobre a IL-4. Esta citocina estimulou significativamente a síntese de IgE ao ser incubada junto a células sanguíneas [46].

Em estudo realizado em 2000, observou-se que, quando houve estimulação da síntese de IL-4, o desenvolvimento da sintomatologia alérgica foi mínimo. No entanto, o aumento da IL-5 foi acompanhado de sintomas característicos da hiperreatividade nasal. Destacou-se, claramente, um interesse e um novo conceito de que IL-4 está implicada na sensibilização alérgica, mas não na manifestação clínica, e que a IL-5, mais que um fator de atopia, parece ser um marco da manifestação clínica de disparo das doenças atópicas. [23].

A **IL-5** é uma citocina ativadora de eosinófilos e serve como ligação entre a ativação das células T e a inflamação alérgica eosinofílica. É produzida pela subpopulação Th2 de células T CD4+ e por mastócitos ativados. A IL-5 é uma das mais importantes citocinas envolvidas com as manifestações clínicas das doenças alérgicas [43, 47]. Alguns autores investigaram a habilidade da IL-5 em causar a migração de eosinófilos para a mucosa nasal *in vivo*. Observaram que ela recruta, preferencialmente, eosinófilos dos vasos para dentro da lâmina própria. É considerada

a mais específica para a linhagem de eosinófilos, sendo essencial para a diferenciação terminal, crescimento, ativação e sobrevivência dessas células sanguíneas [23, 48-50]. Desta forma, os eosinófilos têm sido implicados como sendo as maiores células efetoras na patogênese da doença alérgica [31]. Elas exercem seus efeitos patológicos através de uma variedade de funções como adesão, quimiotaxia, degranulação, formação de produtos, que resultam em importantes alterações histológicas e fisiológicas como lesão tecidual, produção de muco, edema e broncoespasmo [51]. Há uma significativa relação entre os níveis de IL-5, a infiltração eosinofílica nasal e as manifestações clínicas da rinite alérgica [52].

Crianças portadoras de rinite alérgica persistente, devido à sensibilização por ácaros, foram estudadas e observou-se uma significativa relação entre a infiltração eosinofílica nasal e os níveis de IL-5. Observaram que quanto maior o número de eosinófilos infiltrados na mucosa nasal, maior o processo inflamatório e maior a obstrução das vias aéreas [40].

Em 1998, utilizando pólen como sensibilizante, foram comparados três grupos de indivíduos: um não atópico, um atópico assintomático e outro atópico sintomático. Foram medidos os níveis de IgE, IL-5 e IFN- $\gamma$  nos três grupos, antes e após a exposição. No grupo atópico assintomático observou-se, antes da exposição, um pequeno aumento dos valores de IgE e das citocinas, mas ainda em níveis inferiores ao grupo atópico sintomático. No grupo não atópico, não houve alterações. Após a exposição ao alérgeno, o grupo atópico sintomático e o grupo atópico inicialmente assintomático apresentaram os maiores valores de IgE e IL-5. Concluíram que a IL-5 é uma citocina chave para o aparecimento dos sintomas da rinite alérgica. A expressão de IFN- $\gamma$  não diferiu em pacientes sintomáticos ou assintomáticos, sugerindo que as células Th1 não exercem função de sensibilização

com manifestações clínicas da rinite alérgica sazonal [23, 53].

**IL-8** é uma citocina também conhecida como “citocina quimiotóxica”, potente mediador do recrutamento de células e da neovascularização em doenças inflamatórias e neoplásicas [54, 55]. É produzida pelas células epiteliais, macrófagos e linfócitos T [56]. É importante no processo de migração de leucócitos, fazendo com que estes parem de rolar, adiram firmemente ao endotélio e dirijam sua migração em direção ao sítio da inflamação/infecção. A migração dos leucócitos se dá através de um gradiente de quimiocinas cuja concentração vai aumentando em direção ao foco inflamatório [20, 37, 40, 48, 57, 58]. Estudos realizados em culturas de células epiteliais de pacientes sem rinite alérgica, pacientes com rinite alérgica e pacientes portadores de polipose nasal demonstraram que as células de pacientes com rinite e pólipos sintetizam significativamente grande quantidade de IL-8 e GM-CSF [24]. Esta citocina, IL-8, apresenta importante função na fase tardia da reação alérgica, especialmente, na indução da liberação de histamina e leucotrienos [20, 59, 60]. Foi localizada nas células epiteliais da mucosa nasal, semelhante a IL-6, e nas células das glândulas da camada superficial da lâmina própria, próxima dos sinusóides e perto das veias da camada profunda da lâmina própria [20, 61]. Biópsias de mucosa nasal foram colhidas antes e após 1 hora, 24 horas e 1 semana da estimulação alérgica. Observou-se um aumento significativo de eosinófilos, IL-8, IL-1B e RANTES (Regulated and normal t cell expressed and secreted) na primeira hora e nas 24 horas seguintes [61].

O **IFN- $\gamma$**  é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células. O IFN- $\gamma$  promove a diferenciação de células T CD4+ para a subpopulação Th1 e inibe a proliferação de células Th2. O efeito final dessas atividades do IFN- $\gamma$  é promover

reações inflamatórias ricas em macrófagos e, ao mesmo tempo, inibir as reações ricas em eosinófilos dependentes de IgE [37, 39, 61].

Vinte e uma crianças foram seguidas da segunda à sétima estação polínica, com exposição particular à bétula. Nesse estudo, a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 aumentou com a idade tanto em indivíduos atópicos, quanto em indivíduos não atópicos. Duas crianças que foram sensibilizadas e que desenvolveram clínica de rinite alérgica para a bétula mostraram produção persistente de IL-4, IL-5 e IL-9 e diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$ . Concluiu-se que a resposta imunológica Th2 foi regulada para baixo após quatro estações de pólen, exceto em duas crianças que desenvolveram a alergia clínica para a bétula. Nestas crianças, observaram preponderância das células Th2 [62].

Pacientes portadores de rinite alérgica sazonal foram avaliados durante a estação de pólen e fora da mesma. Durante a exposição polinífera, a presença de eosinófilos e neutrófilos na secreção nasal foi observada em todos os indivíduos. Havia baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-4 e IL-5. Fora da estação polinífera, havia leve infiltrado de eosinófilos e neutrófilos e uma relação inversa Th1/Th2 com aumento de IFN- $\gamma$  e diminuição de IL-4 [41].

Observou-se uma desigualdade entre os níveis de IFN- $\gamma$  (Th1) e níveis de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Th2) em um grupo de crianças estudadas, pressupondo-se que uma deficiente liberação de IFN- $\gamma$  poderia ser um possível traço de atopia e teria uma importante função na patogênese da rinite alérgica, permitindo que as citocinas das células Th2 induzam a um aumento intranasal dos níveis de IgE, eosinófilos e ECP (proteína catiônica eosinofílica) [38, 63].

Fatores ambientais como hidrocarbonetos aromáticos, provenientes da queima do diesel, também aumentam a produção de IgE e de algumas citocinas como

IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, o que explica o aumento da incidência de rinite alérgica em regiões industrializadas [4, 62].

### **2.3 RT-PCR: reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa**

Com o advento de novas doenças infecciosas e o ressurgimento de patógenos históricos que se tornaram resistentes a associações de antibióticos, foi necessária a criação de uma nova modalidade de diagnóstico mais rápido, específico e sensível. Assim, em 1985, Saiki, *et al.* desenvolveram uma técnica, inovadora, a reação em cadeia da polimerase, mas que ainda utilizava um grande volume de enzimas com elaboração muito demorada. Kary Mullis, em 1987, percebeu que possuía uma importante ferramenta, inovou a técnica de Saiki, conseguindo especificidade na cópia de determinados segmentos de DNA, introduzindo o conceito de *primer* de PCR. Em 1993, recebeu prêmio Nobel de Química. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro*, potencialmente útil, que pode, em questão de horas, amplificar seqüências específicas de DNA e é extremamente sensível. Encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Uma das modalidades da PCR é a RT-PCR. A enzima transcriptase reversa (RT) reproduz o DNA a partir de um molde de RNA. Esta enzima está sendo muito utilizada no campo da engenharia genética, permitindo o seqüenciamento de fragmentos de DNA através de análises químicas e reações enzimáticas [10, 64-66].

Dreskin *et al.* analisaram dez indivíduos adultos portadores de rinite alérgica submetidos à exposição alergênica específica. As dosagens de IL-5 foram realizadas através de dois métodos: ELISA com coleta de proteínas através de papel filtro, e RT-PCR através de biópsias da mucosa nasal no período de 0 hora, 3 horas e

6 horas após a exposição a alérgeno específico. Os níveis de RNAm para IL-5 medidos pelo RT-PCR tiveram um aumento significativo tanto nas 3 horas quanto nas 6 horas pós-exposição. A IL-5 que foi mensurada através do método ELISA não apresentou uma correlação significativa entre os sintomas alérgicos e as alterações encontradas nesta medida. A dosagem realizada pela RT-PCR correlacionou-se com as mudanças desta citocina e o total de sintomas melhor que as dosagens de IL-5 pelo ELISA [11].



### **3 OBJETIVO**

Comparar o perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  entre pacientes não alérgicos e pacientes alérgicos paucissintomáticos, não estimulados previamente por alérgenos, com a finalidade de se conhecer as expressões destas citocinas neste período.

## 4 PACIENTES E MÉTODO

Trata-se de um estudo transversal prospectivo, composto por 30 pacientes: 13 pacientes portadores de rinite alérgica e 17 pacientes não portadores desta afecção. Estes pacientes tinham indicação prévia para submeterem-se à septoplastia com turbinectomia, adenoidectomia e/ou amigdalectomia com turbinectomia.

### 4.1 População estudada

Os pacientes que participaram desse estudo foram aqueles que procuraram o Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de fevereiro de 2004 a abril de 2005. Dos 30 pacientes estudados, 17 eram do grupo controle, não portadores de rinite alérgica, e 13 eram portadores de rinite alérgica. Estes dois grupos foram selecionados através da história, do exame clínico otorrinolaringológico e do teste alérgico cutâneo – Prick test (APÊNDICES B, C).

A faixa etária variou entre 3 e 47anos, independentes de cor, sexo, etnia, religião ou classe social.

Este estudo não teve nenhuma ação decisória sobre a indicação terapêutica anterior ou posterior ao tratamento cirúrgico realizado, respeitando, eticamente, as decisões dos cirurgiões otorrinolaringológicos. Foram aproveitados apenas os fragmentos de conchas nasais que seriam descartados ao final das cirurgias.

## **4.2 Critérios de inclusão**

Pacientes que seriam submetidos à remoção cirúrgica das conchas nasais e que aceitassem fornecer estes fragmentos, após realização do teste alérgico cutâneo.

## **4.3 Critérios de exclusão**

Pacientes que não concordassem em participar do estudo; pacientes em uso de anti-histamínicos e/ou corticóides por pelo menos trinta dias antes de se realizar o procedimento cirúrgico, ou que não pudessem interromper o uso de medicamentos que influenciassem a resposta cutânea; pacientes com dermatite e eczema graves de pele; pacientes menores de 3 anos ou acima de 60 anos, devido à maior ocorrência de falsa-negatividade em função da diminuição da reação ao teste alérgico nestas idades.

## **4.4 Delineamento do estudo**

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital São Geraldo, pertencente ao Complexo Hospitalar do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

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.

## **4.5 Revisão da literatura**

A revisão da literatura foi iniciada em janeiro de 2004, através de pesquisa

bibliográfica de artigos indexados pelo MEDLINE (Portal de acesso de fonte de consultas da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos) e PUBMED (Portal de acesso de fonte de consultas da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos e outros jornais de ciências da vida para artigos biomédicos), via internet (<www.nlm.nih.gov).

Os artigos foram obtidos através do portal CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - <www.periodicos.capes.gov.br>), BIREME (<www.bireme.br>), através da Biblioteca da UFMG, da Faculdade de Ciências Médicas e do sistema de comutação entre bibliotecas.

#### **4.6 Teste cutâneo**

Os pacientes foram submetidos ao teste cutâneo por punctura – Prick Test. Foram utilizados como antígenos: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, poeira domiciliar, *Blatella sp*, gramínea, fungos, penas, gato e cão. Este material foi adquirido do laboratório farmacêutico Internacional Pharmacêutica Immunology do Brasil Ltda (IPI) – São Paulo. (APÊNDICES A e C).

O teste cutâneo deve ser realizado na face anterior do braço ou na região dorsal em crianças. A pele deve ser limpa com cuidados habituais de assepsia sendo colocados os alérgenos, gotas únicas de cada um, a uma distância de aproximadamente 2 cm. Utiliza-se agulha hipodérmica ou lanceta com a finalidade de promover passagem do alérgeno através do extrato córneo da pele, limitando o grau de penetração. A leitura é feita 15 a 20 minutos após a aplicação dos extratos, considerando-se positivas pápulas com diâmetro igual ou superior a 3 x 3 mm.

Para o controle positivo, foi utilizada a histamina, e, para o controle negativo, o soro fisiológico [3, 8].

## **4.7 Técnica laboratorial**

### **4.7.1 Preparo dos fragmentos de mucosa nasal para extração do RNA**

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 a data da coleta. Em seguida, estes tubos foram colocados em caixa de isopor com gelo e levados ao Laboratório de Imunologia do Hospital São Geraldo, pertencente ao Complexo Hospitalar do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Neste local, os fragmentos foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Todas as manipulações para o preparo do material envolvido no processo de extração do RNA total dos fragmentos foram realizadas, utilizando-se luvas e materiais descartáveis.

Posteriormente, esse material foi encaminhado para o Instituto de Ciências Biológicas (ICB), com todo o rigor exigido, onde também foi mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.7.2 Extração de RNA total**

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isto, as amostras foram maceradas em homogeneizadores de vidro, contendo 1 ml do reagente Trizol® (Invitrogen). Os tecidos foram macerados, e a solução resultante foi transferida para tubos de 1,5 ml. Em cada amostra, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio, e, após misturar vigorosamente, a solução foi incubada em gelo por 15 minutos, seguida de centrifugação a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . 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, obtido em nova suspensão com  $40 \mu\text{l}$  de água

MilliQ (Millipore do Brasil) e tratado com 2,5 U de DNase: RNase free (Promega) por 20 minutos a 37°C. O RNA foi extraído, utilizando 200 µl de reagente Trizol® (Invitrogen) e feita nova suspensão em 30 µl de água MilliQ. 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%.

#### **4.7.3 Síntese de DNA complementar, cDNA e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa**

O cDNA foi sintetizado a partir de 1,25 µg 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 µl, na presença de 1 µl do cDNA, 0,25 mM de dNTP, 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata. Os géis foram fotografados e os resultados analisados por densitometria, utilizando o AlphaDigiDoc 1201TM (AlphaInotech®). Esse programa calcula o valor integrado de densidade (IDV – integrated density value) para cada banda que é definida como a intensidade dos pixels da região delimitada pela banda, subtraída da intensidade dos pixels da coloração de fundo (background) (FIG. 5).

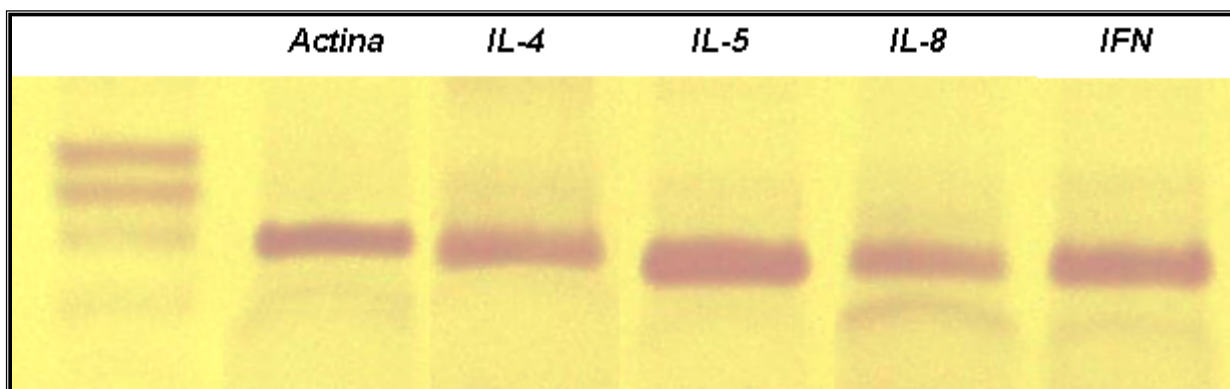


FIGURA 5 – Produtos da PCR analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata.

#### 4.8 Perfil de citocinas

A análise do perfil de citocinas foi pesquisada nos fragmentos de mucosa nasal, utilizando-se a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa semiquantitativa (RT-PCR semiquantitativa). Foram analisadas as transcrições para as seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  (TAB. 1).

**TABELA 1**  
**Seqüências dos primers utilizados na RT – PCR para citocinas**

GENE	Senso 5' → 3'	Antisenso 5' → 3'	Amplicon/bp
$\beta$ -actina	ggatgcagaaggagatcactg	cgatccacacggagtacttg	90
IL-4	ttgaacagcctcacagagcaga	gttgtgtcttgaggcagca	80
IL-5	ctgaggattcctgttcctgt	caacttctattatccactc	257
IL-8	gactccaagctggccgtg	ctccttgcaaaactgcacc	81
IFN- $\gamma$	actgactgaatgtccaacgca	atctgactccttttcgcttcc	101

bp – pares de bases

Como não foi possível clonar o gene para se obter a quantidade absoluta necessária do RT-PCR em tempo real, foi utilizado um gene referência chamado

"house-keeping", que, nesse caso, foi o da  $\beta$ -actina. O coeficiente foi, então, adquirido a partir da divisão do valor da  $\beta$ -actina de cada paciente pela média dos 30 pacientes. Esta dosagem foi chamada de relativa porque mediu-se a expressão do controle em relação ao teste padrão [9, 10, 12, 13, 15, 16, 67, 68].

## **4.9 Métodos estatísticos**

### **4.9.1 Codificação das variáveis**

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 máximo de 95%.

As variáveis contínuas como a idade, IL-4, IL-5, IL-8, IFN- $\gamma$  e  $\beta$ -actina foram analisadas como tal, sendo calculadas as medidas de tendência central (média e mediana) e as medidas de dispersão (desvio-padrão e amplitude) [69-73].

### **4.9.2 Variáveis resposta e análise estatística dos dados**

Neste estudo, as variáveis acima, identificadas como resposta, foram comparadas para os dois grupos de pacientes: alérgicos e não-alérgicos.

Quando estas variáveis resposta foram comparadas com outras variáveis categóricas, por exemplo sexo, foi utilizado o qui-quadrado de Bartlett, determinando se existe associação ou não entre duas ou mais variáveis. Neste estudo, o teste qui-quadrado foi utilizado para verificar se a variância correspondente ao quadrado do desvio-padrão era homogênea entre os dois grupos de cada variável dicotômica, que, quando apresenta valor de  $p > 0,05$ , indica que as variâncias são homogêneas. Neste caso, podem ser usados testes paramétricos como "ANOVA" (Analysis of Variance) e



o teste "t" para comparação de duas médias. Se o valor de p correspondente ao qui-quadrado de Bartlett for menor que 0,05, indicando que as variâncias não são homogêneas, será utilizado um teste não paramétrico, no caso o teste de Kruskal-Wallis, empregado para comparar duas ou mais medianas, calculado pelo Epi Info. Quando o valor de p correspondente a estes testes (ANOVA, teste "t" e Kruskal-Wallis) for menor que 0,05, as médias são diferentes [69-73].

Quando as variáveis resposta foram comparadas com a variável idade, outra variável contínua foi utilizada: o coeficiente de correlação de Pearson [69-73].

#### **4.9.3 Cálculo do erro tipo I e tipo II da amostra**

O número de indivíduos para esta pesquisa baseou-se inicialmente em dados discutidos estatisticamente e obtidos em avaliações de artigos com linhas de pesquisa semelhantes [22, 23, 38, 40, 46, 52, 54, 56, 62, 63, 66, 74-77]. Em virtude do alto custo do material utilizado, da centralização em um único local e do tempo de realização do exame, foi feita a opção por não estender o número de pacientes além daqueles relatados nos artigos estudados. A amostra foi composta por 30 pacientes, sendo 17 do grupo controle (não portadores de rinite alérgica) e 13 pacientes portadores de rinite alérgica.

Assim, uma das análises estatísticas utilizada foi o cálculo do erro tipo II, também chamado de erro beta. No presente estudo, poderia significar que os valores das citocinas são, na média, diferentes entre o grupo com e sem alergia, mas pelo tamanho amostral esta diferença não foi demonstrada. O erro tipo II pode ser causado, entre outros fatores, pelo tamanho insuficiente da amostra. Sendo assim, o tamanho amostral também foi recalculado.

Para os cálculos acima descritos, foi utilizada a fórmula proposta por HOSMER LEMESHOW:

$$n = \frac{2 \sigma [Z_{(1-\alpha/2)} + Z_{(1-\beta)}]^2}{(\text{diferença})^2}$$

Onde:

n = amostra

$\sigma$  = "média do quadrado" nos grupos

$Z(1-\alpha/2)$  = área da curva de distribuição normal do erro tipo I

$Z(1-\beta)$  = área da curva de distribuição normal do erro tipo II

Diferença = valor da diferença da média dos dois grupos.

#### 4.10 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado segundo os trâmites exigidos pelo curso de Pós-Graduação de Medicina da UFMG, área de concentração em Cirurgia e foi submetido à Câmara do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia da Faculdade de Medicina da UFMG, com parecer aprovado pelo Prof. Joel Edmur Boteon (ANEXOS A, B e C).

Em seguida, foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Médica da UFMG (COEP) e aprovado em 14 de outubro de 2004, sob o parecer nº ETIC 044/04, assinado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elena de Lima Perez Garcia (ANEXO D).

#### **4.11 Consentimento livre e informado de participação na pesquisa**

Os participantes foram esclarecidos dos objetivos, métodos e procedimentos deste estudo. O direito de continuidade do atendimento médico, após o término da investigação e a liberdade de cancelar seu consentimento de participação a qualquer momento, sem que isso interferisse no atendimento presente e/ou futuro, foram-lhes assegurado (APÊNDICE D).

## 5 RESULTADOS

Todos os resultados abaixo foram colocados discriminadamente em uma única tabela (APÊNDICE E).

### 5.1 Idade

A faixa etária dos pacientes variou de 3 a 47 anos, estando a média, a mediana, o desvio padrão e a amplitude detalhados na TAB. 2.

**TABELA 2**  
**Distribuição das medidas de tendência central e medidas de dispersão das idades dos pacientes alérgicos e não alérgicos**

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

## 5.2 Sexo

Distribuição por sexo dos pacientes nos grupos alérgico e não alérgico (FIG. 6)

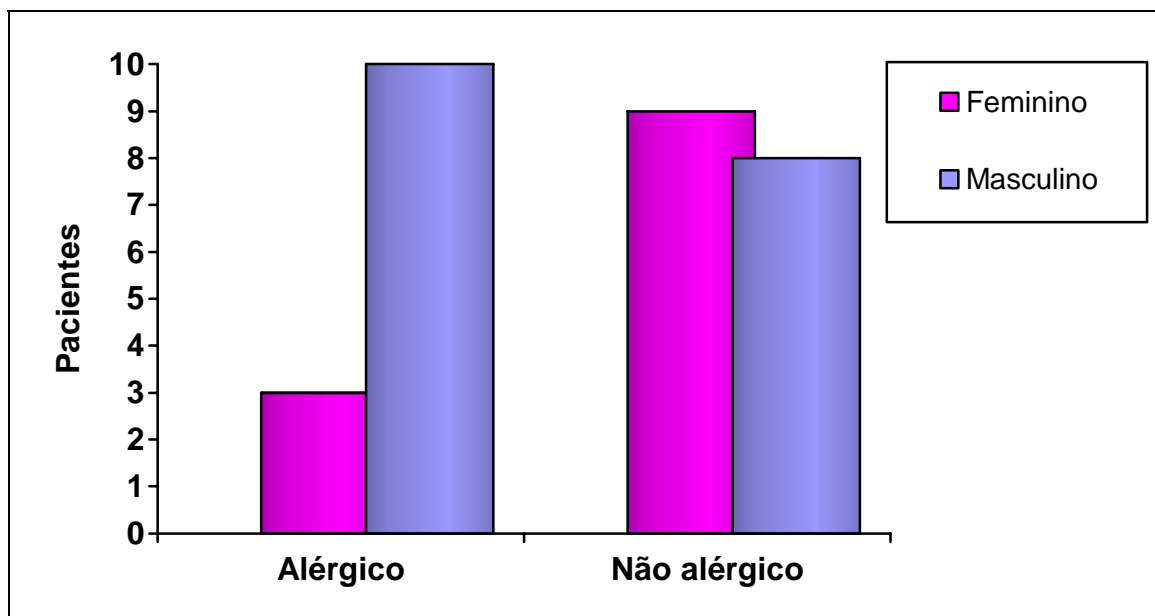


FIGURA 6 – Distribuição dos grupos por sexo

## 5.3 Sinais e sintomas nasais

Sinais e sintomas nasais presentes na história pregressa dos pacientes

(FIG. 7)

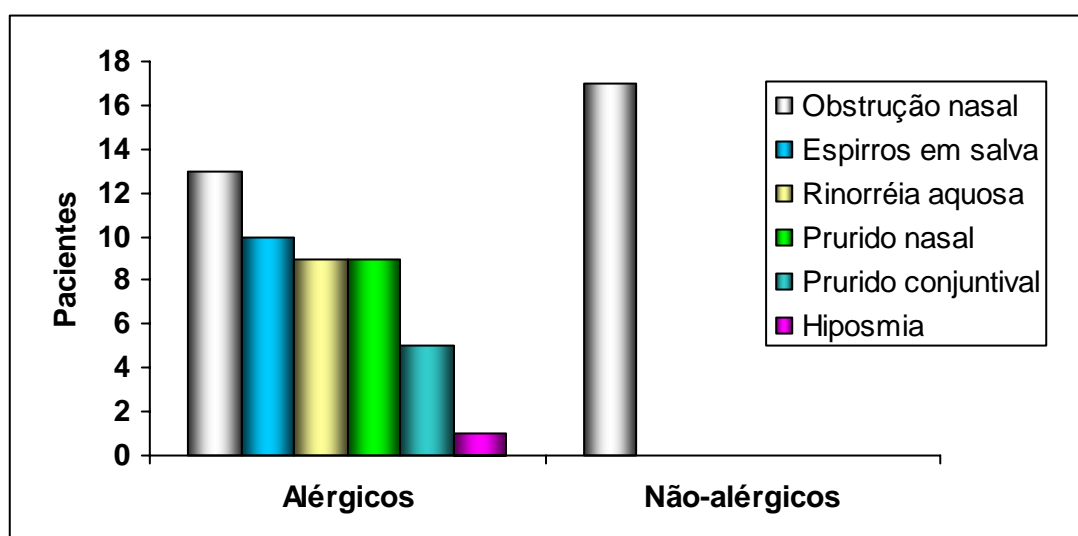


FIGURA 7 – Sinais e sintomas clínicos mais frequentes na história pregressa.

## 5.4 Sensibilidade a alérgenos

Distribuição da sensibilidade a alérgenos no grupo atópico (FIG. 8)

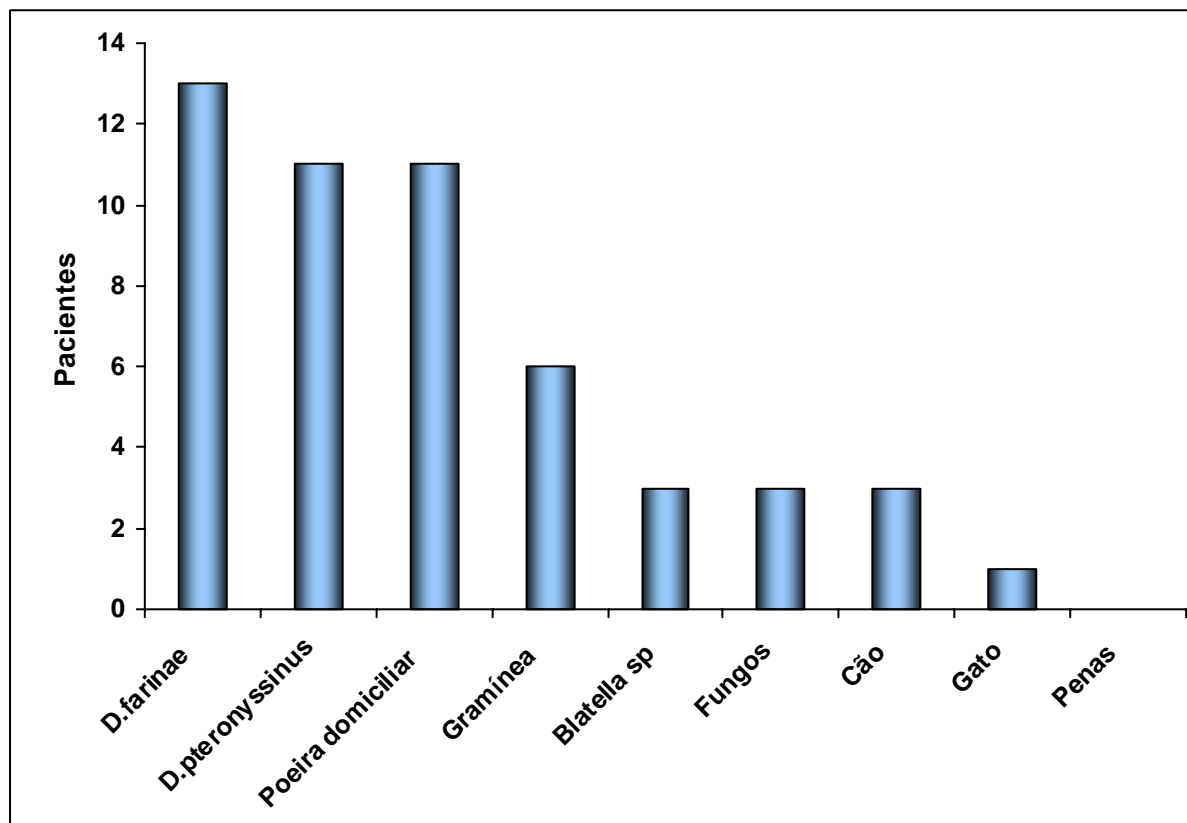


FIGURA 8 – Sensibilização dos pacientes alérgicos aos antígenos mais freqüentes.

## 5.5 Cirurgias realizadas

Os pacientes desta pesquisa foram submetidos às cirurgias listadas na

FIG. 9.

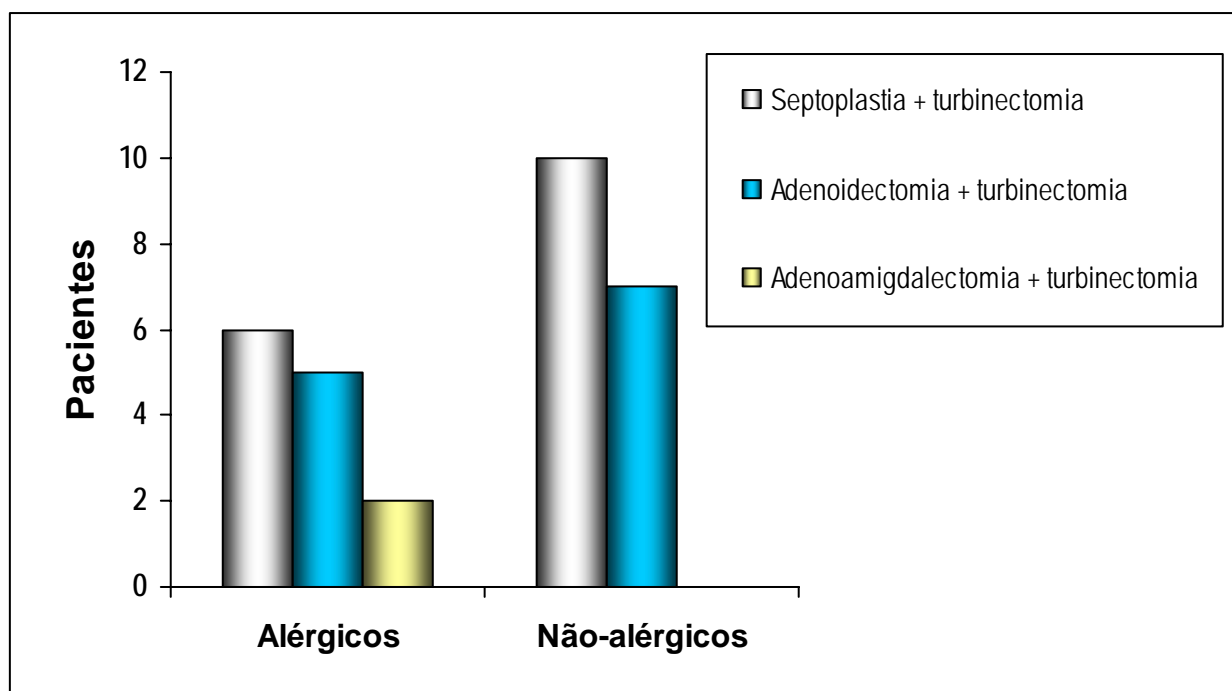


FIGURA 9 – Cirurgias realizadas nos grupos alérgicos e não alérgicos

## 5.6 Perfil das citocinas

Expressão das citocinas IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  com os valores ajustados pelo da  $\beta$ -actina (TAB. 3).

**TABELA 3**

**Comparação da idade e dos valores das citocinas corrigidos pela  $\beta$ -actina entre os pacientes alérgicos e não-alérgicos**

Variável	Alérgicos				Não-alérgicos				Valor de p
	Média	DP	Mediana	Amplitude	Média	DP	Mediana	Amplitude	
$\beta$ -actina	80209	10221	75909	66332-96794	80552	11467	77443	64111-99882	0,98
IL4	37894	38998	24133	2838-126110	13396	15577	4624	119-51296	0,03
IL5	39966	29899	30124	3013-92463	18714	17334	11382	2875-71402	0,06
IL8	44515	23349	40622	17418-95491	37491	33518	27079	6887-129924	0,17
IFN- $\gamma$	123144	72907	99817	29679-184417	102575	42430	95574	29679-184417	0,72
Idade	13,4	7,4	11,0	3,0-26,0	19,2	13	19,0	3,0-57,0	0,21

DP – Desvio-padrão



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Idade

No grupo portador de rinite alérgica, a idade variou de 3 a 26 anos, e, no grupo não alérgico, de 3 a 47 anos. A distribuição das idades nos dois grupos foi assimétrica, uma vez que os pacientes envolvidos nesta pesquisa foram aqueles com indicação para turbinectomias (TAB. 2).

Na TAB. 4 é apresentado o coeficiente de correlação de Pearson para a comparação de IL4, IL5, IL8, IFN- $\gamma$  e  $\beta$ -actina com a variável idade. Não foi observada nenhuma correlação com significância estatística ( $p=0,21$ ) entre as variáveis apresentadas, concordando com dados da literatura [1, 7, 26, 78].

**TABELA 4**  
**Coeficiente de correlação de Pearson entre idade e variáveis resposta**

Variável independente	r	r <sup>2</sup>	Valor-p
$\beta$ -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- $\gamma$	-0,182	0,033	0,337

r: o coeficiente de correlação de Pearson.  
r<sup>2</sup>: o coeficiente de determinação.

## 6.2 Sexo

No grupo alérgico, 23% dos 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 que a rinite alérgica não tem preferência por sexo ou raça como foi observado em dados da literatura [1, 7, 26, 78] (FIG. 6).

## 6.3 Sintomas nasais

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

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 de acordo com a classificação mais recente publicada na literatura [1, 35] (FIG. 4, 7).

## 6.4 Sensibilidade a alérgenos

Utilizaram-se os antígenos *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides 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 [3]. Os pacientes portadores de rinite alérgica apresentaram positividade para o *D. farinae* em 100% dos casos; 84% para o *D. pteronyssinus* e poeira domiciliar; 46% tiveram o teste positivo para gramíneas; 23% reagiram às substâncias alergênicas do cão, da *Blatella sp* e dos fungos. Não houve, neste grupo,

sensibilização para as penas (FIG. 8).

Os resultados acima concordaram com dados da literatura onde a maior ocorrência de rinite alérgica ocorreu devido à sensibilização por ácaros e outros componentes da poeira domiciliar. No Brasil, os sintomas clínicos de pacientes portadores de rinite alérgica são freqüentes durante todo o ano, mas alguns autores relatam a exacerbação nos períodos de outono/inverno, porque as condições climáticas favorecem a proliferação do ácaro, apesar deste ectoparasita estar presente no meio domiciliar durante todo o ano [1, 3, 7].

### **6.5 Perfil das citocinas**

Os valores de IL-4, IL-5, IL-8 e IFN- $\gamma$  foram analisados, quantificados e padronizados através dos dados obtidos e ajustados pelo coeficiente da  $\beta$ -actina. Os resultados de IL-8 e IFN- $\gamma$  foram semelhantes nos dois grupos, à exceção de IL-4 e da forte tendência ao aumento dos níveis de IL-5.

Estudando a IL-4, observou-se que foi a única citocina a ter um aumento estatístico significativo ( $p=0,03$ ), indicando que há diferença entre os grupos alérgico e não alérgico. Esta citocina, por apresentar maior envolvimento com a sensibilização alérgica, foi encontrada em níveis elevados, mas não associada a manifestações clínicas. Poder-se-ia pensar na estimulação que ocorreu através da realização do teste cutâneo, apesar do pequeno volume de antígenos administrados. Por outro lado, estes valores poderiam estar aumentados persistentemente em indivíduos alérgicos paucissintomáticos, o que mereceria maiores estudos [3, 4, 8, 23, 62].

Os níveis de IL-5 apresentaram uma forte tendência a aumentar, mesmo sem diferenças estatísticas significativas ( $p=0,06$ ). OHASHI *et al.* compararam os níveis de IgE, IL-5 e IFN- $\gamma$  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, OHASHI *et al.* observaram uma significativa relação entre os níveis aumentados de IL-5, a infiltração eosinofílica nasal e as manifestações clínicas da rinite alérgica. [53].

Considerando os valores encontrados de IL-8, encontrou-se um poder de 47% que corresponde a um erro tipo II de 53%, o que significa a possibilidade de "encontrar uma diferença que não existia". Com a amostra de 30 pacientes não foi possível afirmar que não existia diferença na comparação de IL-8 e IFN- $\gamma$  entre os pacientes alérgicos e não-alérgicos, pois o poder na comparação dos valores de média e desvio-padrão foi sempre menor que 80%.

Surgiu, então, o questionamento se a ausência de diferença estatística entre IL-8 e IFN- $\gamma$  nos grupos seria motivada por uma amostra insuficiente. Para tentar solucionar a dúvida, foram realizados cálculos para determinar o erro tipo II deste estudo (TAB. 5).

**TABELA 5**  
**Tamanho amostral calculado a partir dos valores de média e desvio-padrão do presente estudo para IL-8 e IFN- $\gamma$**

Citocinas	Tamanho amostral necessário*	
	Poder 80%	Poder 90%
IL-8	266	356
IFN- $\gamma$	133	177

\*Cálculos realizados após a coleta e dosagens das citocinas apresentadas.

Se o estudo fosse composto por 133 pacientes alérgicos e 133 pacientes não alérgicos para os valores de IFN- $\gamma$ , 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. Nesta pesquisa, poder-se-ia também pensar que os dados foram homogêneos porque os pacientes não haviam sido expostos aos antígenos sensibilizantes em volume suficiente, não disparando a cascata de células, mediadores e citocinas da rinite alérgica. [20, 22, 37, 39, 55, 57-59, 61]. Benson *et al.* pressupôs que os pacientes atópicos apresentavam uma deficiente produção de IFN- $\gamma$  o que explicaria níveis diminuídos desta citocina em episódios alérgicos [63]. Desta forma, seria importante um estudo com um tamanho amostral ampliado para averiguar a veracidade de tais suposições.

Na TAB. 6 observou-se o valor do poder do teste estatístico na comparação das médias de IL-8 e IFN- $\gamma$ . Trabalhou-se com um poder mínimo de 80% que não foi encontrado em nenhuma das comparações. Um poder de 80% corresponde a um erro tipo II de 20% (poder = 1 – erro tipo II). Assim, neste estudo, pôde-se observar que as variáveis IL-8, IFN- $\gamma$  não apresentaram diferença na comparação entre os grupos alérgico e não-alérgico, não permitindo afirmar que os grupos eram semelhantes (ou que não existiam diferenças entre eles), pois o poder foi muito baixo (e o erro tipo II muito alto).

**TABELA 6**  
**Poder na comparação das médias de IL-8 e IFN- $\gamma$  do presente estudo**

Citocinas	Poder do teste
IL-8	0,10
IFN- $\gamma$	0,15

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 portadores de rinite alérgica, visto que esta doença é um bom modelo para o estudo destas substâncias. [9-17].

## 7 CONCLUSÃO

Na comparação do perfil das citocinas entre pacientes não alérgicos e pacientes alérgicos paucissintomáticos, observou-se que a IL-4 apresentou níveis significativamente elevados no grupo atópico. Os níveis de IL-5 dos pacientes alérgicos apresentaram forte tendência a aumentar, porém sem diferença estatística significativa. Os valores de IL-8 e IFN- $\gamma$  foram semelhantes nos dois grupos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - (Padrão Vancouver)

### Referências Bibliográficas

1. *II Consenso Brasileiro sobre Rinites 2006*, in *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2006. p. 29-58.
2. Cruz, O.L., Costa, S.S., *Rinite alérgica.*, in *Otorrinolaringologia: princípios e prática.*, Sady Selaimen da Costa, et al., Editors. 1994, Artes Médicas: Porto Alegre. p. 314-321.
3. Mion, O., Mello Jr., J.F., *Up-to-date em Rinite. Diagnóstico das Rinites.*, in *Respire.com*. 2006: São Paulo. p. 2-12.
4. Mello, J.F., Mello Jr., J. F., *Imunofisiopatologia*, in *Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão*. 1997, Lemos Ed: São Paulo. p. 37-45.
5. Bradding, P., et al., *Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation*. *J Immunol*, 1993. **151**(7): p. 3853-65.
6. Sennes, L.U., Sanchez, T.G., *Anatomia e fisiologia nasossinusal.*, in *Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão.*, F.F.M. Castro, Editor. 1997, Lemos Ed: São Paulo. p. 22-36.
7. Araújo, C.A.F., Barros, L. F., Miranda Jr., M. A. B., Fontes, R. S., *Rinopatia alérgica: Conduta terapêutica adaptada para países em desenvolvimento*, in *Revista da Sociedade de Otorrinolaringologia do Estado do Rio de Janeiro*. 2003. p. 80-82.
8. Santos, M.A., Lerner, A.P., Castro, F.F.M., *Diagnóstico clínico e laboratorial das rinites alérgicas.*, in *Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão.*, F.F.M. Castro, Editor. 1997, Lemos Ed: São Paulo. p. 47-62.
9. Bryan, D., et al., *Cytokine gene expression in a murine wound healing model*. *Cytokine*, 2005. **31**(6): p. 429-38.
10. Choi, E.W., et al., *Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **146**(1): p. 101-8.
11. Dreskin, S.C., et al., *Measurement of changes in mRNA for IL-5 in noninvasive scrapings of nasal epithelium taken from patients undergoing nasal allergen challenge*. *J Immunol Methods*, 2002. **268**(2): p. 189-95.
12. Ferreira, A.M., et al., *The effect of MCP-1 depletion on chemokine and chemokine-related gene expression: evidence for a complex network in acute inflammation*. *Cytokine*, 2005. **30**(2): p. 64-71.
13. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes Paracoccidioides brasiliensis infection from disease*. *Cytokine*, 2005. **32**(1): p. 20-9.
14. Mayringer, I., M. Reindl, and T. Berger, *A critical comparison of frequently used methods for the analysis of tumor necrosis factor-alpha expression by human immune cells*. *J Immunol Methods*, 2000. **235**(1-2): p. 33-40.
15. Tengowski, M.W., et al., *Differential expression of genes encoding constitutive and inducible 20S proteasomal core subunits in the testis and epididymis of theophylline- or 1,3-dinitrobenzene-exposed rats*. *Biol Reprod*, 2007. **76**(1): p. 149-63.



16. Yang, H., A.U. Spencer, and D.H. Teitelbaum, *Interleukin-7 administration alters intestinal intraepithelial lymphocyte phenotype and function in vivo*. *Cytokine*, 2005. **31**(6): p. 419-28.
17. Knoers, N.V. and L.A. Monnens, *Teaching molecular genetics: Chapter 1-- Background principles and methods of molecular biology*. *Pediatr Nephrol*, 2006. **21**(2): p. 169-76.
18. Mori, J.C., Castro, A.P.B.M., *Aeroalergen e controle ambiental.*, in *Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão.*, F.F.M. Castro, Editor. 1997, Lemos Ed: São Paulo. p. 77-94.
19. Knol, E.F., et al., *The role of basophils in allergic disease*. *Eur Respir J Suppl*, 1996. **22**: p. 126s-131s.
20. Ohkubo, K., et al., *Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge*. *Rhinology*, 1998. **36**(4): p. 156-61.
21. Boniface, S. and A. Magnan, *[Pathophysiology of the IgE-dependent reaction in respiratory allergy]*. *Rev Pneumol Clin*, 2003. **59**(2 Pt 1): p. 77-83.
22. Calderon, M.A., et al., *A comparison of cytokine release from epithelial cells cultured from nasal biopsy specimens of atopic patients with and without rhinitis and nonatopic subjects without rhinitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. **99**(1 Pt 1): p. 65-76.
23. Nakai, Y., et al., *Allergen-induced mRNA expression of IL-5, but not of IL-4 and IFN-gamma, in peripheral blood mononuclear cells is a key feature of clinical manifestation of seasonal allergic rhinitis*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000. **126**(8): p. 992-6.
24. Naclerio, R. and W. Solomon, *Rhinitis and inhalant allergens*. *Jama*, 1997. **278**(22): p. 1842-8.
25. Baraniuk, J.N., *Pathogenesis of allergic rhinitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. **99**(2): p. S763-72.
26. van Cauwenberge, P., et al., *Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. *Allergy*, 2000. **55**(2): p. 116-34.
27. Wang, J.M., Rambaldi, A., Biondi, A., Chen, Z.G., Sanderson, C.J., Montovani, A., *Recombinant human interleukin-5 is a selective eosinophil chemoattractant*. *Eur J Immunol*, 1989. **19**: p. 701-5.
28. Wang, M., et al., *A common IL-13 Arg130Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patients with allergic rhinitis*. *Hum Genet*, 2003. **113**(5): p. 387-90.
29. Hansen, I., et al., *Mediators of inflammation in the early and the late phase of allergic rhinitis*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004. **4**(3): p. 159-63.
30. Van Cauwenberge, P. and H. Van Hoecke, *Management of allergic rhinitis*. *B-Ent*, 2005. **Suppl 1**: p. 45-62; quiz 63-4.
31. Sehmi, R., et al., *Interleukin-5 selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal but not eosinophilic subjects*. *Blood*, 1992. **79**(11): p. 2952-9.
32. Berger, W.E., *Overview of allergic rhinitis*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2003. **90**(6 Suppl 3): p. 7-12.
33. Ciprandi, G., et al., *Association between response to decongestion testing and sensitizations and allergic inflammation*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006. **96**(3): p. 431-6.

34. Neves, J.E.P., Behar, V.S., Cordás, T.A., *Aspectos psiquiátricos e psicológicos do paciente alérgico.*, in *Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão.*, F.F.M. Castro, Editor. 1997, Lemos Ed: São Paulo. p. 169-175.
35. Van Hoecke, H., et al., *Classification and management of allergic rhinitis patients in general practice during pollen season.* Allergy, 2006. **61**(6): p. 705-11.
36. Johansson, S.G., et al., *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.* Allergy, 2001. **56**(9): p. 813-24.
37. Abbas, A.K., *Imunologia Celular e Molecular.* 5. ed. ed, ed. A.H.L. Abul K. Abbas. 2005, Rio de Janeiro: Elsevier.
38. Benson, M., et al., *Cytokines in nasal fluids from school children with seasonal allergic rhinitis.* Pediatr Allergy Immunol, 1997. **8**(3): p. 143-9.
39. Barbuto, J.A.M., *Imunidade celular.*, in *Imunologia*, V.L.G. Calich and C.A.C. Vaz, Editors. 2001, Revinter: Rio de Janeiro. p. 179-193.
40. Ciprandi, G., et al., *Relationships between allergic inflammation and nasal airflow in children with persistent allergic rhinitis due to mite sensitization.* Allergy, 2005. **60**(7): p. 957-60.
41. Zendejas Cervantes, L.H., et al., *[Quality of life evaluation in the patient with allergic rhinitis].* Rev Alerg Mex, 2003. **50**(3): p. 91-5.
42. Lee, C.H., Le, K. S., Rhee, C. S., Lee, S. O., Min, Y. G. , *Distribution of rantes and interleukin-5 in allergic nasal mucosa and nasal polyps.*, in *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1999. p. p.594-598.
43. Min, Y.G., Lee, C. H., Rhee, C. S., Kim, K. H., Kim, C. S., Koh, Y. Y., Min, K. U., Anderson, P.L., *Inflammatory cytokine expression on nasal polyps developed in allergic and infectious rhinitis.* Acta Otolaryngol., 1997. **v.117**(n.2): p. p. 302-306.
44. Wright, E.D., Frenkiel, S., Ghamdi, K.A., Ghaffar, O., Small, P., Troutt, T., Tavernier, J., Hamid, Q., *Interleukin-4, interleukin-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression in chronic sinusitis and response to topical steroids.* Otolaryngol. Head Neck Surg., 1998. **v.24**: p. p.15-24.
45. Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Nakaniashi, M., Tomizawa, E., Matsumoto, S., *The inductive effect of interleukin 4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes.* Clin Exp Immunol, 1990. **79**: p. 392.
46. Liu, M., et al., *Regulatory roles of IL-12, IL-4 and IFN-gamma on IgE synthesis in atopic patients.* Chin Med J (Engl), 1999. **112**(6): p. 550-3.
47. Kramer, M.F., Ostertag, P., Pfrogner, E., Rasp, G., *Nasal Interleukin-5, immunoglobulin E, eosinophilic cationic protein, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis,* in *Laryngoscope.* 2000. p. 1056-1062.
48. Roboz, G.J. and S. Rafii, *Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production.* Curr Opin Hematol, 1999. **6**(3): p. 164-8.
49. Salerno, M.S., et al., *Binding of octamer factors to the murine IL-5 CLE0 in primary T-cells and a T-cell line.* Cytokine, 2001. **15**(1): p. 4-9.
50. Terada, N., et al., *Interleukin-5 preferentially recruits eosinophils from vessels in nasal mucosa.* Acta Otolaryngol Suppl, 1993. **506**: p. 57-60.

51. Sedgwick, J.B., et al., *Effect of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on in vitro eosinophil function: comparison with airway eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **96**(3): p. 375-85.
52. Ciprandi, G., et al., *Nasal obstruction is the key symptom in hay fever patients*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2005. **133**(3): p. 429-35.
53. Ohashi, Y., 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): p. 596-602.
54. Lee, C.H., et al., *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): p. 215-9.
55. Leonard EJ, S.A., Yoshimura T, Noer K, Kutvirt S, Epps DV, *Leucocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1*. J Immunol, 1990. **144**: p. 1323-1330.
56. Nonaka, M., et al., *GM-CSF, IL-8, IL-1R, TNF-alpha R, and HLA-DR in nasal epithelial cells in allergic rhinitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(5): p. 1675-81.
57. KleinJan, A., et al., *Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(3 Pt 1): p. 441-50.
58. Dahiden CA, K.Y., De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M, *The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils*. J Exp Med, 1990. **170**: p. 1787-1792[9].
59. Bischoff SC, B.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**: p. 1577-1582[9].
60. Min, Y.G. and K.S. Lee, *The role of cytokines in rhinosinusitis*. J Korean Med Sci, 2000. **15**(3): p. 255-9.
61. Ohtoshi, T., Vancheri, C., Cox, G., Gauldie, J., Dolovich, J., Denburg, J.A., Jordana, M., *Monocytmacrophage differentiation induced by upper airway epithelial cells*. Am. J. Respir.Cell. Mol., 1991b. **v.4**: p. 225-263.
62. Bottcher, M.F., M.C. Jenmalm, and B. Bjorksten, *Immune responses to birch in young children during their first 7 years of life*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(12): p. 1690-8.
63. Benson, M., et al., *Low levels of interferon-gamma in nasal fluid accompany raised levels of T-helper 2 cytokines in children with ongoing allergic rhinitis*. Pediatr Allergy Immunol, 2000. **11**(1): p. 20-8.
64. Hara, M., et al., *Clinical usefulness of cellulose acetate electrophoresis as a screening of proteinuria in childhood*. Int J Pediatr Nephrol, 1985. **6**(2): p. 111-6.
65. Ogilvie, A.L., et al., *Leukocyte infiltration and mRNA expression of IL-20, IL-8 and TNF-R P60 in psoriatic skin is driven by TNF-alpha*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2006. **19**(2): p. 271-8.
66. Karlsson, M.G., et al., *Nasal messenger RNA expression of interleukins 2, 4, and 5 in patients with allergic rhinitis*. Diagn Mol Pathol, 1995. **4**(2): p. 85-92.
67. Mygind, N. and P. Bretlau, *Scanning electron microscopic studies of the human nasal mucosa in normal persons and in patients with perennial rhinitis. II. Secretion*. Acta Allergol, 1974. **29**(4): p. 261-80.

68. Mygind, N. and B. Winther, *Light- and scanning electron-microscopy of the nasal mucosa*. Acta Otorhinolaryngol Belg, 1979. **33**(4): p. 591-602.
69. Fonseca, J.S., Martins, G. A., *Curso de estatística*. 6<sup>a</sup> ed. 1996, São Paulo: Jairo S da Fonseca, Gilberto A. Martins.
70. Goulart, E.M.A., *Metodologia e Informática na Pesquisa Médica*. 2000, Belo Horizonte: Eugênio M. A. Goulart. 161.
71. Pagano, M., Gauvreau, K., *Princípios de bioestatística*. 2<sup>a</sup> ed. 2004, São Paulo: Pioneira Thomson Learning.
72. Smailes, J., Mcgrane, A., *Estatística aplicada à administração com Excel*. 2002, São Paulo: Atlas.
73. Soares, J.F., Siqueira, A. L., *Introdução à estatística médica*. 2<sup>a</sup> ed, ed. J.F.S.e.A.L. Siqueira. 2002, Belo Horizonte: COOPMED. 300.
74. Bachert, C., M. van Kempen, and P. Van Cauwenberge, *Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 375-9.
75. Durham, S.R., et al., *Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2390-4.
76. Kramer, M.F., et al., *Nasal IL-16 and MIP-1 alpha in late-phase allergic response*. Allergy Asthma Proc, 2001. **22**(3): p. 127-32.
77. Moverare, R., et al., *Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients*. Allergy, 2000. **55**(2): p. 171-5.
78. Van Hoecke, H., et al., *Is the allergic rhinitis and its impact on asthma classification useful in daily primary care practice?* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(3): p. 758-9.

## **APÊNDICES E ANEXOS**

## APÊNDICE A – Teste cutâneo por punctura – “*Prick test*”

- Deve ser realizado na face anterior do braço ou na região dorsal em crianças.
- A pele deve ser limpa com cuidados habituais de assepsia, não deve apresentar ferimentos ou lesões como eczema de qualquer natureza.
- Após limpeza da pele marcam-se com lápis dermatográfico os locais onde serão colocados os alérgenos, gotas únicas de cada um, a uma distância de aproximadamente 2 cm.
- Para o controle positivo, foi utilizada a histamina, e, para o controle negativo, o soro fisiológico.
- Uso de agulha hipodérmica ou lanceta com a finalidade de promover a passagem do alérgeno através do extrato córneo da pele, limitando o grau de penetração.
- Após 1 minuto retira-se com o auxílio de toalha de papel absorvente o excesso de extrato aplicado para o teste, com cuidado para não contaminar testes vizinhos.
- A leitura é feita 15 a 20 minutos após a aplicação dos extratos, considerando-se positivas pápulas com diâmetro igual ou superior a 3 x 3 mm. Alguns autores consideram positivas pápulas com tamanho igual ou superior a pápula da histamina. Outros autores consideram resultado positivo +++ (3 cruces) para pápulas igual a pápula da histamina e ++ (2 cruces) para pápulas com metade do tamanho da pápula de histamina [3, 8].

## APÊNDICE B – Protocolo clínico

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS –MARÇO/05  
SERVIÇO DE OTORRINOLARINGOLOGIA  
**PROTÓCOLO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DA RINITE ALÉRGICA**

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_  
 DATA DO ATENDIMENTO: \_\_\_\_\_  
 NOME DO RESPONSÁVEL SE MENOR: \_\_\_\_\_  
 DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 IDADE: \_\_\_\_\_  
 SEXO:  FEMININO  MASCULINO  
 COR:  LEUCODERMA  FAIODERMA  OUTROS  
 NATURALIDADE: \_\_\_\_\_  
 PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_  
 ESCOLARIDADE:  PRIMEIRO GRAU  SEGUNDO GRAU  NENHUM  
 ENDEREÇO: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 FONE: \_\_\_\_\_  
 CEP: \_\_\_\_\_

1. SINTOMAS NASAIS, OCULARES E DA OROFARINGE:

- RINORRÉIA  ESPIRROS  PRURIDO  
 OBSTRUÇÃO NASAL  PRURIDO E LACRIMEJAMENTO DOS OLHOS  
 PRURIDO DE OROFARINGE (GARGANTA)  
 OUTROS: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

2. TEMPO DE INÍCIO DOS SINTOMAS:

- < 6 MESES  ENTRE 6 MESES E 1 ANO  > 1 ANO

3. SINTOMAS SÃO:

- SAZONAIS \_\_\_\_\_  
 PERENES

4. USO DE MEDICAMENTOS: \_\_\_\_\_

5. ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA:

- PAI  NÃO  
 SIM  ASMA  RINITE ALÉRGICA  DERMATITE ATÓPICA  
 MÃE  NÃO  
 SIM  ASMA  RINITE ALÉRGICA  DERMATITE ATÓPICA

## APÊNDICE B – Protocolo clínico

- IRMÃOS  NÃO  
 SIM  ASMA  RINITE ALÉRGICA  DERMATITE ATÓPICA
6. CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO:  CASA  APARTAMENTO
7. HABITAÇÃO / TEMPO DE CONSTRUÇÃO:  NOVA  ANTIGA
8. MATERIAL DE CONSTRUÇÃO:  ALVENARIA  MADEIRA
9. AR CONDICIONADO:  SIM  NÃO
10. BOA VENTILAÇÃO AMBIENTAL:  SIM  NÃO
11. MÔFO:  SIM  NÃO
12. VIZINHANÇA:  INDÚSTRIAS  MARCENARIAS  
 OUTROS: \_\_\_\_\_
13. PLANTAS DENTRO DE CASA:  SIM  NÃO
14. FUMANTES NO DOMICÍLIO:  SIM  NÃO
15. ANIMAIS DOMÉSTICOS:  SIM  NÃO  
 CACHORRO  GATO  PASSAROS  OUTROS \_\_\_\_\_
- 
16. CORTINAS:  TECIDO  PERSIANA  MADEIRA
17. CORTINAS EM OUTROS CÔMODOS:  SIM  NÃO
18. CARACTERÍSTICAS DA MOBÍLIA:  
 COURO  TECIDO  PLÁSTICO
19. PISO DO DORMITÓRIO:  
 CERÂMICA  MADEIRA  CIMENTO  CARPETE  TAPETES
20. REVESTIMENTO DE:  COLCHÃO  TRAVESSEIRO
21. USO DE :  COBERTOR  EDREDON
22. PRESENÇA NO QUARTO DE:  MUITOS BRINQUEDOS  
 BICHOS DE PELÚCIA  
 LIVRO



## APÊNDICE C – Teste cutâneo – Tabela de anotação

### TESTE CUTÂNEO

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_

ANTÍGENO	PÁPULA	ERITEMA
HISTAMINA		
<i>D. farinae</i>		
<i>D. pteronyssinus</i>		
POEIRA DOMICILIAR		
<i>Blatella sp</i>		
GRAMÍNEA		
FUNGOS		
PENAS		
GATO		
CÃO		
CONTROLE NEGATIVO		

## APÊNDICE D – Consentimento livre e esclarecido para a participação em pesquisa

### CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR EM ESTUDO DE PESQUISA CLÍNICA

**TÍTULO: ESTUDO CLÍNICO-IMUNOLÓGICO E PESQUISA DO PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES PORTADORES DE RINITE ALÉRGICA.**

**PESQUISADOR:** Dra. Tarcimara Moreira da Silva  
Tel: 3274 7375

#### INTRODUÇÃO

É importante que você leia e compreenda as seguintes explicações sobre a importância deste estudo e sobre os procedimentos propostos.

#### OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa é analisar a presença de substâncias produzidas em nosso organismo, chamadas "Citocinas. Estaremos estudando o perfil das mesmas em pacientes que apresentam rinite alérgica e assim avaliando as respostas inflamatórias desta doença.

#### PROCEDIMENTOS

- Este estudo será realizado em dois grupos de pacientes:

1. Pacientes portadores de rinite alérgica com indicação para remoção cirúrgica parcial de cornetos nasais inferiores que são estruturas "carnosas" localizadas dentro das cavidades nasais.
2. Controle: pacientes normais, não portadores de rinite alérgica com indicação para remoção cirúrgica parcial das estruturas "carnosas" referidas acima.

- Os pacientes serão classificados nestes dois grupos da seguinte forma:

1. Avaliação de sua história
2. Teste cutâneo: para detectar os pacientes portadores e não portadores de rinite alérgica.

- Coleta do material a ser analisado:

Os fragmentos serão provenientes das estruturas "carnosas" do nariz, as quais chamamos de cornetos nasais. A remoção cirúrgica destas estruturas faz parte das cirurgias de correção das tortuosidades nasais, bem como das cirurgias das adenóides e das amígdalas sempre que determinarem a obstrução do nariz. Este material que seria naturalmente desprezado ao final da cirurgia, será levado para a análise laboratorial.

#### RISCOS

Não há maiores riscos. Todo procedimento faz parte do tratamento inicialmente proposto e não acarretará riscos adicionais.

## APÊNDICE D – Consentimento livre e esclarecido para a participação em pesquisa

### **BENEFÍCIOS**

O benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento médico e, conseqüentemente, para melhor análise e tratamento da rinite alérgica. Mesmo com o avanço da medicina, ainda não compreendemos totalmente todo o processo inflamatório desta doença.

### **CUSTOS**

Não haverá custos para os pacientes e você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

### **CONFIDENCIALIDADE**

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido pela lei. As publicações dos dados não o (a) identificarão. Os registros médicos serão de conhecimento do pesquisador e poderão ser verificados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/UFMG.

### **DESLIGAMENTO**

A sua participação é voluntária. A sua recusa em participar não afeta o seu acompanhamento médico em andamento.

### **CONTATO COM A COMISSÃO DE ÉTICA**

Qualquer dúvida que houver a respeito de seus direitos como um(a) paciente de pesquisa, você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/UFMG, no telefone: 3248-9364.

### **CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas ao pesquisador responsável, Dra. Tarcimara Moreira da Silva, e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fiquei ciente de que esta pesquisa não envolverá quaisquer riscos à minha saúde e que meu tratamento seguirá seu curso normal dentro dos parâmetros atuais.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim ou por meus pais ou por meu responsável legal, indicando meu consentimento para participar deste estudo, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

-----Belo Horizonte, ----/----/-----  
Assinatura do paciente ou responsável legal

-----Belo Horizonte, ----/----/-----  
Pesquisador responsável

## APÊNDICE E – Dados dos pacientes

TABELA 7 - DADOS DOS GRUPOS ALÉRGICO E NÃO ALÉRGICO: IDADE, CIRURGIAS, VALORES DAS CITOCINAS E BETA-ACTINA.

Amostra	Grupo	Pacientes	DATA	Act-b	IL5	IL4	IFN-g	IL8	IDADE	CIRURGIA
1	Alérgico	BAM	4/2/2004	69414	24917	10583	87817	26475	17	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
2	Alérgico	PCG	7/2/2004	92552	56954	5291	58544	17019	17	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
3	Alérgico	LFPR	13/4/2004	86753	27852	25514	101305	37419	9	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
4	Alérgico	DAG	29/4/2004	75909	30898	59616	202610	46774	24	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
5	Alérgico	GPR	13/4/2004	73259	72832	3108	73379	31183	3	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
6	Alérgico	SCD	3/12/2004	66322	66817	25910	76399	21066	20	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
7	Alérgico	AOS	6/5/2004	71290	3390	18646	120188	27441	9	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
8	Alérgico	TRP	29/4/2005	96468	48586	104856	36817	79397	11	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
9	Alérgico	MPA	30/3/2005	75719	15819	4175	105737	80788	26	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
10	Alérgico	PLML	16/2/2004	77784	95347	89820	274866	55578	2	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
11	Alérgico	APA	23/4/2004	75909	5018	90779	83285	61456	11	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
12	Alérgico	RAA	12/2/2004	84548	5018	22895	218550	53774	7	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
13	Alérgico	PVSMG	28/1/2004	96794	59885	20971	165026	33662	17	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
14	Não Alérgico	GCL	18/5/2004	92115	29952	21166	101498	10801	4	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
15	Não Alérgico	GCS	25/5/2004	86767	8202	47623	88729	17019	8	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
16	Não Alérgico	WJM	30/3/2005	70413	5142	5291	81962	18910	31	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
17	Não Alérgico	LMC	9/7/2004	99882	3390	31749	52690	15128	28	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
18	Não Alérgico	ABF	4/2/2004	68776	10679	30617	71005	9455	47	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
19	Não Alérgico	DVPS	18/5/2004	75909	29637	127	73570	12176	7	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
20	Não Alérgico	MVAS	28/3/2005	91437	21468	316	136401	25136	31	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
21	Não Alérgico	YASA	6/5/2004	89150	10285	18646	161358	39637	12	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
22	Não Alérgico	AGR	6/4/2005	55065	3560	36763	146026	25068	30	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
23	Não Alérgico	AMSP	27/4/2004	86364	17798	6990	132927	121182	6	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
24	Não Alérgico	AFF	18/3/2004	66217	7119	1925	96674	114450	22	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
25	Não Alérgico	ASA	23/3/2005	64111	24917	1925	108480	87336	17	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
26	Não Alérgico	ND	11/2/2004	77443	27638	6734	30871	28167	27	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
27	Não Alérgico	SASA	27/6/2004	95512	60219	2694	75775	46092	4	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
28	Não Alérgico	WFS	17/12/2004	76211	35996	4040	194923	48653	32	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA
29	Não Alérgico	NML	16/2/2004	75065	11291	4040	102849	33289	3	ADENOIDECTOMIA + TURBINECTOMIA
30	Não Alérgico	PBC	23/1/2004	88957	3058	3108	95763	6237	19	SEPTOPLASTIA + TURBINECTOMIA

## ANEXO A – Aprovação do SEDT Otorrinolaringologia do HC/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte, 05 de outubro de 2004.

Ilma. Sr.

Prof<sup>a</sup>. Maria Elena de Lima Pérez Garcia

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP



Senhora Presidente,

Encaminho aprovação do SEDT Otorrinolaringologia do HC/UFMG referente ao projeto "Estudo clínico-imunológico e pesquisa do perfil das citocinas em pacientes portadores de rinite alérgica" a ser realizado em nosso serviço, com o qual concordamos e nos comprometemos a colaborar.

Atenciosamente,

Prof. Celso Gonçalves Becker  
Coordenador SEDT Otorrinolaringologia HC/UFMG

## ANEXO B – Aprovação do Departamento de Oftalmo/Otorrino e Fonoaudiologia da FM/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ilma. Sra.  
Profa. **Urquiza Helena Meira Paulino**  
Diretora de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas/UFMG

### PARECER

Título do Projeto de Pesquisa:

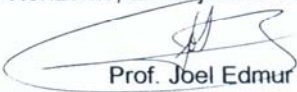
"Estudo clínico-imunológico e pesquisa do perfil das citocinas em pacientes portadores de rinite alérgica"

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Tarcimara Moreira da Silva  
Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

O Chefe do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia da Faculdade de Medicina da UFMG, no uso de suas atribuições, aprovou "Ad-Referendum", o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo clínico-imunológico e pesquisa do perfil das citocinas em pacientes portadores de rinite alérgica", de autoria da Dra. Tarcimara Moreira da Silva e do Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães, a ser desenvolvido no Ambulatório de Otorrinolaringologia - Hospital São Geraldo - HC/UFMG.

Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2004.

  
Prof. Joel Edmur Boteon  
Chefe do Deptº de Oftalmo/Otorrino e  
Fonoaudiologia da FM/UFMG

## ANEXO C – Aprovação do Departamento de Oftalmo/Otorrino e Fonoaudiologia da FM/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ilmo. Sr.  
**Prof. Dirceu Bartolomeu Greco**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

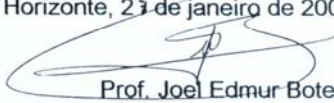
### PARECER

Título do Projeto de Pesquisa:  
"Estudo clínico-imunológico e pesquisa do perfil das citocinas em pacientes portadores de rinite alérgica"

Pesquisadores responsáveis:  
Dra. Tarcimara Moreira da Silva  
Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

O Chefe do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia da Faculdade de Medicina da UFMG, no uso de suas atribuições, aprovou "Ad-Referendum", o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo clínico-imunológico e pesquisa do perfil das citocinas em pacientes portadores de rinite alérgica", de autoria da Dra. Tarcimara Moreira da Silva e do Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães, a ser desenvolvido no Ambulatório de Otorrinolaringologia - Hospital São Geraldo - HC/UFMG.

Belo Horizonte, 23 de janeiro de 2004.

  
Prof. Joel Edmur Boteon  
Chefe do Deptº de Oftalmo/Otorrino e  
Fonoaudiologia da FM/UFMG

## ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 044/04

Interessado: Prof. Dr. Roberto Eustáquio Guimarães  
Faculdade de Medicina - UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 14 de outubro de 2004, após atendida<sup>5</sup> as solicitações à diligência o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo Clínico Imunológico e Pesquisa do Perfil das Citocinas em Pacientes Portadores de Rinite Alérgica** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia  
Presidente do COEP/UFMG

