

Determinação da potência relativa de extratos alergênicos do pólen de *Phleum pratense* através de testes cutâneos

Alessandra dos Santos Bitencourt

Especialização em Alergologia e Imunologia HC – UFPR

Departamento de Pediatria

Hospital de Clínicas

Universidade Federal do Paraná

Orientadores:

Nelson Augusto Rosario Filho

Elizabeth Maria Mercer Mourão

Curitiba - 2014

Sumário

1	Introdução	
1.1	Atopia	3
1.2	Aeroalérgenos.....	3
1.3	Pólen.....	4
1.4	Teste cutâneo.....	5
1.5	Imunoterapia.....	7
1.6	Imunoterapia sublingual.....	10
1.7	Unidades de medida de extratos alergênicos	11
1.8	Contextualização.....	13
2	Objetivos.....	16
3	Material e métodos.....	17
3.1	Aspectos éticos e termo de consentimento.....	17
3.2	Desenho do estudo e amostra da pesquisa.....	17
3.3	Critérios de inclusão.....	18
3.4	Critérios de exclusão.....	19
3.5	Extratos alergênicos.....	20
3.6	Aplicação do teste e leitura dos resultados.....	22
4	Análise estatística.....	24
5	Resultados.....	25
6	Discussão.....	35
7	Conclusão.....	37
8	Referências bibliográficas.....	38

1. Introdução

1.1 Atopia

O termo atopia foi primeiramente descrito por Coca e Cooke em 1923 para descrever um grupo de doenças com resposta de hipersensibilidade tipo 1. [2]

Atopia é uma tendência pessoal ou familiar a produzir anticorpos imunoglobulina E (IgE), em resposta a baixas doses de alérgenos, e desenvolver sintomas típicos de doenças como asma, rinite e dermatite atópica. [3] São também indicadores de atopia: teste cutâneo positivo, presença de IgE específicas séricas, elevação da IgE total e eosinofilia.

1.2 Aeroalérgenos

Alérgenos são substâncias capazes de induzir e reagir com anticorpos IgE específicos que são suficientemente fortes para serem associados à evidência clínica de respostas de hipersensibilidade imediata. [1]

Aeroalérgenos são partículas que induzem reações alérgicas em indivíduos sensibilizados e que podem causar alergia respiratória, cutânea ou conjuntival. [10]

Os aeroalérgenos são alérgenos transportados pelo ar e frequentemente associados a partículas como grãos de pólen, fezes de ácaros, parede fúngica ou secreções de animais. São proteínas ou glicoproteínas relativamente pequenas, altamente solúveis, que se permitem dispersar no muco e em outros fluidos corporais. [1]

A sensibilização a alérgenos depende da genética individual, além dos índices de alérgenos ao qual o indivíduo é exposto e tempo de exposição.

O pólen e os esporos de fungos são os aeroalérgenos mais estudados no meio ambiente devido a maior facilidade de se obter e identificar amostras. [10]

1.3 Pólen

Há mais de 600 gêneros e 10.000 espécies de gramíneas identificadas no mundo. Extratos derivados de pólen de mais de 300 espécies de plantas são manufaturados nos Estados Unidos da América e representam o grupo mais diverso de alérgenos usados na prática médica. [10]

Aproximadamente 60 a 75% dos pacientes com rinite sazonal apresentam teste cutâneo positivo para pólen de ervas, 40% para pólen de gramíneas e 10% para pólen de árvores. [10]

Os grãos de pólen de relevância alergológica são os transportados pelo vento, anemófilos. A transferência dos grãos de pólen dos órgãos produtores masculinos até a estrutura reprodutiva feminina das plantas se denomina polinização. A sensibilização a alérgenos de grãos de pólen pode ocorrer de forma isolada ou associada à sensibilização a outros alérgenos perenes. [1] Dessa forma, as manifestações clínicas podem ocorrer durante todo o ano ou durante a primavera – época da polinização.

No Brasil, a polinização inicia em setembro e pode se estender até janeiro. As variações climáticas e o índice de precipitação pluviométrica controlam a época de polinização e a carga atmosférica do pólen, resultando em modificações na intensidade e no início dos sintomas em cada estação. [7]

Partículas alergênicas são liberadas do citoplasma do pólen por dois mecanismos conhecidos, a difusão rápida em meio isotônico induzindo sintomas alergênicos imediatos nas superfícies mucosas acessíveis – como nasal e conjuntival; e por hidratação em meio hipotônico – como através da água da chuva, que ao reduzir seu tamanho permite o alcance das vias aéreas inferiores induzindo, por exemplo, sintomas de asma. [2]

Várias espécies de gramíneas produtoras de pólen têm sido reconhecidas como alergênicas, entre elas, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* e *Cynodon dactylon*. [1]

O *Phleum pratense* é um pólen de relevância alergênica em regiões de clima temperado. Dentre seus alérgenos se destacam: Phl p 1, Phl p 2 Phl p 5 e Phl p 6. Sendo os grupos 1 e 5, os mais prevalentes na sensibilização de pacientes.

No Brasil, o *Lolium multiflorum*, conhecido como azevém, é a principal gramínea causadora de polinose, especialmente na região sul. Entretanto, em um estudo utilizando anticorpo monoclonal específico, alérgenos do grupo 5 de *Phleum pratense* foram detectados em alguns extratos de gramíneas, incluindo o extrato de *Lolium multiflorum*. [1] Estudos indicam até 95% de homologia entre as gramíneas supracitadas.

Pólenes secos armazenados a menos de 0° C são conhecidos por manter sua atividade alergênica por mais de 10 anos. [10]

1.4 Teste cutâneo

A determinação da sensibilização de um paciente a um determinado alérgeno pode ser realizada através de teste cutâneo, determinação de IgE específica e teste de provocação. Esses métodos se complementam na avaliação da sensibilização alérgica.

Os testes cutâneos de leitura imediata são usados há muitas décadas como forma de identificar a presença de anticorpos IgE específicos para alérgenos. A capacidade de sua fixação na membrana de mastócitos e basófilos é que possibilita a utilização de testes cutâneos. Dessa forma, com a distribuição da IgE nos tecidos fixada a mastócitos é possível provocar uma reação antígeno-anticorpo local, evidenciada pela formação de pápula e eritema, característicos da ação da histamina liberada por mastócitos ativados na reação antígeno-anticorpo IgE. [1]

Os testes cutâneos de leitura imediata se dividem em teste de puntura (prick test) e teste intradérmico. O teste de puntura é o mais específico e apresenta melhor relação com a dosagem de IgE sérica e os testes de provocação, e consiste no padrão ouro no diagnóstico etiológico em doenças alérgicas. É um teste reproduzível, seguro, rápido, simples, bem tolerado e econômico. Há indicação de realizá-lo na avaliação de pacientes com asma, rinite, urticária, alergia alimentar, a medicamentos ou a veneno de insetos.

Drogas como anti-histamínicos e antidepressivos tricíclicos podem inibir os testes cutâneos, devendo ser evitados 2 a 10 dias previamente ao teste, de acordo com a droga.

Em crianças abaixo de 2 anos e adultos acima de 65 anos, se observa uma menor reatividade aos testes cutâneos. [1]

O teste de puntura, descrito por Pepys em 1970, é realizado através do contato da pele com extratos alergênicos glicerinados. Consiste na aplicação de uma gota de cada extrato na pele higienizada, geralmente em região volar do antebraço ou dorso, com uma distância de no mínimo dois centímetros entre cada gotícula; posteriormente se realiza ruptura da camada mais superficial da pele com agulha em ângulo de 45 graus ou puntor específico.

Além do uso do extrato alergênico deve-se realizar um controle negativo com solução salina e um controle positivo com solução de histamina. A leitura é realizada 15 a 20 minutos após início do teste, sendo considerado positivo o teste que apresentar um diâmetro médio da pápula obtida maior que o do controle negativo e maior ou igual a 3 mm. Alguns pacientes podem apresentar uma resposta tardia ao teste após 1 hora, estendendo-se até no máximo 12 horas.

O teste intradérmico consiste na aplicação de 0,02 ml de alérgeno, geralmente na face volar do antebraço, superficialmente. Recomenda-se que seja precedido de um teste de puntura negativo para o mesmo alérgeno. Interpreta-se o resultado como positivo se houver formação de pápula com diâmetro médio maior ou igual a 3 mm, semelhante ao teste de puntura.

As reações adversas aos testes de leitura imediata são mínimas, mas podem variar de reações sistêmicas leves como urticária, a anafilaxia. Dessa forma recomenda-se manter o paciente no mínimo 30 minutos após o teste em observação.

1.5 Imunoterapia

A tolerância imune é essencial para manutenção da homeostase. A numerosa quantidade de antígenos presentes no hospedeiro, especialmente em superfícies mucosas, desafia o sistema imune diariamente. Porém o estímulo normalmente leva a uma tolerância saudável, sem resposta. A intolerância aos antígenos externos ou alérgenos podem desencadear reações de hipersensibilidade que clinicamente se manifestam por rinite, asma, dermatite atópica, alergia alimentar ou anafilaxia. A intolerância a antígenos próprios leva ao desenvolvimento de doenças auto-imunes. Indubitavelmente, a regulação da tolerância é essencial para a vida. [15]

A imunoterapia, introduzida por Noon e Freedman em 1911, é um procedimento efetivo para o tratamento de pacientes com doenças alérgicas mediadas por IgE para alérgenos definidos. [1] Consiste na administração de quantidades crescentes de um determinado extrato alergênico em indivíduos sensibilizados com objetivo de induzir tolerância e reduzir, conseqüentemente, as manifestações clínicas relacionadas à exposição natural do paciente ao alérgeno.

A imunoterapia específica é uma forma de tratamento comprovadamente eficaz nas doenças alérgicas, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS - WAO) desde 1998, consensos americanos, europeus e brasileiros, para o tratamento e prevenção da rinoconjuntivite alérgica, asma alérgica e reações a picadas de insetos. Está ainda indicada nos pacientes com baixa resposta terapêutica ou efeitos colaterais graves a terapia farmacológica empregada. [4]

Classicamente a via de aplicação é subcutânea, entretanto novas vias têm sido estudadas e aplicadas recentemente, como exemplo a via sublingual.

Seus benefícios estão relacionados à redução dos sintomas, da necessidade de uso de medicamentos, melhora na qualidade de vida e excedem o período de tratamento proporcionando longa remissão da doença após interrupção do seu uso. Há, entretanto, limitações que consistem em desconforto na aplicação e necessidade de visitas frequentes ao hospital para aplicação, no caso da imunoterapia subcutânea.

O mecanismo fisiopatológico da imunoterapia específica ainda não é bem estabelecido, porém há dois mecanismos descritos importantes: a reversão do perfil de citocinas das células Th 2 para o perfil Th 1, e o aumento na produção de IL-10 - citocina de efeito imunossupressor que induz a tolerância imunológica específica ao alérgeno. [4] Dentro dos parâmetros imunológicos destacam-se ainda como ações da imunoterapia: redução do número de mastócitos e eosinófilos; redução na liberação de mediadores e produção de citocinas por mastócitos, eosinófilos e basófilos; diminuição da proliferação de linfócitos T induzidos pelo antígeno e de fase tardia; indução na produção de linfócitos T reguladores; diminuição da resposta Ig E específica por linfócitos B; aumento na produção de Ig G4 e Ig A por linfócitos B.

Clinicamente, tais efeitos culminam na remissão da doença por tempo prolongado, melhora clínica, redução da terapia farmacológica e diminuição da resposta ao alérgeno nos testes de puntura e provocação.

A imunoterapia permanece como único tratamento imunomodulador antígeno específico utilizado em humanos capaz de influenciar a resposta imunológica iniciada pelo alérgeno e restabelecer a imunidade normal. [1]

A indicação para imunoterapia consiste em ser portador de uma doença alérgica mediada por IgE, como: rinite e conjuntivite alérgica, asma alérgica e anafilaxia a veneno de insetos, sendo a doença comprovada por história clínica ou teste de provocação com alérgeno. Os alérgenos até o momento disponíveis para o tratamento imunoterápico são de ácaros da poeira, insetos e alguns venenos, pólenes, fungos e epitélio de animais.

Pela especificidade da resposta é no grupo de pacientes monossensibilizados que a imunoterapia tem a maior probabilidade de ser bem sucedida. [1]

É recomendada em crianças a partir de 5 anos de idade. As contraindicações limitam-se ao diagnóstico de asma grave com volume expiratório forçado no primeiro minuto (VEF 1) menor que 70% do previsto, uso de B2 bloqueador e inibidores da enzima conversora de angiotensina, idosos portadores de comorbidades e início durante gestação.

Sua aplicação quando subcutânea é realizada na região lateral do braço, em região posterior do terço médio em um ângulo de 40 graus; e quando sublingual é depositada em região sublingual por 2 minutos e depois deglutida [8]. A imunoterapia sublingual, em caso de apresentação em comprimido, pode ser deixada até completa dissolução em região sublingual, e posteriormente deglutida [11]. O paciente deve ser mantido em observação após aplicação por um tempo mínimo de 30 minutos.

O tratamento se divide em fase de indução – na qual se aplicam doses crescentes do alérgeno até se atingir a dose desejada para manutenção, que consiste na segunda fase, mensalmente administrada. Não há um tempo de tratamento estabelecido para a imunoterapia, devendo esse ser individualizado a cada paciente. Porém, o mínimo de um ano deve ser considerado para se obter uma resposta clínica perceptível e uma manutenção de 3 a 5 anos para efeitos duradouros posteriormente. Os efeitos adversos podem ser locais ou sistêmicos podendo inclusive culminar em morte, portanto devem ser reconhecidos e tratados de imediato.

Efeitos adversos e a longa duração do tratamento imunoterápico são inegavelmente os impactos negativos no uso dessa estratégia terapêutica. Uma rota promissora é a administração de alérgenos por via intralinfática, guiada por ultrassonografia, que podem induzir tolerância com três aplicações. Similarmente, a imunoterapia epicutânea tem se mostrado altamente

imunogênica. Em um estudo recente, de novembro de 2013, de Senti G. e colaboradores, com desenho de estudo placebo controlado e duplo-cego, a segurança e eficácia da imunoterapia epicutânea com gramínea de pólen em pacientes com rinite alérgica foi demonstrada com apenas seis aplicações. [15]

A imunoterapia com alérgenos permanece como o principal procedimento no manejo de desordens alérgicas em longo prazo. [15]

1.6 Imunoterapia sublingual

A imunoterapia oral foi inicialmente proposta como um método de tratamento para doenças alérgicas em 1900. Em 1980, um estudo clínico demonstrou uma resposta dose-dependente com um aeroalérgeno específico e bem caracterizado. Em 1998, a OMS reconheceu a imunoterapia sublingual como um método alternativo e promissor na imunoterapia, e estimulou o seguimento dos estudos clínicos para investigação da técnica. [23]

A eficácia e a segurança desse método em adultos e crianças, apesar da grande heterogeneidade entre os trabalhos, foram confirmadas por metanálises. Porém, ainda faltam mais informações sobre seus mecanismos de ação, doses ótimas e a comparação com a imunoterapia subcutânea convencional. [1]

A segurança se destaca dentre os aspectos positivos, uma vez que seus efeitos adversos são localizados e leves. Suas indicações são semelhantes à imunoterapia subcutânea. As últimas publicações indicam que há evidência de uma boa resposta na alergia ao pólen. [1]

É consenso que a imunoterapia sublingual envolve mecanismos semelhantes à subcutânea, induzindo respostas dirigidas ao linfócito T pelo alérgeno, suprimindo a reação inflamatória alérgica com alterações nos níveis de IgG 4 e indução de células T regulatórias. [1]

Um estudo de BPharm G. e colaboradores, duplo-cego, placebo controlado e randomizado comparou eficácia, segurança e custo das imunoterapias orais Oralair, Grazax e imunoterapia subcutânea para pólen, em pacientes com rinite alérgica sensibilizados por gramínea. A imunoterapia oral Oralair se mostrou o método mais econômico dentre os avaliados, porém não houve diferença entre eficácia e segurança dos métodos comparados. [13]

1.7 Unidades de medidas de extratos alérgênicos

As vacinas de alérgenos são usadas terapêuticamente na regulação negativa dos mecanismos mediados por IgE que causam as doenças alérgicas. Assim como modificam a resposta alérgica exacerbada aos alérgenos que causam essas doenças. [10]

O termo extrato alérgênico refere-se às substâncias obtidas pela extração dos componentes ativos de animais, vegetais ou fungos, que após processamento têm sua alergenicidade reduzida e imunogenicidade mantida. [1]

Extratos alérgênicos são produzidos e vendidos pelo mundo para o diagnóstico e tratamento de doenças mediadas por IgE. Esses extratos são vacinas complexas de materiais biológicos, que incluem proteínas, carboidratos, enzimas e pigmentos. [10]

Para realização adequada da imunoterapia é necessário o uso de extratos padronizados nos quais se conhece potência e componentes relevantes.

A regulação de padronização de extratos do FDA requer que quando um teste de avaliação de potência alérgênica esteja disponível, os produtores devam submeter cada lote ao teste antes de disponibilizá-lo para venda. [10]

A padronização é o processo por meio do qual a potência de determinado extrato pode ser avaliada, comparando-a a amostras-referência com quantidades conhecidas de alérgenos específicos. Embora seja altamente desejável, nem todos os extratos utilizados na prática clínica são padronizados, nesse caso cada produtor deve ter seu controle interno para assegurar um nível aceitável de

comparação a cada novo lote utilizado. Tal controle é referido como produto padrão interno de referência – PPIR. [1]

Nos EUA a regulamentação da padronização dos extratos alergênicos é feita pela CBER (Center for biologics evaluation and research) do FDA (Food and drug administration). Extratos não padronizados são expressos em unidades de nitrogênio protéico ou unidades de peso/volume – com os quais não é possível comparar potência biológica ou composição alergênica dos extratos.

Extratos padronizados são expressos em atividade biológica ou unidades de massa e são passíveis de comparação entre potências. Entretanto, a determinação da potência de um extrato alergênico é complexa, sendo que a maioria das companhias fabricantes se baseia em testes cutâneos ou intradérmicos para determinar sua unidade padrão. [9]

A potência do extrato-referência do CBER é calculada a partir do método ID50EAL, que consiste na aplicação de três diluições crescentes por via intradérmica do extrato que se quer padronizar, em indivíduos fortemente alérgicos à substância testada. A diluição necessária para produzir um halo de 50mm (D50) é obtida para cada indivíduo testado e a média dessas diluições é chamada de D50 média. Um extrato tem potência de 100.000 BAU/ml quando seu D50 é igual a 14. [1]

Na Europa a regulamentação utiliza o teste de puntura em dez diluições crescentes no extrato a ser testado em indivíduos sensibilizados e compara os halos de eritema aos da histamina. Quando esse halo for igual ao produzido pela puntura de uma solução de histamina a 10mg/ml define-se que o extrato apresenta 10.000 BU/ml (Biological Unit) ou 10 HEP/ml (Histamine Equivalent Potency). Essa regulamentação é chamada de “Note for Guidance on Allergen Products”. [1;10] A determinação da quantidade de alérgenos em microgramas por mililitro é de difícil obtenção na descrição da composição dos extratos alergênicos.

Dessa forma, extratos de diferentes fabricantes com a mesma unidade podem não ser idênticos quanto à potência devido à diferença na sensibilização da população selecionada, no número de pacientes testados e nos diferentes métodos empregados.

1.8 Contextualização

Nas duas últimas décadas houve um aumento significativo do uso da imunoterapia sublingual na Europa e um interesse crescente nesta modalidade de tratamento mundialmente.

Em resposta a este interesse, uma força tarefa conjunta do Colégio Americano de Alergia, Asma e Imunologia (ACAAI), da Academia Americana de Alergia, Asma e Imunologia (AAAAI) e os Comitês de Diagnóstico de Imunoterapia e Alergia (JTFSLIT) executaram uma revisão de diversos artigos de imunoterapia sublingual publicados até outubro de 2005. Um ponto crítico encontrado foi a dificuldade de compreensão e comparação entre as diferentes unidades para quantificação dos extratos utilizados pelos fabricantes.

A melhor compreensão das dosagens de extratos é importante não apenas no método sublingual. No mínimo metade das dosagens americanas recomendadas para imunoterapia subcutânea é baseada nos estudos europeus, além das doses correspondentes para extrato americano que são baseadas em medidas de um alérgeno específico de extratos padronizados disponíveis comercialmente e providos pelos fabricantes. Como citado na última atualização da Prática de Parâmetros na Imunoterapia: “extrapolar na prática doses seguras e efetivas pode não ser cientificamente válido”.

Existe uma variação considerável em como a potência de extratos alergênicos é medida e reportada mundialmente. Na Europa, a maioria dos fabricantes reporta a potência de um extrato alergênico com unidades baseadas em referência própria o que dificulta a compreensão da dose exata utilizada.

Mesmo com a tendência de alguns fabricantes em expressarem a potência de seus produtos também em unidades de massa (microgramas do alérgeno dominante), que ainda é unidade arbitrária a ser comparada entre companhias e continentes, as análises e reagentes usados para determinar a quantidade do alérgeno principal também podem variar.

Por isso, o comitê de imunoterapia da Academia Americana de Alergia, Asma e Imunologia vem selecionando uma série de estudos para comparar a qualidade e a potência de extratos europeus e americanos. O primeiro estudo realizado pelo comitê foi uma revisão da potência de extratos alergênicos produzidos na Europa. Na sequência um segundo estudo comparou, *in vitro*, extratos europeus e americanos em diferentes laboratórios americanos cuidadosamente selecionados. A última etapa proposta é a comparação, *in vivo*, de testes de puntura na pele com extratos de manutenção de imunoterapia sublingual. Foram comparados extratos europeus e americano para avaliar medida biológica da sua potência de uma forma mais precisa do que através de testes *in vitro*.

Uma pesquisa extensa, de Dreborg e colaboradores em 2007, validaram testes de puntura e testes intradérmicos para avaliar a potência biológica dos extratos de imunoterapia. O padrão de referência interno (IHRS) de extratos alergênicos europeus é definido pela potência do extrato em testes cutâneos por puntura. Somente o laboratório HAL Allergy utilizou teste intradérmicos para estabelecer seus IHRS. Pesquisadores europeus, entretanto, recomendam o procedimento do FDA-EUA, através de teste intradérmico para estimar a relação de potência entre extratos. Não obstante, o método de puntura por ensaio biológico também é válido para estimar a relação de potência dos extratos.

Nos EUA a potência de extratos alergênicos é definida pelo FDA, avaliando sua potência em reações a testes intradérmicos (padrão biológico).

Neste presente estudo, realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, se optou pelo uso de teste de puntura para avaliação da potência dos extratos alergênicos selecionados.

2. Objetivos

Os objetivos do estudo são comparar em testes de puntura a potência de extratos europeus de *Phleum pratense* em relação ao extrato de referência do FDA e histamina, visando comprovar necessidade de uma padronização das unidades dos extratos disponíveis para imunoterapia e, posteriormente, definição de um ponto de corte na titulação para definição de dose inicial de imunoterapia.

Há interesse prático em se conhecer como os extratos alergênicos europeus de *Phleum pratense* se comparam ao concentrado de referência americano, uma vez que permitirá uma comparação entre as doses utilizadas em diferentes pesquisas clínicas de diferentes países.

O objetivo do estudo se estender ao Brasil é esclarecer se pessoas alérgicas em diferentes partes do mundo reagem igualmente ao mesmo grupo de extratos alergênicos, pois diferenças entre reações aos testes cutâneos poderiam indicar que doses diferentes são necessárias em imunoterapia específica para doenças alérgicas de acordo com a localização geográfica do paciente.

3. Material e métodos

3.1 Aspectos éticos e termo de consentimento

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas, na data de 06 de março de 2012, como emenda ao protocolo versão de 16 de janeiro de 2012, pelo coordenador em vigência no período.

Os pacientes selecionados se tornaram cientes e autorizaram os procedimentos realizados durante a pesquisa através de Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido, igualmente aprovado pelo Comitê de Ética responsável.

Testes cutâneos foram realizados em 15 pacientes alérgicos, selecionados conforme critérios de inclusão e exclusão, com a história clínica sugestiva de alergia a *Phleum pratense* e teste cutâneo de puntura com alta reatividade a este alérgeno.

Este estudo será registrado no endereço eletrônico: www.clinicaltrials.gov, e irá seguir estritamente as seguintes diretrizes para triagens clínicas:

- Declaração de Helsinki (sobre os médicos envolvidos em pesquisa biomédica em pacientes humanos) na sua versão atualizada, estipulada na 52º assembleia geral de Edinburgh, Escócia, em outubro de 2000, como nos comentários da 54º assembleia em Washington, EUA, em 2002 para §29 e 56º assembleia em Tóquio, Japão, 2004 para §30
- ICH (Conferência internacional na harmonização de requerimentos técnicos para registro de farmacêuticos para uso humano) diretrizes para boa prática clínica (ICH tópico E 6, passo 5; CPMP/135/95) maio 1996
- Recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR.

3.2. Desenho do estudo e amostra da pesquisa

Para documentar a potência relativa em testes cutâneos de extratos alergênicos de *Phleum pratense* de diferentes fabricantes o delineamento selecionado foi um estudo transversal, triplo cego, randomizado, multicêntrico e internacional.

Para realização do estudo em amplitude mundial, co-investigadores foram denominados nos países selecionados para o estudo: México (Centro Médico Nacional), Inglaterra (Brighton Medical Center), Estados Unidos da América (Mayo Clinic) e Brasil (Universidade Federal do Paraná). O estudo foi iniciado em 2009 e não foi concluído até o momento. O mesmo processo de seleção e testes foi realizado nos países participantes.

Posteriormente a coleta de dados, todo o material disponível da pesquisa será enviado à Alemanha, University Clinic Köln A. ö. R., Cologne, e Center of investigation and statistics, University Clinic, Aachen, para análise estatística.

Os pacientes foram selecionados através de notificação eletrônica via INTRANET (sistema eletrônico do Hospital de Clínicas - UFPR), solicitando recrutamento de indivíduos com sintomas típicos de rinite durante o período da primavera; notificação também aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital.

3.3 Critérios de inclusão

1. Pacientes cientes e concordantes sobre os procedimentos através do preenchimento do termo de consentimento informado
2. Pacientes de qualquer sexo ou raça, com idade entre 18 e 55 anos
3. Histórico clínico compatível com possível alergia ao pólen
4. Resultado positivo para teste de puntura (≥ 8 mm diâmetro de pápula) para *Phleum pratense* com extrato para diagnóstico (10.000AU/mL).
5. Eliminação temporária de medicação que possa interferir com os resultados de testes cutâneos de acordo com a seguinte tabela:

Cetotifeno	30 dias
------------	---------

Astemizol	50 dias
Fexofenadina	7 dias
Mequitazina	7 dias
Cetirizina	7 dias
Loratadina	7 dias
Mizolastina	7 dias
Corticóide tópico ou inibidor de calcineurina na área de teste cutâneo	7 dias

Determinou-se que anti-histamínicos de primeira geração e antidepressivos tricíclicos deveriam ser suspensos até sete dias antes do procedimento de teste cutâneo.

3.4 Critérios de exclusão

1. Espirometria com VEF₁ abaixo de 80% do valor normal predeterminado
2. Gravidez ou pacientes femininos sem prática contraceptiva aceitável
3. Pacientes com histórico de anafilaxia ou reações alérgicas graves
4. Necessidade de anti-histamínicos para controlar sintomas
5. Administração de corticóide nos últimos 15 dias, ou de ação prolongada nos últimos 90 dias
6. Portadores de dermatite atópica ativa
7. Uso de medicação psicotrópica
8. Hiperreatividade cutânea - controle negativo superior a 3 mm de diâmetro ou tendência a urticária
9. Pacientes em vigência de imunoterapia ou com história de realização nos últimos 5 anos

Como critério de eliminação considerou-se a presença de algum evento adverso ou mais de três semanas de intervalo entre as duas sessões.

- | | | |
|----|-------|-----------------|
| 1. | Dil3 | 1 frasco de 2mL |
| 2. | Dil10 | 1 frasco de 2mL |
| 3. | Dil30 | 1 frasco de 2mL |

B. ALK-Abelló Denmark Grazax 75,000 SQ-T

(dissolvido em 1ml de glicerina 50%)

- | | | |
|----|-------------|-----------------|
| 0. | concentrado | 1 frasco de 2mL |
| 1. | Dil3 | 1 frasco de 2mL |
| 2. | Dil10 | 1 frasco de 2mL |
| 3. | Dil30 | 1 frasco de 2mL |

C. Stallergènes Paris (Staloral 300IR/mL) of *Phleum pratense*

- | | | |
|----|-------------|-----------------|
| 0. | concentrado | 1 frasco de 2mL |
| 1. | Dil3 | 1 frasco de 2mL |
| 2. | Dil10 | 1 frasco de 2mL |
| 3. | Dil30 | 1 frasco de 2mL |

D. Stallergènes Paris Oralair 300IR

(dissolvido em 1ml de glicerina 50%)

- | | | |
|----|--------------|-----------------|
| 0. | concentrado: | 1 frasco de 2mL |
| 1. | Dil3 | 1 frasco de 2mL |
| 2. | Dil10 | 1 frasco de 2mL |
| 3. | Dil30 | 1 frasco de 2mL |

E. CBER/FDA aprovado: 10.000 BAU/mL extrato glicerinado de *Phleum pratense*

- | | | |
|----|-------------|-----------------|
| 0. | concentrado | 1 frasco de 2mL |
| 1. | Dil3 | 1 frasco de 2mL |
| 2. | Dil10 | 1 frasco de 2mL |
| 3. | Dil30 | 1 frasco de 2mL |

- Controle negativo (solução salina): 2 frascos com conta gotas de 3 mL
- Controle positivo (histamina 10%): 2 frascos com conta gotas de 3 mL

A cada dia de teste de punção, as diluições foram feitas de frascos do concentrado. Para manter a atividade biológica dos extratos, eles foram mantidos a temperatura entre +2 e +8°C na geladeira e retirados somente durante a aplicação dos testes. No término de cada dia de teste de punção os frascos com as diluições foram descartados.

3.6 Aplicação do teste e leitura dos resultados

Os 15 pacientes que preencherem os critérios de inclusão e exclusão foram marcados com números em ordem consecutiva, como registrados no protocolo. O número consiste de 3 dígitos: o primeiro número indica o local do estudo, os próximos dois números indicam registro do paciente. Este numeral foi escrito em toda documentação do estudo e serve como identificação juntamente com as iniciais do nome do paciente.

Os extratos alergênicos de *Phleum pratense* de diferentes fontes e diluições foram selecionados de forma cega e aplicados em lados opostos do dorso do indivíduo. Entretanto foi conhecida qual das três vias formam pares de diluição em cada linha de extratos. Os frascos de concentrados (A-E) e os controles negativos e positivos foram mantidos em códigos e revelados, apenas, ao final do estudo.

O código dos frascos foi disponibilizado num envelope fechado para o coordenador geral do estudo, para o principal investigador de cada centro e para o responsável pela análise estatística.

No caso de um evento adverso relacionado à administração do material de teste cutâneo, qualquer decisão de abrir o código poderia ser tomada pela equipe de monitoramento de segurança do estudo.

Visando se obter resultados mais confiáveis, antes de iniciar os testes de puntura com os extratos em estudo, o técnico designado para aplicação dos testes foi submetido a um treinamento. O teste de proficiência consiste na aplicação alternada de histamina e solução salina no antebraço do paciente. Ambas, histamina e salina são aplicadas dez vezes e a média do diâmetro da pápula é usada para calcular o coeficiente de variação que não deve ser superior a 20%. A concentração de histamina usada normalmente dá um diâmetro da pápula em torno de 6 mm (intervalo de 4 a 8 mm aceitável). O teste é repetido até que o técnico seja aprovado.

Os testes de puntura para cada extrato concentrados e diluídos foram aplicados quadruplicamente – dois lados do dorso em dois dias não consecutivos. O aplicador do teste soube somente quais são os controles positivos e negativos, assim como os frascos que não são diluídos, ou seja, os concentrados. Além disso, o controle negativo foi usado para confirmar a reatividade da pele do paciente, conforme descrito nos critérios de inclusão.

Os resultados foram avaliados após 15 minutos pelo contorno da pápula e eritema com caneta porosa e transferidos com adesivo transparente para uma folha branca de papel. Esse método, utilizando a fita adesiva, é padrão ouro no registro de testes cutâneos, utilizado em diversos estudos.

Após 7 a 15 dias, durante a segunda sessão, a mesma rotina foi estabelecida e todo o teste foi repetido, para conseguir o total de quatro repetições.

4.0 Análise estatística

Optou-se por uma análise estatística preliminar, apenas dos dados obtidos no Brasil. Uma vez que os dados dos demais países ainda não se encontram disponíveis para comparação.

A análise estatística foi realizada através do programa Statistica 8.0. Foi determinada a normalidade das variáveis e utilizados testes paramétricos e não paramétricos, de acordo a distribuição encontrada.

Em estudo anterior de 30 pacientes por grupo a reprodutibilidade intra-individual dos testes de puntura foi alta. As diferenças entre as potências dos extratos foram confirmadas pelos valores de p abaixo de 0,01. Dado a condição experimental desta triagem, com comparações intra-individuais dos quatro extratos alergênicos, uma amostra de 15 pessoas por centro é apropriada. Com a repetição de medidas em todos os indivíduos isto corresponderia a uma amostra inter-individual de aproximadamente 60 pacientes por centro ou 240 pacientes no total para comparações de extratos.

5.0 Resultados

Foram analisados testes cutâneos por puntura de 15 pacientes, com histórico compatível com alergia ao pólen.

Esses pacientes realizaram duas visitas ao serviço de referência e foram submetidos aos testes no dorso à esquerda e direita, com padrão em duplicata, dos extratos analisados em suas diluições padronizadas pelo estudo.

Os dados obtidos foram submetidos à mensuração manual, em régua milimetrada, por um único examinador. Foram avaliadas média, desvio-padrão, mediana e intervalo de confiança de todos os dados, conforme tabela 1 e 2. Considerou-se um resultado estatisticamente significativo quando o valor obtido de $p < 0,05$.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os testes realizados no primeiro e segundo dia, com utilização do Teste t de Student pareado, com $p = 0,37$ na comparação dos extratos concentrados, $p = 0,20$ na comparação entre os extratos na diluição 3 e $p = 0,33$ na comparação entre os extratos na diluição 10. Para comparação entre os extratos na diluição 30, foi utilizado o teste de Wilcoxon, com $p = 0,30$.

Não houve diferença entre os testes realizados no dorso à direita e esquerda, baseado no teste Anova Fatorial com $p = 0,97$. (Gráficos 1 e 2)

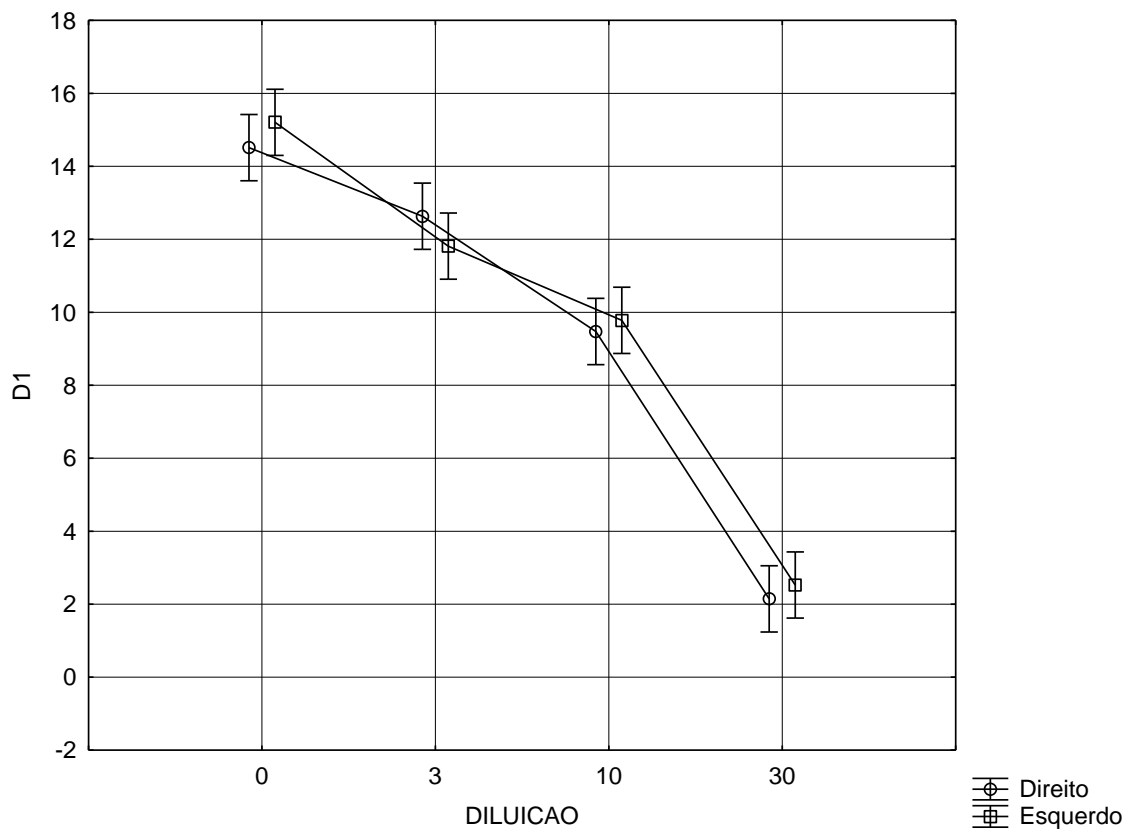


Gráfico 1

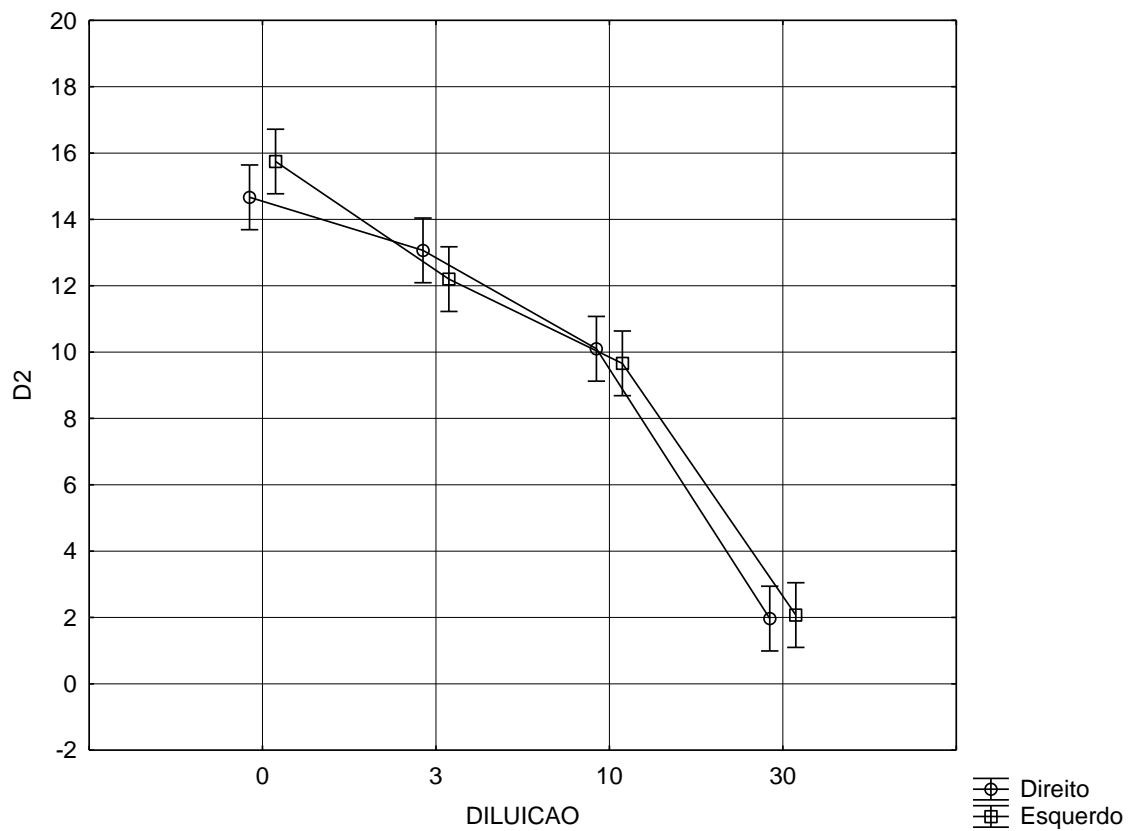


Gráfico 2

Considerou-se as médias como valores de referência para comparação dos extratos concentrados, na diluição 3 e 10, devido a distribuição simétrica das variáveis. Já na diluição 30, considerou-se a mediana como valor de referência para comparação, devido distribuição assimétrica das variáveis e tendência à zero.

Na avaliação de dados do primeiro dia de testes:

A média obtida das pápulas do extrato A concentrado foi de 15,9 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 12,7 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 9,7mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

A média obtida das pápulas do extrato B concentrado foi de 12,8 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 10,3 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 8,4 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 5 mm.

A média obtida das pápulas do extrato C concentrado foi de 16,5 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 13,5 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 12,6 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

A média obtida das pápulas do extrato D concentrado foi de 13,3 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 11,3 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 8,7 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

A média obtida das pápulas do extrato E concentrado foi de 15,7 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 13,2 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 8,7 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

Na comparação entre os extratos concentrados, os resultados obtidos foram semelhantes no extrato A, C e D. O extrato B na diluição 3, o extrato C na diluição 10 e o extrato A na diluição 30 foram diferentes dos demais na comparação entre todos os extratos. Nas variáveis com distribuição simétrica foi utilizado o teste paramétrico Anova. Nas variáveis com distribuição assimétrica foi utilizado o teste não-paramétrico Anova de Kruskal-Wallis.

Ao se avaliar os extratos A, B, C, D e E, concentrados, se obteve $p = 0,006$. Portanto, estatisticamente significativo, indicando que houve diferença entre os grupos na comparação entre as médias das pápulas obtidas. Na diluição 3 se obteve $p = 0,01$, estatisticamente não significativo, indicando que não houve diferença entre os grupos nessa diluição. Na diluição 10 e 30 se obteve $p < 0,001$, estatisticamente significativo, mostrando diferença de potência entre os extratos na mensuração das pápulas.

Ao se comparar a potência dos extratos no primeiro dia de teste, em relação ao diâmetro das pápulas obtidas, no grupo do extrato concentrado os extratos mais potentes em ordem decrescente foram C, A, E, D e B. Sendo dessa forma, o extrato C o mais potente avaliado no teste de extratos concentrados no primeiro dia, e o extrato B o menos potente dentre os extratos avaliados. Na diluição 3 a potência se manifestou da seguinte forma em ordem decrescente: C, E, A, D e B. Na diluição 10 a potência em ordem decrescente foi: C, A, D = E e B. Na diluição 30 a potência em ordem decrescente foi: B, E, D, C e A.

Tabela 1.

TABELA 1 - MENSURAÇÃO DAS PÁPULAS (mm) NO D1						
MÉDIA + DESVIO PADRÃO MEDIANA (MÍNIMO E MÁXIMO) INTERVALO DE CONFIANÇA 95%						
EXTRATOS						
DILUIÇÃO	A	B	C	D	E	
(C)	15,9 + 4,9 15,7 (6,5 - 27,0) IC = 14,1 - 17,8	12,8 + 3,9 12,5 (5,5 - 21,0) IC = 11,4 - 14,3	16,5 + 6,2 16,0 (7,5 - 36,0) IC = 9,0 - 23,7	13,3 + 4,1 12,5 (6,5 - 24,0) IC = 9,0 - 18,7	15,7 + 4,4 16,7 (5,5 - 21,5) IC = 14,1 - 17,4	0,006*
1:3	12,7 + 4,4 13,2 (6,0 - 21,0) IC = 11,0 - 14,4	10,3 + 2,8 10,5 (3,5 - 17,0) IC = 9,3 - 11,4	13,5 + 4,3 13,0 (6,5 - 25,5) IC = 11,9 - 15,1	11,3 + 3,9 10,5 (5,0 - 19) IC = 9,9 - 12,8	13,2 + 4,4 12,2 (5,0 - 24) IC = 11,5 - 14,8	0,01*
1:10	9,7 + 2,6 9,0 (5,0 - 16,0) IC = 8,7 - 10,6	8,4 + 2,1 8,0 (4,5 - 14,5) IC = 7,7 - 9,2	12,6 + 4,8 11,7 (6,0 - 26,5) IC = 7,0 - 18,0	8,7 + 2,3 8,5 (4,0 - 14) IC = 7,8 - 9,6	8,7 + 2,4 8,5 (5,0 - 14) IC = 7,8 - 9,6	< 0,001*
1:30	0,4 + 1,5 0,0 (0,0 - 6,0) IC = (0 - 0)	4,1 + 3,8 5,0 (0,0 - 11,0) IC = 0,0 - 9,2	1,9 + 2,8 0,0 (0,0 - 8,0) IC = 0,0 - 6,5	2,5 + 3,4 0,0 (0,0 - 9,0) IC = 0,0 - 7,5	2,8 + 3,7 0,0 (0,0 - 10) IC = 0,0 - 7,7	< 0,001**

Histamina = 9,9 + 2,5 (IC 95% = 8,9 - 10,8) Mediana = 9,5 (6,0 - 20,0) IC = 7,5 - 12,2

* Anova ** Anova de Kruskal-Wallis

Na avaliação de dados do segundo dia de testes:

A média obtida das pápulas do extrato A concentrado foi de 16,7 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 14,3 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 9,8 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

A média obtida das pápulas do extrato B concentrado foi de 12,4 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 10,5 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 8,7 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 6 mm.

A média obtida das pápulas do extrato C concentrado foi de 17,9 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 13,7 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 11,4 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

A média obtida das pápulas do extrato D concentrado foi de 14,3 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 12 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 8,7 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

A média obtida das pápulas do extrato E concentrado foi de 14,6 mm, na diluição 3 a média obtida foi de 12,5 mm, na diluição 10 a média obtida foi de 10,5 mm e na diluição 30 a mediana obtida foi de 0 mm.

Na comparação entre os extratos concentrados, os resultados obtidos foram semelhantes nos extratos A e C. O extrato B na diluição 3, foi diferente dos demais na comparação entre todos os extratos. Nas variáveis com distribuição simétrica foi utilizado o teste paramétrico Anova. Nas variáveis com distribuição assimétrica foi utilizado o teste não paramétrico Anova de Kruskal-Wallis.

Ao se avaliar os extratos A, B, C, D e E, concentrados, se obteve $p = 0,001$, portanto estatisticamente significativo, indicando que houve diferença entre os grupos na comparação entre as médias das pápulas obtidas. Na diluição 3 se obteve $p = 0,01$, estatisticamente não significativo, indicando que não houve diferença entre os grupos nessa diluição. Na diluição 10 se obteve $p = 0,006$, estatisticamente significativo, mostrando diferença de potência entre os extratos na mensuração das pápulas. Assim como na diluição 30 com $p < 0,001$.

Ao se comparar a potência dos extratos no segundo dia de teste, em relação ao diâmetro das pápulas obtidas, no grupo do extrato concentrado os extratos mais potentes em ordem decrescente foram C, A, E, D e B.

Conforme encontrado no primeiro dia de testes. Sendo dessa forma, o extrato C o mais potente avaliado no teste de extratos concentrados, e o extrato B o menos potente dentre os extratos avaliados.

Na diluição 3 a potência se manifestou da seguinte forma em ordem decrescente: C, A, E, D e B. Na diluição 10 a potência em ordem decrescente foi: C, E, A e D = B. Na diluição 30 a potência em ordem decrescente foi: B, C, D, E e A.

Tabela 2.

TABELA 2 - MENSURAÇÃO DAS PÁPULAS (mm) NO D2						
DILUIÇÃO	EXTRATOS					
	A	B	C	D	E	
(C)	16,7 + 5,8 16,0 (7,5 – 30,0) IC = 9,5 – 26,0	12,4 + 4,0 11,7 (7,0- 24) IC = 10,9 – 13,9	17,9 + 6,0 16 (9,5 – 37) IC = 15,6 – 20,1	14,3 + 5,2 14 (6,5 – 32) IC = 12,4 – 16,3	14,6 + 4,9 13,5 (7,0- 28) IC = 12,7 – 16,4	0,001
1:3	14,3 + 5,0 12,7 (8 – 25) IC = 12,4 – 16,1	10,5 + 3,5 9,7 (5,5 – 18,5) IC = 9,2 – 11,8	13,7 + 4,8 13,7 (7,0-26,5) IC = 11,9 – 15,5	12,0 + 4,5 10,7 (6,5 – 26) IC = 10,3 -13,7	12,5 + 4,4 11,5 (5,0 -23,5) IC = 10,8- 14,2	0,01
1:10	9,8 + 3,4 9,2 (5,5 – 21) IC = 8,5 -11,1	8,7 + 2,5 8,7 (5,0 – 13,5) IC = 7,8 -9,7	11,4 + 3,8 10,5 (5,0 – 19) IC = 10 -12,8	8,7 + 2,7 8,5 (5,0 – 16,5) IC = 7,7 -9,7	10,5 + 3,6 9,7 (6,5 – 20,5) IC = 9,1 - 11,8	0,006
1:30	0,4 + 1,5 0 (0 – 6,5) IC = 0 - 0	5,0 + 3,5 6,0 (0,0 – 12,0) IC = 0-8,5	2,4 + 3,1 0 (0 - 8,5) IC = 0- 7,0	1,3 + 2,7 0 (0 -9,0) IC = 0 -6,7	0,98 + 2,2 0 (0 -6,0) IC = 0 – 6,0	< 0,001

Histamina: Média 9,9 + 2,3 (IC = 9,0 – 10,7) Mediana = 9,5 (6,5 – 15,0) IC = 7,2 – 13,0

A média obtida das punturas com histamina no primeiro e segundo dia foi de 9,9 mm.

No primeiro dia de testes, avaliando-se a frequência de reações negativas e positivas, nos extratos concentrados obteve-se 6% de reações negativas - com diâmetro médio menor que 8 mm, e 94% de reações positivas - com diâmetro médio maior ou igual a 8 mm. Na diluição 3 obteve-se 12% de reações negativas e 88% de reações positivas. Na diluição 10 obteve-se 30% de reações negativas e 70% de reações positivas. Na diluição 30 obteve-se 92% de reações negativas e 8% de reações positivas.

No segundo dia de testes, nos extratos concentrados obteve-se 4,6% de reações negativas, e 95% de reações positivas. Na diluição 3 obteve-se 10,6% de reações negativas e 89,3% de reações positivas. Na diluição 10 obteve-se 31,3% de reações negativas e 68,7% de reações positivas. Na diluição 30 obteve-se 94% de reações negativas e 6% de reações positivas.

Conforme demonstrado no gráfico 3, se observa a união de todas as aferições em um único grupo por extrato, com a redução progressiva do diâmetro médio mensurado das pápulas de acordo com a diluição gradual dos extratos e redução da sua concentração.

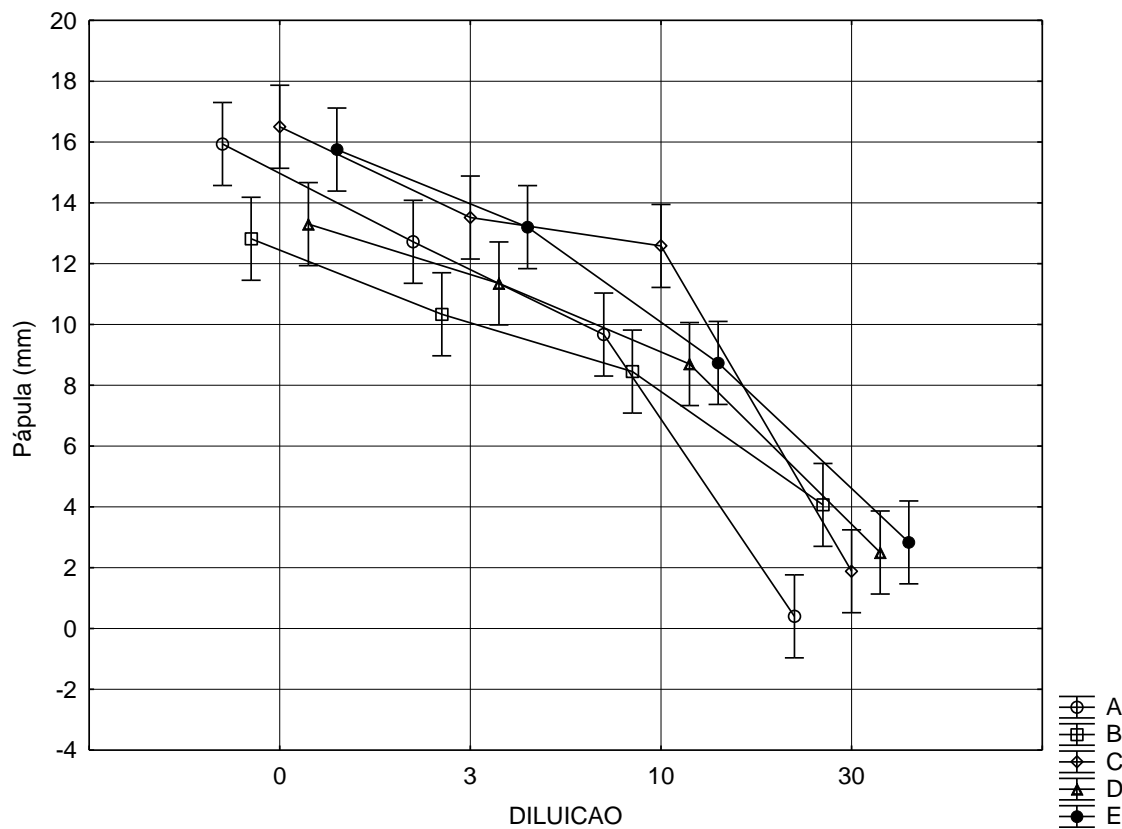


Gráfico 3

6.0 Discussão

Devido ao aumento significativo da incidência das doenças alérgicas nos últimos anos, a melhor compreensão de sua causa e mecanismos é de extrema importância. [15]

A imunoterapia é baseada na administração de doses crescentes do alérgeno identificado como causal, visando reduzir a reatividade de pacientes alérgicos; além de ser o único tratamento com objetivo de tratar a causa e não os sintomas da alergia respiratória. [11]

A indução terapêutica de tolerância pode restaurar a imunidade em condições como desordens alérgicas e autoimunes. A imunoterapia é um dos melhores exemplos para ilustrar a indução de tolerância por antígenos externos. [15]

A eficácia da imunoterapia oral na rinite alérgica e asma foi demonstrada em diversas metanálises, incluindo subpopulações pediátricas. [11]

Dessa forma, a padronização dos extratos alergênicos é um tema de extrema relevância na alergologia, uma vez que permite ao médico atuante tomar a melhor decisão na escolha do extrato, de acordo com a sensibilização do paciente.

A ausência de uma unidade comum aos extratos disponíveis mundialmente dificulta uma adequada comparação da potência dos mesmos.

Portanto, o estudo realizado se propôs a comparar os extratos comercialmente disponíveis, em centros de referência mundiais, que em teoria deveriam ter a mesma eficácia na melhora clínica do paciente com sensibilização a determinados alérgenos, sem controle de sua doença.

Os extratos comparados são de apresentação líquida e em comprimido.

Os resultados obtidos mostraram que há diferença estatisticamente significativa ao se comparar por teste de puntura os extratos alergênicos

disponíveis para imunoterapia oral. A determinação de relação causal entre concentração em microgramas de alérgenos por mililitro e diâmetro de reação cutânea obtida, não se aplica, uma vez que não se tem informações precisas de metodologia de preparo e obtenção dos extratos. Além disso, conforme se observou o extrato com maior concentração de *Phleum pratense* por mililitro - o extrato do FDA, não apresentou reações proporcionalmente maiores, embora já diluído em 50%.

Na avaliação dos extratos pode se dizer que a potência, com base no teste de puntura com extratos concentrados, apresentados em ordem decrescente, ou seja do mais potente ao menos potente, foram: Staloral, Soluprick, FDA, Oralair e Grazax. Comprovadamente obtidos no primeiro e segundo dia de testes, e a direita e esquerda no dorso dos pacientes (quaduplicata). Mostrando dessa forma que há, sim, uma diferença de potência entre os extratos disponíveis para imunoterapia e, portanto, poderá gerar uma diferença na resposta clínica individual do paciente.

Essa diferença comprova a necessidade de padronização, como no estudo de Zavadniak e colaboradores, que comparou nível de alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* em microgramas por mililitro e encontrou níveis insuficientes para alcançar doses efetivas preconizadas internacionalmente para imunoterapia. [21]

Os benefícios que os pacientes obterão deste estudo, quando plenamente concluído a nível mundial, são indiretos na maioria dos casos. Os resultados finais do estudo pretendem estabelecer a dose ótima administrada em imunoterapia sublingual para alérgenos, especialmente porque essa terapia se encontra em ascensão no Brasil. Os resultados podem ser estendidos a esta modalidade de tratamento amplamente empregada no país, inclusive no HC-UFPR.

7.0 Conclusão

É importante se garantir a qualidade de extratos alergênicos visando segurança e eficácia do tratamento imunoterápico. Além de que a padronização dos mesmos permite uma redução na frequência e gravidade das reações sistêmicas secundárias a imunoterapia.

Na comparação entre a potência dos extratos, em sua grande maioria, houve uma diferença estatisticamente significativa.

Isso determina que exista uma variabilidade de potência nos diversos extratos disponíveis comercialmente e, conseqüentemente, na resposta clínica no tratamento das doenças alérgicas.

Dessa forma, há necessidade de uma padronização de unidade de extratos alergênicos, visando uma resposta semelhante e confiável, de acordo com a preferência comercial do médico assistente, no tratamento do paciente alérgico.

8.0 Referências bibliográficas

1. Solé D., Bernd L., Rosario N., Tratado de alergia e Imunologia Clínica, São Paulo, 2011
2. Bernandes C. Alérgenos de Pólen de *Lolium multiflorum*: determinação da reatividade cruzada de anticorpos IgE aos componentes alergênicos de extratos comerciais de gramíneas. Universidade Federal de Uberlândia, 2007
3. Johansson et al, 2001
4. Seba J., Rosario N., França A., Guia prático de utilização de extratos alergênicos para fins diagnósticos e terapêuticos nas doenças alérgicas, 2014
5. Dreborg et al, Standardization of Allergen Extracts. Allergy Methods and Protocols Methods in Molecular Medicine, 2008
6. Canonica et al. World Allergy Organization Journal 2014 7:6 doi:10.1186/1939-4551-7-6
7. Rosario N. Polinose em Curitiba: apresentação de 21 casos. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia. Janeiro a setembro, 1986
8. Mailhol C., Didier A. Specific immunotherapy in grass pollen allergy. Human Vaccines and Immunotherapeutics. October, 2012
9. Larsen J., Lowenstein H., An overview of allergen extracts. Uptodate. April, 2014
10. Adkinson et al, Middleton's Allergy Principles and Practice, 6th edition, 2003, Volume 1
11. Pastorello et al, 5-grass pollen tablets achieve disease control in patients with seasonal allergic rhinitis unresponsive to drugs: a real-life study. Journal of Asthma and Allergy, June 2013
12. FDA allergenic. Workshop em diagnóstico e imunoterapia em alergia, Maio, 2014
13. BPharm G., Ellis A., Sublingual or subcutaneous immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: an indirect analysis of efficacy, safety and cost. Journal of Evaluation in Clinical Practice. December, 2013
14. Nelson H. SCIT: Preparation of allergen extracts for therapeutic use. Uptodate. April, 2014
15. Kucuksezer et al. Mechanisms of immune tolerance to allergens in children. Korean Journal Pediatrics. November, 2013
16. Motta et al. Testes cutâneos. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia. Maio, 2005.

17. FDA. Guidance for Industry, On the Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment Description Information for an Allergenic Extract or Allergen Patch Test. April, 1999
18. ALK. PRODUKTKATALOG. September, 2013
19. Mourão E. Testes de provocação conjuntival na avaliação de hiperreatividade ocular específica e inespecífica. Universidade Federal do Paraná, 2010
20. BGFA – Research Institute of Occupational Medicine. Allergen content of grass-pollen preparations for skin prick test and for sublingual immunotherapy
21. Zavadniak A. F. Verificação da potência de extratos alergênicos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, 2004
22. Zavadniak A. F. Comparação de dispositivos para testes cutâneos alérgicos por puntura e variação na leitura da reação cutânea por diferentes observadores. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, 2003
23. Creticos P. et al. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. Uptodate. September, 2014.