



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

### **Rinite alérgica, imunoterapia e biomarcadores**

Pedro Silva Nunes

---

**MAIO'2019**

**U**

**LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

### **Rinite alérgica, imunoterapia e biomarcadores**

Pedro Silva Nunes

**Orientado por:**

Dr. Marco António Alveirinho Cabrita Simão

---

**MAIO'2019**

## Resumo

A rinite alérgica é uma doença muito frequente na prática clínica em otorrinolaringologia, estimando-se que 1 em cada 5 pessoas sofram da doença. Causa sintomas como congestão e prurido nasal, rinorreia aquosa e crises esternutatórias, sendo que o tratamento habitual é sintomático, passando por anti-histamínico oral e corticoide nasal. Com a imunoterapia é possível modificar a história natural da doença, pois é um tratamento que atua no problema de base, alterando os mecanismos imunopatológicos associados, induzindo tolerância ao alergénio e aliviando os sintomas no longo termo. É então necessário investigar biomarcadores que prevejam a progressão da doença e resposta imune antes e depois do tratamento, avaliem eficácia, segurança e adesão, assim como sirvam para estabelecer um prognóstico clínico. Compreender os mecanismos fisiopatológicos por detrás da rinite alérgica facilita a identificação de possíveis biomarcadores e novas formas terapêuticas. A imunoterapia incita uma mudança de resposta Th2 para Th1, induzindo células Treg e Breg, associando-se a uma produção de IgG<sub>4</sub> competindo com IgE específica para o alergénio e diminuindo os sintomas alérgicos. Destacam-se a nível de previsão da resposta clínica, a razão sIgE/tIgE e a medição no soro da atividade inibitória para IgE, como IgE-FAB, sendo biomarcadores promissores neste âmbito. Os elevados níveis de IgG<sub>4</sub> mostram mais interesse como biomarcador de adesão ao tratamento do que de prognóstico clínico. O estudo de células dendríticas utilizando RT-PCR revelou-se promissor, mostrando correlação clínica e sendo possível separar doentes que respondem ou não respondem, à imunoterapia. Contudo, até à data, nenhum biomarcador foi ainda aprovado para uso na prática clínica, mas existe, no entanto, uma constante investigação na área, sendo que é necessária mais evidência a corroborar a sua utilidade, tanto durante a imunoterapia, como após descontinuação.

**Palavras-chave:** rinite alérgica, imunoterapia, biomarcadores, mecanismo, investigação.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

## Abstract

Allergic rhinitis is very frequently seen in clinical practice amongst otorhinolaryngologists, with an estimation of 1 person in 5 being affected. It causes symptoms such as nasal congestion and pruritus, watery rhinorrhea and sneezing, whose treatment frequently is symptomatic, with the use of oral anti-histamines and intranasal corticoids. With immunotherapy it is possible to change the natural progression of the disease because it is a treatment that focuses on the base of the problem, modifying the immunopathologic mechanisms underlying the condition, and inducing long term allergen tolerance, improving symptoms. Therefore, it is necessary to investigate biomarkers that can evaluate efficacy, safety, treatment compliance and predict disease progression and immune response before and after immunotherapy. Understanding the pathophysiologic mechanisms behind allergic rhinitis facilitates the identification of biomarkers and novel therapies. Immunotherapy promotes a shift from a Th2 to a Th1 response, inducing Treg and Breg cells, associated with the production of IgG<sub>4</sub>, competing with allergen specific IgE, thus decreasing allergy symptoms. At predicting clinical outcome both sIgE/tIgE and a measurement of serum inhibitory activity for IgE such as IgE-FAB stand out as promising biomarkers. High levels of IgG<sub>4</sub> show more interest as biomarker for treatment compliance rather than clinical outcome. The study of dendritic cells using RT-PCR was promising, exhibiting clinical correlation and separating immunotherapy responders from non-responders. However, so far, no biomarkers were approved for use in clinical practice, but there is, nonetheless, a constant research in this field, with need of more evidence to reinforce its utility during and after discontinuation of immunotherapy.

**Keywords:** allergic rhinitis, immunotherapy, biomarkers, mechanism, investigation.

# Índice

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>A RINITE ALÉRGICA</b> .....	<b>6</b>
EPIDEMIOLOGIA .....	6
CUSTO ECONÓMICO DA RINITE ALÉRGICA .....	6
CLASSIFICAÇÃO DA RINITE ALÉRGICA .....	7
FISIOPATOLOGIA .....	8
RELAÇÃO COM A ASMA.....	10
DIAGNÓSTICO .....	10
TRATAMENTO .....	11
<b>IMUNOTERAPIA NA DOENÇA ALÉRGICA</b> .....	<b>12</b>
<b>BIOMARCADORES NA IMUNOTERAPIA DA RINITE ALÉRGICA</b> .....	<b>14</b>
IMUNOGLOBULINAS .....	16
ATIVACÃO DE BASÓFILOS .....	18
CITOCINAS .....	19
BIOMARCADORES CELULARES.....	19
BIOMARCADORES <i>IN VIVO</i> .....	21
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>24</b>

## Introdução

A rinite alérgica é uma doença muito presente na prática clínica, que pode ou não vir associada a asma. É de facto tão habitual, que se estima que 1 em cada 5 pessoas sofram de rinite alérgica, afetando a qualidade de vida das mesmas e acumulando custos económicos para a sociedade (1).

A rinite alérgica é essencialmente uma doença IgE mediada, causando clássicos sintomas de congestão e prurido nasal, crises esternutatórias e rinorreia aquosa (2). É comum o tratamento sintomático à base de corticoide nasal e/ou anti-histamínico oral, no entanto, a imunoterapia, que foi introduzida há mais de 100 anos por Leonard Noon, é uma forma de tratamento que pode mudar o curso natural da doença pois interfere com os mecanismos imunopatológicos, de maneira que é uma área de elevado interesse, não só para a rinite alérgica em si, mas também para outras alergias.

Surge então a necessidade de procurar biomarcadores no tratamento com imunoterapia, que possam fornecer um prognóstico clínico, prever a progressão da doença e resposta imunológica antes e após tratamento, avaliar a eficácia, segurança e adesão ao tratamento. Este artigo de revisão da literatura, pretende abordar a rinite alérgica e incidir na imunoterapia e estudo de biomarcadores, e as suas possíveis aplicações no tratamento da rinite alérgica.

# A rinite alérgica

## **Epidemiologia**

A rinite alérgica é uma doença altamente frequente, tratando-se de um problema transversal a todos os países e continentes, sendo uma patologia global presente em todo o planeta. A prevalência da rinite alérgica é descrita com valores entre 10-30% em adultos, no entanto estes números refletem incerteza na medida em que muitos estudos efetuados possuíam limitações em termos da população selecionada para a amostra, assim como restrições geográficas (1,2). Num estudo desenhado para avaliar na Europa ocidental (Espanha, Bélgica, UK, Alemanha, França) a prevalência da rinite alérgica, foram escolhidas 9646 pessoas via entrevista telefónica, das quais 3856 foram classificadas como positivas para a possibilidade de rinite alérgica e das quais 724 foram examinadas clinicamente e 411 confirmadas como tendo o diagnóstico de rinite alérgica (1). Chegou-se à conclusão que a prevalência total era de 22,7% nos países selecionados para o estudo, afetando cerca de 1 em cada 5 indivíduos (1). Nos Estados Unidos da América, a rinite alérgica é classificada como a quinta doença crónica mais comum no país com uma prevalência estimada entre 5-22%, representando aproximadamente 60 milhões de doentes (3). Recentemente, no início de 2018, foi publicado um estudo onde diversos especialistas em otorrinolaringologia de 4 diferentes continentes responderam a um questionário, destacando-se como resultado de uma das perguntas sobre epidemiologia, uma prevalência global entre 15-25% (4). Nas crianças a prevalência da rinite alérgica está em crescendo com valores de prevalência na Europa ocidental de 8,3% e 8,8% na América do Norte, para crianças com 6 e 7 anos e 14,6% em adolescentes com 13 e 14 anos mundialmente (5).

## **Custo económico da rinite alérgica**

Por ser das doenças mais prevalentes, é de esperar que os custos de saúde relacionados com a rinite alérgica sejam elevados. Pegando em dados de estudos de três países diferentes encontrou-se um gasto monetário relativo elevado, para com custos quer diretos, quer indiretos, relacionados com a doença. Nos Estados Unidos da América, é estimado anualmente que os custos diretos dos sistemas de saúde relacionados com a rinite alérgica rondem \$2,5bilhões, sendo que custos indiretos possam variar desde \$0,1 a

\$9,7 bilhões (2,3). No caso da Coreia do Sul os custos diretos relacionados com a saúde atingiram \$223,68 milhões e ainda chegaram \$49,25 milhões em custos indiretos (6). Já na Suécia, é estimado que o custo total por pessoa e por ano seja de €961,1 resultando de €210,3 de custos diretos e €750,8 de custos indiretos (7).

### **Classificação da rinite alérgica**

A rinite alérgica pode ser sazonal ou perene, dependendo essencialmente na presença e variação dos alérgenos consoante as diversas estações do ano. Alérgenos como o pólen são rotulados como sazonais, enquanto que por exemplo, os alérgenos como ácaros ou pelo de animais são classificados como perenes. No entanto, os alérgenos sazonais podem persistir durante o ano caso adiram a superfícies dentro de casa, como carpetes, lençóis, cortinados, chão com alcatifa, mobília, entre outros. Desta maneira, é utilizada a classificação proposta pela ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) que classifica a rinite alérgica quanto à duração e gravidade (8).

Quanto à duração será:

- Intermitente se os sintomas estão presentes menos de 4 dias por semana, ou há menos de 4 semanas;
- Persistente se os sintomas estão presentes pelo menos 4 dias por semana, ou há 4 semanas.

Quanto à gravidade será:

- Ligeira, se nenhum dos sintomas abaixo estiver presente;
- Moderada-grave se pelo menos um dos seguintes estiver presente: distúrbios de sono, interferência na prática das atividades diárias, interferência no desempenho profissional ou escolar, sintomas não toleráveis.



## Fisiopatologia

Numa visão geral, a rinite alérgica é uma doença IgE mediada, iniciando-se o processo fisiopatológico quando as APCs (*antigen presenting cells*) processam o alérgeno e apresentam alguns péptidos através do complexo major de histocompatibilidade classe II (MHC classe II) aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, resultando na sua diferenciação em linfócitos Th2 (9,10). Estes linfócitos Th2 ativados irão produzir diversas citocinas, como a IL-4 e IL-13, que vão interagir com linfócitos B induzindo a mudança de classe de imunoglobulina para IgE (10). As IgE específicas para o antígeno ligam-se posteriormente aos recetores de mastócitos e basófilos (11).

Podemos dividir a reação alérgica na rinite em duas fases: uma inicial que dura entre 1 a 2 horas e outra tardia que se lhe segue, durando 12 a 24 horas (10). Na fase inicial, os mastócitos e basófilos libertam grânulos ao serem ativados pelas IgE específicas para o alérgeno, contendo mediadores como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos (10). A histamina que é o principal componente, vai ser responsável por estimular as terminações nervosas do V par craniano (trigémio), resultando em prurido e crises esternutatórias (9,10). A rinorreia vai ser causada pela estimulação da histamina nas glândulas mucosas, provocando a secreção de muco, e os leucotrienos em conjunto com as prostaglandinas e a histamina irão atuar nos vasos sanguíneos, provocando congestão nasal (9,10). Na fase tardia, o influxo de eosinófilos, linfócitos T-*helper* e basófilos, será o principal mecanismo que desencadeia a persistência dos sintomas (9-11). As substâncias chave para que tal aconteça são uma variedade de citocinas como é o caso da IL-4 e IL-13 produzidas nos mastócitos, que vão atuar aumentando a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) no endotélio, favorecendo a migração das células (9-11). No caso de existir constante estimulação, estas alterações podem resultar na remodelação, embora em menor grau do que na asma alérgica, consistindo principalmente em fibrose subepitelial, modificação das estruturas ciliares levando a má função mucociliar, aumento da espessura da membrana basal e descamação (12,13).

Quando a exposição ao alérgeno é demasiado baixa ou insignificante ao ponto de provocar sintomas, existe, no entanto, fraca inflamação com consequente infiltrado (14). Tal situação envolve a expressão de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), que é o principal recetor para os rinovírus, predispondo os doentes a infeções da porção superior

das vias respiratórias, e sendo causa importante de exacerbações nos doentes que também são asmáticos (4,14).

## NASAL ALLERGIC INFLAMMATION

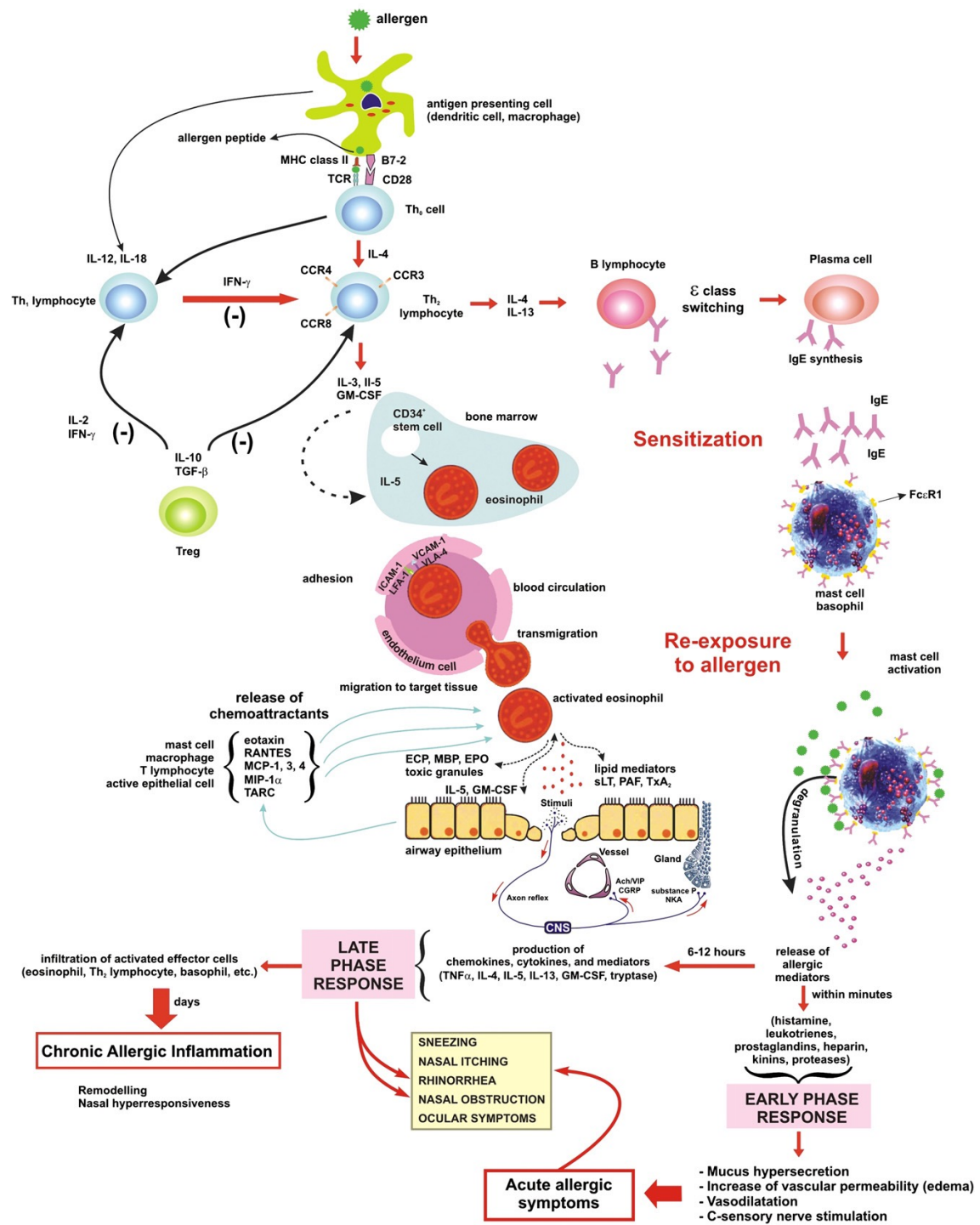


Figura 1. Fisiopatologia da inflamação alérgica (15).

## **Relação com a asma**

Tanto os doentes apenas com rinite alérgica, tanto os doentes apenas com asma, apresentam fator de risco para vir a desenvolver quer uma, quer outra doença concomitantemente. A relação entre rinite alérgica e asma é conhecida, sendo que cerca de 19-38% dos doentes com rinite alérgica têm também asma (14). Num estudo sobre o seguimento durante 10 anos de 99 doentes com diagnóstico prévio de asma, rinite alérgica, ou ambos, foi observado que 50% dos asmáticos desenvolveram rinite alérgica e 32% dos doentes com rinite alérgica, desenvolveram asma (16). Num estudo transversal suíço com doentes asmáticos, realizado para avaliar a relação entre a asma e a rinite alérgica (*LARA – Link Allergic Rhinitis in Asthma*) verificou-se que 76% (950) dos doentes asmáticos tinham também rinite alérgica (17).

Os doentes com rinite alérgica, partilham características semelhantes com os doentes asmáticos, nomeadamente no que toca a uma hiperreatividade brônquica que pode resultar em broncospasmo, secreção de muco e tosse, embora nos doentes asmáticos esta condição seja 25x superior comparativamente à rinite alérgica (18). Existe ao mesmo tempo um aumento de reatividade a diversos estímulos e substâncias, entre as quais se podem destacar a histamina, capsaicina, metacolina, ar seco, leucotrieno D<sub>4</sub> e o alergénio (18).

No que toca à fisiopatologia, a asma e rinite alérgica apresentam semelhanças tendo o mesmo tipo de células envolvidas como é o caso dos eosinófilos, mastócitos e linfócitos Th2, assim como a nível humoral, histamina, leucotrienos, quimiocinas, citocinas Th2 e moléculas de adesão (18).

## **Diagnóstico**

O diagnóstico é geralmente estabelecido com uma história clínica com sintomas clássicos como rinorreia aquosa, obstrução nasal, prurido nasal ou crises esternutatórias, e confirmado usando o teste cutâneo para o alergénio (*prick test*), ou doseamento específico de IgE no soro (11).

## Tratamento

O algoritmo de tratamento é o apresentado na figura 2, passando por uma fase inicial de toma oral de anti-histamínicos de segunda geração associados ou não a um corticoide intranasal, consoante a classificação da rinite (19).

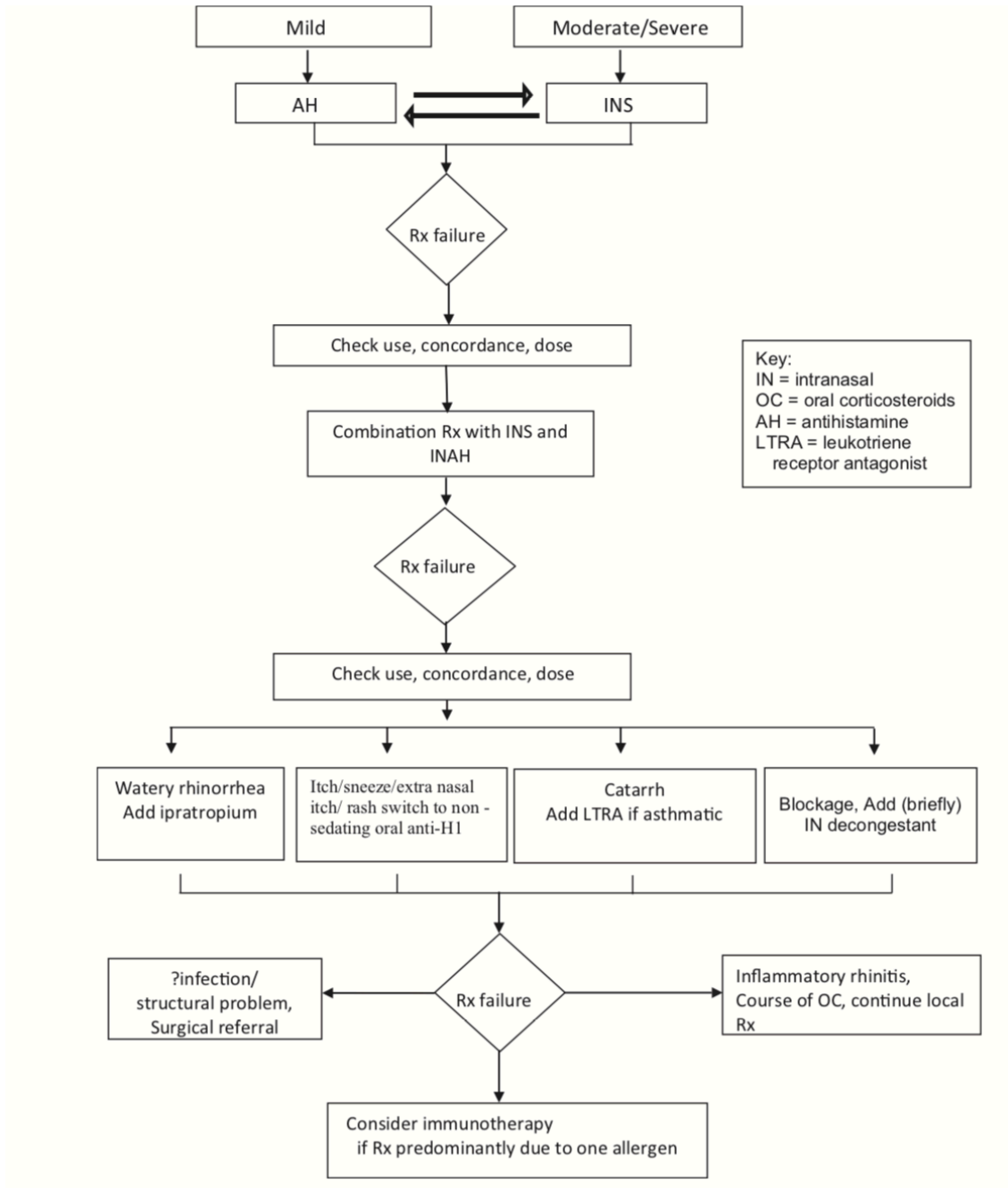


Figura 2. Algoritmo do tratamento da rinite (19).

## Imunoterapia na doença alérgica

A imunoterapia na doença alérgica é o único potencial tratamento modificador da doença. Começou com Leonard Noon, que a introduziu em 1911, onde mostrou que a inoculação subcutânea com extrato de pólen como profilaxia, resultava no desaparecimento da irritação conjuntival causada pela alergia ao pólen (20).

A imunoterapia pode ser administrada por via subcutânea (SCIT – *subcutaneous immunotherapy*) ou por via sublingual (SLIT – *sublingual immunotherapy*). Inicialmente a via subcutânea foi a mais utilizada, no entanto, desde os últimos 25 anos que a via sublingual foi crescendo de popularidade sendo atualmente a via mais usada (21). Existem também outras formas de administração em estudo, como a via intralinfática e a via epicutânea (22).

A imunoterapia na rinite alérgica segundo a EAACI (*European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) deve ser considerada quando todos os seguintes critérios estão presentes:

- Sintomas fortemente sugestivos de rinite alérgica com ou sem conjuntivite;
- Existe evidência de sensibilização IgE (medição de IgE no soro ou testes cutâneos positivos) para um ou mais alérgenos;
- Sintomas moderados a severos que interfiram com as atividades diárias ou qualidade de sono apesar de medicação apropriada e/ou estratégias de evicção (23).

As guidelines da EAACI referem com nível de evidência I e grau A que para obter benefícios de longo termo na rinite alérgica, a imunoterapia deve ser administrada por um período mínimo de 3 anos (23). No que toca à relação com a asma, um tratamento de 3 anos consecutivos de imunoterapia reduz a probabilidade de crianças e adolescentes com rinite alérgica virem a desenvolver asma nos 2 anos subsequentes (24). Os efeitos adversos podem variar desde reações locais a sistêmicas. Em termos de reações locais, no caso da SCIT variam desde eritema, prurido e edema no local da injeção (25). Na SLIT pode existir prurido orofaríngeo, edema ou sintomas gastrointestinais (caso associados a sintomas sistêmicos, já são considerados reação sistémica) (26). A SCIT foi associada a

efeitos adversos sistémicos, entre os quais a anafilaxia, ao passo que no caso da SLIT, os efeitos adversos graves são menos comuns, e existe o conforto de o tratamento poder ser administrado em casa pelo próprio (22).

Relativamente à SCIT, o que é padronizado como regime de administração, compreende 1 injeção por semana, numa fase de carga com doses elevadas, seguida de uma dose de manutenção a cada 4 semanas de intervalo, num local capaz de lidar com possíveis efeitos adversos graves, tais como a anafilaxia (21). No que diz respeito à SLIT, são usadas gotas sublinguais que devem estar em contacto pelo menos 2 minutos na mucosa, podendo existir uma fase inicial de carga, mas não sendo necessário (27). Em relação a contraindicações para a realização de imunoterapia, são quaisquer condições que possam agravar possíveis efeitos adversos sistémicos, como é o caso de enfarte recente do miocárdio ou angina instável, asma descontrolada, doenças autoimunes graves e imunodeficiências severas (21,27).

A nível de custos, a maioria dos estudos fármaco-económicos apontam para uma diminuição nos gastos, bem como uma revisão sistemática com meta-análise, que chegou à conclusão que numa base de £20k a £30k por QALY (*quality-adjusted life years*) a imunoterapia é custo efetiva após 6 anos de tratamento quando comparada à medicação habitual para controlar os sintomas (23,28).

## Biomarcadores na imunoterapia da rinite alérgica

De forma a proporcionar um melhor tratamento, sendo mais eficaz e tornar mais rápida a remissão de sintomas, assim como potenciar a descoberta de novas formas terapêuticas, a procura de biomarcadores preditivos de resposta clínica na imunoterapia na doença alérgica é de extrema relevância. Um bom biomarcador deve ser capaz de fornecer um resultado quantitativo e dar capacidade ao médico para diagnosticar, estadiar, prever a evolução clínica e controlar a eficácia terapêutica (29).

A *taskforce* da EAACI efetuou uma revisão da literatura de todos os candidatos a biomarcadores usados em ensaios clínicos de doentes com rinite alérgica e com ou sem asma, dividindo-os em 7 grupos distintos (30).

IgE:

- IgE, onde estão incluídos a sIgE (específica), tIgE (total) e sIgE/tIgE;

Subclasses IgG;

Atividade inibitória no soro para IgE:

- IgE-FAB;
- ELIFAB.

Ativação de basófilos:

- CD63;
- CD203c;
- DAO;
- Libertação de histamina.

Citocinas:

- Th2: IL-4, IL-13, IL-9, IL-17, eotaxina, TNF- $\alpha$ ;
- Th1: IFN- $\gamma$ , IL-12;
- Reguladoras: IL-10, TGF- $\beta$ .

Biomarcadores celulares:

- Células T reguladoras;
- Células B reguladoras;
- Células dendríticas.

Biomarcadores *in vivo*:

- Testes de provocação;
- Estudos em câmara controlada.

De maneira a entender como os biomarcadores podem ser úteis, é necessário compreender os mecanismos por detrás da imunoterapia. Dentro da complexidade envolvida no processo podem destacar-se as modificações no comportamento das células T, B e dendríticas (31).

Num indivíduo alérgico, as células dendríticas capturam e apresentam o antígeno a células T *naive*, induzindo uma resposta Th2 e favorecendo produção de IgE para o respetivo antígeno, sendo que na exposição subsequente os mastócitos e basófilos serão ativados pela IgE específica para o antígeno e libertarão grânulos causando os sintomas já conhecidos (31). Quando é feita a imunoterapia contendo o alérgico em doses altas, as células dendríticas irão produzir citocinas como a IL-12, IL-27 e IL-10, provocando uma mudança de resposta Th2 para Th1 induzindo células Treg e Breg (31).

As células Treg produzirão IL-10 e TGF- $\beta$  que vão suprimir a resposta Th2, contribuindo para o controlo da reação alérgica (27). Nas células B, vão induzir a formação de IgA, IgG e IgG<sub>4</sub>, bem como vão ter efeitos supressivos a nível dos basófilos, mastócitos, eosinófilos e resposta Th2 (27,31). Do lado das células Breg, estas produzem



IL-10 tendo efeitos supressores nas células T efectoras e participando na diminuição de células B produtoras de IgE, assim como também possuem um papel na produção de IgG<sub>4</sub> (32). Tudo isto irá culminar num desvio na resposta Th2 para Th1 com produção de IgA, IgG e IgG<sub>4</sub>, competindo com a IgE para ligação ao alérgeno e dessa forma diminuindo a resposta alérgica (31).

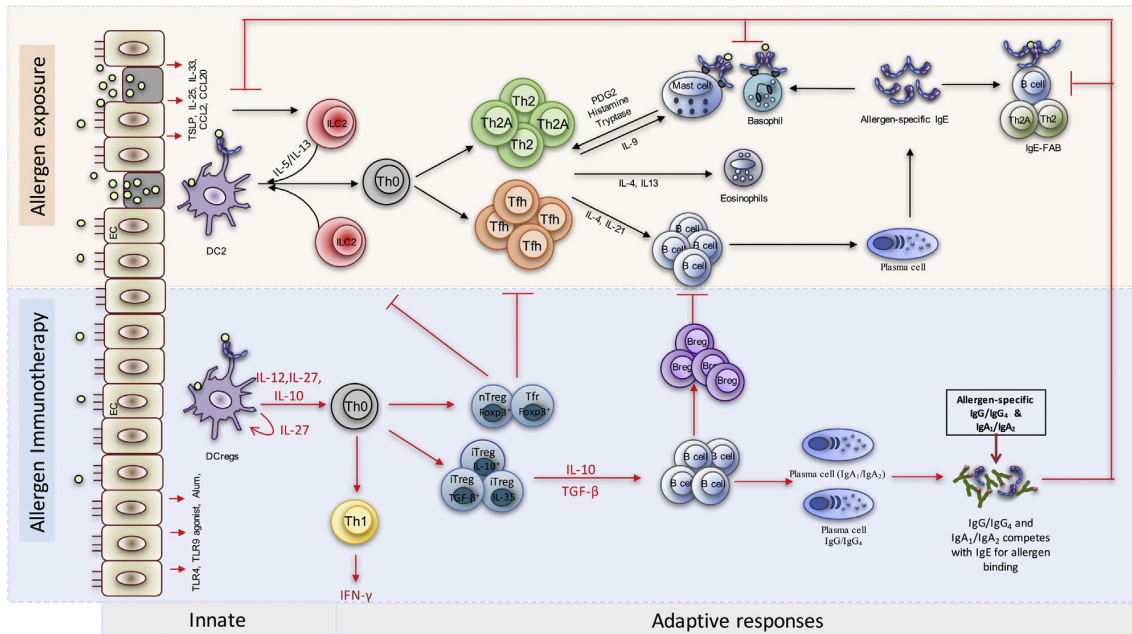


Figura 3. Diferentes mecanismos na imunoterapia (31).

## Imunoglobulinas

Relativamente à IgE, quando elevada para um antígeno específico e combinada com sintomatologia derivada da exposição, é critério de diagnóstico para alergia e para início de imunoterapia. Tanto com a SCIT, como com a SLIT na imunoterapia para pólen, foi demonstrado que os níveis de sIgE como de tIgE se elevam numa fase inicial, seguindo-se de uma diminuição, sem repercussão na clínica, existindo, no entanto, uma atenuação no aumento sazonal dos níveis de sIgE, sendo que não há uma associação evidente entre a diminuição progressiva dos níveis de sIgE no longo termo, em relação com os sintomas, em estudos realizados no decorrer de vários anos (31). No que diz respeito à razão sIgE/tIgE, os resultados são controversos, havendo estudos que encontram correlação com a clínica e outros que não conseguem obter o mesmo resultado, sendo o caso de um ensaio clínico randomizado duplo-cego com placebo, embora com

amostra limitada (30,33). A IgE tem potencial como biomarcador para diagnóstico, com possível utilidade a nível de prognóstico de gravidade e progressão da doença, no entanto a razão sIgE/tIgE requer ainda validação através de mais estudos como ensaios clínicos randomizados duplo-cegos com placebo para obter validação de um valor de *cut-off* para sensibilidade e especificidade.

No decurso da imunoterapia, espera-se que os níveis das diversas subclasses de IgG específicos para o antigénio se elevem. Chegam a aumentar cerca de 10 a 100 vezes, quando comparados com os níveis basais prévios, o que inclui a IgG<sub>1</sub> e de forma mais preponderante a IgG<sub>4</sub> (30). A IgG<sub>4</sub> compete com a IgE para ligação aos recetores Fcε dos mastócitos e basófilos, sendo deste modo que atua como anticorpo de bloqueio, diminuindo a libertação de grânulos, de forma que em teoria, levará a diminuição da resposta alérgica e consequente redução sintomática (30). Há, no entanto, estudos com conclusões divergentes, de maneira que não foi estabelecida uma relação firme entre o nível de IgG<sub>4</sub> e redução dos sintomas, sendo necessária mais investigação nesta área (31). Ainda assim, foi também reportada uma diminuição na razão sIgE/IgG<sub>4</sub> em estudos com SLIT que pode ter implicações na correlação com diminuição dos sintomas, apesar de que nada tenha sido ainda confirmado (33). As subclasses de IgG podem ser bons biomarcadores de cumprimento e colaboração na terapêutica, isto porque o grande aumento das mesmas observado na imunoterapia é causado por uma alta exposição ao alérgico, podendo ser útil para avaliar a adesão ao tratamento.

A atividade IgG inibitória no soro é um dos mecanismos que pode explicar a eficácia da imunoterapia. De forma a poder avaliar a atividade IgG inibitória ao competir com a IgE para o antigénio, foi desenvolvido e validado um teste que se baseia em citometria de fluxo denominado IgE-FAB (*facilitated allergen-binding*) (34). O teste mede a capacidade que a IgG no soro obtida após imunoterapia tem para inibir a ligação de complexos IgE específicos para o alérgico aos recetores FcεRII (CD23) nas células B (30). Através do FcεRII as células B podem contribuir para a resposta alérgica, na medida em que mais antigénio é apresentado a células T, favorecendo um aumento da resposta alérgica IgE mediada (35). ELIFAB (*enzyme-linked immunosorbent-facilitated antigen-binding*), é um outro método menos complexo que também pode ser utilizado com a mesma finalidade, e segue os princípios de um teste ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (33). Os dados obtidos com estes métodos propõem uma correlação entre a resposta clínica à imunoterapia e os resultados do teste, superior àquela

que se obtém se apenas se medirem os níveis de IgG, o que sugere que tanto a IgE-FAB como a ELIFAB forneçam uma medida de adicional funcionalidade e acrescentem mais informação no que toca à relação da afinidade anticorpo-alergénio, assim como também da avidéz (30,36). Porém, não existe informação sobre uma relação entre os resultados obtidos pela IgE-FAB entre doentes que respondem ou não respondem à imunoterapia (30). O teste IgE-FAB demonstra potencial no uso para prognóstico clínico e avaliação da eficácia da imunoterapia, tratando-se de um teste reproduzível, embora possa estar limitado a centros especializados e sendo ainda necessária mais evidência a apoiar a relação com a clínica e resultados obtidos.

### **Ativação de basófilos**

A medição da ativação de basófilos é importante para monitorizar a terapêutica e a sua eficácia, visto que por libertarem grânulos quando ativados pelo IgE específico para o alergénio, contribuem para a exacerbação de sintomas. Através de testes utilizando citometria de fluxo e amostras sanguíneas é possível verificar a ativação de basófilos, avaliando a expressão de marcadores de superfície tais como CD63 e CD203c (30). No caso do CD63, trata-se de um marcador utilizado para detetar a libertação de grânulos pelos basófilos (31). Visto que está localizado na membrana do grânulo, apenas é exteriorizado e conseqüentemente detetado quando existe fusão do grânulo com a membrana celular do basófilo (30). No caso do CD203c, este está localizado internamente na membrana plasmática, sendo que é exteriorizado assim que acontece a ativação do basófilo (30). Uma outra técnica que também envolve medição baseada em citometria de fluxo, permite detetar diamina oxidase (DAO) conjugada com o fluorocromo ficoeritrina (33). Nesta técnica, como a histamina é o substrato natural para a DAO, uma ativação com estimulação com alergénio e com conseqüente libertação de histamina contida nos grânulos, vai provocar uma diminuição proporcional de DAO intracelular, permitindo concluir que existiu ativação de basófilos (31). Existe, no entanto, divergência nos resultados obtidos em estudos controlados com placebo, naquilo que toca à influência da imunoterapia na ativação de basófilos. Alguns apontam para uma redução da ativação de basófilos com a imunoterapia, enquanto outros não conseguem obter os mesmos resultados, sendo uma possível explicação, o modo como é administrada a imunoterapia, tendo a SCIT melhores resultados que a SLIT (30,33). Em relação a estes marcadores,

existe a vantagem de os testes apenas necessitarem de uma pequena amostra sanguínea, porém são necessários mais estudos para poder compreender a eficácia da imunoterapia na redução de basófilos ativados e entender se pode ser um bom biomarcador de prognóstico na rinite alérgica.

## **Citocinas**

Com a imunoterapia, vão existir diversos processos que contribuirão para a diminuição da resposta alérgica, sendo um deles o desvio de uma resposta Th2 para Th1. Desta forma é de prever que diversas citocinas estejam envolvidas no processo, sendo potenciais alvos como biomarcadores. Podemos esperar uma redução de citocinas Th2, tais como IL-4, IL-9, IL-13, e também de citocinas envolvidas na inflamação como IL-17, eotaxina, TNF- $\alpha$  (30). Em contrapartida, o desvio para Th1 envolveria aumento de citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$  e com efeito regulador, TGF- $\beta$  e IL-10 (30). Todavia, os estudos efetuados apresentam opiniões divergentes, sendo que atualmente com a imunoterapia não foi comprovada uma correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas, e a clínica apresentada (33). No entanto, se considerarmos o envolvimento local, é possível que se obtenham resultados mais conclusivos acerca do papel da imunoterapia nos efeitos das citocinas e respetiva resposta clínica (33). Níveis locais de citocinas obtidos após provocação nasal com alergénio elevaram-se, e regrediram após imunoterapia bem-sucedida quando comparado com o grupo de controlo, embora exista pouca evidência (30). A mudança nas citocinas locais após imunoterapia, pode fornecer informação sobre o prognóstico e evolução clínica, mas mais estudos nesta matéria necessitam de ser feitos para poder compreender se é possível utilizar citocinas como biomarcadores para correlação clínica, pois atualmente ainda estão longe de poderem ser usadas nesse âmbito.

## **Biomarcadores celulares**

Os principais candidatos para estudar esta classe de biomarcadores na imunoterapia, serão células que participem ativamente na organização, regulação e supressão da resposta imunológica, tais como as células Treg, Breg e dendríticas.

As células Treg estão envolvidas na tolerância imunológica proveniente da imunoterapia dividindo-se em nTreg (células Treg formadas no timo) e iTreg (células Treg induzidas provenientes de T CD4+ e FOXP3-) produzindo citocinas reguladoras como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35 (37). No decurso da imunoterapia, as células Treg estão envolvidas na mudança de resposta Th2 para Th1, sendo que o seu aumento local na mucosa nasal após imunoterapia bem-sucedida com diminuição da clínica associada, é sugestivo de um papel importante na indução da tolerância ao alérgeno (38). Contudo, as células T aparecem numa fase inicial da imunoterapia, quando ainda não existe qualquer correlação clínica, de maneira que são precisos mais estudos para poderem ser usadas como biomarcador preditivo (30). A acrescentar mais dificuldade no seu uso, está o facto de que não existe, um marcador específico para células Treg, de forma que a sua deteção é difícil e não pode ser realizada por rotina em laboratório.

Em relação às células Breg podemos estabelecer uma comparação às células Treg no que toca à regulação da resposta alérgica. A imunoterapia vai favorecer uma mudança nas células B específicas para o alérgeno no sentido da subpopulação Breg, que irá gerar TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35, participando na inibição de células T pró-alérgicas e produzindo IgG<sub>4</sub>, havendo evidência sugerindo existir correlação com a clínica (33). No entanto, o uso de células Breg como biomarcador preditivo não é aplicável na prática clínica, pois requer técnicas complexas para a sua deteção, que apenas são possíveis em laboratórios especializados.

As células dendríticas fazem parte da imunidade inata e são células apresentadoras de antígeno que têm um papel importante na organização da resposta imune adaptativa. As diferenças associadas aos marcadores celulares, aquando da diferenciação das células dendríticas em DC1, DC2, DC17, DCreg, podendo participar na especialização de células T efectoras Th1, Th2, Th17 ou Treg respetivamente, podem fornecer melhores dados sobre a diminuição de uma resposta pró-alérgica e aumento da tolerância ao alérgeno durante a imunoterapia (30). No caso de células DC2, estas expressam importantes marcadores como CD141, GATA-3, OX40L, RIPK4, enquanto que células DCreg expressam C1QA, Fc $\gamma$ RIIIA, FTL, SLCO2B1 (39). Uma diminuição nos marcadores DC2 e um aumento nos marcadores DCreg no sangue, foi associada à imunoterapia após 4 meses de tratamento num estudo usando SLIT, existindo correlação clínica, tendo ainda sido calculada uma especificidade de 90,48% e sensibilidade de 61,9% para distinguir doentes que respondem ou não respondem, à imunoterapia entre 2 e 4 meses de tratamento,

quando foi usada uma combinação de 5 marcadores de células dendríticas, nomeadamente C1QA, FcγRIIIA (marcadores DCreg) e CD141, GATA-3, RIPK4 (marcadores DC2) (39). Estes marcadores celulares têm ainda a vantagem de poderem ser monitorizados no sangue através de RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) (31). Os resultados são promissores, na medida em que tornam possível prever a resposta imunológica e a correlacionam com a clínica, porém, são necessários estudos com largas amostras a corroborar estes efeitos.

### **Biomarcadores *in vivo***

Nesta classe de biomarcadores estão envolvidas técnicas de provocação alérgica, que poderão ser úteis para avaliar a reatividade antes e depois de receber tratamento. Estão englobados testes cutâneos e intradérmicos, testes de provocação conjuntival e nasal e ainda testes em câmaras simulando exposição ambiental (30). Existem diversos métodos para diferentes tipos de testes, no entanto, o teste de provocação nasal é o mais estudado (30). A provocação nasal permite avaliar as células e mediadores locais, medir por escalas os sintomas, e também o pico de fluxo inspiratório nasal (33). A imunoterapia associa-se a uma diminuição na resposta alérgica quando comparada aos controlos, tanto na fase inicial como tardia, sendo que se observaram valores mais baixos de triptase, eotaxina e citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) (30). Nos testes mais recentes, em câmaras simulando exposição ambiental, consegue-se uma maior semelhança com a realidade do que através da provocação nasal, havendo um estudo encontrando correlação entre a sintomatologia causada pelo teste e a de uma exposição natural (40). Embora requeira validação clínica, a guideline da *European Medicines Agency* (EMA) julga que os testes em câmaras possam ser promissores no sentido de avaliar a eficácia do tratamento segundo padrões ambientais próprios estabelecidos, o que seria útil em estudos de fase III (30). Os testes de provocação alérgica deverão estar associados aos resultados obtidos com os outros biomarcadores, mas existe no entanto, a necessidade de padronizar e aprovar os diferentes testes, para complementar na previsão da resposta clínica.

## Conclusão

A rinite alérgica é uma doença que tem aumentado de prevalência pelo mundo inteiro, não só nos adultos como também em crianças, e embora não seja uma doença fatal, é importante não esquecer que se pode associar a absentismo laboral e a gastos económicos acentuados (2,5).

A terapêutica farmacológica clássica da rinite alérgica (anti-histamínico oral e/ou corticoide nasal) é puramente sintomática, não corrigindo a fonte do problema, tendo limitações e efeitos adversos, ao passo que a imunoterapia é capaz de induzir a tolerância ao alérgeno, atuando nos mecanismos imunopatológicos, alterando a história natural da doença e aliviando os sintomas a longo prazo (19).

Os avanços no conhecimento dos mecanismos na imunoterapia, possibilitaram que se investigassem diversos biomarcadores que facilitem estabelecer um prognóstico clínico, avaliem segurança, adesão, eficácia e a resposta imunológica antes e depois do tratamento (30). Embora não se tenha mostrado útil para prever a resposta clínica à imunoterapia, a sIgE mostrou ser o biomarcador mais relevante para a seleção de doentes para imunoterapia (33). Apesar de serem necessários mais estudos para validar e corroborar as possíveis aplicações de diversos biomarcadores, destacam-se alguns consoante as suas características. A nível de previsão da resposta clínica, a razão sIgE/tIgE demonstrou estar relacionada com a clínica, carecendo, no entanto, da validação de um valor de *cut-off* para sensibilidade e especificidade, sendo necessária mais investigação (30). No caso da IgG, o uso de um teste que avalia uma medição funcional no soro da sua atividade inibitória para IgE, como IgE-FAB, demonstra melhor correlação com a clínica do que os níveis elevados de IgG<sub>4</sub>, no entanto, são necessários dados comparativos em doentes que respondem ou não respondem, à imunoterapia (30). O nível alto de IgG<sub>4</sub> terá mais interesse do ponto de vista de um biomarcador para avaliar a adesão à imunoterapia, visto que uma alta exposição ao alérgeno derivado do tratamento, é responsável por um elevado nível de IgG<sub>4</sub>, o que teria particular interesse no caso da SLIT que é realizada no domicílio pelo doente (30). A avaliação de biomarcadores que envolvam citometria de fluxo e outras técnicas complexas, requerem recursos que somente estão disponíveis em centros especializados, de maneira que, embora existam resultados promissores que correlacionem células Treg e Breg, e a

diminuição da ativação de basófilos com a resposta clínica, ainda estão longe de serem aplicados na prática, e nesta fase são úteis para comparar resultados obtidos em ensaios clínicos com a teoria (31). O uso de RT-PCR para estudar marcadores de células dendríticas mostrou resultados promissores no sentido em que foi possível separar doentes que respondem ou não respondem, à imunoterapia, embora sejam necessários mais estudos para reproduzirem os mesmos resultados (33). A identificação deste tipo de doentes é importante para que se possam excluir os doentes que não beneficiarão com a imunoterapia, reduzindo custos associados, e tornando a imunoterapia cada vez mais personalizada, daí que seja essencial realizar estudos com os 2 grupos, comparando-os. Contudo, atualmente ainda nenhum biomarcador foi validado, embora estejam a aumentar a quantidade de estudos na área investigando os diversos potenciais.

## Agradecimentos

Desejo agradecer ao Prof. Dr. Óscar Dias, que desde o princípio, se mostrou disponível e acedeu rapidamente ao meu pedido para desenvolver o Trabalho Final de Mestrado em otorrinolaringologia. Esteve sempre pronto para me assistir e encaminhar, sendo incansável. Agradeço igualmente ao Dr. Marco Simão por ter aceite ser o meu orientador e auxiliar-me quando necessário, estando constantemente bem disposto e recetivo.

Quero agradecer também à minha família pelo apoio e afeto ao longo desta fase e em especial à Inês, pela ajuda, compreensão e carinho, e porque caminhou ao meu lado durante todo o percurso.



## Bibliografia

1. Bauchau V., Durham S. (2004) Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *European Respiratory Journal* 24:758-764.
2. Mims J.W. (2014) Epidemiology of allergic rhinitis. *International Forum of Allergy & Rhinology* 4:S18-S20.
3. Bernstein J.A. (2010) Allergic and mixed rhinitis: Epidemiology and natural history. *Allergy and Asthma Proceedings* 31:365-369.
4. Passali D., et al. (2018) The International Study of the Allergic Rhinitis Survey: outcomes from 4 geographical regions. *Asia Pacific Allergy* 8:e7.
5. Barr J.G., et al. (2014) Allergic rhinitis in children. *BMJ* 349:g4153.
6. Kim S.Y., et al. (2010) Economic Burden of Allergic Rhinitis in Korea. *American Journal of Rhinology & Allergy* 24:e110-e113.
7. Cardell L., et al. (2016) TOTALL: high cost of allergic rhinitis – a national Swedish population-based questionnaire study. *npj Primary Care Respiratory Medicine* 26:15082.
8. Brożek J.L., et al. (2017) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines - 2016 revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140:959-958.
9. Pawankar R., et al. (2011) Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pacific Allergy* 1:157-167.
10. Osguthorpe J.D. (2013) Pathophysiology of and potential new therapies for allergic rhinitis. *International Forum of Allergy & Rhinology* 3:384-392.

11. Min Y. (2010) The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis. *Allergy asthma & immunology research* 2:65-76.
12. Bousquet J., et al. (2004) Allergic rhinitis: a disease remodeling the upper airways? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113:43-49.
13. Naclerio R.M., Bachert C., Baraniuk J.N. (2010) Pathophysiology of nasal congestion. *International journal of general medicine* 3:47-57.
14. Compalati E., et al. (2010) The link between allergic rhinitis and asthma: the united airways disease. *Expert Review of Clinical Immunology* 6:413-423.
15. Sin B., Togias A. (2011) Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. *Proceedings of the American Thoracic Society* 8:106-114.
16. Lombardi C., et al. (2001) The natural history of respiratory allergy: a follow-up study of 99 patients up to 10 years. *Respiratory Medicine* 95:9-12.
17. Taegtmeyer A.B., et al. (2009) Allergic rhinitis in patients with asthma: the Swiss LARA (Link Allergic Rhinitis in Asthma) survey. *Current Medical Research and Opinion* 25:1073-1080.
18. Khan D.A. (2018) Allergic rhinitis and asthma: Epidemiology and common pathophysiology. *Allergy and Asthma Proceedings* 35:357-361.
19. Scadding G.K., et al. (2017) BSACI guideline for the diagnosis and management of allergic and non-allergic rhinitis (Revised Edition 2017; First edition 2007). *Clinical & Experimental Allergy* 47:856-889.
20. Durham S.R., Nelson H. (2011) Allergen immunotherapy: a centenary celebration. *The World Allergy Organization journal* 4:104-106.
21. Jutel M., et al. (2015) International consensus on allergy immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136:556-568.

22. Casale T.B., Stokes J.R. (2014) Immunotherapy: what lies beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133:612-619.
23. Roberts G., et al. (2017) EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: Allergic Rhinoconjunctivitis, in Antonella Muraro, Graham Roberts (ed.). *Allergen Immunotherapy Guidelines Part 2: Recommendations*. Zurich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology 71-114.
24. Halken S., et al. (2017) EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Prevention of allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* 28:728-745.
25. Cox L., et al. (2011) Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127:S1-S55.
26. Cox L., et al. (2006) Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117:1021-1035.
27. Şahin E., et al. (2016) Mechanism of Action of Allergen Immunotherapy. *American Journal of Rhinology & Allergy* 30:S1-S3.
28. Cox L. (2015) Allergy immunotherapy in reducing healthcare cost. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 23:247-254.
29. Adkinson A., et al. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 69:89-95.
30. Shamji, M.H., et al. (2017) Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy* 72:1156-1173.
31. Shamji M.H., Durham S.R. (2017) Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140:1485-1498.

32. van de Veen W., Akdis M. (2014) Mechanisms of immune regulation in allergy, in Global Atlas of Allergy. Part 23. Akdis C.A. and Agache I. (Eds), Zurich, Switzerland. European Academy of Allergy and Clinical Immunology 90-91.
33. Licari A., et al. (2018) Biomarkers of immunotherapy response in patients with allergic rhinitis. *Expert Review of Clinical Immunology* 14:657-663.
34. Shamji M.H., et al. (2006) The IgE-facilitated allergen binding (FAB) assay: Validation of a novel flow-cytometric based method for the detection of inhibitory antibody responses. *Journal of Immunological Methods* 317:71-79.
35. Henningsson F., et al. (2011) IgE-mediated enhancement of CD4<sup>+</sup> T cell responses in mice requires antigen presentation by CD11c<sup>+</sup> cells and not by B cells. *PloS one* 6:e21760.
36. Shamji M.H., et al. (2012) Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy* 67:217-226.
37. Schmitt E.G., Williams C.B. (2013) Generation and function of induced regulatory T cells. *Frontiers in immunology* 4:152.
38. Radulovic S., et al. (2008) Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121:1467-1472.
39. Gueguen C., et al. (2016) Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137:545-558.
40. Jacobs R.L., et al. (2012) Responses to ragweed pollen in a pollen challenge chamber versus seasonal exposure identify allergic rhinoconjunctivitis endotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130:122-127.