



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Effect of cigarette smoke on counts of immunoreactive cells to eotaxin-1 and eosinophils on the nasal mucosa in young patients with perennial allergic rhinitis[☆]



Bertha Beatriz Montañó-Velázquez^a, Eulalia Beatriz Flores-Rojas^a,
Francisco Javier García-Vázquez^b, Silvio Jurado-Hernandez^a,
Marco Antonio Venancio Hernández^c, Angélica Kathya Alanis Flores^c
e Kathrine Jáuregui-Renaud^{d,*}

^a Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional La Raza, Service of Otorhinolaryngology, Cidade do México, México

^b Instituto Nacional de Pediatría, Molecular Pathology Laboratory, Department of Pathology Anatomy, Cidade do México, México

^c Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN La Raza, Hospital de Especialidades, Service of Immunology and Allergy, Cidade do México, México

^d Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional sXXI, P.B. Edificio C Salud en el Trabajo, Medical Research Unit in Otonerology, Cidade do México, México

Recebido em 11 de janeiro de 2016; aceito em 27 de abril de 2016

Disponível na Internet em 12 de abril de 2017

KEYWORDS

Rhinitis;
Allergic;
Tobacco;
Chemokine CCL11;
Eosinophils

Abstract

Introduction: In teenagers with perennial allergic rhinitis, exposure to tobacco cigarette smoke increases the count of eosinophils in the nasal mucosa; the recruitment of eosinophils arises from the combined action of a number of cellular and molecular signals, including eotaxin.

Objective: To assess the effect of exposure to tobacco cigarette smoke on the count of immunoreactive cells to eotaxin-1 and eosinophils on the nasal mucosa of children and teenagers with perennial allergic rhinitis.

Methods: In a cross-sectional study, forty-four patients were evaluated (aged 7–19 years old): 22 with and 22 with no exposure to tobacco cigarette smoke. After replying to 2 validated questionnaires, on Asthma and Allergies in Childhood and on the severity of nasal symptoms, nasal mucosal samples were obtained by scraping the middle one-third of the inferior turbinates. Then counts of immunoreactive cells to eotaxin-1 and eosinophils were assessed by immunohistochemistry.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.04.011>

[☆] Como citar este artigo: Montañó-Velázquez BB, Flores-Rojas EB, García-Vázquez FJ, Jurado-Hernandez S, Venancio Hernández MA, Alanis Flores AK, et al. Effect of cigarette smoke on counts of immunoreactive cells to eotaxin-1 and eosinophils on the nasal mucosa in young patients with perennial allergic rhinitis. Braz J Otorhinolaryngol. 2017;83:420–5.

* Autor para correspondência.

E-mail: kathrine.jauregui@imss.gob.mx (K. Jáuregui-Renaud).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

Results: Patients with exposure to tobacco cigarette smoke showed higher cell counts of both eotaxin-1 and eosinophils than patients with no exposure to the smoke, with no correlation between the two variables. However, both counts, of eotaxin-1 and eosinophils, were related to the cotinine/creatinine ratio.

Conclusions: Exposure to tobacco cigarette smoke can increase eotaxin-1 and the count of eosinophils in the nasal mucosa of young patients with perennial allergic rhinitis.

© 2016 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PALAVRAS-CHAVE

Rinite;
Alérgico;
Tabaco;
Quimiocina CCL11;
Eosinófilos

Efeito do tabagismo nas contagens de células imunorreativas a eotaxina-1 e eosinófilos na mucosa nasal em pacientes jovens com rinite alérgica perene

Resumo

Introdução: Em adolescentes com rinite alérgica perene, a exposição à fumaça do cigarro de tabaco aumenta a contagem de eosinófilos na mucosa nasal. O recrutamento de eosinófilos surge da ação combinada de alguns sinais celulares e moleculares, inclusive a eotaxina.

Objetivo: Avaliar o efeito da exposição à fumaça do cigarro de tabaco na contagem de células imunorreativas a eotaxina-1 e eosinófilos na mucosa nasal de crianças e adolescentes com rinite alérgica perene.

Método: Em um estudo transversal, 44 pacientes foram avaliados (entre sete e 19 anos): 22 com e 22 sem exposição à fumaça do cigarro de tabaco. Depois de responder a dois questionários validados, sobre asma e alergias na infância e sobre a gravidade dos sintomas nasais, as amostras de mucosa nasal foram obtidas por meio de raspagem do terço médio das conchas inferiores. Em seguida, as contagens de células imunorreativas para eotaxina-1 e eosinófilos foram avaliadas por imuno-histoquímica.

Resultados: Os pacientes com exposição à fumaça do cigarro de tabaco apresentaram contagens de células mais elevadas tanto para eotaxina-1 como para eosinófilos em comparação com os pacientes sem exposição à fumaça, sem correlação entre as duas variáveis. No entanto, ambas as contagens, de eotaxina-1 e eosinófilos foram relacionadas com a razão cotinina/creatinina.

Conclusões: A exposição à fumaça do cigarro de tabaco pode aumentar a eotaxina-1 e a contagem de eosinófilos na mucosa nasal de pacientes jovens com rinite alérgica perene.

© 2016 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

As doenças alérgicas, tais como a asma, a rinite alérgica e a dermatite atópica, são caracterizadas por um aumento do número de eosinófilos no sangue circulante e a desgranulação no tecido alvo é considerada o maior evento patogênico.¹ O recrutamento de eosinófilos surge da ação combinada de alguns sinais celulares e moleculares, inclusive a eotaxina.^{2,3} A eotaxina-1 liga-se com elevada afinidade ao receptor 3 de quimiocina CC, que é expressada por uma variedade de células inflamatórias.⁴⁻⁶ O bloqueio da eotaxina ou CCR3 tem sido proposto como uma nova abordagem para imunoterapia da alergia.^{7,8} No entanto, são necessárias mais informações sobre a interação entre os ligantes e os seus receptores.

A rinite alérgica é uma condição comum que acomete pessoas de todas as idades, o pico de prevalência na vida ocorre na adolescência.⁹ Demonstrou-se que, em pacientes adultos com rinite alérgica, a provocação alérgica nasal

pode levar a aumentos paralelos da contagem de eosinófilos e níveis de eotaxina no lavado nasal, com uma forte correlação entre as duas variáveis.¹⁰ Em condições naturais da doença, sem provocação nasal, em comparação com os controles, a concentração de eotaxina-1 no líquido de lavagem nasal de pacientes com rinite alérgica é aumentada em ambas as formas, sazonal ou perene, e está relacionada com a percentagem de eosinófilos nas lavagens e da gravidade da expressão dos sintomas.¹¹

As crianças expostas à fumaça ambiental do tabaco têm um risco aumentado de desenvolver doenças do trato respiratório. Experiências em modelos murinos mostram que a fumaça do tabaco pode desencadear uma resposta imunitária exagerada, rápida e prolongada.^{12,13} Em humanos, os efeitos da fumaça do tabaco sobre as vias respiratórias superiores incluem o recrutamento e ativação de células inflamatórias.¹⁴ Em adolescentes com rinite alérgica perene, os pacientes expostos à fumaça do cigarro de tabaco, em comparação com aqueles sem exposição, podem apresentar

Tabela 1 Características dos 44 pacientes com rinite alérgica perene: 22 com e 22 sem exposição a fumaça do tabaco de cigarro

Variáveis (Média ± DP)	Exposição passiva (n = 22)	Sem exposição (n = 22)	<i>p</i> ≤ 0,05
Idade (anos)	12,09 ± 3,0	11,9 ± 3,2	-
Peso (Kg)	47,09 ± 14,99	44,46 ± 15,48	-
Altura (m)	1,48 ± 0,13	1,45 ± 0,16	-
Índice de massa corporal	20,98 (4,6)	20,44 (3,43)	-
Tempo de evolução clínica (anos)	3,6 ± 2,1	4,4 ± 3,3	-
Razão cotinina/creatinina na urina (ng/mg)	25,98 ± 3,7	11,21 ± 2,47	<i>p</i> ≤ 0,01
Eotaxina-1 (células imunorreativas por milímetro quadrado)	194 ± 178	4 ± 7	<i>p</i> ≤ 0,01
Contagem de eosinófilos (células imunorreativas por milímetro quadrado)	198 ± 264	18 ± 40	<i>p</i> ≤ 0,01
Alérgenos	Frequência (n)	Frequência (n)	
<i>Dermatophagoides</i> sp.	40% (9)	50% (11)	-
Ácaros domésticos	45% (10)	36% (8)	-
Sintomas nasais	Frequência (n)	Frequência (n)	
Barata	32% (7)	36% (8)	-
Obstrução	90% (20)	86,36% (19)	-
Rinorreia	95,45% (21)	95,45% (21)	-
Prurido	81,81% (18)	81,81% (18)	-
Espirro	86,36% (19)	68,18% (15)	-
Escore total (mediana & intervalo)	6 (4-8)	6 (4-8)	-

um aumento da contagem de eosinófilos na mucosa nasal.¹⁵ Em pacientes com asma, o tabagismo aumenta os níveis de eotaxina.¹⁶

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da exposição à fumaça do cigarro de tabaco nas contagens de células imunorreativas a eotaxina-1 e eosinófilos na mucosa nasal de crianças e adolescentes com rinite alérgica perene.

Método

Considerações éticas

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do local e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes e de seus pais.

Participantes

Participaram 44 pacientes com rinite alérgica perene, todos moravam na mesma área da Cidade do México. A inclusão no estudo foi considerada consecutivamente quando rinite alérgica perene foi diagnosticada pela primeira vez e os pacientes não tinham evidências de infecção, sinusite, otite média, pólipos nasais, anormalidade anatômica, doença sistêmica, doença pulmonar, asma, dermatite atópica, rinite alérgica sazonal ou gravidez, nem usavam imunoterapia, corticosteroides (nasais ou sistêmicos), cromolina, tratamento anti-inflamatório ou antileucotrienos nos três meses anteriores à participação no estudo.

De acordo com a exposição à fumaça do cigarro de tabaco, eles foram classificados em dois grupos, com idade,

peso, índice de massa corporal e tempo de evolução clínica semelhantes (tabela 1):

Grupo I – 22 pacientes expostos a fumaça do cigarro, entre sete e 19 anos (média ± desvio padrão de 12 ± 3 anos), 12 do sexo masculino e 10 do feminino.

Grupo II – 22 pacientes não expostos a fumaça do cigarro, entre sete e 17 anos (11,9 ± 3,2 anos), 15 do sexo masculino e sete do feminino.

Procedimentos

A exposição ou não exposição a fumaça do cigarro foi determinada por meio da Pesquisa Global de Tabaco na Juventude¹⁷ e pela razão cotinina/creatinina na urina.¹⁸ No mesmo dia em que os participantes responderam ao questionário, a urina deles foi coletada para avaliação de sua razão cotinina/creatinina. Apenas quando as duas avaliações eram consistentes os pacientes eram incluídos no estudo. A razão cotinina/creatinina foi avaliada por imunoensaio por quimioluminescência competitivo de fase sólida para cotinina (Metabólitos de Nicotina, DPC França; Immulite 1000, DPC, NJ, EUA) e método de Jaffé colorimétrico para creatinina (Clinical Chemistry IL Test tm Spinreac, Saint Esteve de Bas, Espanha; Express Plus, Bayer, Tarrytown NY, EUA). Um valor de corte de 21,8 ng/mg da relação cotinina/creatinina foi usado para identificar a exposição à fumaça do tabaco.¹⁸

Após avaliação clínica, os pacientes responderam à versão curta do questionário do Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância⁹ e a um questionário validado da gravidade dos sintomas nasais em crianças com rinite alérgica perene.¹⁹ Os sintomas avaliados foram: congestão, espirros,

prurido e rinorreia. A gravidade de cada sintoma foi avaliada pelo paciente como ausente (0), leve (1), moderada (2) ou grave (3). O escore total de sintomas foi calculado como a soma de cada escore de sintomas (máximo = 12).¹⁹ Em crianças e adolescentes com rinite alérgica perene, esse questionário mostrou uma consistência de 0,89 e repetibilidade de 96%, com um coeficiente de repetibilidade de 2.²⁰

Amostras de mucosa nasal foram obtidas por raspagem do terço médio das conchas inferiores (RhinoProbe Arlington Scientific Inc., Arlington, TX, EUA) e foram coradas com coloração de Wright-Giemsa. Todas as amostras foram analisadas por imuno-histoquímica, por dois revisores independentes, em lâminas de dez campos calibradas, selecionadas aleatoriamente (Leica, DM750, $\times 40$), para determinar as contagens de células imunorreativas a eotaxina-1 e eosinófilos por milímetro quadrado, com o uso de ligando 11 (eotaxina EPR5825; Gene-Tex Irving, CA, EUA) de quimiocina de anticorpo monoclonal de coelho (C-C mtf) e anticorpos monoclonais murinos (proteína básica maior de camundongo BMK13, 1:25; Chemicon International, Tamecula, CA, EUA), respectivamente.

Análise estatística

Após o teste de Kolmogorov-Smirnov, a análise estatística foi feita de acordo com a distribuição dos dados por meio do teste *t* de Student, coeficiente de correlação de Pearson e análise de covariância; valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Manifestações clínicas dos pacientes

As características gerais dos pacientes estão descritas na [tabela 1](#). Entre os pacientes com exposição a fumaça de tabaco (Grupo I), 21 relataram apenas exposição passiva e um relatou tanto a exposição passiva como ativa. Nos dois grupos, o número de alérgenos positivos no teste cutâneo (AllerStand, Cidade do México; diretrizes do IRC de 1994) foi de 1 a 13 (mediana 3) e o alérgeno mais frequente foi *Dermatophagoides sp* (40% no grupo I vs. 50% no Grupo II).

A frequência e a gravidade dos sintomas nasais são descritas na [tabela 1](#). Não houve diferença entre os grupos, quer na frequência de cada sintoma ou na pontuação total (mediana 6, nos dois grupos). O sintoma mais frequente foi rinorreia, relatada por 95% dos pacientes nos dois grupos.

Contagem de células imunorreativas de eotaxina-1 e eosinófilos

Os pacientes com exposição a fumaça de cigarro apresentaram contagens elevadas de células imunorreativas na mucosa nasal tanto para eotaxina-1 como eosinófilos, em comparação com os pacientes sem exposição (teste *t* de Student, $p < 0,05$) ([tabela 1](#)). Embora as duas variáveis não tenham mostrado relação linear entre elas, em todo o grupo, as contagens de células de eotaxina-1 e eosinófilos foram relacionadas com a razão de cotinina/creatinina na urina (coeficiente de Pearson $r = 0,51$ e $0,50$, respectivamente, $p < 0,001$) ([fig. 1](#)).

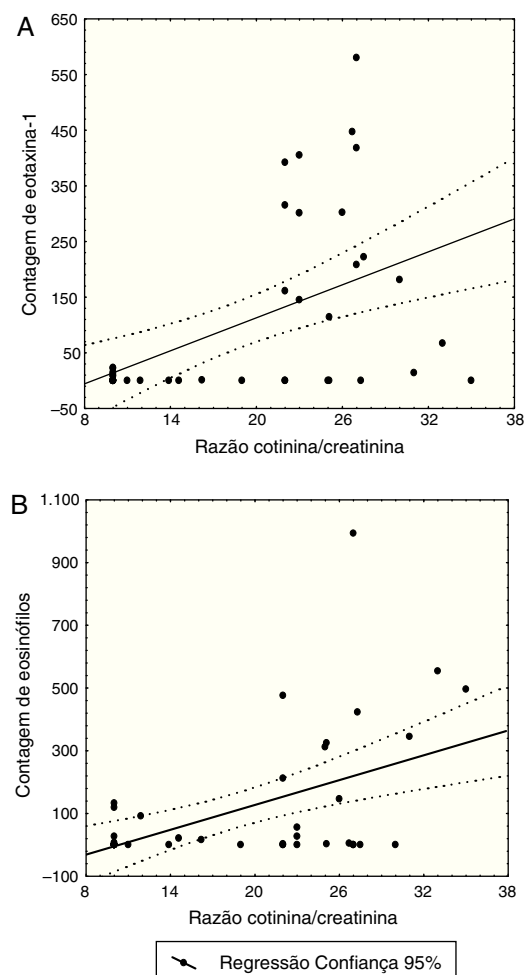


Figura 1 Relação linear entre a razão cotinina/creatinina na urina e (A) contagem de células imunorreativas a eotaxina-1, e (B) contagem de eosinófilos na mucosa nasal dos 44 pacientes com rinite alérgica perene.

A análise de covariância mostrou que a relação entre a contagem de células de eotaxina-1 e a razão cotinina/creatinina na urina era independente da idade, do sexo e do índice de massa corporal dos pacientes ($p > 0,05$), enquanto a relação entre a contagem de células de eosinófilos e a razão cotinina/creatinina na urina foi relacionada com a idade ($\beta = -0,6$, IC 95% $0,89-0,31$) e o índice de massa corporal ($\beta = 0,44$, IC 95% $0,15-0,74$) (modelo total $R = 0,7$, $p < 0,001$).

Discussão

Os resultados deste estudo mostram evidências de que, em comparação com crianças e adolescentes sem exposição a fumaça do cigarro, aqueles com rinite alérgica perene expostos à fumaça do tabaco podem ter aumentado a contagem de células imunorreativas em sua mucosa nasal, tanto de eotaxina-1 quanto de eosinófilos, que estão relacionadas com a sua razão cotinina/creatinina na urina.

Em modelos animais e em seres humanos, vários efeitos da exposição a fumaça de tabaco sobre a resposta imune têm sido descritos,²¹⁻²⁴ inclusive contagens sanguíneas

modificadas de eosinófilos e monócitos.²⁵ No entanto, não há estudos que tenham avaliado o efeito da exposição a fumaça do tabaco sobre a eotaxina-1 em pacientes com rinite alérgica. Este estudo mostra que até mesmo a exposição passiva à fumaça do tabaco pode aumentar as contagens de células imunorreativas à eotaxina-1 na mucosa nasal, o que está linearmente relacionado com a exposição. Assim, em pacientes com rinite alérgica, a avaliação e o controle da exposição à fumaça do tabaco podem contribuir para evitar mais danos à mucosa nasal.

Curiosamente, a contagem de células imunorreativas de eotaxina-1 não foi relacionada com as contagens de eosinófilos ou com as características dos indivíduos. Esse achado pode ser explicado porque a eotaxina-1 liga-se com elevada afinidade ao receptor 3 de quimiocina CC, que é expresso por uma variedade de células inflamatórias, inclusive eosinófilos, mastócitos, basófilos e linfócitos T auxiliares de tipo 2.⁴⁻⁶ Assim, CCR3-eotaxina são expressas não apenas em células implicadas na ativação ou migração de eosinófilos, mas também em várias outras células envolvidas na inflamação alérgica.^{26,27}

A relação entre a contagem de eosinófilos e o índice de massa corporal, observada em todo o grupo de pacientes, está de acordo com relatos prévios, que mostram uma relação proporcional entre o índice de massa corporal e as doenças alérgicas das vias respiratórias.^{15,28,29} No entanto, mais estudos são necessários para entender o seu significado.

O achado de uma frequência/gravidade semelhante dos sintomas nasais em pacientes com rinite alérgica expostos ou não à fumaça do tabaco pode ter sido relacionada com a idade dos participantes. As evidências sustentam que crianças e adolescentes com rinite perene frequentemente sub-relatam seus sintomas nasais.^{30,31} Além disso, o cenário do estudo pode ter sido um fator de confusão; todos os participantes moravam em uma das cidades mais poluídas do mundo. Como os dois grupos foram expostos de maneira semelhante à poluição, eles eram comparáveis, mas os fatores ambientais podem ter interferido em seus sintomas. Várias associações intra e inter países, entre fatores ambientais e prevalência de sintoma de rinite persistente, têm sido relatadas.^{32,33} No Peru³⁴ e no Brasil,³⁵ sintomas mais importantes de asma e rinite foram observados em adolescentes urbanos quando comparados com aqueles que vivem em aldeias rurais.

As evidências apontam que os hormônios sexuais são propensos a desempenhar um papel importante no desenvolvimento e desfecho da resposta imune alérgica.³⁶ Contudo, este estudo não foi projetado para explorá-lo; a faixa etária semelhante e a razão homens/mulheres dos dois grupos possibilitaram comparações entre eles e minimizaram uma possível influência desses fatores sobre os resultados.

As principais limitações deste estudo foram o formato e o tamanho da amostra. O desenho transversal impediu a discussão de qualquer relação causal; e o tamanho da amostra possibilitou identificar apenas as diferenças mais evidentes, sem afastar outras relações possíveis entre as variáveis do estudo. Embora os critérios de seleção tenham sido úteis para controlar a influência das principais variáveis de confusão (como as doenças inflamatórias concomitantes e imunoterapia), uma possível influência sobre os resultados de outros potenciais fatores de confusão, como a

ingestão de alimentos e a exposição respiratória a outras substâncias, não pode ser excluída.

Conclusão

A exposição à fumaça do cigarro de tabaco pode aumentar a eotaxina-1 e a contagem de eosinófilos na mucosa nasal de pacientes jovens com rinite alérgica perene.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Kariyawasam HH, Robinson DS. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27:117-27.
2. Teran LM, Rojas-Ramos E, Avalos AF, Perez-Fernandez L, Cuevas F. The chemokines RANTES, MCP-3, MCP-4, eotaxin-1 and eotaxin-2 are associated with eosinophil recruitment into the airways of asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:S36.
3. Semik-Orzech A, Barczyk A, Wiaderekiewicz R, Pierzchała W. Eotaxin, but not IL-8, is increased in upper and lower airways of allergic rhinitis subjects after nasal allergen challenge. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32:230-8.
4. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997;277:2005-7.
5. Heinemann A, Hartnell A, Stubbs VE, Murakami K, Soler D, LaRosa G, et al. Basophil responses to chemokines are regulated by both sequential and cooperative receptor signaling. *J Immunol*. 2000;165:7224-33.
6. Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells. *Chem Immunol Allergy*. 2005;87:130-44.
7. Luster AD. Antichemokine immunotherapy for allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1:561-7.
8. Elsnér J, Escher SE, Forssmann U. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy*. 2004;59:1243-58.
9. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368:733-43.
10. Terada N, Hamano N, Kim WJ, Hirai K, Nakajima T, Yamada H, et al. The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid: its key role in eosinophil recruitment in nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:575-9.
11. Salib RJ, Lau LC, Howarth PH. Nasal lavage fluid concentrations of eotaxin-1 (CCL11) in naturally occurring allergic rhinitis: relationship to disease activity, nasal luminal eosinophil influx, and plasma protein exudation. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:995-1002.
12. Seymour BWP, Pinkerton KE, Friebertshausen KE, Coffman RL, Gershwin LJ. Second-hand smoke is an adjuvant for T-helper-2 responses in a murine model of allergy. *J Immunol*. 1997;159:6169-75.
13. Rumold R, Jyrala M, Diaz-Sanchez D. Second hand smoke induces allergic sensitization in mice. *J Immunol*. 2001;167:4765-70.
14. Vinke JG, Kleinjan A, Severijnen WFM, Fokkens WJ. Passive smoking causes an "allergic" cell infiltrate in the nasal mucosa of non-atopic children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1999;51:73-81.

15. Montaña-Velázquez BB, Campillo Navarrete R, García F, Mogica Martínez MD, Becerril-Ángeles M, Jáuregui-Renaud K. Influence of exposure to tobacco cigarette smoke on the eosinophil count on the nasal mucosa in young patients with perennial allergic rhinitis. *Rhinology*. 2013;51:253–8.
16. Krisiukienė A, Babusyte A, Stravinskaite K, Lotvall J, Sakalauskas R, Sitkauskienė B. Smoking affects eotaxin levels in asthma patients. *J Asthma*. 2009;46:470–6.
17. Warren CW, Jones NR, Peruga A, Chauvin J, Baptiste JP, Costa de Silva V, et al. Centres for Disease Control and Prevention (CDC). Global youth tobacco surveillance, 2000–2007. *Morb Mortal Wkly Rep Surveill Summ*. 2008;57:1–28.
18. Olivieri M, Bodini A, Peroni DG, Costella S, Pacifici R, Piacentini GL, et al. Passive smoking in asthmatic children. Effect of a “smoke-free house” measured by urinary cotinine levels. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27:350–3.
19. Corren J, Harris AG, Aaronson D, Beaucher W, Berkowitz R, Bronsky E, et al. Efficacy and safety of loratadine plus pseudoephedrine in patients with seasonal allergic rhinitis and mild asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:781–8.
20. Montaña-Velázquez BB, Jáuregui-Renaud K, Campillo Navarrete MR, Mojica Martínez M, Ruiz Hinojosa A, Becerril Angeles M. Evaluation of a questionnaire for measuring nasal symptoms in subjects with allergic rhinitis. *Rev Alerg Mex*. 2003;50:17–21.
21. Kalra R, Singh SP, Savage SM, Finch GL, Sopori ML. Effects of cigarette smoke on the immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive calcium stores. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;293:166–71.
22. Matsumoto K, Aizawa H, Inoue H, Koto H, Takata S, Shigyo M, et al. Eosinophilic airway inflammation induced by repeated exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 1998;12:387–94.
23. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Renard SI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1770–6.
24. Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, Kluger MJ. Nicotine-induced modulation of T cell function. Implications for inflammation and infection. *Adv Exp Med Biol*. 1998;437:279–89.
25. Jensen EJ, Pedersen B, Narvestadt E, Dahl R. Blood eosinophil and monocyte counts are related to smoking and lung function. *Respir Med*. 1998;92:63–9.
26. Oyamada H, Kamada Y, Kuwasaki T, Yamada Y, Kobayashi Y, Cui C, et al. CCR3 mRNA expression in bronchial epithelial cells and various cells in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;120 Suppl. 1:45–7.
27. Gerber BO, Zanni MP, Uguccioni M, Loetscher M, Mackay CR, Pichler WJ, et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol*. 1997;7:836–43.
28. Bråbäck L, Hjertqvist A, Rasmussen F. Body mass index, asthma and allergic rhinoconjunctivitis in Swedish conscripts—a national cohort study over three decades. *Respir Med*. 2005;99:1010–4.
29. Weinmayr G, Forastiere F, Büchele G, Jaensch A, Strachan DP, Nagel G, et al. Overweight/obesity and respiratory and allergic disease in children: international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) phase two. *PLOS ONE*. 2014;9:e113996.
30. Priftisa KN, Drigopoulos K, Sakalidou A, Trigaa M, Kalliss V, Nicolaidou P. Subjective and objective nasal obstruction assessment in children with chronic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70:501–5.
31. Montaña-Velázquez BB, Navarrete RC, Mogica Martínez MD, Becerril-Ángeles M, Jáuregui-Renaud K. Rhinomanometry in young patients with perennial allergic rhinitis with/without recent exposure to tobacco smoke. *Clin Otolaryngol*. 2011;36:320–4.
32. Fuertes E, Butland BK, Ross Anderson H, Carlsten C, Strachan DP, Brauer M, et al. Childhood intermittent and persistent rhinitis prevalence and climate and vegetation: a global ecologic analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113:386–92.
33. D’Amato G, Holgate ST, Pawankar R, Ledford DK, Cecchi L, Al-Ahmad M, et al. Meteorological conditions, climate change, new emerging factors, and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organ*. 2015;14, 8:25. eCollection 2015.
34. Robinson CL, Baumann LM, Gilman RH, Romero K, Combe JM, Cabrera L, et al. Effect of urbanisation on asthma, allergy and airways inflammation in a developing country setting. *Thorax*. 2011;66:1051–7.
35. Solé D, Cassol VE, Silva AR, Teche SP, Rizzato TM, Bandim LC, et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among adolescents living in urban and rural areas in different regions of Brazil. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007;35:248–53.
36. Almqvist C, Worm M, Leynaert B, working group of GA2LEN WP 2.5 Gender. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy*. 2008;63:47–57.