

**SOCIEDADE PORTUGUESA  
DE ALERGOLOGIA E  
IMUNOLOGIA CLÍNICA**

**DIRECÇÃO**

**Presidente**

Dr. Celso Chieira

**Vice-Presidentes**

Prof. Dr. Segorbe Luís  
Prof. Dr. A.G. Palma-Carlos  
Prof. Dr. Mário Queirós

**Secretário-Geral**

Dr.ª Maria da Graça Castel-Branco

**Secretário-Geral Adjunto**

Dr. Mário Loureiro

**Tesoureiro**

Dr. Rosado Pinto

**ASSEMBLEIA GERAL**

**Presidente**

Dr. Pinto Mendes

**Vice-Presidente**

Dr. Libério Ribeiro

**Secretário**

Dr.ª Ana Maria Todo-Bom

**COMISSÃO VERIFICADORA DE  
CONTAS**

Dr. Figueiredo Pinto  
Dr.ª Natália Ferreira  
Dr. Carlos Loureiro

Com o segundo número do volume 2 da REVISTA PORTUGUESA DE IMUNOALERGOLOGIA abre-se um novo capítulo na vida deste órgão oficial da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Pela primeira vez são incluídos dois artigos científicos de investigadores estrangeiros e, por esse facto, escritos em inglês. Se, à primeira vista, esta iniciativa da Redacção parece abrir uma excepção ao principal objectivo da RPIA - a produção científica dos investigadores portugueses que se situam na área da Alergologia e Imunologia Clínica - ela abre caminho a uma divulgação mais alargada do conteúdo científico das reuniões anuais da SPAIC.



Essa divulgação, iniciada no número anterior com a publicação dos resumos das comunicações livres apresentadas, é aqui alargada com o texto de três excelentes conferências da reunião do Porto. Estas publicações permitirão, aos poucos membros da Sociedade que não puderam estar presentes e a todos os Colegas que recebem a Revista, obter uma breve panorâmica do âmbito científico da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica e da actividade dos seus membros. Como membro recente do Conselho Científico da Revista Portuguesa de Alergologia e Imunologia apraz-me também registar que ao apelo da Redacção para a publicação dos principais temas das conferências responderam tão prontamente dois investigadores de renome internacional.

De facto o Dr. Stephan Durham, do National Lung and Heart Institute de Londres, apresenta-nos aqui o seu elegante modelo em que novas técnicas de imunocitoquímica e genética molecular são aplicadas à investigação de problemas clínicos da prática diária da Alergologia - a rinite alérgica e a sua imunomodulação. Os resultados obtidos, fruto de um longo trabalho da sua equipa de investigação, apontam para a possível base molecular da complementaridade de duas diferentes terapêuticas há muito usadas nesta situação - a corticoterapia tópica e a imunoterapia específica. Pelo seu lado o Dr. Alvarez Cuesta, do Hospital Ramon e Cajal de Madrid, expõe-nos a sua larga experiência no estudo da alergia à penicilina, abordando a metodologia diagnóstica e a atitude prática face às diferentes apresentações clínicas desta situação. Na rubrica «Tema Teórico de Actualização» é também incluída a intervenção da Dr.ª Marianela Vaz na mesa redonda sobre Asma Brônquica, fazendo o ponto da situação sobre o papel fulcral dos linfócitos T na patogenia da asma.

Abrem-se, assim, neste número as páginas da REVISTA PORTUGUESA DE IMUNOALERGOLOGIA à colaboração internacional. Esperamos que este novo desafio venha a constituir um estímulo para que os membros da SPAIC e todos os colaboradores da RPIA mantenham, ou se possível aumentem, o nível científico a que nos habituaram no primeiro volume da Revista.

*DR. LUÍS DELGADO*



# Allergic Rhinitis: Basic Mechanisms and Influence of Treatment

STEPHAN R. DURHAM \*

The classical mechanism of induction of immediate symptoms following allergen exposure involves the IgE dependent activation of mast cells and basophils. Another feature characteristic of allergic rhinitis is local eosinophilia. Recent data suggests that local mechanisms of IgE regulation and tissue eosinophilia depend upon release of cytokines particularly from T lymphocytes, but also from alternative cells including mast cells. This brief review of studies from our own and other groups evaluate the evidence for a putative role for cytokines, their cell source and the influence of treatment including immunotherapy and topical corticosteroids.

## MAST CELLS

Immediate symptoms of itching, sneezing, watery nasal discharge and nasal congestion following both natural and experimental allergen exposure occur as a consequence of the IgE - dependent activation of nasal mucosal mast cells. Mast cell degranulation has been observed directly in biopsy specimens following local provocation<sup>1</sup>, epithelial mast cell numbers increase following seasonal grass pollen exposure<sup>2</sup> and epithelial mast cell numbers are reduced by treatment with corticosteroids<sup>3</sup> and following allergen specific immunotherapy.<sup>4</sup> Mediators released following mast cell degranulation include histamine, tryptase and bradykinin. Newly formed, membrane-derived mediators include LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> and prostaglandin D<sub>2</sub>. A further potent lipid mediator released is platelet activating factor. The known biological properties of these mediators include vasodilation, increased vascular permeability, chemotaxis for inflammatory cells and induced neural reflexes, all of which may contribute to the development of immediate nasal symptoms following allergen exposure. Mediators of hypersensitivity are detectable in nasal washings during both imme-

diate<sup>5</sup> and late-phase responses<sup>6</sup> following allergen provocation. The identification of both histamine and the mast cell-specific prostaglandin D<sub>2</sub> during immediate responses confirms mast cell involvement. The release of histamine but not prostaglandin D<sub>2</sub> at 3-11 hr after challenge implies basophil participation during late-phase responses.<sup>6,7</sup> The contribution or otherwise of mediators in the production of clinical symptoms is reflected by the therapeutic response to specific mediator antagonists. The efficacy of oral (and topical) antihistamines in suppressing itch, sneezing and discharge (but not nasal blockage) confirms a primary role for histamine. Recent studies suggest that leukotriene antagonists and lipoxygenase inhibitors may also be effective, although specific bradykinin antagonists (now available) have yet to be tested.

## EOSINOPHILS

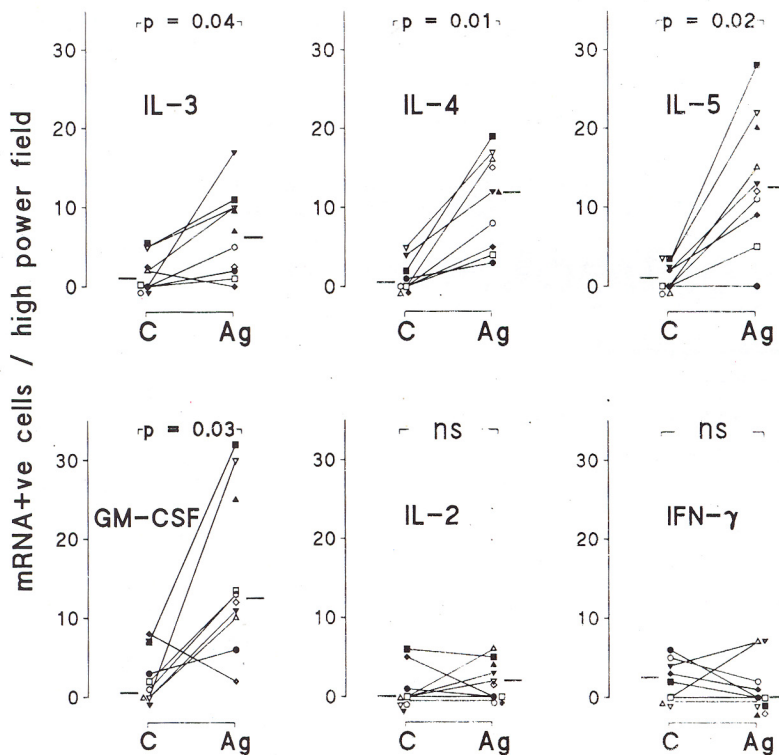
A characteristic feature of allergic rhinitis is local eosinophilia which is evident in nasal lavage<sup>8</sup> and in nasal biopsies<sup>9</sup> although the mechanism remains unclear. Tissue eosinophilia may result from increased eosinophil chemotaxis or vascular adhesion, increased bone marrow production of eosinophils or prolonged survival of eosinophils in tissues. Recent evidence strongly supports a role for so called "Th2-type" cytokines as originally defined in murine studies<sup>10</sup> and recently confirmed "*in vitro*"<sup>11</sup> and "*in vivo*"<sup>12</sup> in studies of human T lymphocytes.

## CYTOKINES IN ALLERGIC RHINITIS

Cytokines, originally described as products of T lymphocytes, are now known to be produced by a wide variety of cells including macrophages, eosinophils, mast cells, basophils and epithelial cells. By use of nasal biopsy and the combined techniques of immunohistology and *in situ* hybridisation we have examined the role of T lymphocytes and cytokines during natural exposure<sup>13</sup> and following local provocation<sup>14, 15</sup> and have examined the influence of treatment with immunotherapy<sup>16</sup> and topical corticosteroids.<sup>17</sup>

\* Senior lecturer and honorary consultant physician  
Royal Brompton / National Heart & Lung Institute - London  
Department of Allergy and Clinical Immunology  
Conferência apresentada na XIV Reunião Anual da S.P.A.I.C.,  
Dez. 1993

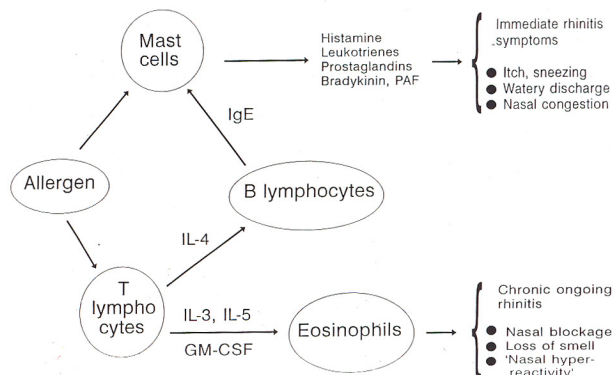




**Figure 1** - *In situ* hybridization of nasal biopsies using rioprobes for IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-2 and IFN- $\gamma$ . The cytokine mRNA profile of cells infiltrating biopsy sites 24 h after local allergen provocation (Ag) and after challenge with a control solution (C). The symbols identify values from the same individual patients, in two subjects (A), biopsies for *in situ* hybridization were obtained only after allergen. Median values are represented by the solid bars. Comparisons were made using the Wilcoxon matched pairs signed ranks test.

During natural grass pollen seasonal exposure, the characteristic findings on immunohistology of nasal biopsies was tissue eosinophilia (with an increase in both total and "activated" EG2+ cells and the epithelial migration of tryptase-only (but not tryptase + chymase positive) mast cells.<sup>13</sup> At 24 hr after local grass pollen provocation we observed an increase in CD4+ helper T lymphocytes, an increase in CD25+ (interleukin 2 receptor bearing) cells and elevations in both eosinophils and neutrophils<sup>14</sup>. *In situ* hybridisation studies demonstrated preferential mRNA expression for IL-4 and IL-5 during the late phase at 24 hr.<sup>15</sup> Elevations in IL-3 and GM-CSF were also observed but not increases in IL-2 or IFN $\gamma$ . There was a close correlation between "Th2-type" cytokine mRNA expression and the number of activated (EG2+) eosinophils, particularly IL-5 (Fig. 1).

Taken together these observations support CD4+ T lymphocyte recruitment and activation and the release of Th2-type cytokines "*in vivo*" contributing to the development of late nasal responses and associated tissue eosinophilia. The precise cell(s) of origin of these cytokines is yet to be determined, although our preliminary data suggests the principal cellular source (at least at mRNA level) to be T lymphocytes, with a contribution from mast cells.<sup>18, 19</sup> (Figure 2).





More recently we have examined the effect of treatment on these cellular findings. Briefly, both immunotherapy<sup>16</sup> and prolonged (6 weeks) treatment with topical corticosteroids<sup>17</sup> inhibit both early and late phase nasal responses after allergen (grass pollen) challenge. Both forms of treatment also inhibit local numbers of T lymphocytes and eosinophils.<sup>16, 17</sup>

Our hypothesis was that immunotherapy and corticosteroids may act by distinct mechanisms inhibiting local recruitments of activated, CD25+, CD4+ T lymphocytes and eosinophils. We have performed two large prospective double blind placebo controlled trials each involving over 40 patients. Following one year treatment with immunotherapy a repeat nasal allergen provocation demonstrated inhibition of both early and late nasal responses. There was a non-significant reduction in IL-4 and IL-5 mRNA+ cells during the late phase response.<sup>20</sup> The striking finding was a significant increase in allergen induced cells mRNA+ for interferon gamma. This suggested a "switch" in favour of an additional TH1 response following successful immunotherapy.<sup>20, 21</sup> In contrast six weeks pretreatment with topical corticosteroids (Fluticasone propionate, when compared to placebo treatment) resulted in selective inhibition of cells mRNA+ for IL-4. No significant decrease in IL-5 mRNA+ cells was observed after challenge and no increase in interferon gamma.<sup>22</sup> Thus topical corticosteroids act by suppressing TH2-type response whereas immunotherapy may act by modulating T lymphocytes in favour of an additional TH1 response characterised by local increases in interferon gamma.

## REFERENCES

1. Gomez E, Corrado OJ, Baldwin DL, Swanton AR, Davies RJ. Direct *in vivo* evidence for mast cell degranulation during allergen-induced reactions in man. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 637-645.
2. Viegas M, Gomez E, Brooks J, Gatland D, Davies RJ. Effect of the pollen season on nasal mast cells. *Br Med J* 1987; 294:414.
3. Gomez E, Clague JE, Gatland D, Davies RJ. Effect of topical corticosteroids on seasonally induced increases in nasal mast cells. *Br Med J* 1988; 296:1572-1573.
4. Otsuka H, Mezawa A, Ohnishi K, Okubo K, Seki H, Okuda M. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:115-119.
5. Naclerio RM, Proud D, Togias AG, et al. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med* 1985;313:65-70.
6. Iliopoulos O, Proud D, Franklin Adkinson N, et al. Relationship between the early, late and rechallenge reaction to nasal challenge with antigen: observations on the role of inflammatory mediators and cells. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86:851-861.
7. Bascom R, Wach SM, Naclerio RM, Pipkorn U, Galli SJ, Lichtenstein LM. Basophil influx occurs after nasal challenge: effects of topical corticosteroid pretreatment. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:580-589.
8. Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge: effect of corticosteroid pretreatment. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:406-412.
9. Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Robinson DS, Irani A-MA, Schwartz LB, Mackay IS, Kay AB and Durham SR. Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:170-176.
10. Mosmann TR, Chevwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RG. Two types of murine helper T cell clone 1 definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-2357.
11. Wierenga EA, Snoek M, De Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML. Evidence for compartmentalisation of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144:4651.
12. Kay AB, Sun Ying, Varney V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, Wardlaw AJ, Hamid Q. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 1991; 173:775.
13. Bentley AM, Jacobson MR, Cumberworth V, Barkans JA, Moabel R, Schwartz LB, Irani A-MA, Kay AB, Durham SR. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:821-829.
14. Varney VA, Hamid QA, Gaga M, Sun Ying, Jacobson M, Frew AJ, Kay AB, Durham SR. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 1993; 92:644-651.
15. Durham SR, Sun Ying, Varney VA, Jacobson Mr, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid Q. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol* 1992; 148:2390-2394.
16. Durham SR, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Kay AB. Effect of grass pollen immunotherapy on allergen-induced early and late nasal responses. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:290 (Abstr).
17. Rak S, Jacobson MR, Sudderick RM, Masuyama K, Kay AB, Lowhagen O, Durham SR. Effect of topical fluticasone propionate on allergen-induced early and late nasal responses and associated tissue eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:299 (Abstr).



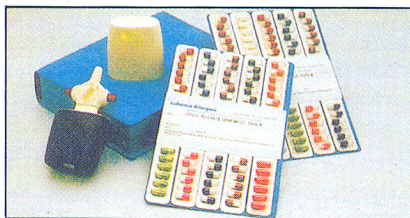
18. Sun Ying, Hamid Q, Barkans J, Moqbel R, Durham SR, Kay AB. Phenotype of cells expressing interleukin-5 mRNA in the nasal mucosa after local allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:252 (Abstr).
19. Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bews JPA, Hunt TC, Okayama Y, Heusser CH, Bullock GR, Church MK, Holgate ST. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med* 1992; 176:1381.
20. Durham SR, Varney VA, Sun Ying, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid Q. 1994 (submitted).
21. Durham SR, Varney VA, Gaga M, Frew AJ, Jacobson MR, Kay AB. Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:Suppl 1:206-210.
22. Masuyama K, Jacobson MR, Rak S, Meng Q, Sudderick RM, Kay AB, Lowehagen O, Hamid Q, Durham SR. Topical glucocorticosteroid (Fluticasone propionate) inhibits cells expressing cytokine mRNA for interleukin-4 (IL-4) in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis. *Immunology* 1994 (in press).

## Lofarma Lusitana Limitada

Av. Valbom 16, 2º esq.  
2750 Cascais

**L.L.L.**

Tel. 01/2846733  
Telefax 01/2846788



**ALLERKIN TEST**  
Test di provocazione nasale  
per Graminacee, Parietarie  
e Dermatophagoides



# Allergy to Penicillin

E. ALVAREZ CUESTA, MD., PhD.; (\*) A. BERISTAIN, MD. (\*)

## SUMMARY

*Since Fleming discovered Penicillin, it has been one of the most widely used antibiotics due to the combination of its bactericide efficiency, low cost and scarce side effects.*

*Among the latter, the most frequent ones that restrict its use in the common clinical practice are precisely the phenomena of both real or suspected hypersensitivity. Not in vain does penicillin head the list of drugs capable of precipitating allergic reactions, estimating that these can affect 2% of the general population at some moment in their lifetime. An idea of the real importance of this problem can be given with the observation that, for every 100,000 penicillin injections there are between 10 and 40 hypersensitivity reactions, 2 of which can be fatal anaphylactic reactions. Thus, only in the United States of America, some 300 persons per year die from this cause.*

*We will explain some features of the hypersensitivity to penicillins in the following, concentrating on its pathogeny, clinical manifestations and diagnostic possibilities.*

## PATHOGENY

Penicillin is a low molecular weight molecule, of about 300 Daltons, and thus is incapable of precipitating an immune response by itself. It must, therefore, bind to a high weight molecular molecule, generally a protein, that will act as a carrier, the hapten-carrier complex being the truly immunogenic one. From this, the production or non-production of an immune response and the nature of this response will depend on both the features of the hapten and the carrier as well as the characteristics of the individual's immunological response.

Penicillin, in its native state, lacks the free radicals necessary to securely bind, by covalent linkages, with the corresponding macromolecule. Thus, there arises the importance of knowing its metabolic routes, since it is through these that the capacity of functioning as a hapten is acquired. Figure 1 shows a summary of the principal routes of metabolization of penicillin, as well as both its main major and minor antigenic determinations that are truly responsible for the existence of the hypersensitivity reactions of these.

## ANTIGENIC DETERMINANTS OF PENICILLIN

The antigenic determinants of penicillin can be classified as major and minor (Table I). Each one of them is associated to the preferential development of one type of immune response that gives rise to different types of clinical manifestations (Table II).

### Benzyl-penicilloyl:

It is estimated that 95% of the penicillin administered to a subject is capable of binding to a carrier through a beta-lactam ring, which is made up of a non-polar phenylacetamide nucleus and a thiazolidine group with carboxyl endings, thus forming benzyl-penicilloyl (BPO). This is the best characterized antigenic determinant, against which most of the synthesized antibodies are directed in both man and animal. That is why it is considered the major antigen determinant. It basically gives rise to the production of the IgG and IgM antibodies that mediate the accelerated or retarded urticarial reactions.

### Minor antigenic determinants

The minor antigenic determinants are formed in much lesser quantities. Penicillenate, penicillamine, polypenicoyl, penaldate, benzyl-penicilloic acid and penalmdic acid stand out. Basically, they induce IgE synthesis and are the main responsible agents of the immediate reactions, urticaria, angioedema,

(\*) Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain

\* Conferência apresentada na XIV Reunião Anual da S.P.A.I.C., Dez. 1993



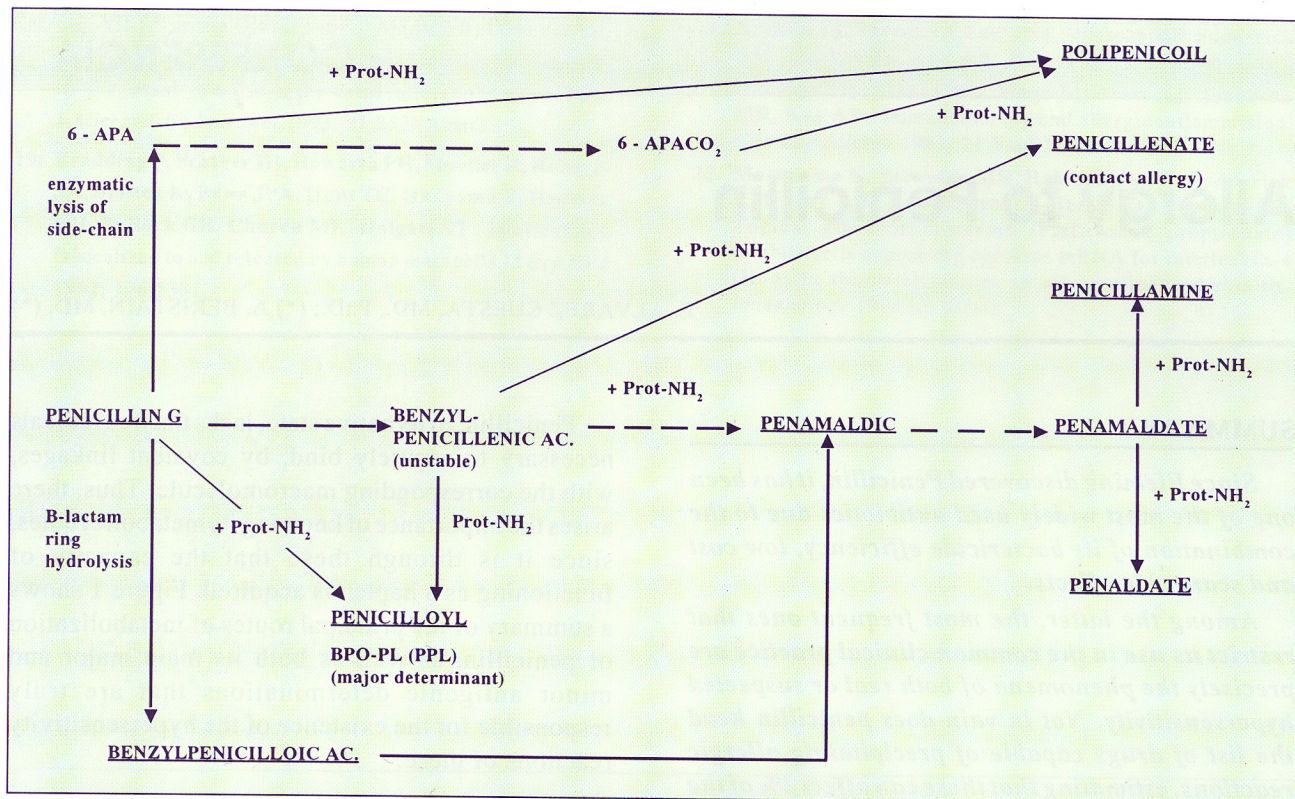


Figure 1 - Penicillin metabolism

bronchospasm, that can give rise to anaphylactic shock, and to a lesser degree, to the accelerated reactions.

Table I

ANTIGENIC DETERMINANTS OF PENICILLIN

1. Major antigenic determinant
  - Benzyl-penicilloyl (BPO)
2. Minor antigenic determinants
  - Penicillenate
  - Penicillamine
  - Polypenicoyl
  - Penaldate
  - Benzyl-penicilloic acid
  - Penamaldic acid
3. Other antigens:
  - Impurities
  - Penicillin polymers

Other possible antigens

- **Impurities:** These are basically exogenous proteins that appear in the process of penicillin

Table II

**PATHOGENY OF THE ALLERGY TO PENICILLIN**  
**Immunology of the reactions to penicillin**

TYPE OF REACTIONS ACCORDING TO CLINICAL PICTURE		ANTIGEN	ANTIBODY	TYPE OF REACTION GEL & COOMBS
anaphylactic		minor determinants	IgE	I
accelerated reactions		major determinants	IgE	I
late reactions	Hemolysis	BPO fixed to the red cell membrane	IgG, IgM	II
	Interstitial Nephritis	BPO fixed to the tubular membrane	IgG, IgM	II
	Serum Sickness	major determinants	IgG, IgM	III
	Maculopapular Rash	BPO?	IgM?	delayed Hypersensitivity

production. It seems that they are capable of binding to benzyl-penicilloyl groups, thus acquiring immunogenic capacity. Given the improvements introduced into the manufacturing process, the concentration of these impurities is lesser and lesser, and thus their clinical importance is decreasing.



- **Penicillin polymers:** It seems that these have the same specificity as the penicilloyl determinant.

## CLINICAL MANIFESTATIONS

The clinical manifestations can be quite variable depending on the mechanism involved. Their approximate frequency is shown in Table III:

According to Levine <sup>1</sup>, they can be classified in function of their appearance in time in:

- Immediate reactions.
- Accelerated reactions.
- Late reactions.

Table III

### CLINICAL PICTURES: FREQUENCY OF APPEARANCE

URTICARIA	46%
ANGIOEDEMA	
GENERALIZED EXANTHEMA	17%
HYPOTENSION	12%
SERUM DISEASE	10%
CONTACT DERMATITIS	3%
BLOOD DYSCRASIA	32%
PRURITUS	2%
ASTHMA	0.7%

#### 1. **Immediate reactions:**

These occur during the first hour after administering the drug. The most frequent manifestation is urticaria, with or without angioedema, this being followed by hypotension, that has the greatest vital risk since it can end up in frank anaphylactic shock, and by wheezing dyspnea.

They result from the activation of the mastocytes and/or circulating basophils by the union of the antigen with the specific IgE located in their respective membranes. In most of the cases, the responsible antibodies are directed against the minor determinants of the penicillin, although at times they can be against the BPO <sup>2</sup>. In principle, this is paradoxical, since the synthesis of specific IgE against BPO is estimated to be five times greater than against the minor determinants. In an attempt to explain this situation, it has been postulated that the presence of the antigen in very

small quantities - as is the case of the minor antigenic determinants - would give rise to the synthesis of a very high specific IgE affinity that would not be counterbalanced by the presence of the specific IgG blocker antibodies since these would need greater quantities of circulating antigen for their synthesis. The BPO, present in greater quantities, would have a clearer IgE response but a lower affinity, together with the synthesis of specific IgG blockers.

#### 2. **Accelerated reactions:**

These take place between one to 72 hours after the administration of the penicillin. They are basically represented by urticarial/angioedema type reactions and other exanthematic eruptions. They seem to be mediated by specific IgE antibodies against BPO, present at the onset of the treatment with the drug. They sometime disappear even though the antibiotic treatment is continued, this having been seen to temporally correlated to an increase in the concentration of specific IgG against BPO.

#### 3. **Late reactions:**

They occur from the third day after the onset of the treatment with the penicillin. The most representative manifestations are exanthematic eruptions, although in this case, the clinical as well as physiopathological variety (Table II) is great. Thus, the urticaria with or without angioedema, dermatitis exfoliative, Stevens-Johnson's syndrome, drug fever and serum disease are also typical.

Other manifestations, much less frequent, include the interstitial nephritis, hepatitis, blood dyscrasia (neutropenias, thrombocytopenias and hemolytic anemias), pulmonary infiltrative pathology and vasculitis, that can even develop into lupoid reactions.

## DIAGNOSTIC TESTS

For many years, all those subjects who reported a clinical history of adverse reaction compatible with penicillin were considered to be allergic to penicillin. Already by 1969, Levine <sup>3</sup> had stated that any of the "allergic" subjects to penicillin could tolerate it without important problems. Since then, this overdiagnosis has been confirmed in several occasions. <sup>4,5</sup>

Among the reasons explaining why a subject who had previously presented a typical reaction to penicillin can later tolerate it, there are two that stand out:



- the symptoms that had been considered to be allergic ones were really produced by the original infection.
- the subject had lost his sensitivity to the medication. <sup>6</sup>

Given that the clinical history is not sufficient to reach an unerring diagnosis of hypersensitivity to penicillin, it is necessary to develop other tests that complemented it so as to detect those patients who truly have a risk of developing a new allergic reaction after re-exposure to penicillin. To do so, we can count on a series of "in vivo" and "in vitro" tests (Table IV), some of which we will comment on.

Table IV

DIAGNOSTIC TECHNIQUES

<ul style="list-style-type: none"> <li>- "IN VIVO" TEST:           <ul style="list-style-type: none"> <li>- SKIN TEST</li> <li>- SPECIFIC PROVOCATION TEST</li> </ul> </li> <li>- "IN VITRO" TEST:           <ul style="list-style-type: none"> <li>- RAST</li> <li>- OPTIC BASOPHIL DEGRANULATION</li> </ul> </li> </ul>
---

Skin tests

Skin tests are indicated in those subjects having a previous history of hypersensitivity reaction after the administration of penicillin that are susceptible of having been IgE mediated. Therefore, they have no predictive value in serum disease, cytopenias, dermatitis exfoliative, interstitial nephritis, drug fever or maculopapular rash.

The following products are commercialized:

- Penicilloyl polylysine (PPL): synthetic conjugate of BPO with a non- immunogenic carrier.
- Disodic benzyl-penicilloate, representing the minor antigenic determinants (MDM).
- Penicillin G.

In general, the skin test with PPL detects between 35% and 75% of the subjects allergic to penicillin, its sensitivity being increased if the minor antigenic determinants and penicillin G are also tested. <sup>7,8</sup>

We use undiluted PPL, in a concentration of  $6 \times 10^5$  M =, benzyl-penicilloate up to a concentration of 0.5 mg/dl and penicillin G up to 10,000 U/ml for the skin tests. The concentration used at onset and its subsequent doses depends on the characteristics of the clinical history. We always begin with the prick test, and if this is negative, we then use the

intradermoreaction. We evaluate both techniques according to that established in the international literature. <sup>9</sup>

In our experience <sup>7,8</sup>, the effectiveness of the skin tests in predicting the tolerance to the re-exposure to penicillin (negative predictive value) is 97%. The remaining 3% presented reactions that at no time were life threatening. On the contrary, a positive skin test strongly suggests non-tolerance to the readministration of penicillin (high positive predictive value).

Regarding the safety of this technique, in our experience <sup>10</sup> only 0.4% of the patients presented a slight pruriginous urticaria with MDM or penicillin G, that was easily controlled with the normal medication. In any case, as three cases of death have been described with this technique <sup>11</sup>, we recommend that the tests only be used in the presence of a qualified allergologist and after suspension of drugs that may strengthen the anaphylactic reactions (beta-blockers, for example).

All things considered, the skin tests with PPL, MDM and penicillin G, done by experienced personnel, are a rapid, safe and effective method to predict the risk of suffering an allergic reaction to the readministration of penicillin.

Determination of specif IgE: RAST technique

This is a solid phase radioimmunoassay technique described by Wide and Juhlin in 1971 <sup>12</sup>. This technique has several problems in the diagnosis of hypersensitivity to medicaments in general and therefore applicable to the diagnosis of allergy to penicillin: <sup>13</sup>

- As its nature is a non-protein antigen and therefore it lacks amine groups, it has difficulties in its linkage to the solid phase.
- It is difficult to know exactly what transformations the drug undergoes in the organism as well as the exact structure of the haptent-carrier complex that will be needed to bind to the solid phase.

It has some advantages regarding the skin tests:

- The allergen is stable in the solid phase.
- They are preferable to the skin tests in patients with dermographism, extended dermatitis and in general in all the occasions in which the former tests are not possible.
- The results are quantitative, and therefore, easily comparable.



The main disadvantages are:

- Its specificity <sup>7, 13</sup> is less than that of the skin tests.
- It is an expensive technique in relation to the "in vivo" studies.
- It is only possible to detect abnormalities with the major antigenic determinant since none of the minor ones are commercialized, the latter, as we have indicated, being the main cause of anaphylactic shock.

In general, it is a sensitive and specific method <sup>7, 13</sup>, although its results are inferior to those of the skin tests.

### Basophil degranulation test

With this test, we are attempting to quantify the specific degranulation of the IgE mediated antigen of the basophils of the peripheral blood. Although technically it is available to any minimally equipped laboratory, in practice, its use is not very extensive due to the difficulty of the technique.

Ureña et al <sup>14</sup> established the limits of positivity of this test in 35% of degranulation for penicilloyl (52% sensitivity, 86% specificity) and 25% for the minor determinants (61% sensitivity and 72% specificity). In principle, it would be less reliable than the skin test and slightly more than the RAST.

### Specific provocation

It is by far the best diagnostic technique, although it should only be used by experienced allergologists, because of the possibility of inducing severe systemic reactions. The false positive reactions are rare, occurring when the attacks are evaluated in the acute phase. The false negative reactions are also rare, although they can occur if we test the drug during the refractory period or if we have induced tolerance.

It is indicated in those patients in whom, having a suggestive clinical history, hypersensitivity to penicillin has not been diagnosed by other techniques and in whom we consider that it is essential in order to reach the final diagnosis.

We have used the subcutaneous and intramuscular route, according to the protocol presented in Table V, once we have made sure of the negativity of the skin tests. In order to avoid false negative reactions, that can occur if the provocation is done much after the initial reaction, we perform the reprovocation at 15 days. In this period, we assume that the immunological memory, if it exists, should

Table V

### EXPOSURE (PROVOCATION) TEST WITH PENICILLIN G

PENICILLIN CONCENTRATION	DAY	PENICILLIN UNITS DOSE	ROUTE	WAITING TIME
10,000 U/ml	1	500 1000 2000	SC	45'
	2	5000	SC	45'
12,000				
100,000 U/ml	3	25,000	SC	45'
	4	100,000 200,000	SC	45'
5		400,000 800,000	IM	45'

SC = subcutaneous; IM = intramuscular

have been activated. We begin the reprovocation with the reperformance of the skin tests, following the protocol given in Table VI.

Table VI

### REPROVOCATION TEST WITH PENICILLIN G

— 15 DAYS AFTER (DAY N.º 20)

— PROTOCOL:

— SKIN TEST: — PENICILLOYL POLYLYSINE — BENZYL PENICILLOATE — PENICILLIN G

PRICK and INTRA

— RE-EXPOSITION WITH PENICILLIN:

— 200,000 PENICILLIN UNITS 45'

— 2,000,000 PENICILLIN UNITS

### ATTITUDE TOWARD A REACTION AFTER THE ADMINISTRATION OF PENICILLIN

Finally, we will give a practical summary of the attitude to take when with the most frequent reactions presented in the general clinical course after the administration of penicillin.

#### A. Urticaria, angioedema, anaphylaxis

In principle, they are mediated by a Type I mechanism of Gell and Coombs. They are the major indication for the realization of the skin tests with penicillin G and its major and minor determinants. It is estimated that if these are negative, the possibility of presenting a hypersensitivity reaction after the readministration of the drug is low and in any case, it is generally mild and limited to the skin. Given this possibility and in order to verify or discard the



presence of hypersensitivity to penicillin, another type of technique should be used, such as the RAST, basophil degranulation or even the controlled provocation up to therapeutic doses with penicillin. If the skin tests are positive, there is a high risk (50-70%) that a new administration of the drug will provoke an allergic reaction. In this case, and if the use of penicillin is essential, it is possible to begin desensitization with the drug. We recommend the review done by Lopes et al<sup>15</sup> to the reader for its indications and techniques for both the oral and parenteral route.

#### **B. Blood dyscrasis, interstitial nephritis, drug fever or serum disease:**

These are due to a Type II or Type III Gell and Coombs hypersensitivity mechanism. The skin tests can be useful only to discard the concomitant presence of Type I hypersensitivity.

These generally appear in the course of prolonged treatment at high doses. In a practical way, if the skin tests are negative and the administration of penicillin essential, during a short treatment, it can be slowly introduced by a doctor experienced in this subject, with a close control for the appearance of possible side effects, that, in case of appearing, would mean the suspension of the drug and the administration of high doses of systemic steroids.

#### **C. Contact dermatitis:**

This is mediated by a Type IV mechanism. It is a rare entity at present, practically limited to the professional pathology. The prick and intradermic skin tests are not useful for its diagnosis, although patches, which are read after a period of time, can be used. The subjects with this pathology, in general, can accomplish toleration to the systemic administration of penicillin.

#### **D. Toxic epidermal necrolysis, dermatitis exfoliative:**

Their mechanisms are unknown. The performance of skin tests is not indicated. The readministration of penicillin is totally contraindicated given the possibility of provoking a potentially lethal reaction.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Levine BB. Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. *N Engl J Med* 1966; 275: 1115-25.
2. Levine BB, Redmond AP. Minor haptenic determinant - specific reagins of penicillin hypersensitivity in man. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1969; 35:445-55.
3. Levine BB, Zolov DM. Prediction of penicillin allergy by immunological test. *J Allergy* 1969; 43:231-239.
4. Song DD, Casale TB, Codeni JJ et al. Interim results of the NIAID collaborative clinical trial of skin testing with major and minor penicillin derivatives in hospitalized adults *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71 (suppl): 147 (abstract)
5. Alvarez Cuesta E, Ibañez MD, Carrillo T, Sanchez Cano M, Alcover R. Allergy to beta-lactamic antibiotics: Clinical experience with a protocol of skin test with commercial antigens. *Ann Allergy* 1985; 55:371.
6. Chandra RK, Joglekar SA, Thomas E. Penicillin allergy. *Arch Dis Child* 1980; 55:857-866.
7. Alvarez Cuesta E. Significado clínico de la determinación de la IgE total y específica en alergia pediátrica. Tesis doctoral. *Universidad Complutense de Madrid* 1987;3:721-737.
8. Alvarez Cuesta E, Cuesta Herranz J., Ureña V., Atopia Penicilínica: Eficacia y seguridad de las pruebas cutáneas. *Rev Esp Alerg Immunol Clin* 1990; 5: suppl. 2:32-35.
9. Dreborg S. Skin tests used in type I allergy skin testing. Position paper prepared by the Sub-committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 (suppl): 22-59.
10. Alvarez Cuesta E., Cuesta J., Ureña V., Moneo I., Alcover R. Hipersensibilidad a la penicilina: Analisis estadístico-epidemiológico de las técnicas utilizadas para su diagnóstico. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1988; 3:51-60.
11. Van Dellen RD. Skin test for penicillin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:169-175.
12. Wide L, Juhlin L. Detection of penicillin allergy of the immediate type by radioimmunoassay of reagins (IgE) to penicilloyl conjugates. *Clin Allergy* 1971; 1:171-76.
13. Cuesta J, Alvarez Cuesta E, Ureña V. Valoración del Rast en Alergia a medicamentos. *Rev Esp Alerg Immunol Clin* 1990; 5, suppl 2:51-53.
14. Ureña V, Alvarez Cuesta E, Cuesta J, Liaño F, Bootello A. Fiabilidad del test de degranulación de basófilos en el diagnóstico de la alergia a fármacos. *Rev Esp Alerg Immunol Clin* 1990; 5, suppl 2:53-56.
15. Lopes I., Falcão H., Vaz M. Alergia a penicilina. *Rev. Port. Imunoalergol* 1993; 1:167-173.

#### *Send correspondence to:*

Dr. E. Alvarez Cuesta  
 Claudio Cuello 76  
 28001 Madrid - Spain



# Linfócitos T na Mediação da Asma (\*)

MARIANELA VAZ\*\*

Sendo a asma brônquica uma doença conhecida desde a antiguidade, só nas últimas duas décadas se começaram a clarificar os mecanismos envolvidos na sua patogenia e o reconhecimento de que a inflamação das vias aéreas é um achado universal, mesmo em doentes assintomáticos, é talvez a mudança mais importante nos nossos conceitos sobre esta doença.

Até há alguns anos os estudos patológicos limitavam-se aos tecidos de doentes que morriam em mal asmático; a possibilidade de se recorrer a biópsias da mucosa brônquica e a lavados broncoalveolares (LBA) para observar o que se passava em doentes controlados, permitiu verificar que muitas das alterações estruturais e inflamatórias observadas "*post-mortem*" apareciam mesmo em asmáticos ligeiros, fora de crise.<sup>1,2,3</sup>

A presença de grandes quantidades de células epiteliais descamadas e de numerosos eosinófilos têm sido dados constantes enunciados em biópsias e LBA e vários trabalhos demonstraram existir uma correlação entre o número de células epiteliais e de eosinófilos e seus mediadores e a severidade clínica e ao grau de reactividade das vias aéreas.<sup>4,10</sup>

Uma das áreas que mais recentemente tem despertado o interesse no estudo da patogenia da asma é o papel dos linfócitos T na regulação e na expressão da inflamação associada a alergia e a asma.

Enquanto que o papel dos linfócitos B na regulação da síntese da IgE específica de antigénio na resposta humoral da asma alérgica está bem estabelecido, até há pouco não se conhecia qual era a importância dos linfócitos T nesta situação.

Estudos recentes têm permitido avaliar a intervenção dos linfócitos T na mediação da asma, por um lado no controlo da síntese da IgE, por outro na atracção e activação de células inflamatórias, das quais se destacam os eosinófilos, mas também os monócitos, neutrófilos e basófilos.

## A - LINFÓCITOS T NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DA IgE

A verificação de níveis elevados de IgE nas imunodeficiências tímicas primárias e a inibição "*in vitro*" da síntese da IgE pelos linfócitos de doentes atópicos vieram chamar a atenção para o papel regulador das células T na produção de IgE.

Sabe-se hoje que as células B em repouso, requerem um primeiro sinal fornecido pela interacção física com as células T activadas, que pode consistir numa interacção clássica cognitiva (TCR / CD3+ moléculas classe II do MHC) ou interacções não específicas mediadas por proteínas de superfície presentes nas células CD4 activadas e células B. Um outro sinal importante necessário à síntese da IgE é fornecido pela IL-4 libertada pelas células T activadas, que é negativamente regulada pelo INF- $\gamma$  e outras citocinas. Existem ainda outros sinais complementares que podem potenciar a síntese da IgE.<sup>11-13</sup>

No rato foram identificados dois tipos de clones de linfócitos T CD4, denominados Th1 ou Th2 com base no perfil de produção de citocinas: Th1 - IL-2, IL-3, INF- $\gamma$ , GM-CSF e TNF  $\alpha$  mas não IL-4 e IL-5 e Th2 - IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, mas não IL-2 e INF- $\gamma$ . Apesar de ainda estar por estabelecer uma certeza se no homem também existem estes dois tipos de células, vários estudos têm vindo a sugerir que as células T específicas de antigénio se podem comportar com as células Th2 murinas.<sup>14-16</sup>

\* Intervenção na Mesa redonda sobre Asma Brônquica, na Reunião Anual da S.P.A.I.C., Dezembro 1993

\*\* Chefe de Serviço e Directora da Universidade de Imunoalergologia Hospital de S. João - Porto



## B - LINFÓCITOS T E INFLAMAÇÃO NA ASMA

As primeiras evidências do envolvimento dos linfócitos T na patogenia da inflamação na asma resultaram de estudos anátomo-patológicos ultra-estruturais "post-mortem" e de tecidos de biópsias da mucosa que demonstram a presença de grande número de linfócitos, alguns atípicos, com forma irregular, localizados intraepiteliais. Mais recentemente, por intermédio de técnicas imunocitoquímicas, recorrendo a diversos anticorpos monoclonais, tem-se demonstrado a presença de linfócitos T activados, exprimindo à superfície moléculas de activação CD25 (IL-2R), HLA-DR e VLA-1, no sangue periférico, no LBA e em biópsias brônquicas.

Vários aspectos têm sido estudados:

### • ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA ASMA AGUDA GRAVE

Corrigan e cols<sup>17</sup> num primeiro trabalho publicado em 1988 estudaram fenótipos e marcadores de activação de células T do sangue periférico de doentes admitidos por asma grave (na admissão ao 3.º e 7.º dia) e compararam os resultados com controles, tendo verificado que a percentagem de células CD4 e CD8 eram idênticas em todos os grupos, mas os doentes com asma grave tinham um aumento significativo de marcadores de activação: IL-2R, HLA-Dr e VLA-1, sendo as células com IL-2R exclusivamente do fenótipo CD4. A percentagem de células com IL-2R e HLA-DR tendia a diminuir à medida que os doentes melhoravam clinicamente, sob influência da terapêutica.

Num estudo posterior<sup>18</sup> estes autores alargaram a investigação original e além de marcadores de actividade foram analisar produtos solúveis da activação das células T - INF- $\gamma$  e receptor solúvel da IL-2. Neste trabalho confirmaram que os linfócitos T CD4 dos doentes com asma aguda grave tinham um aumento significativo dos três marcadores de activação (IL-2R, HLA-DR e VLA-1), não expressando as células CD8 nem IL-2R nem VLA-1. Verificaram ainda que as concentrações de IL-2R e INF- $\gamma$  eram significativamente mais elevadas nos doentes com asma aguda grave, que existia uma correlação entre as variações de débito expiratório máximo e a percentagem de células CD4 que expressavam IL-2R do dia 1 para o dia 3 e que as concentrações séricas de IL-2R diminuam significativamente do dia 1 para o dia 3, coincidindo com a melhoria do débito expiratório máximo. Estes

resultados sugerem que a activação dos linfócitos T CD4 é muito importante na crise aguda de asma.

### • VARIAÇÕES DAS SUB-POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T APÓS PROVOCAÇÃO ESPECÍFICA

Alguns investigadores têm vindo a observar o que se passa com as subpopulações de linfócitos T após provocação brônquica específica em doentes asmáticos.

Assim, Gerblin e cols<sup>19</sup> verificaram uma redução do número de linfócitos CD4 no sangue periférico imediatamente após provocação brônquica específica com um extracto de gramíneas a que os doentes estavam sensibilizados, que durava 72 horas, sem alteração das células CD8. Não se verificava nenhum fenómeno idêntico após provocação com metacolina, não dependendo portanto as alterações da broncoconstrição em si.

Para testar a hipótese de que a diminuição das células CD4 no sangue periférico se devia a uma chamada destas células ao pulmão, os mesmos autores<sup>20</sup> foram analisar o que se passava simultaneamente no sangue periférico e no líquido de lavado bronco-alveolar, nas mesmas condições. Confirmaram a diminuição dos linfócitos CD4 no sangue periférico e ao mesmo tempo um aumento significativo destas células no LBA, após a provocação com antigénio, mas não com o placebo, o que favorece a hipótese de a provocação antigénica condicionar uma chamada destas células ao pulmão.

### • LINFÓCITOS T E EOSINÓFILOS

Sabe-se que os eosinófilos estão aumentados no sangue periférico e nas vias aéreas dos asmáticos e se correlacionam com a diminuição da função pulmonar e o aumento da reactividade brônquica.

Apesar de não se conhecerem ainda completamente os factores que levam à proliferação e aumento da sobrevivência dos eosinófilos nos doentes asmáticos, muitos estudos têm sugerido um papel importante dos linfócitos T na regulação destas células.

"*In vitro*" a IL-3, IL-5 e GM-CSF, que são libertados fundamentalmente pelos linfócitos, modulam a proliferação dos eosinófilos a partir dos progenitores, assim como a sua activação e libertação de mediadores.

Vários autores têm vindo a analisar nos últimos anos as relações entre linfócitos T e eosinófilos. Azzawi e cols<sup>21</sup> estudaram o fenótipo dos linfócitos T e o estado de activação de linfócitos e eosinófilos nos tecidos colhidos por biópsias brônquicas em



asmáticos atópicos e não atópicos e em controlos e a sua correlação com a resposta à metacolina. Verificaram a presença de um número mais elevado de células CD3 e CD4 nos 2 grupos de asmáticos, quando comparados com os controlos, com diferenças insignificantes nas células CD8, assim como uma percentagem mais elevada de células CD25 (IL-2R) e de eosinófilos activados (EG2) nos asmáticos. A percentagem de células CD25 e EG2 era significativamente mais elevada nos doentes com hiperreactividade à metacolina.

Bradley e cols <sup>22</sup> ao estudarem os tecidos de biópsias feitas a 21 asmáticos atópicos, 10 atópicos sem asma e 12 controlos, verificaram que o número total de leucócitos (CD45) e de linfócitos CD3, CD4 e CD8, embora tendessem a ser mais elevados nos asmáticos, não apresentavam diferenças significativas, mas havia uma percentagem significativamente mais elevada de células CD25 e de eosinófilos activados (EG2) no grupo dos asmáticos. O número de eosinófilos activados correlacionava-se positivamente com o número de células CD3 e CD25 e com a reactividade à metacolina. Estes resultados suportam a hipótese de que os linfócitos T activados libertam produtos que regulam o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas.

Walker e cols <sup>23</sup> verificaram no sangue periférico que o número de células T que expressavam IL-2R se correlacionava com a eosinofilia e que a sobrevida dos eosinófilos "*in vitro*" aumentava significativamente quando estas células eram cultivadas com soro de asmáticos, comparativamente com o que acontecia com o soro de controlos. Os factores existentes no soro dos asmáticos, responsáveis pelo aumento da sobrevida dos eosinófilos foram identificados, através de anticorpos neutralizantes, como IL-3, IL-5 e GM-CSF.

Bentley e cols <sup>24</sup>, num estudo de fragmentos de biópsias de doentes com asma ocupacional por isocianatos, de asmáticos extrínsecos e de controlos, não encontraram diferenças significativas no número de células CD3, CD4 e CD8, mas os doentes asmáticos, quer com asma ocupacional quer atópicos tinham uma percentagem mais elevada de eosinófilos totais (BM K13) e activados (EG2) e de células que expressavam IL-2R do que os controlos.

Os mesmos investigadores <sup>25</sup> estudaram um grupo de doentes com asma intrínseca, comparando-os com doentes com asma extrínseca e controlos e verificaram que o número de linfócitos CD3 e CD4 era mais elevado no primeiro grupo. O número total de eosinófilos e EG2 e de células CD25 era significativamente mais elevado nos 2 grupos de

asmáticos do que nos controlos. O número de eosinófilos activados correlacionava-se com a pontuação de sintomas e com o pC20 da metacolina.

Estes resultados sugerem que a activação dos linfócitos T e a infiltração por eosinófilos são fenómenos comuns à asma intrínseca e à asma extrínseca.

A activação das células nos doentes não alérgicos poderá ser feita por agentes infecciosos, por auto-antígenos ou outros factores, podendo estar envolvido um fenómeno de mimetismo molecular, como nas doenças autoimunes.

Yang e cols <sup>26</sup> verificaram que os linfócitos de doentes asmáticos, mas não de indivíduos normais aumentavam significativamente a proliferação e a sobrevida dos eosinófilos "*in vitro*", o que parecia não estar directamente relacionado com a presença de uma expressão aumentada CD25 dos linfócitos.

Todos estes trabalhos sugerem que os asmáticos têm um número aumentado de células CD4 activadas no sangue periférico e no tecido pulmonar e que estas células libertam citoquinas, nomeadamente IL-5 que regulam a chamada, aumentam a sobrevida e activam os eosinófilos.

## • ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 E EFEITO DA CORTICOTERAPIA

O papel dos linfócitos T na mediação da asma pode ter uma importância muito grande não só na compreensão da patogénese da doença, mas igualmente na resposta à terapêutica.

Efectivamente, Corrigan e cols <sup>27</sup> têm vindo a estudar a relação entre a activação de linfócitos T e a resposta à terapêutica com corticosteroides e apresentam resultados interessantes.

Quando compararam um grupo de asmáticos crónicos resistentes aos corticosteroides com um grupo de doentes sensíveis após uma e duas semanas de terapêutica verificaram que os primeiros tinham uma percentagem significativamente mais elevada de linfócitos T que expressavam as moléculas de activação IL-2R e HLA-DR.

Quando cultivaram "*in vitro*" células mononucleares do sangue periférico com PHA na presença ou ausência de dexametasona ou de ciclosporina A, verificaram que a dexametasona inibia significativamente a proliferação dos linfócitos T dos doentes sensíveis, mas não dos resistentes; a ciclosporina inibia em ambos os grupos, sendo o efeito menos marcado nos doentes resistentes.

O estudo da inibição da elaboração de IL-2 e INF- $\gamma$  pelos linfócitos T estimulados por mitogénios revelou que a dexametasona só inibia essa produção



nos doentes sensíveis aos corticosteroides, enquanto que a ciclosporina inibia em ambos os grupos.

Estas observações demonstram que há um grupo de doentes que mantem uma activação permanente dos linfócitos T, mesmo a receberem corticosteroides, o que sugere que os linfócitos T podem ser um alvo da terapêutica com estes fármacos.

Num outro trabalho <sup>28</sup> demonstraram que a terapêutica com corticosteroides instituída por exacerbações agudas de asma se associava a uma diminuição da IL-5 detectável no soro antes da medicação e a uma queda significativa dos eosinófilos periféricos, o que sugere que as exacerbações da asma estão associadas à produção de IL-5, que regula a eosinofilia; que os corticosteroides inibem.

#### • ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 NA ASMA E PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOQUINAS

Uma vez que a IL-4 é uma citocina muito importante nas doenças atópicas, modulando o crescimento dos mastócitos e promovendo a síntese de IgE e que a IL-5 é responsável pela diferenciação, aumento da sobrevivência e activação dos eosinófilos, é sedutor pensar que os atópicos terão um predomínio de células semelhantes às Th2 murinas.

Wierenga e cols <sup>15</sup> demonstraram que nos indivíduos atópicos os clones de células T específicas para o alérgeno tinham uma produção de citocinas com um padrão semelhante às Th2, enquanto que os clones não específicos de antígeno produziam grandes quantidades de INF- $\gamma$  e pouca IL-4.

Robinson e cols <sup>16</sup> estudaram em 15 asmáticos e 10 controlos o perfil de expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de citocinas em células de LBA por técnica de hibridização "in situ" e verificaram que os asmáticos tinham mais células com mRNA para IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF, o que é compatível com a activação predominante de uma sub-população T do tipo Th2.

Os mesmos autores <sup>29</sup> verificaram que após um teste de provocação brônquica específica as células do LBA apresentavam um aumento da expressão de mRNA para IL-4, IL-5, GM-CSF e IL-3, mas não para IL-2 e INF- $\gamma$  e simultaneamente um aumento de eosinófilos.

Mais recentemente <sup>30</sup> verificaram que havia uma associação significativa entre o número de células que expressavam mRNA para IL-4, IL-5 e GM-CSF e a obstrução brônquica, a hiperreactividade brônquica e a sintomatologia clínica.

Gagnon e cols <sup>31</sup> demonstraram em doentes sensíveis ao polen de lolium perene, que o perfil da

síntese de linfoquinas era influenciado pela exposição natural aos polens, parecendo que durante a estação polínica existe uma maior proporção de células Th2 em circulação.

Não parecem pois restar dúvidas de que os linfócitos T desempenham um papel extremamente importante na patogénia da asma brônquica.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Laitinen LA, Heiro M, Laitinen A, Kava T, Haalela. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:599-606.
2. Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 87:1470-1473
3. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:434-457.
4. Kirby JG, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:379-383.
5. Kelly C, Ward C, Stenton CS, Bird G, Hendrick DJ, Walters EH. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airways responsiveness. *Thorax* 1988; 43:684-692.
6. Wardlaw AJ, Dunelto S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:62-69.
7. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:806-817.
8. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1745-1753.
9. Foresi A, Bertorelli G, Pesci A, Chetta A, Olivieri D. Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage and in bronchial biopsy in asthma during remission. *Chest* 1990; 98:528-535.
10. Bousquet J, Chanez P, Jacoste JY, Enander I, Venge P, Simonet C, Ahlstedt S, Michel FB, Godard P. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:649-660.
11. Vercelli D, Jabara HH, Arai K, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires IL-4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD<sub>3</sub> complex and MHC classe II antigens. *J Exp Med* 1986; 169:1295-1308.
12. Parronchi P, Tiri A, Macchia D, De Carli M, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Noncognate contact-dependent B cell activation can promote IL-4 dependent *in vitro* human IgE synthesis. *J Immunol* 1990; 144:2102-2108.
13. Romagnani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990; 11:316.
14. Romagnani S. Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12:256-257.
15. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg M. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4 T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144:4651-4656.



16. **Robison DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan CJ, Durham SR, Kay AB.** Predominant Th2 like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
17. **Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB.** T lymphocyte activation in acute severe asthma. *The Lancet* 1988; 1:1129-1132.
18. **Corrigan CJ, Kay AB.** CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:970-977.
19. **Gerblich AA, Campbell AE, Schuyler MR.** Changes in T lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N Engl J Med* 1984; 310:1349-1352.
20. **Gerblich AA, Salik H, Schuyler MR.** Dynamic T cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:533-537.
21. **Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham SR, Kay AB.** Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1407-1413.
22. **Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani A-MA, Shwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB.** Eosinophils, T lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:661-674.
23. **Walker C, Virchow JC, Bruijnzeel PLB, Blaser K.** T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol* 1991; 146:1829-1835.
24. **Bentley AM, Maestrelli P, Sietta M, Fabbri M, Robison DS, Bradley BL, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB.** Activated T lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate - induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:821-829.
25. **Bentley AM, Menz G, Storz CHR, Robison DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB.** Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:500-506.
26. **Yang JP, Renzi PM.** Interleukin-2 and lymphocyte - induced eosinophil proliferation and survival in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:792-801.
27. **Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB.** Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1026-1032.
28. **Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth V, Doi S, Kikuchi Y, Takatsu K, Durham SR, Kay AB.** CD4 T lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:540-547.
29. **Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Sun Ying, Kay AB, Durham SR.** Activation of CD4+T cells increased Th2-type cytokine mRNA expression and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:313-324.
30. **Robinson D, Sun Ying, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB, Hamid Q.** Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytoquines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:397-403.
31. **Gagnon R, Akoum A, Hebert J.** Jol p I - induced IL-4 and INF- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells of atopic and nonatopic subjects during and out of the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:950-956.



# Gamaglobulina Endovenosa na Terapêutica da Asma Grave - Caso Clínico

JOSEFINA RODRIGUES\*, LUIS DELGADO \*\*,  
M. GRAÇA CASTEL-BRANCO\*\*\*, MARIANELA VAZ\*\*\*\*

## RESUMO

A asma brônquica é uma doença inflamatória das vias aéreas, onde participam mecanismos imunológicos com envolvimento de linfócitos T, eosinófilos, mastócitos e anticorpos IgE. Clínicamente é uma situação heterogênea indo desde a necessidade ocasional de broncodilatadores até à asma severa corticodependente. Nalguns destes casos outras terapêuticas anti-inflamatórias têm sido usadas (saís de ouro, metotrexato, ciclosporina A, gamaglobulina -IVIG) devido aos seus efeitos na redução dos corticosteroides e controle da asma. Resultados encorajadores têm sido obtidos com a gamaglobulina endovenosa (IVIG).

**OBJECTIVOS:** avaliação clínica e imunológica de uma doente com asma brônquica instável cortico-dependente e dermatite atópica, tratada com IVIG durante 6 meses.

**MÉTODOS:** ministração de IVIG (400 mg/kg) cada 4 semanas numa doente atópica de 26 anos, medicada regularmente com agonistas  $\beta_2$  e corticosteroides inalados, teofilina oral e prednisolona. Registos diários de sintomas, dos débitos expiratórios (DEMI), da medicação regular e de recurso foram realizados durante os 6 meses de tratamento. No início e antes de cada infusão quantificaram-se as imunoglobulinas e as subpopulações linfocitárias circulantes (citometria de fluxo).

**RESULTADOS:** observou-se uma melhoria progressiva nos parâmetros objectivos avaliados: 1) média da variação diária do DEMI (1.º mês 17,1%, 6.º mês 7,8%); 2) consumo diário de prednisolona (5,8 para 2,0 mg); 3) inalações extra de  $\beta_2$  agonistas (11,4 para 7,3). Observou-se também uma redução dos níveis séricos de IgE (780 para 342 kU/L) com uma elevação da IgG (986 para 1502 mg/dl). Houve uma redução ligeira dos linfócitos circulantes CD4+ (53,5% to 42%) e dos linfócitos T activados (CD4+CD25+ 1,8 para 0,6%; CD8+DR+ 2,9 para 1,6%), concomitante com um aumento dos CD8+ (25,8 para 28%) e sobretudo dos linfócitos com fenótipo NK (CD57+ 4,1 para 8,3% e CD16/56+ 1,4 para 7,3%). Uma redução dos sintomas e extensão das lesões de dermatite foi também observada. Não se verificaram reacções adversas às infusões de IVIG.

**CONCLUSÕES:** os resultados preliminares obtidos neste caso sugerem que as acções imunomoduladoras da IVIG poderão ser úteis no controle dos casos mais graves de asma brônquica. Um estudo aberto em doentes seleccionados será necessário para confirmar estas observações.

**PALAVRAS-CHAVE:** asma brônquica, corticoides, IVIG, linfócitos T, células NK.

## SUMMARY

### INTRAVENOUS GAMMAGLOBULIN (IVIG) THERAPY IN SEVERE BRONCHIAL ASTHMA - A CASE REPORT

**BACKGROUND:** bronchial asthma is a chronic inflammatory condition of respiratory airways, where immunological mechanisms are thought to play an important role, mainly with the participation of T lymphocytes, eosinophils, mast cells and IgE antibodies. Clinically, it is an heterogeneous condition ranging from mild symptoms requiring

\* Assistente Hospitalar de Imunoalergologia  
Unidade de Imunoalergologia - H.S.João, Porto.

\*\* Assistente Hospitalar e Assistente da Faculdade de Imunologia  
Faculdade de H.S. João e Medicina, Porto.  
(Director: Prof. Dr. Fleming Torrinha).

\*\*\* Chefe de Serviço de Imunoalergologia  
Unidade de Imunoalergologia - H.S. João

\*\*\*\* Chefe de Serviço de Imunoalergologia  
Directora da Unidade de Imunoalergologia - H.S.João  
Trabalho apresentado em poster na Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia, Lisboa, Novembro de 1993 e na Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunoalergologia, Porto, Dezembro de 1993. Publicado em resumo na Revista Portuguesa de Imunoalergologia, 1993, 2 (1): 64.



ocasional bronchodilators, to severe intractable steroid-dependent asthma. In some of these severe cases other anti-inflammatory drugs have been used (gold salts, methotrexate, cyclosporin A, intravenous gamma globulin-IVIG) due to their steroid-sparing effect and to control life-threatening asthma. Several reports have been recently published showing encouraging results with intravenous immunoglobulin (IVIG).

**AIMS:** a follow-up study of a patient with steroid-dependent unstable bronchial asthma and severe atopic dermatitis, treated with IVIG during 6 months.

**METHODS:** IVIG (400 mg/Kg) was administered every 4 weeks to a 26 years old female atopic patient, regularly medicated with inhaled  $\beta_2$  agonists and corticosteroids qid, oral theophyllin and daily prednisolone. Daily records of symptoms scores, peak expiratory flow rates (PEFR), extra inhaled  $\beta_2$  agonists and steroid consumption were analysed during the treatment period. Serum immunoglobulins and peripheral blood lymphocyte subpopulations (flow cytometry) were measured initially and before each infusion.

**RESULTS:** a progressive clinical improvement was apparent in the objective parameters evaluated: 1) mean daily variation of PEFR (1<sup>st</sup> month 17.1%, 6<sup>th</sup> month 7.8%); 2) mean daily prednisolone consumption (5.8 mg to 2.0 mg); 3) mean daily extra  $\beta_2$  inhalations (11.4 to 7.3). A reduction of serum IgE levels (780 to 342 kU/L) with a increase in IgG levels (986 to 1502 mg/dl) was seen. A reduction of peripheral blood CD4+ lymphocytes (53.5% to 42%) and activated T lymphocytes (CD4+CD25+ 1.8 to 0.6%; CD8+DR+ 2.9 to 1.6%) was also seen, concomitantly with an increase in CD8+ (25.8 to 28.0%) and, specially, NK lymphocytes (CD57+ 4.1 to 8.3% and CD16/56+ 1.4 to 7.3%). A reduction of the extension and symptoms of the dermatitis lesions were also recorded. No adverse reactions were seen during IVIG infusions.

**CONCLUSIONS:** these preliminary results in this case suggest that the immunomodulatory properties of IVIG may be helpful to control severe cases of bronchial asthma. An open labelled study in selected patients is warranted to extend these observations.

**KEY WORDS:** bronchial asthma, corticosteroid-resistance, IVIG, T lymphocytes, NK cells.

## INTRODUÇÃO

A asma brônquica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, onde mecanismos imunológicos desempenham um papel preponderante, com a participação de linfócitos T, eosinófilos, mastócitos e anticorpos da classe IgE.<sup>1</sup> A heterogeneidade clínica da asma é bem conhecida, variando entre sintomas ligeiros necessitando de broncodilatadores ocasionalmente, até à asma grave corticodependente e, em alguns doentes, corti-coresistente<sup>2,3</sup>. Nestes últimos casos têm sido utilizadas várias terapêuticas anti-inflamatórias e/ou imunossupressoras, tais como os sais de ouro,<sup>4,5,6</sup> o metotrexato<sup>7,8,9,10</sup> e a ciclosporina,<sup>11,12</sup> essencialmente pela possibilidade de reduzir as doses e os efeitos laterais dos corticosteroides.

Os concentrados de gamaglobulina humana são usados há mais de 60 anos na prevenção de doenças infecciosas, como é exemplo a imunização passiva contra o tétano e, nos últimos 40 anos nas imunodeficiências congénitas da produção de anticorpos como tratamento de substituição.<sup>13</sup> O desenvolvimento de preparações cuja aplicação endovenosa é praticamente destituída de riscos originou uma utilização mais alargada. Assim, nos últimos 20 anos a gamaglobulina endovenosa (IVIG) tem sido usada para tratar uma grande variedade de doenças,<sup>14,15</sup> que vão desde as imunodeficiências primárias às secundárias, nomeadamente nas infecções associadas à SIDA e em grandes queimados e, ainda mais recentemente, como agente imuno-modulador. De facto, desde os primeiros resultados de utilização com sucesso em doenças idiopáticas presumivelmente de etiologia auto-imune, como a PTI<sup>16</sup> e a doença de Kawasaki, o seu âmbito de aplicação tem vindo a ser cada vez mais alargado.

Últimamente, e de forma igualmente empírica, a actividade potencialmente anti-inflamatória da IVIG tem sido também utilizada nas doenças alérgicas como a dermatite atópica e a asma brônquica.<sup>14</sup> Trabalhos recentes, embora na sua maioria não controlados e envolvendo pequeno número de doentes, têm revelado resultados animadores desta terapêutica na melhoria da asma e na redução das doses de corticosteroides.<sup>17,18,19</sup>

Com o objectivo de avaliar a eficácia da IVIG na terapêutica da asma grave iniciámos um estudo aberto em doentes corticodependentes, com efeitos laterais graves dessa terapêutica ou corticosteroides-resistentes, utilizando um protocolo de avaliação durante um ano, ministrando IVIG mensalmente durante o primeiro semestre, funcionando o segundo semestre de vigilância sem esta terapêutica como controle do primeiro período.



Os autores descrevem um dos casos incluídos em que, paralelamente, foi feita a avaliação de alguns parâmetros imunológicos que pudessem contribuir para a interpretação dos possíveis mecanismos de acção da IVIG.

## CASO CLÍNICO

Fez-se o estudo de uma doente com asma grave corticodependente e dermatite atópica severa, tratada com IVIG durante seis meses. Trata-se de uma mulher de 26 anos, com asma grave corticodependente e dermatite atópica severa enviada à consulta de Imunoalergologia do Hospital de S. João em 1990. A asma era grave desde a infância e necessitava de vários pulsos de corticoterapia oral por ano. O eczema era extenso e resistente à terapêutica que lhe vinha a ser ministrada. O estudo efectuado revelou testes cutâneos "Prick" positivos para ácaros do pó da casa (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Farinae*), com RAST classe 3 para os ácaros, IgE total de 866 kU/L e um Rx pulmonar normal. As provas funcionais respiratórias apresentavam débitos pulmonares diminuídos, com síndrome ventilatório obstrutivo ligeiro (VEMS 78%, DEM25/75 41%), com um débito expiratório máximo instantâneo muito variável frequentemente com valores abaixo de 200 L/m. Apesar da terapêutica instituída - salbutamol (400 mcg) e beclometasona (250mcg) inalados 3 vezes/dia, a doente pouco melhora e deixa de comparecer na consulta.

Ao fim de ano e meio, é novamente observada, por agravamento clínico, com crises graves que a tinham levado quatro vezes ao Serviço de Urgência nos últimos 6 meses. O eczema, sempre extenso tinha tido exacerbações frequentes. Necessitava de 8 mg/dia de prednisolona nos últimos oito meses para controle sintomático. Apesar das tentativas de reduzir as doses de prednisolona, manteve agravamento progressivo nos 3 meses seguintes, quer da asma quer do eczema, com vários ciclos de prednisolona oral e recurso ao Serviço de Urgência do Hospital da sua área de residência cerca de 5 vezes. Apresentava sinais evidentes de Síndrome de Cushing iatrogénico, sendo incluída nessa altura no protocolo de terapêutica com Gamaglobulina Endovenosa (IVIG) previamente aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de S. João.<sup>20</sup>

## MÉTODOS

Foi fornecido à doente um cartão para registo diário de sintomas (score de 0-4, para um total de 16),<sup>21</sup>

do DEMI, da medicação regular e de recurso, durante os 6 meses de tratamento.

Iniciou terapêutica com IVIG (Sandoglobulina®), na dose de 400 mg/Kg numa única aplicação mensal, durante 6 meses, período durante o qual manteve terapêutica com salbutamol 400mcg e beclometasona 250mcg inalados 4vezes/dia, teofilina 400mg/dia e metilprednisolona 16mg/dia, além de inalações adicionais de agonista  $\beta_2$  de curta duração de acção para alívio sintomático. A redução dos corticosteroides foi efectuada de forma lenta e progressiva, após observação da doente em visitas quinzenais, de acordo com a melhoria clínica e funcional, avaliada pelo score de sintomas e variações diárias dos valores do DEMI.

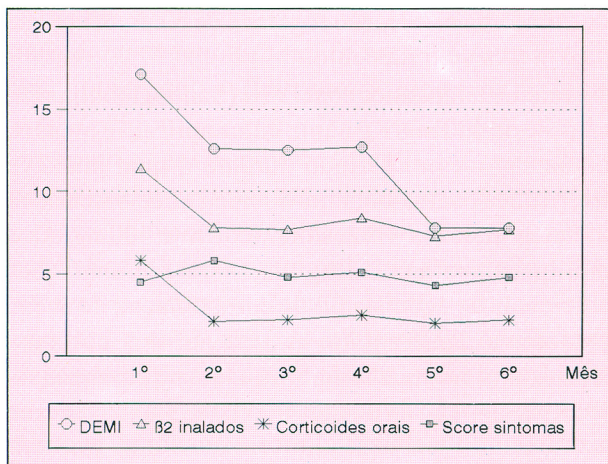
A avaliação prévia incluiu hemograma e bioquímica geral, um ECG, Rx pulmonar, PFR com difusão de CO, estudo da hiperreactividade brônquica com metacolina, doseamento do cortisol plasmático e urinário basais, testes cutâneos a alérgenos comuns, doseamento de IgG, IgA, IgM, IgE, provas de hipersensibilidade retardada (Multitest®, IMC) e sub-populações linfocitárias (imunofluorescência directa e citometria de fluxo). O estudo analítico - hemograma, imunoglobulinas e sub-populações linfocitárias - foi repetido antes de cada infusão e durante todo o período de terapêutica.

## RESULTADOS

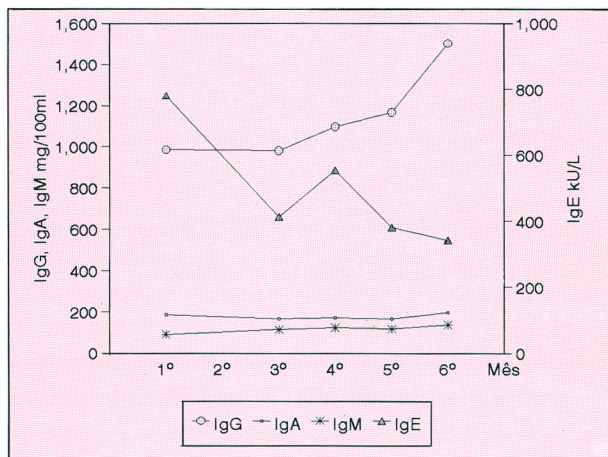
A administração de IVIG acompanhou-se de uma melhoria clínica progressiva nos parâmetros objectivos de gravidade da asma (Fig 1): variação diária de DEMI (1.º mês 17,1%, 5.º mês 7,8%), no consumo médio de prednisolona oral/dia (de 5,8 mg para 2 mg), na média diária de inalações adicionais do agonista  $\beta_2$ /dia (11,4 para 7,3).

Nos parâmetros imunológicos verificou-se redução dos níveis de IgE (780 para 342 kU/L) com elevação dos níveis de IgG (986 para 1502 mg/dl) (Fig. 2). Observou-se, também, uma ligeira redução da proporção relativa de linfócitos periféricos CD4+ (53,5 para 42,5%) e dos linfócitos T activados (CD4+CD25+ de 1,8% para 0,6% ; CD8+DR+ de 2,9% para 1,6%) com um aumento nos linfócitos CD8+ (de 25,8% para 28%) e, sobretudo, dos linfócitos com fenótipo *Natural Killer* (Fig 3) - CD16+CD56+ (de 1,4% para 7,3%) e CD57+ (de 4,1 para 8,3%). Nas restantes subpopulações estudadas (CD3, CD19, CD4CD45RA e CD4CD29) não se verificaram variações significativas ao longo do tratamento.

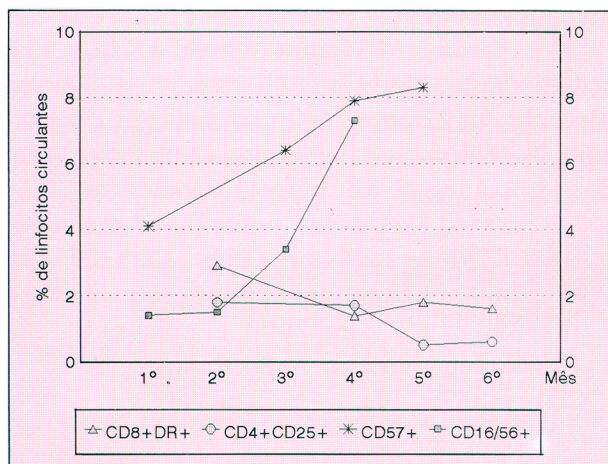




**Figura 1** - Variações no registo diário do DEMI (média da percentagem de variação diária), da medicação de recurso com agonistas β2 (média diária de inalações) e corticosteroides (média diária de prednisolona em mg) e de sintomas (score médio), durante os 6 meses de tratamento com gamaglobulina endovenosa numa doente com asma grave.



**Figura 2** - Variações nos níveis séricos das imunoglobulinas durante os 6 meses de tratamento com gamaglobulina endovenosa.



**Figura 3** - Variações nas subpopulações linfocitárias (% de linfócitos circulantes) durante 6 meses de tratamento com gamaglobulina endovenosa.



**Figura 4** - Lesões de dermatite atópica numa doente com asma grave, antes (A) e após 6 meses de terapêutica mensal com gamaglobulina endovenosa (B).

Foi também observada redução na extensão e gravidade das lesões de dermatite atópica (Fig. 4) e redução do prurido. Não se registaram reacções adversas durante a infusão da IVIG.

## DISCUSSÃO

Os corticosteroides são sem dúvida um tratamento eficaz na asma brônquica refractária à terapêutica broncodilatadora. Actuam primariamente no processo inflamatório que acompanha a asma e a que tem sido atribuído um papel preponderante na hiper-reatividade brônquica que caracteriza a doença.<sup>22</sup> No entanto, apesar do uso crescente de corticosteroides com potente actividade anti-inflamatória, continuam a observar-se alguns doentes com formas particularmente graves e instáveis de asma brônquica, resistentes a esta terapêutica.<sup>2,3</sup> Assim, quer devido à morbilidade que a terapêutica com corticosteroides acarreta, quer às formas mais graves e resistentes, tem surgido a necessidade de recorrer a outras terapêuticas.<sup>4,12</sup>

A opção pelo tratamento com IVIG nesta doente teve essencialmente o objectivo de diminuir a dependência e a morbilidade da terapêutica com corticosteroides e estabilizar a asma. Esta doente apresentava grandes variações diárias dos valores do DEMI, que constituíram um dos principais critérios de gravidade da sua asma.<sup>23</sup> De facto, a doente apresentava à entrada oscilações diárias médias de 17% no DEMI, mas que foram superiores a 20% num terço dos registos do 1º mês de avaliação. No final do tratamento estes valores passaram para 8% (Fig. 1) e foram superiores a 20% em apenas dois dias.



A ministração de IVIG acompanhou-se também, neste caso, de menor recurso a agonistas  $\beta_2$  inalados e redução das doses de prednisolona diária (Fig. 1). No entanto, não observámos variações importantes dos dados subjectivos (score de sintomas), o que reforça mais uma vez a importância da monitorização da asma brônquica por parâmetros objectivos.<sup>21,24</sup>

Os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos da IVIG não são ainda claramente conhecidos. Algumas hipóteses têm sido propostas, particularmente em relação aos seus efeitos nas doenças auto-imunes: bloqueio dos receptores Fc, imuno-regulação através de interacções idiótipo/anti-idiótipo e interferência na produção de anticorpos por mecanismo de imunossupressão.<sup>25</sup> Vários estudos "in vitro" e "in vivo" têm também revelado um efeito supressor da gamaglobulina endovenosa na actividade linfocitária (Quadro I).

QUADRO I

Actividade Imunossupressora da IVIG	Referência
Inibição da activação dos linfócitos CD4+	26
Inibição da cooperação T/B na síntese de imunoglobulinas dependente de linfócitos CD8+	27
Aumento dos linfócitos CD8+ circulantes com diminuição da relação auxiliar-indutora/auxiliar-supressora (CD4CD29+/CD4CD45RA+)	28
Diminuição da proliferação linfocitária <i>in vitro</i>	29
Diminuição da activação alogénica e mitogénica dos linfócitos, actividade NK e ADCC	30

Estudos recentes tem demonstrado a presença de células T activadas (HLA DR+, CD25+) na mucosa brônquica de doentes asmáticos, num número que se relaciona com a gravidade clínica da doença.<sup>1</sup> Por outro lado, estudos quer no sangue quer no líquido de lavagem broncoalveolar têm apontado para uma participação central dos linfócitos T na inflamação da asma, habitualmente favorecendo uma intervenção de linfócitos CD4+ na asma extrínseca e CD8+ nas formas intrínsecas.<sup>31</sup> Assim, os mecanismos de imunossupressão T atribuídos à IVIG poderão estar também envolvidos nos seus efeitos benéficos na asma.<sup>17, 18, 19</sup> De acordo com este possível efeito, estarão as observações no nosso caso que sugerem uma diminuição da activação T periférica - a diminuição da proporção relativa de linfócitos CD4+CD25+ e CD8+DR+ (Fig. 3).

O aumento marcado do número de linfócitos com o fenótipo NK (CD3- CD16/56+) entre o início e o 4.º/5.º mês foi para nós inesperado. Se, por um lado, as gamaglobulinas endovenosas, ou os seus fragmentos Fc, poderão modular a expressão do CD16,<sup>32</sup> um dos receptores de baixa afinidade para a IgG (Fc $\gamma$ III) presente em neutrófilos, macrófagos<sup>33</sup> e células NK,<sup>34, 35</sup> por outro, as IVIG parecem diminuir a actividade NK.<sup>30</sup> Como neste trabalho identificamos estas células apenas antigénicamente, utilizando uma mistura de anticorpos monoclonais anti-CD16 e CD56 marcados com o mesmo fluorocromo, é-nos impossível estabelecer se essa variação é devida a um aumento relativo de um ou outro fenótipo. No entanto, o aumento concomitante da proporção de células CD57+ CD8-, um outro fenótipo de linfócitos com actividade *Natural Killer*<sup>36</sup>, sugere-nos um efeito sobre esta subpopulação funcional de linfócitos e não apenas uma modulação da expressão do CD16. No entanto, as duas hipóteses não são totalmente exclusivas; de facto, a molécula CD16 pode ser clivada da membrana após activação celular<sup>33-35, 37</sup> e passar a uma forma solúvel para a qual tem sido proposta um efeito de modulação negativa da actividade ADCC.<sup>37</sup> Esta é um dos mecanismos de citotoxicidade também presente nas células NK e que nelas é estritamente dependente do CD16.<sup>38</sup>

A subida progressiva dos níveis séricos da IgG que verificámos nesta doente poderá ser atribuída à infusão regular da gamaglobulina humana, onde predomina largamente esta classe de anticorpos, e parece estar de acordo com a cinética habitual da IgG após ministração endovenosa.<sup>39</sup> A diminuição dos níveis de IgE também observada, apesar de já descrita,<sup>17</sup> parece-nos de mais difícil explicação e poderá, eventualmente, estar ligada à acção imunomoduladora da IVIG. De facto, recentemente tem sido reconhecida a presença de anticorpos IgG anti-IgE no soro humano normal<sup>40, 41</sup> e um papel destes autoanticorpos anti-IgE no «feed-back» negativo da síntese de IgE tem sido também proposto.<sup>40, 42</sup>

Em conclusão, os resultados obtidos neste caso sugerem-nos, embora de forma necessariamente preliminar, que as acções imunomoduladoras da IVIG poderão ser úteis no controle dos casos mais graves de asma brônquica. Uma possível interacção da IVIG com a actividade linfocitária T e NK e na modulação da síntese de IgE, é também sugerida pelos nossos resultados. Um estudo aberto e mais alargado, em doentes seleccionados, será necessário para confirmar estas observações.



Os autores agradecem a colaboração da Sr.<sup>a</sup> D. Conceição Magalhães e do Dr. João Pedro Ramos nos trabalhos de citometria de fluxo. Agradecem, também, a colaboração da Sr.<sup>a</sup> Enf.<sup>a</sup> Benvenida na aplicação do tratamento com IVIG.

**BIBLIOGRAFIA**

1. **Corrigan CJ, Kay AB.** T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13( 12): 501-6.
2. **Alvarez J, Leung YM, Iklé D, Gelfand EW, Szeffler SJ.** Steroid-resistant asthma :Immunologic and pharmacologic features. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89 (pt 3): 714-21.
3. **Lane SJ, Lee TH.** Corticosteroid resistance in asthma. *ACI News* 1993;5(4): 110-4.
4. **Klaustermyer WB, Nritake DT, Kwong FK.** Chrysotherapy in the treatment of corticosteroid dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987;79: 720-5.
5. **Bernstein DI, Bernstein IL, Bodenheimer SS et al.** An open study of Aurofin in the treatment of steroid dependent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81 (1): 6-16.
6. **Faria E, Todo Bom A, Rosário M, Lourenço M, Pinto Mendes JA, Chieira C.** Auranofina e asma brônquica corticoddependente (resumo). *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 1993; 2(1): 63.
7. **Mulharkey MF, Blumenstein BA, Andrade P et al.** Methotrexate in the treatment of corticosteroid - dependent asthma. *N Engl J Med* 1988; 348 (10): 603-7.
8. **Balter MS, Rbuck AS.** Treatment of the recalcitrant asthmatic. *Ann Allergy* 1989; 63: 297-300.
9. **Mulharkey MF, Lambert JK, Blumenstein BA.** Long term Methotrexate treatment in corticosteroid- dependent asthma. *Ann Int Med* 1990; 112: 557-81.
10. **Rodrigues J, Moreira Silva JP, Azevedo M.** Methotrexate in steroid dependent asthmatics (resumo). *Clin Exp Allergy* 1990; 20(1): 37.
11. **Alexander AG, Barnes NC, Kay AB.** Trial of cyclosporin in corticosteroid dependent chronic severe asthma. *Lancet* 1992; 339:324-8.
12. **Tavares MB, Alendouro P, Lourenço M, Tomás MR, Pinto Mendes JA, Chieira C.** Ciclosporina A e asma brônquica corticoddependente (resumo). *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 1993; 2 (1): 64.
13. **Buckley RH, Schiff RI.** The use of intravenous immunoglobulin in immunodeficiency diseases. *N Engl J Med* 1991; 325: 110-7.
14. **Dwyer JM.** Manipulating the immune system with immunoglobulin. *N Engl J Med* 1992; 326(2):107-16.
15. **Desai RG.** Recent advances in intravenous immunoglobulin therapy. *Cancer* 1991; 68 (6 suppl): 1415-68.
16. **Imbach P, Barandun S, Baumgartner C, et al.** High-dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory, in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood. *Paediatr Acta* 1981; 46: 8-6.
17. **Mazer BD, Gelfand EW.** An open-label study of high-dose intravenous immunoglobulin in severe childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 976-83.
18. **Page R, Friday G, Stillwagon P, Skoner D, Caliguiri L, Fireman P.** Asthma and selective immunoglobulin subclass deficiency: improvement of asthma after immunoglobulin replacement therapy. *J Pediatr* 1988; 112 (1): 127-131.
19. **Rodrigues J, Vaz M.** Gamaglobulina endovenosa: uma nova alternativa na asma corticoddependente? (resumo). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Patologia Respiratória* 1992; 17:2.

20. Gamaglobulina endovenosa no tratamento da asma corticoddependente do adulto. *Comissão de Ética do Hospital de S. João* 1992, Documento 33.
21. **Rodrigues J, Carballada F, Cuesta C, Cunha L, Moreira Silva JP, Vaz M.** Asthma severity: Evaluation with diverse clinical parameters (resumo). *Arquivos de Medicina* 1992; 5( 4):4.
22. **Barnes PJ.** Effect of the corticosteroids on airway responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:570-6.
23. **Cross D, Nelson HS.** The role of the peak flow meter in the diagnosis and management of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87(1 Pt 1):120-8.
24. International Consensus Report on Diagnosis and Management of asthma. *Allergy* 1992; 47 (13).
25. **Saxon A, Giorgi JV, Sherr EH, Kagan JM.** Failure of B cells in common variable immunodeficiency to transit from proliferation to differentiation is associated with altered B cell molecule display. *J Allergy Clin Immunol* 1989 ; 84(1):44-54.
26. **Leung DYM, Burns JC, Newburger JW et al.** Reversal of lymphocyte activation in vivo in the Kawasaki syndrome by intravenous gammaglobulin. *J Clin Invest* 1987; 79:468-72.
27. **Ballow M, White W, Desbonnet C.** Modulation of *in vitro* synthesis of immunoglobulin and the induction of suppressor activity by therapy with intravenous immunoglobulin. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84 (4 Pt2):595-602.
28. **Macey MG, Newland AC.** CD4 and CD8 subpopulation changes during high dose intravenous immunoglobulin treatment. *Brit J Haematol* 1990; 76:513-20.
29. **Antel JP ,Medorf ME, Oger JJ, Kuo HH, Arnason BJW.** Generation of suppressor cells by aggregated human globulin. *Clin Exp Immunol* 1981; 43: 351-6.
30. **Kawada K , Terasaki PI.** Evidence for immunosuppression by high dose gamma globulin. *Exp Hematol* 1987; 15:133-6.
31. **Walker C, Virchow JC.** T cells and endothelial cells in asthma. *Allergy* 1993;48:34-31.
32. **Debré M, Bonnet M-C, Fridman W-H et al.** *Lancet* 1993; 342:945-9.
33. **Tedder TF.** Cell-surface receptor shedding: a means of regulating function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:305-306.
34. **Edberg JC, Redecha PB, Salmon JE, Kimberly RP.** Human FcγRIII (CD16). Isoforms with distinct allelic expression, extra-cellular domains, and membrane linkages on polymorphonuclear and Natural Killer cells. *J Immunol* 1989; 143:1642-9.
35. **Lanier LL, Phillips JH, Testi R.** Membrane anchoring and spontaneous release of CD16 (FcR III) by natural killer cells and granulocytes. *Eur J Immunol* 1989; 19:775-8.
36. **Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF.** Subpopulations of human Natural Killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983; 131 (4):1789-96.
37. **Levy PC, Utell MJ, Fleit HB, Roberts NJ, Ryan DH, Looney RJ.** Characterization of human alveolar macrophage Fcγ receptor III a transmembrane glycoprotein that is shed under *In Vitro* culture conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:307-314.
38. **Storkus WJ, Dawson JR.** Target structures involved in Natural Killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules. *Critical Rev Immunol* 1991; 10 (5):393- 416.
39. **Amato M, Hüppi P, Imbach P, Llanto A, Bürgi W.** Serial IgG and IgM serum levels after infusion of different Ig-preparations (IgG or IgM - enriched) in preterm infants. *Pediatr Allergy Immunol* 1993; 4:217-20.
40. **Stadler BM, Furukawa K.** Immunoglobulin E regulation beyond the cytokine network. *ACI News* 1993; 5/6:160-2.
41. **Jensen-Jarolim E, Vogel M, de Weck AL, Sadler BM.** Anti-IgE autoantibodies mistaken for specific IgG. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:31-43.
42. **Stämpfli MR, Miescher S, Stadler BM.** Control of human IgE synthesis by anti-IgE antibody. *ACI News* 1993; 5/6:165-6.



# Orientação Terapêutica na Asma Durante a Gravidez

AURORA CARVALHO \*

Conforme consta na introdução da proposta de um protocolo prospectivo sobre Asma e Gravidez, publicado no n.º 1 do vol. 2 da Revista Portuguesa de Imunoalergologia, os autores propuseram-se apresentar normas de orientação terapêutica a seguir na asma durante a gravidez, com base nos elementos que os colegas Rogério Matos (Hosp. Santa Maria, Lisboa), Alda Manique (Hosp. Santa Maria, Lisboa), Mário Loureiro (HUC, Coimbra), fizeram chegar à Comissão de Alergologia Respiratória da SPPR realizada em Junho de 1993.

A síntese apresentada é da autoria da Dr.ª Aurora Carvalho, um dos elementos coordenadores da referida Comissão.

Por se entender que o assunto tratado, para além de interessar aos especialistas de Asma, se reveste de grande interesse para o Clínico Geral, a Redacção da Revista decidiu incluí-lo na rubrica "A Alergologia e o Clínico Geral".

## ASMA E GRAVIDEZ - PROTOCOLO TERAPÊUTICO

Durante a gravidez ocorrem modificações fisiológicas - respiratórias, hormonais, de equilíbrio ácido-base, gasométricas. Estudos retrospectivos indicam que cerca de um terço dos asmáticos melhoram, um terço pioram e um terço mantêm as características de gravidade da asma (Gluck e Gluck...).

No sangue do cordão umbilical existe normalmente hipoxia e acidose o que reduz as possibilidades do feto suportar a hipoxemia materna induzida por situações clínicas como a asma. Isto implica que **a asma seja tratada eficazmente durante a gravidez**. A prevenção de hipoxemia é o principal objectivo no controle da asmática grávida. É fundamental o controle dos sintomas e a manutenção da função pulmonar.

A terapêutica da asma na grávida é a mesma utilizada na asmática não grávida. A maior parte dos fármacos utilizados são seguros.

A terapêutica farmacológica deve ser adequada à gravidez da asma (critérios clínicos, funcionais, necessidade de medicação), reduzindo a terapêutica às doses mínimas eficazes, dando preferência à via inalatória.

\* Assistente Hospitalar Graduada de Pneumologia  
Serviço de Pneumologia - C.H. Gaia  
Director de Departamento: Dr. Ramalho de Almeida



## ASMA LIGEIRA

(1 a 2 crises /semana

DEMI > 80% do previsto)

- $\beta_2$  agonista, inalado, acção curta em SOS
- $\beta_2$  agonista ou CGDS antes do exercício ou exposição a alérgeno conhecido

## - ASMA MODERADA

(1 a 2 crises /semana

DEMI 60 a 80% do previsto

Asma nocturna - > 2x/mês)

- $\beta_2$  agonista, inalado, acção curta, S.O.S.
- Corticoide inalado em baixas doses ou CGDS
- Corticoide inalado em altas doses
- $\beta_2$  agonista acção prolongada ou teofilina retard - na asma nocturna

## - ASMA GRAVE

(Crises frequentes, sintomas permanentes, asma nocturna frequente, DEMI < 60% do previsto)

- Corticoide inalado
- $\beta_2$  de acção prolongada, teofilina retard
- Corticoide oral (menor dose eficaz e se possível em dias alternados)
- $\beta_2$  agonista, acção curta, SOS.

## EXACERBAÇÕES:

- Oxigenoterapia
- $\beta_2$  agonista em nebulização
- $\beta_2$  agonista de acção curta inalado (em câmara expansora)
- Brometo de ipatrópio inalado (em câmara expansora)
- Corticoides por via sistémica (metil-prednisona)
- Aminofilina I.V.
- $\beta_2$  injectável

## IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA:

Manter se iniciada anteriormente à gravidez e benéfica. Não deve ser iniciada durante a gravidez.

## FÁRMACOS A NÃO UTILIZAR:

- Compostos alfa-adrenérgicos (descongestionantes nasais); adrenalina I.V.
- Antibióticos - tetraciclina, aminoglicosídeos, sulfamidas, ciprofloxacina.
- Vacinas de vírus vivos.
- Anti-histamínicos - evitar sempre que possível, inocuidade não provada.

## PARTO:

- É importante a preparação prévia da doente, realização de cinesiterapia respiratória.
- Evitar o uso de  $\beta_2$  agonistas em altas doses, pelo atraso de trabalho de parto que podem induzir.
- Evitar doses altas de aminofilina, risco de convulsões neonatais.
- Nas asmáticas corticodependentes administrar corticóides sistémicos (hidrocortisona, prednisona) antes do parto.