

**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

No Editorial que assinámos na Revista da SPAIC de Agosto-Novembro de 1993, aquando do início de funções da Direcção a que presidimos durante o triénio 1993-1995, escrevemos: "Tarefa difícil a que nos espera, tanto mais ser indubitável que a Especialidade de Imunoalergologia, em Portugal, sofre ameaças de vários quadrantes e por diferentes razões, mas cujo pecado original deriva, em nossa opinião, da sua própria estruturação: demasiado abrangente (ou ambiciosa, segundo outros) e, por isso, com alguma imprecisão dos seus contornos o que, aliás, é denominador comum a outras especialidades. Mas, no nosso caso, os médicos hospitalares sentem-no bem e as relações contractuais com as estruturas da Saúde, como as ARS, são incompreensivelmente confusas e claramente dessincronizadas com os direitos que, naturalmente, assistem a uma especialidade hospitalar e simultaneamente reconhecida pela nossa Ordem".



Entenderam, na altura, os elementos da Direcção proposta a sufrágio apresentar um conjunto de intenções, denominado "Linhos Programáticas" que, no essencial, reflectiam preocupações e objectivos próprios daquele momento e que aqui recordo:

1. Desenvolver o relacionamento com a Ordem dos Médicos, nomeadamente com o seu Bastonário, e com o Colégio de Especialidade de Imunoalergologia, no sentido de contribuir para a definição das normas de formação e qualificação de especialistas a nível nacional e europeu, bem como a atribuição de idoneidade aos Serviços para formação na especialidade.
2. Promover o relacionamento com o Ministério da Saúde, com os objectivos essenciais de desenvolver Acções de Formação dos médicos e quadros profissionais de saúde e ainda no domínio da educação dos doentes.
3. Manter e dinamizar as relações com outros organismos e associações internacionais do âmbito da Imunoalergologia, nomeadamente Interasma, GAILL e AMAIC. Haver representação efectiva (mandatada) da SPAIC na IAACI e EAACI. Reactivação do Protocolo com o American College of Allergy and Immunology. Efectivação da representação da SPAIC no "Board" Europeu de Alergologia e Imunologia Clínica.
4. Manter a Revista Portuguesa de Imunoalergologia como órgão oficial da SPAIC, na sua actual estrutura, e sujeitar a Revista a apreciação com o objectivo de sua indexação em bases de dados internacionais.
5. Apoiar os grupos de trabalho que se proponham realizar projectos clínicos ou de investigação de âmbito nacional.
6. Incentivar e apoiar a formação de Associações de doentes do foro da Imunoalergologia.
7. Manter a Reunião Anual da SPAIC em regime rotativo pelos três Centros (Coimbra, Lisboa e Porto). Promover uma segunda Reunião Científica Anual preferencialmente em conjunto com Sociedades afins.
8. Publicar o Directório dos sócios.
9. Promover a criação de uma sede que centralize toda a área administrativa da Sociedade.
10. Incentivar a criação de Bolsas, subsidiadas pela Indústria Farmacêutica na área da especialidade. Rever o Regulamento do Prémio Dome-Hollister-Stier.

É tempo de balanço.

O estilo de intervenção, o protagonismo que se assume, são características individuais provavelmente pouco significativas quando se trata de dar contas do que foi prometido.

A par das Assembleias Gerais, a Revista da SPAIC é também meio adequado para o registo desse balanço, embora que sucinto. Assim:

1. O primeiro acto oficial da Direcção foi uma entrevista com o Bastonário da Ordem dos Médicos, Dr. Santana Maia, a quem expressamos e documentamos as principais preocupações da especialidade.
2. No âmbito do relacionamento com o Colégio da Especialidade de Imunoalergologia foram desenvolvidas acções, de forma permanente, pelos três elementos da Direcção, simultaneamente eleitos para o Colégio (Drs. Rosado Pinto, Mário Loureiro e Celso Chieira).
3. O presidente da Direcção teve duas entrevistas com o Sr. Secretário de Estado da Saúde concretizando-se, neste âmbito, duas Acções de Formação para Clínicos Gerais com o patrocínio oficial do Ministério da Saúde e a sua intervenção no sentido de separar as competências da Imunoalergologia versus Pneumologia nos accordos com as ARS. O essencial, isto é, a criação de mais lugares hospitalares, não foi contemplado.

3. As relações entre a SPAIC e outros Organismos e Associações Internacionais ligados à especialidade foram, finalmente, regularizados através da nomeação formal do Vice-Presidente, Prof. Palma Carlos, como principal representante da Sociedade junto desses Organismos.

A regularização de quotas em atraso face a alguns desses Organismos Internacionais, situação penalizante para o bom nome da SPAIC, foi também um acto prioritário desta Direcção.

4. Apesar dos altos custos que acarreta, foi possível preservar a imagem da Revista da SPAIC, na sua actual estrutura.

Todavia, a sua indexação internacional ainda não foi viabilizada.

5. O apoio a médicos interessados na realização de projectos de investigação está contemplado, através dos três Prémios Anuais da SPAIC - Indústria Farmacêutica e, designadamente, pelo Prémio SPAIC - Bayer DHS, vocacionado para jovens médicos que apresentem projectos fundamentados hierarquicamente quanto à sua viabilidade de execução.

6. A formação da Associação Portuguesa de Asmáticos (APA), já em pleno funcionamento legal é, provavelmente, uma das realizações mais significativas que a Direcção cessante fomentou e acarinhou através de diversas formas, incluindo o apoio financeiro. O alcance das suas funções é óbvio, desde que projectada a todo o país.

7. Durante o período de vigência manteve-se o figurino tradicional da rotatividade da Reunião Anual pelos três principais centros alergológicos nacionais.

A colaboração activa da S.P. de Pediatria, através do seu Núcleo de Imunoalergologia, foi uma constante.

Também as Reuniões Intercalares, mais vocacionadas para o debate de temas "border-line" da especialidade, foram acontecendo.

De âmbito internacional, realizou-se uma Reunião conjunta com a Sociedade Galega de Alergologia e Imunologia Clínica em Pontevedra (26 e 27 de Maio de 1995) com a participação de perto de uma centena de colegas espanhóis.

8. Por solicitação expressa desta Direcção ao Dr. Carlos Nunes e aproveitando os dados de registo constantes da Reunião do Algarve e subsequentes, foi organizado o Directório dos Sócios da SPAIC, já editado e distribuído.

9. A aquisição de uma Sede para a Sociedade deverá ser, em nosso entender, um ponto programático de todas as Direcções difícil de concretizar, não só pelo seu número de sócios mas, sobretudo, pelas implicações financeiras que a sua manutenção acarreta. Mas é um anseio natural.

De acordo com os novos estatutos da Sociedade, para que possa vir a assumir a figura de Instituição sem fins lucrativos, cujo processo de elaboração teve início no final de 1993, tendo sido outorgados em 28 de Junho de 1995 no 2.º Cartório Notarial de Coimbra e publicados no Diário da República de 4 de Fevereiro de 1996, a Sede social mantém-se em Lisboa (Hospital de Santa Maria). Contudo, a Sede administrativa poderá ser em qualquer outro local.

10. A existência de Prémios e Bolsas de Estudo protagonizará a forma mais eficaz de manter viva a Sociedade. Por um lado, motivam os associados ao incentivar a capacidade de realização e investigação na área da especialidade; por outro, prestigia a própria Sociedade e a Indústria Farmacêutica que para isso se disponibilize, pois é uma maneira de distinguir quem, entre todos os membros, individualmente ou em grupo, consegue destacar-se. Os Júris Nacionais são o garante.

Bem terá andado a Direcção ao alargar de um para três os Prémios Anuais SPAIC - Indústria Farmacêutica: SPAIC - UCB Stallergens, SPAIC-Bayer DHS e SPAIC-Astra.

Este é o balanço. É o acerto de contas entre o que se prometeu através de um Programa de Acção sufragado e o que foi feito. Apesar de algumas vicissitudes, sempre possíveis ao longo de três anos, houve trabalho feito e de forma empenhada por todos os membros da Direcção.

Por isso, lhes expresso o meu agradecimento público.

À Direcção eleita em Fevereiro último e em particular ao seu Presidente, Dr. Rosado Pinto, quero manifestar-lhe a minha solidariedade e o desejo de um desempenho brilhante e eficaz. O seu espírito de intervenção e a sua capacidade de realização serão a mais valia de uma equipa, também individualmente prestigiada, para bem do futuro da Imunoalergologia portuguesa.

São estes os meus votos.

Mantemos, contudo, a convicção de que a vitalidade de qualquer Sociedade científica depende, fundamentalmente, da dinâmica dos elementos que a compõem. À Direcção, por ser transitória compete, no essencial, criar condições e fomentar o interesse dos seus associados pela sua dignificação.

CELSO CHIEIRA

O Receptor de Alta Afinidade para a IgE na Resposta Inflamatória Alérgica

L. TABORDA BARATA*, M HUMBERT**, B. SIHRA*, O. M. KON*

RESUMO

O receptor de alta afinidade para a imunoglobulina E (Fc ϵ RI) foi classicamente descrito em mastócitos e basófilos. Recentemente, o Fc ϵ RI foi também detectado na superfície de monócitos e macrófagos, em células de Langerhans e outras células dendríticas que expressam o marcador CD1a, em eosinófilos e em certas linhas celulares T. Embora a ligação da IgE ao Fc ϵ RI por si mesma não active a célula que expressa o receptor, a interacção subsequente entre as moléculas de IgE ligadas a receptores e alergenos para os quais essas IgE sejam específicas, induz activação celular e síntese e/ou libertação de diferentes tipos de mediadores. Estes efeitos são reproduzidos quando se estimulam as células que expressam o Fc ϵ RI, com anticorpos anti-receptor. Embora os efeitos mais conhecidos da activação através do Fc ϵ RI sejam aqueles que se passam a nível do mastócito e do basófilo, com as suas consequências em tremos de fenómeno de hipersensibilidade de tipo I, outras células Fc ϵ RI-positivas sofrem igualmente fenómenos de activação, desgranulação e libertação de diferentes tipos de mediadores. O Fc ϵ RI, pelo menos em células como as células de Langerhans e em monócitos, pode igualmente servir para captar alergenos de uma forma extremamente eficiente, com subsequente apresentação a linfócitos T, no contexto de moléculas de classe II do complexo maior de histocompatibilidade. Embora os efeitos ligados à activação através da forma membranar do Fc ϵ RI possam estar envolvidos no desencadear da resposta inflamatória alérgica, uma forma solúvel do Fc ϵ RI parece possuir propriedades anti-alérgicas, quer *in vivo* quer *in vitro*, o que poderá abrir novos

campos de intervenção terapêutica na área de doenças alérgicas.

PALAVRAS-CHAVE: Fc ϵ RI; alta afinidade; solúvel; receptor para IgE; reacção alérgica tardia; mastócitos; eosinófilos; células de Langerhans; células T; pele; mucosa nasal; mucosa brônquica; atopia.

SUMMARY

*The high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI) was classically described on mast cells and basophils. Recently, Fc ϵ RI was also detected on the surface of monocytes and macrophages on Langerhans' and other CD1a-bearing dendritic cells, on eosinophils and on certain T cell lines. Although the binding of IgE to Fc ϵ RI does not activate the receptor-bearing cell, the subsequent interaction between receptor-bound specific IgE molecules and the relevant allergen induces cell activation and synthesis and/or secretion of different types of mediators. These effects can be reproduced by stimulating Fc ϵ RI-bearing cells with anti-receptor antibodies. Although the best known effects of Fc ϵ RI-mediated cell activation are those seen in the mast cell and basophil, and which eventually result in type I hypersensitivity, other Fc ϵ RI-positive cells also undergo activation, synthesis and degranulation of different types of mediators. Fc ϵ RI, at least in cells such as Langerhans cells and monocytes, can also be used for an extremely effective uptake and presentation of allergens in the context of class II major histocompatibility molecules. Although the effects due to triggering of the membrane form of Fc ϵ RI may be involved in the pathophysiology of the inflammatory allergic response, a soluble form of Fc ϵ RI seems capable of exerting anti-allergic effects both *in vivo* and *in vitro*, which may have therapeutic prospects in allergic disease.*

KEY-WORDES: Fc ϵ RI; high affinity; soluble; IgE receptor; late-phase reaction; mast cells; eosinophils; Langerhans' cells; T cells; skin; nasal mucosa; bronchial mucosa; atopy.

* Sector de Imunoalergologia, Serviço de Pneumologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal (Dir.: Prof. Robalo Cordeiro).

+ Service de Pneumologie, Hôpital Antoine Béclère, Paris, France (Dir.: Prof. P. Duroux).

Allergy & Clinical Immunology, National Heart & Lung Institute, Imperial College of Science, Technology and Medicine, and Royal Brompton Hospital, London, UK (Dir.: Prof. A. B. Kay).

INTRODUCTION

This review describes the structure, cellular expression and functional aspects of the high affinity receptor for IgE (Fc ϵ RI). It also analyses the possible pathogenic implications of expression of Fc ϵ RI on cells other than mast cells and basophils and elaborates on the prospects of a therapeutic approach specifically targeted against this receptor in the context of clinical allergy.

GENERAL CONSIDERATIONS

The presence of specific receptors for immunoglobulin E (IgE) on several cell types provides a mechanism for coupling antigen-antibody interactions with cellular effector responses. There are at least three types of receptors that specifically bind IgE with different affinities¹. The high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) is capable of binding the Fc region of monomeric IgE with an affinity at least two orders of magnitude greater than the two other receptor types². The binding of IgE by Fc ϵ RI present on the cell membrane does not activate the receptor-bearing cell but, in appropriately sensitized individuals, the interaction of Fc ϵ RI-bound IgE with the relevant antigen elicits a response that varies according to the cell type. In mast cells and basophils, for instance, the response principally consists of degranulation and release of pre-formed mediators and cytokines^{2,5}, and *de novo* formation of substances relevant to the acute phase of allergic reactions². In cells such as Langerhans cells and monocytes/macrophages, the presence of Fc ϵ RI could significantly enhance their role as antigen-presenting cells^{6,7}, as well as their mediator release⁸. Finally, novel approaches to targeting the Fc ϵ RI suggested by murine studies^{9,10}, may have therapeutic possibilities in allergic diseases.

STRUCTURAL AND GENOMIC ASPECTS

Fc ϵ RI is a tetrameric complex consisting of one α -chain and two γ -chains, associated by non-covalent interactions¹¹. The α -, β - and γ -chains have one, four and one membrane-spanning regions, respectively (Fig. 1). The binding site for IgE is located on the α -chain^{12,16}, but the β - and γ -chains are necessary for signal transduction through Fc ϵ RI. Studies with co-transfection of α - and γ -chains have suggested that in the human, the α - and γ -chains may be sufficient for the expression and function of Fc ϵ RI on the cell surface¹⁷. Complementary DNA clones coding for the human α ^{18,19} and γ ¹⁷ chains have been isolated. Recently, great interest was raised by the observation that the β -chain of the Fc ϵ RI was located on chromosome 11q13 and was in close linkage with a putative gene for atopy²⁰. In addition, a substitution in one aminoacid in

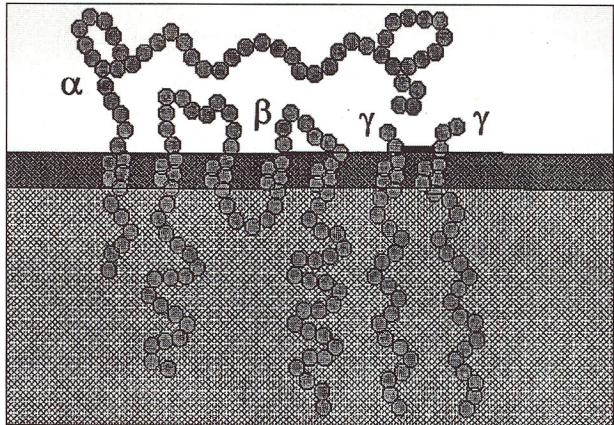


Fig. 1 - Estrutura do receptor de alta afinidade para a IgE (Fc ϵ RI), composto por uma cadeia α , que contém o local de ligação para a fração Fc da IgE; uma cadeia β , e um homodímero de cadeias γ . As cadeias β e γ são necessárias para a transdução de sinal.

the β -chain has also been shown to be associated with high total serum IgE levels²¹.

Each receptor molecule binds one IgE molecule^{22,24}, and several studies have shown, at least in mast cells and basophils, that for efficient cell activation and mediator release, a minimum of two receptors must be cross-linked by allergen^{25,26}. This may not be the case in other cell types, particularly in terms of allergen uptake and presentation.

A recombinant, soluble form of Fc ϵ RI, basically composed of the α -chain on its own or of constructs of the α -chain and the Fc portion of IgG, can bind IgE *in vitro* with affinity similar to that of the membrane form^{27,28}. This has led several groups to express the recombinant form of soluble form of Fc ϵ RI in several systems in order to study both the stoichiometry of IgE binding to the α -chain^{25,26,29}, and the effects of soluble Fc ϵ RI on IgE production by B cells³⁰ and in type I hypersensitivity reactions in animal models¹⁰.

CELLULAR EXPRESSION AND FUNCTION

Fc ϵ RI can be expressed by different cell types. Although traditionally described on mast cells and basophils^{31,32}, the high affinity receptor has more recently been detected on monocytes³⁴, Langerhans cells^{35,36}, eosinophils³⁷ and certain T cell lines³⁸. We have recently shown the presence of increased numbers of Fc ϵ RI-bearing cells in bronchial biopsies from patients with asthma (atopic and non-atopic) and from non asthmatic, atopic patients³⁹, and after allergen challenge in the skin⁴⁰ (Fig. 2) and nose⁴¹ of atopic patients. Very little is known about the possibility of modulation of expression of Fc ϵ RI on the cell surface by cytokines or other mediators, except for the upregulation that was shown to occur in mast cell and T cell lines, after incubation with IL-9³⁸.

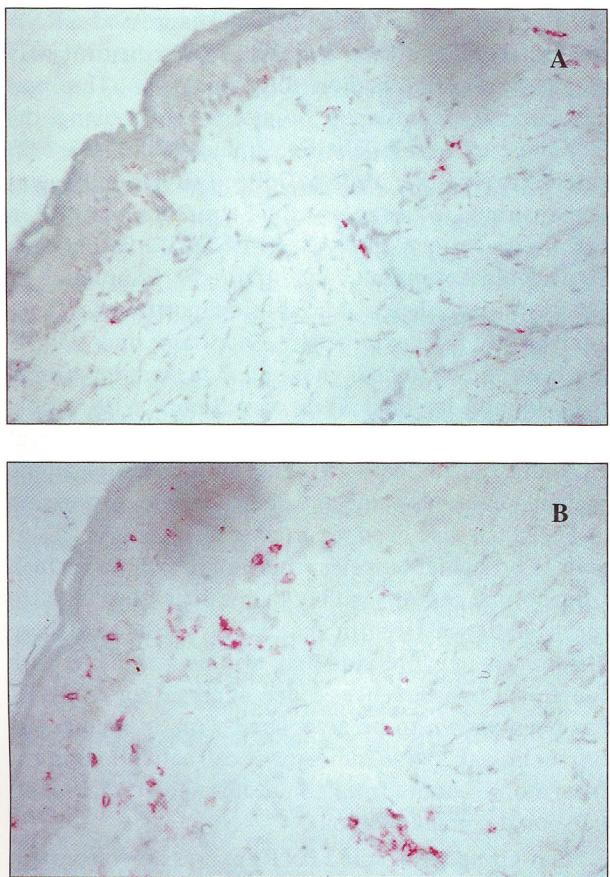


Fig. 2 - Células positivas (a vermelho; ICC) para a cadeia α do Fc ϵ RI 24 horas após injeção intradérmica de diluente controlo (A) ou alergeno (B)

Mast cells and basophils

It has been known for some time that both mast cells and basophils bind IgE through at least two types of receptors, with different affinities^{31,33}. One of the receptors on murine mast cells was shown to bind IgE with high affinity, due to a slow dissociation of the bound IgE³¹. These results were subsequently confirmed with human basophils⁴². Aggregation of at least two receptor molecules is necessary for efficient signal transduction and cell activation of mast cells and basophils^{25,26}, although antibodies directed against epitopes on the Fc ϵ RI α -chain have the same effect, in the absence of IgE^{43,45}. In both mast cells and basophils, activation through Fc ϵ RI ultimately results in the release of newly synthesized and pre-formed mediators. Striking morphological changes can be observed within minutes and culminate in degranulation⁴⁶. In addition, mast cells and basophils have also been shown to synthesize and release different cytokines (e.g., GM-CSF, IL-3 TNF α) after prolonged cross-linking of Fc ϵ RI^{3,4,47}.

Using double immunocytochemistry (ICC), we characterized expression of the Fc ϵ RI α -chain on mast cells present in sections from the nasal and bronchial

mucosa and the skin of atopic and non-atopic patients^{39,41}. Although in the bronchial mucosa there was a trend for expression of Fc ϵ RI being greater on mast cells from atopic than from non-atopic subjects, this did not reach significance. In general, therefore, 85% and 97% of mast cells were Fc ϵ RI $^+$ in the bronchial and nasal mucosa, respectively. In the skin, 90% and 95% of mast cells were Fc ϵ RI $^+$ before and after allergen challenge, respectively. Conversely, mast cells accounted for most of Fc ϵ RI $^+$ cells in the nose, lung and skin (63%, 70% and 50%, respectively). These results show that, at least when surface expression of Fc ϵ RI is analysed with ICC, expression of this receptor on mast cells is heterogeneous. In the skin, the phenotype of almost 10% of Fc ϵ RI $^+$ cells observed after allergen challenge could not be identified. We believe that these were basophils.

Fc ϵ RI α -chain expression on basophils from atopic patients and non-atopic controls was also studied by our group using dual-colour flow cytometry⁴⁸. Expression was significantly higher in atopic than in non-atopic subjects, and correlated with the levels of total serum IgE.

Monocytes/macrophages

IgE-dependent activation of monocytes may potentially have a crucial role in allergic tissue inflammation in view of the capacity to induce mediator release and to take part in antigen uptake and presentation. Human peripheral blood monocytes⁴⁹ and rat alveolar macrophages⁵⁰ were shown to release mediators such as LTC₄ after binding IgE. Although monocytes also express the low affinity IgE receptor (CD23)⁵¹ and the IgE-binding protein εBP³³, which are preferentially involved in the binding of IgE-antigen complexes, Fc ϵ RI is apparently the most important IgE receptor for monomeric IgE. This is supported by experiments showing that blocking antibodies against the α -chain of Fc ϵ RI (15-1 mAb), but not blocking antibodies against CD23 were able to prevent almost completely the binding of allergen-specific monomeric IgE to surface receptors on peripheral blood monocytes from atopic subjects⁷. From a functional point of view, subsequent cross-linking of Fc ϵ RI-bound monomeric IgE by specific allergen may induce activation and/or degranulation of monocytes and/or macrophages, as indirectly suggested by anti-Fc ϵ RI antibody-mediated sustained cytosolic Ca²⁺ increase in peripheral blood monocytes from atopic subjects³⁴. Furthermore, a recent report has shown that triggering of Fc ϵ RI with monoclonal antibodies also induces release of prostaglandin E2⁸.

Expression of Fc ϵ RI on the membrane of monocytes and macrophages may also be crucial for antigen uptake and presentation to T cells as demonstrated in monocyte-enriched peripheral blood mononuclear cells

(ME-PBMC)⁷. In these experiments, ME-PBMC were shown to present allergen to T cell clones in a highly efficient way if allergen were targeted to Fc ϵ RI. Importantly, this ability was almost completely abrogated when competitive anti-Fc ϵ RI (but not anti-CD23) mAb were added to *in vitro* cultures.

Our group has studied the expression of the Fc ϵ RI α -chain on monocytes in bronchial³⁹, cutaneous⁴⁰ and nasal⁴¹ biopsies. Baseline (bronchial) and post allergen-challenge (nasal and skin) biopsies consistently showed the presence of high numbers of Fc ϵ RI α -chain $^+$ monocytes/macrophages in the cellular infiltrate, ranging between 25% of total macrophages in the nasal and bronchial mucosae and 45% in the skin. Conversely, Fc ϵ RI α -chain $^+$ monocytes/macrophages comprised about 20%, 35% and 40% of total Fc ϵ RI α -chain $^+$ cells in the cellular infiltrate in the nose, lung and skin, respectively. The results suggest the presence of two subsets of macrophages (Fc ϵ RI $^+$ and Fc ϵ RI $^-$) and may explain why a previous report could not find expression of Fc ϵ RI α -chain on factor XIIIa $^+$ macrophages in the skin of patients with atopic dermatitis⁵².

Using dual-colour flow cytometry, expression of Fc ϵ RI α -chain was studied by our group on peripheral blood monocytes from atopic patients and non-atopic controls⁴⁸. Although average Fc ϵ RI α -chain expression on monocytes was one hundred-fold less (as determined by specific mean fluorescence of binding of the Fc ϵ RI α -chain mAb) than in basophils, the receptor was detected in about 28% of total monocytes. In addition, the percentage of Fc ϵ RI $^+$ monocytes was greater in atopic than in non-atopic subjects. A previous report had only detected the receptor on monocytes from atopic individuals³⁴ but recent evidence of significant expression of Fc ϵ RI on monocytes from non-atopic individuals has been obtained under certain culture conditions⁵³. Membrane expression of Fc ϵ RI may last longer on monocytes from atopic subjects than on those from non-atopic subjects because of the stabilizing effects of IgE upon binding to the receptor and this may explain differences in detectable expression of Fc ϵ RI on monocytes between the two groups of subjects⁵³. Interestingly, our study showed a positive correlation between Fc ϵ RI expression on peripheral blood monocytes and total serum IgE⁴⁸.

CD1a $^+$ Langerhans' and dendritic cells

CD1a $^+$ Langerhans cells (LC) are very potent antigen-presenting cells^{54,55}. LC were initially shown by immunocytochemistry to express membrane IgE molecules in patients with atopic dermatitis⁵⁶, particularly in lesional, inflamed cutaneous areas⁵⁷. Expression of membrane IgE was later also detected on LC from normal skin⁵⁸. As in monocytes, IgE binding was first demonstrated to be mediated by CD23^{59,60} and the IgE-binding protein ϵ BP⁶¹. Subsequent experiments

showed that purified epidermal LC expressed mRNA for the Fc ϵ RI α - and γ -chains and constitutively expressed Fc ϵ RI on their membrane^{35,36}. This was subsequently confirmed on dermal LC, using the technique of double-labelling immunofluorescence⁵². Interestingly, the high affinity IgE receptor was demonstrated to be the principal structure involved in IgE binding since antibodies to CD23, ϵ BP or even Fc γ R could not inhibit such binding⁶². Expression of Fc ϵ RI is nevertheless variable on purified LC⁶³, as analysed by flow cytometry⁶⁴, and, more importantly, has been shown to be higher on LC present in lesional than in non-lesional skin of patients with atopic dermatitis³⁵. In addition, Fc ϵ RI expression on CD1a $^+$ LC and dendritic cells is higher in the skin of atopic than in non-atopic subjects³⁵. Furthermore, expression of Fc ϵ RI has also been reported to be higher on CD1a $^+$ cells in bronchial biopsies from atopic asthmatics than from normal controls, although this difference failed to reach statistical significance⁶⁵. Nevertheless, these differences in expression may also be associated with functional consequences since aggregation of Fc ϵ RI has been shown to be associated with an increase in intracellular Ca $^{2+}$ (an indicator of cell activation) in LC from atopic but not from non-atopic subjects (Strobel, personnal communication).

Our group has studied Fc ϵ RI expression on dermal CD1a $^+$ LC or LC-like cells in the dermis⁴⁰. Using a polyclonal antibody (997) to the Fc ϵ RI α -chain, we detected the high affinity receptor on dermal CD1a $^+$ LC in baseline biopsies from the skin of atopic patients. Although Fc ϵ RI $^+$ dermal LC comprised only about 3% of the total number of Fc ϵ RI $^+$ cells in the dermis, about 94% of dermal LC were Fc ϵ RI $^+$. Allergen challenge was not associated with significant increases in the percentage of Fc ϵ RI $^+$ LC. Most dermal Fc ϵ RI $^+$ LC were located in perivascular units, where T cells, amongst other cell types, can also be observed. This location would facilitate interactions between LC and T cells and possibly contribute to subsequent local presentation of antigens by LC to T cells. It is indeed known that dermal CD1a $^+$ LC or LC-like cells are potent antigen-presenting cells for T cells^{54,55}. More importantly, allergens may be preferentially taken up and presented to T cells by IgE-bearing LC, as demonstrated in LC isolated from patients with atopic dermatitis of which only the IgE-bearing LC were shown to present allergen to T cells⁶.

Eosinophils

Eosinophils can bind IgE with low affinity through receptors such as Fc ϵ RII/CD23⁶⁶ and Mac2/ ϵ -binding protein⁶⁷. More recently, Soussi Gouni *et al*³⁷ showed that Fc ϵ RI was also expressed on peripheral blood eosinophils from patients with hypereosinophilic syndromes and on eosinophils present in the skin of

patients with atopic dermatitis and bullous pemphigoid. Using Northern blotting and RT-PCR techniques, these authors demonstrated that isolated eosinophils expressed mRNA for the α , β and γ chains of Fc ϵ RI. Furthermore, using flow cytometry and ICC with the competitive monoclonal antibody (mAb) 15-1 to the α -chain of Fc ϵ RI, these authors were able to detect eosinophils positive for the receptor in peripheral blood and the skin. Finally, using the mAb 15-1 in two sets of experiments, a dose-dependent inhibition of monomeric IgE binding was observed in cultured eosinophils, and eosinophil degranulation as indicated by the release of eosinophil peroxidase was detected when 15-1 was added to the cultures. Our group studied the expression of Fc ϵ RI on eosinophils in atopic and non-atopic patients⁴⁸. Dual colour flow-cytometry showed that peripheral blood eosinophils from both atopic and non-atopic donors express Fc ϵ RI on the cell membrane although at very low levels, as compared to basophils or monocytes. Furthermore, there was a significantly greater expression ($p=0.004$) of Fc ϵ RI on eosinophils from atopic donors than on those from non-atopic donors.

We also used the technique of ICC to study the expression of Fc ϵ RI on eosinophils present in biopsies taken from the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis, from the bronchial mucosa of patients with allergic asthma and from the skin of atopic patients^{39,41}. Expression of Fc ϵ RI was detected on eosinophils in the three types of biopsies. In general, there was a wide inter-patient variability of expression of the receptor on eosinophils, particularly in the nose and lung. Furthermore, although the percentage of Fc ϵ RI⁺ cells that were eosinophils was relatively low both in the nose and in the lung (median, range = 6%, 0 - 35% and 4%, 0 - 14%, respectively), about 20% (10 - 45%) of Fc ϵ RI⁺ cells were eosinophils after allergen challenge in the skin. Conversely, 15%, 5% and 26% eosinophils were Fc ϵ RI⁺ in the nose, lung and skin, respectively. These results confirm other studies performed in atopic dermatitis⁶⁸ and show that eosinophils are capable of expressing at least the α -chain of Fc ϵ RI, although there is great variability of expression between different tissues. Amongst other reasons, the use of high doses of allergen injected intradermally, as opposed to the relatively lower doses used for allergen challenge in the nose and natural exposure in the lung, may account for the differences observed in Fc ϵ RI expression observed between tissues.

It is still debatable whether eosinophils can indeed express the complete Fc ϵ RI receptor on their membrane. Although messenger RNA for the β - and γ -chains was detected by some authors in eosinophils purified from the peripheral blood of patients with hyper-eosinophilia³⁷, others have only been able to detect

mRNA for the α -, but not for the β - or γ -chains in peripheral blood eosinophils isolated from atopic subjects (Bjerke *et al*, personnal communication). Further, Bjerke *et al* could not detect expression of the α - or γ -chain protein on the membrane of eosinophils and the α -chain was only observed within eosinophil granules, using electron microscopy. Our own results, in contrast, show that eosinophils isolated from the peripheral blood of atopic patients (asthma, rhinitis or atopic dermatitis) express the α -chain on their membrane, albeit at low levels. Since the membrane expression of the α -chain depends on the presence of the γ -chain¹⁷, this suggests that eosinophils may be able, under certain circumstances, to express the functional receptor, consisting of both chains, on their surface. Clearly, the possibility of expressing the full receptor on eosinophils may have different implications. We have found a positive correlation between the numbers of Fc ϵ RI⁺ (α -chain) eosinophils and the size of the cutaneous late phase reaction 24 h after allergen injection ($r = 0.89$; $p = 0.02$; Spearman's test). If eosinophils can express the full receptor on their membrane, triggering of Fc ϵ RI may induce mediator release³⁷ and be involved in IgE-mediated antigen presentation, since eosinophils can also act as antigen-presenting cells⁶⁹. In this case, our positive correlation would suggest that the magnitude of the late phase reaction may, at least in part, depend on mediators released by activated Fc ϵ RI⁺ eosinophils. On the other hand, if eosinophils can only express the α -chain in their granules, and eventually release it as a soluble form of Fc ϵ RI, then Fc ϵ RI⁺ eosinophils may to a certain extent be involved in the downregulation of the magnitude of the late phase reaction, since soluble Fc ϵ RI has been shown in an animal model to downregulate type I hypersensitivity reactions^{10,70}.

T cell lines

Messenger RNA for the Fc ϵ RI α - and γ -chains has been detected by Northern blot and RT-PCR analyses in murine T cell lines, cultured in the presence of IL-9³⁸. Furthermore, these T cell lines could also bind IgE in a CD23-independent way, when incubated with IL-9. Indeed, although these T cell lines constitutively expressed CD23, which can bind IgE with low affinity, binding of IgE was only detected after incubation with IL-9, which induced expression of Fc ϵ RI without affecting expression of CD23. Fc ϵ RI, thus far, has not been detected on peripheral blood T cells from atopic patients⁴⁸, or on CD3⁺ T cells present in the cutaneous LPR^{40,52} or in the bronchial mucosa³⁹. At the moment, although it may be possible that under certain circumstances, some T cells may express Fc ϵ RI, this awaits confirmation and the relevance of such expression still has to be determined.

Atopy-related IgE and Fc ϵ RI expression

The observation of a relationship between the number of receptor-bound IgE on purified human basophils and the level of myeloma IgE added to the culture medium first suggested that IgE-binding receptors on these cells were not saturated although the possibility that a direct effect of IgE in terms of induction of receptor expression could not be excluded⁷¹. Such a relationship was later confirmed in basophils isolated from atopic and non-atopic subjects, in which receptor-bound IgE correlated with the total serum IgE concentration⁷², and reproduced in basophils cultured with IgE-rich serum⁷³. These experiments suggested that the number of receptors on basophils was modulated by the serum IgE concentration, although the possibility of genetic association or modulation by similar regulatory factors between serum IgE and the number of IgE receptors could not be excluded.

The first indication that expression of Fc ϵ RI itself correlated with serum IgE levels was given by a murine model of *Nippostrongylus brasiliensis* infection, in which changes in expression of Fc ϵ RI on mast cells showed a highly significant correlation with infection-induced changes in serum IgE⁷⁴. Using flow cytometry, our group was the first to describe a strong correlation between total serum IgE levels and the number of Fc ϵ RI receptors on basophils and monocytes from atopic and non-atopic patients⁴⁸. Furthermore, the level of receptor occupancy on these cell types also correlated with the level of total IgE. An association between total serum IgE and the numbers of Fc ϵ RI-bearing cells was also observed in bronchial biopsies from asthmatic patients³⁹.

Another line of research produced interesting observations which provided, at least theoretically, a possible explanation for the association observed between total serum IgE and expression of Fc ϵ RI. These observations consisted of the demonstration of the localization of the gene for the β -chain of the Fc ϵ RI on chromosome 11q13, in close linkage with a putative gene for atopy²⁰. This would suggest that altered expression of the β -chain (and, eventually, Fc ϵ RI) might be associated with the high IgE status of atopy. Interestingly, a common variant of the β -chain (leucine substituted for isoleucine at position 181 in the fourth transmembrane domain) was then demonstrated amongst unrelated nuclear families with allergic asthmatic probands, and shown to be associated with high total serum IgE levels²¹.

The relevance of the findings concerning the β -chain of Fc ϵ RI and the putative atopy gene need further clarification and assessment of their relevance. Indeed, several groups have failed to detect linkage between the putative atopy gene and a marker on chromosome 11q^{75,79}. In addition, as mentioned before,

expression of Fc ϵ RI in humans does not require the β -chain. The possibility still remains, however, that expression of the β -chain may somehow modulate expression of the other Fc ϵ RI component chains. Altered expression of the β -chain might therefore be expected, at least in theory, to have consequences in expression of the complete receptor. At present, the relevance of the observations regarding the genetics of the Fc ϵ RI β -chain still has to be ascertained.

Interestingly, in our study involving bronchial biopsies from atopic asthmatic, atopic non-asthmatic, non-atopic asthmatic and non-atopic non-asthmatic subjects, we showed that atopy is characterized by elevated numbers of Fc ϵ RI-bearing cells irrespective of the patients' asthmatic status³⁹. Furthermore, we also showed that non-atopic asthmatic also have increased numbers of Fc ϵ RI-bearing inflammatory cells in the bronchial mucosa, in the absence of known allergies, possibly suggesting a deregulation of local IgE synthesis. Overall, our study indicated that expression of Fc ϵ RI in the bronchial mucosa is necessary but not sufficient for asthma, although other factors are required for the development of asthma in predisposed individuals.

Therapeutic prospects

Therapeutic approaches involving Fc ϵ RI have involved both the membrane and the soluble form. In one study, the Fc ϵ RI α -gene was targeted and "knocked-out" in embryonic stem-cells, thereby generating Fc ϵ RI-deficient mice⁹. Although there were no changes in mast cell development, both passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and systemic anaphylaxis were inhibited in the Fc ϵ RI-deficient mice, thus indicating that although Fc ϵ RI was not necessary for mast cell development, it was necessary for induction of IgE-mediated anaphylaxis. These findings were supported by a different study showing that intravenous injection of the soluble form of Fc ϵ RI into previously antigen-sensitised mice mostly suppressed IgE-dependent type I hypersensitivity on re-exposure to the antigen¹⁰. In another study, using Rhesus monkey and human lung parenchymal tissues that were passively sensitized with allergen, incubation with a soluble construct consisting of human Fc ϵ RI joined to a truncated IgG heavy chain (Fc ϵ RI-IgG) abolished subsequent allergen-induced parenchymal contraction and histamine release that was observed in lung tissue not incubated with Fc ϵ RI-IgG⁷⁰. In a different report, *in vitro* addition of recombinant soluble Fc ϵ RI to cultures of purified human B cells inhibited IgE production through specific interaction with the membrane-bound form of IgE³⁰. To what extent this phenomenon may be relevant to the effects observed *in vivo* is not known at present. In indirect support of a positive correlation between blockage of binding of specific serum IgE to membrane-

-bound Fc ϵ RI and an inhibition of type I hypersensitivity allergic-like phenomena, interesting results have been obtained *in vitro*, with IgE-producing cell lines derived from allergic patients before and after "rush" immunotherapy⁸⁰. In this report, "rush" immunotherapy was associated with a significant decrease in the *in vitro* binding of specific IgE to Fc ϵ RI, in the presence of antigen. This direct effect of antigen on IgE binding to Fc ϵ RI may, at least in part, explain the rapidly beneficial effects frequently observed with this type of immunotherapy^{81,82}.

Interaction with the function of Fc ϵ RI may have beneficial therapeutic applications and may eventually be achieved by interfering with the surface expression of Fc ϵ RI, the binding function of the receptor, and/or blockage of receptor-mediated signal transduction. At present, the only known method of reducing surface expression of Fc ϵ RI is through targeting and "knocking-out" of the receptor α -chain gene. This will of course raise clinical issues in human subjects. Theoretically, downregulation of receptor expression on the cell surface might also be achieved through the administration of inhibitory mediators (possibly cytokines). As discussed previously, interference with the binding of IgE by Fc ϵ RI, through the use of recombinant competitive molecules, that may block or induce conformational changes on the receptor binding site, appears to be a promising possibility. At present, however, it is unclear whether modulation of Fc ϵ RI expression on cells other than mast cells and basophils is not detrimental in immunological terms. Finally, dissociation of receptor-ligand interactions on the α -chain from signal transduction pathways (dependent on β - and γ -chains) could also impair the ability of Fc ϵ RI-bearing cells to initiate immune responses. The specificity of such interaction would, however, need to be sought, since the mechanism of signal transduction associated with Fc ϵ RI is still relatively unknown.

In summary, the high affinity receptor for IgE has an important role in allergic inflammation and further knowledge of the mechanisms of its expression and function may allow a more effective therapeutic intervention in allergic diseases.

REFERENCES

- Sutton BJ, Gould HJ.** The human IgE network. *Nature* 1993; 366: 421-8.
- Metzger H, Alcaraz G, Hohman R, Kinet J-P, Pribluda V, Quarto R.** The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Ann Rev Immunol* 1986; 4: 419-70.
- Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE.** Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc ϵ RI or to calcium ionophores. *Nature* 1989; 339: 64-7.
- Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C.** Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* 1989; 339: 150-2.
- Burd PR, Rogers HW, Gordon JR et al.** Interleukin-3-dependent and - independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* 1989; 170: 245-7.
- Mudde GC, van Reijse FC, Boland GJ, de Gast GC, Bruijnzeel PLB, Bruijnzeel-Koomen CAFM.** Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* 1990; 69: 335-41.
- Maurer D, Ebner C, Reininger B et al.** The high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol* 1995; 154: 6285-90.
- Takenaka M, Tanaka Y, Anan S, Yoshida H, Ra C.** High affinity IgE receptor-mediated prostaglandin E2 production by monocytes in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108: 247-53.
- Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet J-P.** Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* 1993; 75: 969-76.
- Naito K, Hirama M, Okumura K, Ra C.** Soluble form of the human high-affinity receptor for IgE inhibits recurrent allergic reaction in a novel mouse model of type I allergy. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1631-7.
- Metzger H, Kinet J-P, Perez-Montfort R, Rivnay B, Wank SA.** A tetrameric model for the structure of the mast cell receptor with high affinity for IgE. *Prog Immunol* 1983; 5: 493-501.
- Hogarth PM, Hulett MD, Ierino FL, Tate B, Powel MS, Brinkworth RI.** Identification of the immunoglobulin binding regions (IBR) of Fc γ RII and Fc ϵ RI. *Immunol Rev* 1992; 125: 21-35.
- Hulett MD, McKenzie IFC, Hogarth PM.** Chimeric Fc receptors identify immunoglobulin-binding regions in human Fc γ RII and Fc ϵ RI. *Eur J Immunol* 1993; 23: 640-5.
- Riske F, Hakimi J, Mallamaci M et al.** High affinity human IgE receptor (Fc ϵ RI): analysis of functional domains of the alpha-subunit with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1991; 266: 11245-51.
- Robertson MW.** Phage and Escherichia coli expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. Domain localization of the IgE-binding site. *J Biol Chem* 1993; 268: 12736-43.
- Mallamaci MA, Chizzonite R, Griffin M et al.** Identification of sites on the human Fc ϵ RI alpha subunit which are involved in binding human and rat IgE. *J Biol Chem* 1993; 268: 22076-83.
- Kuster H, Thompson H, Kinet J-P.** Characterization and expression of the gene for the human Fc receptor γ subunit: definition of a new gene family. *J Biol Chem* 1990; 265: 6448-52.
- Shimizu A, Tepler I, Benfey PN, Berenstein E, Siraganian RP, Leder P.** Human and rat mast cell high-affinity immunoglobulin E receptors: characterization of putative alpha-chain gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1907-11.
- Kochan J, Pettine LF, Hakimi J, Kishi K, Kinet J-P.** Isolation of the gene coding for the alpha subunit of the human high affinity IgE receptor. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 3584.
- Sandford AJ, Shirakawa T, Moffat MF et al.** Localisation of atopy and b-subunit of high affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993; 341: 332-4.

21. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M et al. Association between atopy and variants of the β -subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Nature Genetics* 1994; 7: 125-30.
22. Kanellopoulos JM, Liu TY, Poy G, Metzger H. Composition and subunit structure of the cell receptor for immunoglobulin E. *J Biol Chem* 1980; 255: 9060-6.
23. Miller L, Blank U, Metzger H, Kinet J-P. Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells. *Science* 1990; 249: 174-7.
24. Hakimi J, Seals C, Pettine LF, Kochan JP. A chimeric human Fc ϵ RI alpha subunit that binds IgE. *FASEB J* 1990; 4: A1873.
25. Segal DM; Taurog JD, Metzger H. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 2993-7.
26. Fewtrell C, Metzger H. Larger oligomers of IgE are more effective than dimers in stimulating rat basophilic leukemia cells. *J Immunol* 1980; 125: 701-10.
27. Blank U, Ra C, Kinet J-P. Characterization of truncated α chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Biol Chem* 1991; 266: 2639-46.
28. Yagi S, Yanagida M, Tainda I, Hasegawa A, Okumura K, Ra C. High-level expression of the truncated alpha-chain of human high-affinity receptor for IgE as a soluble form by baculovirus-infected insect cells. Biochemical characterization of the recombinant product. *Eur J Biochem* 1994; 220: 593-8.
29. Keown MB, Ghirlando R, Young RJ et al. Hydrodynamic studies of a complex between the Fc fragment of human IgE and a soluble fragment of the Fc ϵ RI alpha-chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1841-5.
30. Yanagihara Y, Kajiwara K, Ikizawa K, Koshio T, Okumura K, Ra C. Recombinant soluble form of the human high-affinity immunoglobulin E (IgE) receptor inhibits IgE production through its specific binding to IgE-bearing B cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 2162-5.
31. Kulczychi Jr A, Isersky C, Metzger H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. I. Evidence for specific binding of IgE. *J Exp Med* 1974; 139: 600-16.
32. Froese A. The presence of two kinds of receptors for IgE on mast cells. *J Immunol* 1980; 125: 981-7.
33. Frigeri LG, Liu FT. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 861-7.
34. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B et al. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc ϵ RI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994; 179: 745-50.
35. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI). *J Exp Med* 1992; 175: 1285-90.
36. Wang B, Rieger A, Kilgus O et al. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc ϵ RI. *J Exp Med* 1992; 175: 1353-65.
37. Soussi Gounni A, Lamkhioued B, Ochiai K et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994; 367: 183-6 (erratum *Nature* 1994; 368: 473).
38. Louahed J, Kermouni A, van Snick J, Renaud J-C. IL-9 induces expression of granzymes and high-affinity IgE receptor in murine T helper clones. *J Immunol* 1995; 154: 5061-70.
39. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L et al. High affinity immunoglobulin E receptor (Fc ϵ RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and non-atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 (Em publicação).
40. Taborda-Barata L, Grant JA, Humbert M et al. High affinity IgE receptor (Fc ϵ RI)-bearing eosinophils, mast cells, macrophages and Langerhans cells in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects. (Resumo) *Allergy* 1995; 50: 26 (Suppl.): 48.
41. Rajakulasingam K, Grant JA, Humbert M, O'Brien F, Taborda-Barata L, Durham SR, Kay AB. Recruitment of Fc ϵ RI-positive cells in the nasal mucosa in atopic rhinitis subjects following allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1996 (Em publicação).
42. Ishizaka T, Dvorak AM, Conrad DH, Niebyl JR, Marquette JP, Ishizaka K. Morphologic and immunologic characterization of human basophils developed in cultures of cord blood mononuclear cells. *J Immunol* 1985; 134: 532-40.
43. Ishizaka T, Chang TH, Taggart M, Ishizaka K. Histamine release from rat mast cells by antibodies against eat basophilic leukemia cell membrane. *J Immunol* 1977; 119: 1589-96.
44. Isersky C, Taurog JD, Poy G, Metzger H. Triggering of cultured neoplastic mast cells by antibodies to the receptor for IgE. *J Immunol* 1978; 121: 549-58.
45. Ra C, Kochan JP, Hakimi J, Danho W, Metzger H, Kinte J-P. The high affinity IgE receptor: anti-peptide antibodies confirm isolated cDNA codes for alpha subunit. *FASEB J* 1988; 2: A1248.
46. Oliver JM, Seagrave J, Stump RF, Pfeiffer JR, Deanin GG. Signal transduction and cellular response in RBL-2H3 mast cells. *Prog Allergy* 1988; 42: 185-245.
47. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF α /cachetin. *Nature* 1990; 346: 274-6.
48. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high affinity IgE receptors (Fc ϵ RI) on peripheral blood basophils, monocytes and eosinophils in atopic and non-atopic subjects: relationship to total serum immunoglobulin E (IgE) concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1996 (Em publicação).
49. Capron A, Dessaint J-P, Capron M, Bazin H. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature (London)* 1975; 253: 474-5.
50. Rankin JA, Hitchcock M, Merrill W, Bach MK, Brashler JR, Askenase PW. IgE-dependent release of leukotriene C4 from alveolar macrophages. *Nature (London)* 1982; 297: 329-31.
51. Melewicki FM, Spiegelberg HL. Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1980; 125: 1026-31.
52. Osterhoff B, Rappersberger K, Wang B et al. Immunomorphologic characterization of Fc ϵ RI-bearing cells within the human dermis. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 315-20.
53. Reischl IG, Corvaia N, Pollabauer E-M et al. Regulation and function of Fc ϵ RI expression on normal monocytes (Resumo). *Allergy* 1995; 50: 26 (Suppl.): 48.
54. Meunier L, Gonzalez-Ramos A, Cooper KD. Heterogeneous populations of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells. *J Immunol* 1993; 151: 4067-80.
55. Sepulveda-Merrill C, Mayall S, Hamblin AS, Breathnach SM. Antigen-presenting capacity in normal human dermis is mainly subserved by CD1a+ cells. *Br J Dermatol* 1994; 131: 15-22.
56. Bruynzeel-Koomen C, van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruynzeel PLB. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1986; 278: 199-205.
57. Bieber T, Dannenberg B, Prinz JC et al. Occurrence of IgE-bearing epidermal Langerhans cells in atopic eczema: a study of the time course of the lesions and with regard to the IgE serum level. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 215-9.

- 58. Wang B, Rieger A, Stingl G.** Epidermal Langerhans cells in normal human skin bear IgE-binding structures (Resumo). *J Invest Dermatol* 1991; 96: 1014.
- 59. Bieber T, Rieger A, Neuchrist C et al.** Induction of Fc epsilon R2/CS23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and gamma interferon. *J Exp Med* 1989; 170: 309-14.
- 60. Torresani C, Manara GC, Ferrari C, De Panfilis G.** Immunoelectron microscopic characterization of a subpopulation of freshly isolated epidermal Langerhans cells that reacts with anti-CD23 monoclonal antibody. *Br J Dermatol* 1991; 124: 533-7.
- 61. Wollenberg A, de la Salle H, Hanau D, Liu FT, Bieber T.** Human keratinocytes release the endogenous beta-galactosidase-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med* 1993; 178: 777-85.
- 62. Bieber T.** IgE-binding molecules on human Langerhans cells. *Acta Dermato-Venerologica* 1992; 176 (Suppl.): 54-7.
- 63. Bieber T, Ring J.** In vivo modulation of the high-affinity receptor for IgE (FcεRI) on human epidermal Langerhans cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 204-7.
- 64. Bieber T.** FcεRI on human Langerhans cells: a receptor in search of new functions. *Immunol Today* 1994; 15: 52-3.
- 65. Semper AE, Hartley JA, Tunon-de-Lara JM et al.** Expression of the high affinity receptor for immunoglobulin E (IgE) by dendritic cells in normals and asthmatics: In: Banchereau J, Schmitt D (eds.). *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*. Vol. 2. New York; Plenum Press; 1995: 135-8.
- 66. Capron M, Truong MJ, Aldebert D et al.** Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2423-9.
- 67. Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M.** Human eosinophils express functional IgE binding molecules (Mac 2/εBP) of the S-type lectin family. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3230-5.
- 68. Tanaka Y, Takenaka M, Matsunaga Y et al.** High affinity IgE receptor (FcεRI) expression on eosinophils infiltrating the lesions and mite patch tested sites in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1995; 287: 712-7.
- 69. Weller PF, Rand TH, Barrett T, Elovic A, Wong DT, Finberg RW.** Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1α expression. *J Immunol* 1993; 150: 2554-62.
- 70. Saban R, Haak-Frendscho M, Zine M et al.** Human FcERI-IgG and humanized anti-IgE monoclonal antibody MaE11 block passive sensitization of human and rhesus monkey lung. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 836-43.
- 71. Ishizaka T, Soto CS, Ishizaka K.** Mechanisms of passive sensitization. III. Number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes. *J Immunol* 1973; 111: 500-11.
- 72. Conroy MC, Adkinson Jr NF, Lichtenstein LM.** Measurement of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release. *J Immunol* 1977; 118: 1317-21.
- 73. Malveaux FJ, Conroy MC, Adkinson Jr NF, Lichtenstein LM.** IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J Clin Invest* 1978; 62: 176-81.
- 74. Shaikh N, Rivera J, Stead RH, Marshall JS.** Changes in expression of the rat mast cell high affinity IgE receptor (FcεRI) correlate with serum IgE levels. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Canadian Royal College of Medicine* 1994; 94. Available from the Canadian Royal College of Medicine.
- 75. Amelung PJ, Panhuysen CIM, Postma DS et al.** Atopy and bronchial hyperresponsiveness: exclusion of linkage to markers on chromosomes 11q and 6p. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1077-84.
- 76. Hizawa N, Yamaguchi E, Ohe M et al.** Lack of linkage between atopy and locus 11q13. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1065-9.
- 77. Rich SS, Roitman-Johnson B, Greenberg B, Roberts S, Blumenthal MN.** Genetic analysis of atopy in three large kindreds: no evidence of linkage to DS11S97. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1070-6.
- 78. Lympany P, Welsh KI, Cochrane GM, Kemeny DM, Lee TH.** Genetic analysis of the linkage between chromosome 11q and atopy. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1085-92.
- 79. Coleman R, Trembath RC, Harper JI.** Chromosome 11q13 and atopy and underlying atopic eczema. *Lancet* 1993; 341: 1121-2.
- 80. Stämpfli MR, Rudolf M, Miescher S, Pachlopnik JM, Stadler BM.** Antigen-specific inhibition of IgE binding to the high-affinity receptor. *J Immunol* 1995; 155: 2948-54.
- 81. Goldstein GL, Chai H.** Efficacy of rush immunotherapy in decreasing bronchial sensitivity to inhaled antigens in perennial childhood asthma. *Ann Allergy* 1981; 47: 333-7.
- 82. Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W, Guerin B, Maasch HJ, Dhivert H, Michel FB.** Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed-grass pollen allergoids. I Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 591-8.

Correspondência

L. Taborda Barata
 Unidade de Imunoalergologia
 Serviço de Pneumologia
 Hospitais da Universidade de Coimbra
 3000 COIMBRA - PORTUGAL

Estudo Comparativo de Procaterol Versus Salbutamol Solução Respiratória em Aerossol no Tratamento da Crise de Asma da Criança

MANUEL CUNHA¹, ADELAIDE TABORDA², ROSÁRIO TOMAS³, JOSÉ ANTÓNIO PINHEIRO^{4*}

RESUMO:

Realizou-se um estudo prospectivo com o objectivo de comparar a eficácia das soluções respiratórias de salbutamol e procaterol na crise de asma em 37 crianças com idade ≥ 6 anos. Destes, tiveram que ser excluídos 17, por não se incluírem nos critérios previamente definidos. A comparação incidiu sobre as 20 crianças restantes.

Estabeleceram-se aleatoriamente 2 grupos. O grupo I (7 crianças) recebeu salbutamol em três doses: 150, 50 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, com intervalos de 20 minutos. O grupo II (13 crianças) recebeu procaterol 30 μg em dose única.

A avaliação clínica (tosse, pieira, cansaço e dispneia) e funcional (FEV_1 e $\text{FEF}_{25-75\%}$) foi realizada antes da medicação, aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a 1.^a nebulização. Foi feito um questionário aos pais para avaliar a evolução dos sintomas à 6.^a hora.

Os doentes foram distribuídos em relação à gravidade da crise de acordo com o FEV_1 — 60 a 80% (ligeira); 40 a 60% (moderada) e < 40% (grave). O carácter aleatório da escolha permitiu apenas comparar o efeito dos dois fármacos nas crises ligeiras e moderadas.

A melhoria funcional tornou-se evidente logo aos 15 minutos, mantendo-se durante as 2 horas do estudo, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois fármacos.

Na avaliação à 6.^a hora, mantinham sintomas 6/6 doentes do grupo I e 8/13 do grupo II.

Efeitos secundários leves (tremores, cefaleias e palpitações) ocorreram em 57% do grupo I e em 38% do grupo II.

A utilização do procaterol solução respiratória em dose única (30 μg) poderá ser uma alternativa a 3 doses de salbutamol (150, 50 e 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) pelo menos nas crises ligeiras e moderadas.

PALAVRAS-CHAVE: Crise de asma. Procaterol. Asma na criança. Aerossol. Nebulização.

SUMMARY

Salbutamol is the most frequently used β_2 agonist world-wide. Emergency Department protocol at Pediatric Hospital of Coimbra prescribes three "cumulative doses" in acute asthma exacerbations. This prospective study compares safety and efficacy between three doses of salbutamol (group I) and one single dose of procaterol (group II) using a respiratory solution delivered by aerosol nebulization.

At the beginning, the study involved 37 children with ages ≥ 6 years, with acute exacerbations of bronchial asthma. After the study we excluded 17 patients because they didn't meet the inclusion criteria. We compared the efficacy of these drugs in the remaining 20 children.

The clinical evaluation (cough, wheezing and dyspnea) and functional (FEV_1 and $\text{FEF}_{25-75\%}$) was made before medication and 15, 30, 60 and 120 minutes after the first nebulization.

The distribution in group I or II was aleatory, and we compared patients with mild (FEV_1 60-80%) or moderate (FEV_1 40-60%) symptoms.

Clinical improvement and a positive change in spirometric values (FEV_1 and $\text{FEF}_{25-75\%}$) were observed

* 1. Interno de Pediatria H. Pediátrico Coimbra
2. Assistente Hospitalar de Pediatria HD Viseu
3. Interna de Imuno-Alergologia dos HUC
4. Assistente Hospitalar Graduado de Pediatria HPC

15 minutes after nebulization, persisting two hours without significant differences in both groups. Six hour later, mild asthmatic symptoms persisted in 6/6 patients in group I and 8/13 in group II. Mild adverse effects (tremor, headaches, dizziness and palpitations) were reported in 57% in group I and 38% in group II.

We conclude that a single dose (30 μ g) of procaterol respiratory solution may be a safe and efficient alternative to three "cumulative doses" of salbutamol. This practice may simplify the treatment of children older than six years with mild or moderate exacerbations of bronchial asthma, at the Pediatric Emergency Department.

KEY WORDS: Acute asthma: Procaterol, Aerosol. Asthma in Children.

INTRODUÇÃO

Nos Serviços de Pediatria, as agudizações de asma brônquica são causa frequente de atendimento nos Departamentos de Urgência. São também responsáveis por grande número de internamentos de curta duração. Esta grande morbilidade requer um consumo importante de tempo por parte dos profissionais de saúde, com custos acrescidos em material técnico e humano¹. A tendência terapêutica nos últimos anos privilegia a auto-medicação no domicílio com recurso aos β -miméticos inalados¹. Porém, nem sempre a criança ou os familiares são correctamente instruídos para praticarem essas técnicas. Recorrem assim aos Serviços de Urgência dos Hospitais, onde a actuação primeira na maioria dos casos permanece a mesma - β -miméticos por via inalatória.

Em qualquer das circunstâncias — domicílio ou hospital — procura-se um efeito broncodilatador duradouro, bem como esquemas terapêuticos simples, seguros e eficazes.

Entre os β -miméticos mais usados actualmente, encontram-se o salbutamol, a terbutalina e o procaterol. O protocolo até agora em vigor no Hospital Pediátrico de Coimbra propõe 3 doses da solução respiratória de salbutamol a 0,5% espaçadas de 20 minutos até um máximo de 5 mg. O salbutamol em solução respiratória tem sido largamente utilizado na crise de asma em muitos centros como medicação de primeira linha².

O procaterol é um agonista β_2 - selectivo que demonstrou possuir menor efeito cardioestimulante e maior duração de ação do que o salbutamol, sem induzir tolerância^{3,4}.

A utilização de procaterol na forma oral tem sido defendida por muitos autores^{4,5,6,7}, contudo são ainda reduzidos os estudos que apoiam a utilização da solução respiratória, em nebulização, na crise de asma na criança⁸.

Foi objectivo do presente estudo comparar a eficácia de três doses de salbutamol (doses "cumulativas") com uma dose única de procaterol, em nebulização, e avaliar os efeitos adversos de ambos os fármacos.

METODOLOGIA

Realizou-se um estudo prospectivo durante um período de 3 meses (Set/93 - Nov/93) em doentes asmáticos, com idade superior a 6 anos, que recorreram ao Serviço de Urgência ou à Consulta de Alergologia com crise de asma (pieira, dispneia, tosse) e padrão obstrutivo no estudo funcional respiratório: volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV_1) $\leq 80\%$ e/ou fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da capacidade vital ($FEF_{25-75\%}$) $\leq 70\%$ ^{9,10}.

Classificou-se a gravidade da crise de acordo com o padrão obstrutivo, obtido pelo valor de FEV_1 — ligeira (60-80%), moderada (40-60%), e grave (< 40%).

Foram estabelecidos aleatoriamente 2 grupos. Grupo I - doentes que realizaram terapêutica com salbutamol segundo protocolo ainda em vigor no Serviço de Urgência do Hospital Pediátrico (1.^a dose de 150 μ g/Kg; 2.^a e 3.^a doses de 50 μ g/Kg, com intervalos de 20 minutos, até um máximo de 5 mg). Grupo II - doentes que realizaram terapêutica com procaterol (30 μ g/dose) a qual era repetida 60 minutos depois, sempre que a clínica o justificasse. Ambos os fármacos foram administrados por via inalatória, utilizando a respectiva solução respiratória, diluída em 2 ml de soro fisiológico, em nebulização com 6 e 8 litros de O_2 /min, respectivamente. Usou-se um nebulizador Mini Neb Inspiron® com máscara de aerosol.

Realizou-se uma avaliação clínica (tosse, pieira, dispneia, cansaço, cianose, frequência cardíaca, frequência respiratória) e funcional (FEV_1 , $FEF_{25-75\%}$), antes e aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a nebulização de procaterol, ou a 1.^a nebulização de salbutamol. Utilizou-se uma escala de gravidade para os parâmetros clínicos (++ grave, + moderada, ± ligeira, - ausente). A frequência cardíaca (FC) e a frequência respiratória (FR) foram avaliados pelo médico, por observação e contagem durante 60 segundos. Os parâmetros espirométricos foram obtidos por *Vitalograph compact* utilizando as tabelas de Polgar (Fig. 1). Foi considerado como melhoria funcional, um aumento significativo na percentagem de variação (Change) do $FEV_1 \geq 15\%$ e do $FEF_{25-75\%} \geq 25\%$ ^{3,4}.

Os efeitos secundários foram avaliados durante 2 horas pelo médico, registando as queixas do doente.

Não foram administrados outros medicamentos, nomeadamente corticóides orais, até à 6.^a hora após a nebulização, para não alterar os resultados, excepto nos casos em que pelo reaparecimento dos sintomas tal se justificou.

Fig. 1 - Ficha de colheita de dados

NOME _____ N.º PROCESSO _____

DATA DE NASCIMENTO ____ / ____ / ____

Data de Observação ____ / ____ / ____

Residência: _____

Início da crise há ____ horas

Origem: Serviço de Urgência _____ Consulta de Alergologia _____

Medicamentos Utilizados (últimas 12 horas)

Broncodilatadores _____ Corticoides _____

Tratamento de Fundo _____

Medicamento Utilizado: Salbutamol (3 nebulizações com intervalo de 20 minutos)

Procaterol (1 nebulização)

	0 min (pré)	15 min (pós)	30 min	60 min	120 min
Tosse*					
Pieira*					
Dispneia*					
Cansaço*					
Tiragem*					
Cianose*					
Insuflação*					
FR					
FC					
Peak Flow M					
P.E.F. (vitalog)					
FVC					
FEV1					
FEV1 / FVC					
FEF 25-75%					
Efeitos 2 ^{os}					
Cefaleias					
Tremores					
Palpitações					
Opinião do Doente #					

* Grave ++, Moderado +, Ligeiro ±, Ausente -.

Muito Melhor ++, Melhor +, Ligeiramente melhor ±, Inalterado 0, Agravado -.

Pedi-se aos doentes ou aos pais o preenchimento de um questionário onde era especificada a hora do reaparecimento dos sintomas até à 6.^a hora após a nebulização e a necessidade de administrar outros medicamentos (Fig. 2).

Fig. 2 - Questionário para o domicílio, respondido pelos pais.

Avaliação até à 6.^a hora após a nebulização

1 - Mantém alguns Sintomas? Sim? _____

Que sintomas mantém?

Pieira? _____ Falta de ar? _____ Tosse? _____

Não? _____ A que horas desapareceram? _____

3 - Que outros medicamentos tomou depois de vir ao hospital?

(Por exemplo Ventilan, Onsudil, Bricanyl, Medrol, etc.)

Diga se foi xarope, inalador, rotacaps, turbo ou comprimidos)

Diga quantas vezes foi necessário e a que horas.

Avaliaram-se os 2 grupos em relação à idade, sexo, duração e gravidade da crise e medicação nas 12 horas prévias ao ensaio. Compararam-se os resultados da clínica, dos parâmetros funcionais (dados colhidos pelo médico) e efeito à 6.^a hora (análise dos questionários).

Foram excluídos os doentes cuja avaliação funcional não apresentava padrão obstrutivo, isto é, $FEV_1 > 80\%$ ($n=7$), os que apresentavam pieira "crónica" ($n=3$) e os que não colaboraram na realização da espirometria. As crianças com crises graves ($FEV_1 < 40\%$) receberam, aleatoriamente, Salbutamol ($n=5$) e Procaterol (apenas 1). Por isso a comparação entre os 2 grupos com crise não foi possível, sendo excluídos 6 doentes do estudo comparativo. Excluíram-se ainda os doentes que tiveram necessidade de realizar 2.^a dose de Procaterol ($n=1$), dado que não se incluíam nos objectivos do estudo.

Os resultados foram analisados pelo teste exacto de Fisher e pelo X^2 (resultados clínicos), teste t de Student não emparelhado para comparação de médias e teste t de Student emparelhado para comparação de médias (provas funcionais, FC e FR). Considerámos haver diferença estatisticamente significativa quando $p<0.05$.

RESULTADOS

Os 20 doentes seleccionados tinham idades compreendidas entre 6 e 17 anos, pertencendo 7 ao grupo I (Salbutamol) e 13 ao grupo II (Procaterol). As características dos doentes em relação à idade, sexo, proveniência, medicação nas 12 horas prévias e duração da crise estão referenciadas na tabela I, sendo os dois grupos semelhantes.

	Grupo I (Salbutamol) n = 7	Grupo II (Procaterol) n = 13
Idade média	10,7	10,6
Sexo (M/F)	3/4	8/5
Proveniência		
Serv. Urgência	3	9
Cons. Alergologia	4	4
Medicação nas 12 horas prévias		
β - mimético	5	8
Corticóide oral	1	0
Ausência de medicação	1	5
Duração da crise		
< 3 horas	0	1
3-24 horas	3	6
> 24 horas	4	6

Tabela I - As características de ambos os grupos eram semelhantes. Sem diferenças estatisticamente significativas - teste de Fisher.

Onze doentes apresentavam crise de asma ligeira (3 no grupo I e 8 no grupo II) e 9 apresentavam crise moderada (4 no grupo I e 5 no grupo II) - tabela 2.

Gravidade da crise (% de FEV_1)	Grupo I (Salbutamol) n=7	Grupo II (Procaterol) n=13
Ligeira: 60-80	3	8
Moderadas: 40-60	4	5

Tabela 2 - A distribuição dos doentes por gravidade da crise foi semelhante.

Sem diferenças estatisticamente significativas - teste de Fisher.

Nota: nas crises graves ($FEV_1 < 40\%$) os grupos não eram comparáveis (5 crianças no Grupo I e 1 no Grupo II).

Verificou-se uma melhoria progressiva dos sintomas analisados (dispneia, tosse, pieira e cansaço), em ambos os grupos, constatada logo na 1.^a avaliação aos 15 minutos (Quadro 1 e 2).

Quadro 1 - Avaliação clínica do grupo I (Salbutamol) traduzindo uma melhoria da tosse, pieira, dispneia e cansaço.
A melhoria foi significativa logo a partir dos 15 minutos (teste de Fisher $p < 0.05$).

n = 7	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Tosse	++	0	0	0	0
	+	5	3	2	2
	±	2	3	4	2
	-	0	1	1	3
Pieira	++	1	1	0	0
	+	3	1	1	0
	±	3	4	3	3
	-	0	1	3	4
Dispneia	++	0	0	0	0
	+	4	2	0	0
	±	3	4	3	1
	-	0	1	3	6
Cansaço	++	0	0	0	0
	+	2	2	0	0
	±	5	2	3	1
	-	0	3	4	6

Grave ++, Moderado +, Ligeiro ±, Ausente -

Quadro 2 - Avaliação clínica do grupo II (Procatérol) traduzindo uma melhoria da tosse, pieira, dispneia e cansaço.
A melhoria foi significativa logo a partir dos 15 minutos (teste de Fisher $p < 0.05$).

n = 13	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Tosse	++	1	0	0	0
	+	7	5	4	3
	±	5	6	7	6
	-	0	2	2	4
Pieira	++	4	1	0	0
	+	5	4	3	1
	±	4	7	7	10
	-	0	1	2	2
Dispneia	++	3	1	1	0
	+	7	3	1	3
	±	3	7	6	4
	-	0	2	5	9
Cansaço	++	2	0	0	0
	+	3	4	3	1
	±	8	7	5	6
	-	0	2	5	6

Grave ++, Moderado +, Ligeiro ±, Ausente -

Houve um efeito broncodilatador com ambos os medicamentos, comprovando a eficácia de cada um deles isoladamente (figuras 3, 4, 6 e tabela 3).

Evolução do FEV₁ — com o Salbutamol (Média global)

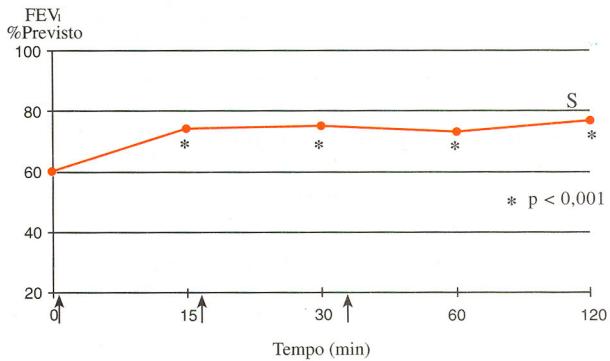


Fig. 3 - Avaliação do efeito broncodilatador de 3 doses (↑) de Salbutamol (S) avaliada pela percentagem do valor previsto de FEV₁. Diferença com significado estatístico ($p < 0,001$) teste t Student não emparelhado para comparação de médias.

Evolução do FEV₁ — com o Procatérol (Média global)

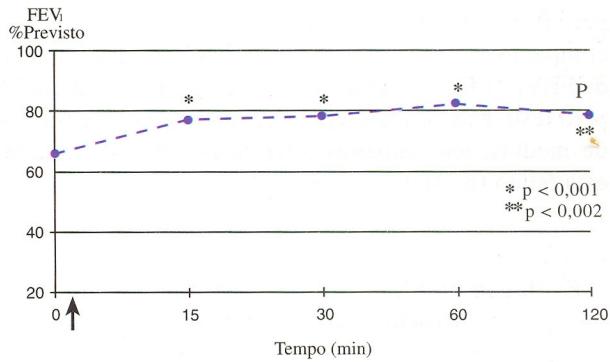


Fig. 4 - Avaliação do efeito broncodilatador de 1 dose (↑) de Procatérol (P) avaliada pela percentagem do valor previsto de FEV₁. Diferença com significado estatístico ($p < 0,001$ e $p < 0,002$) teste t Student não emparelhado para comparação de médias.

(M ± S.D.)	Grupo	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
FEV ₁	(I) Salbutamol	0	23 ± 7	25 ± 14	24 ± 20	34 ± 14
	(II) Procatérol	0	18,5 ± 3,5	22 ± 16	27 ± 17	22 ± 18
FEV _{25-75%}	(I) Salbutamol	0	43 ± 18	45 ± 29	41 ± 35	50 ± 24
	(II) Procatérol	0	33 ± 8	44 ± 27	43 ± 31	36 ± 28

Tabela 3 - Médias (M) e Desvio Padrão (S.D.) da percentagem de melhoria para o FEV₁ e FEF_{25-75%}, nos Grupos I e II.

Evolução do FEV₁ — percentagem de melhoria com o Salbutamol e com o Procaterol (Média global)

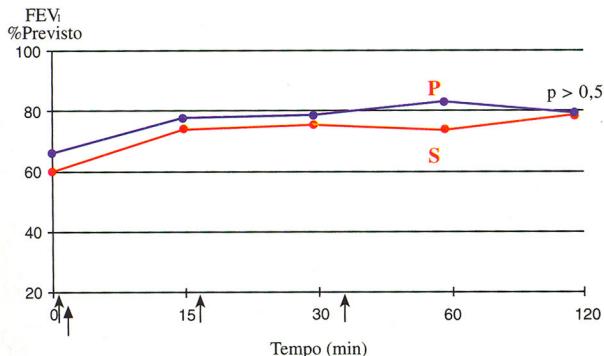


Fig. 6 - Comparação da eficácia entre 1 dose (↑) de Procaterol (P) e 3 doses (↑) de Salbutamol (S), avaliada pela percentagem de melhoria (change) do FEV₁. Sem diferença com significado estatístico ($p > 0,3$) teste t Student.

A evolução dos valores do FEV₁ avaliada pela percentagem do valor previsto (fig. 5) e de melhoria (fig. 6), mostrou aumento $\geq 15\%$, em todos os doentes, logo aos 15 minutos, que se manteve até à 2.^a hora.

A evolução do FEV_{25-75%} avaliada ela percentagem do valor previsto (fig. 7) e de melhoria (fig. 8), mostrou um aumento $\geq 25\%$, em todos os doentes, logo aos 15 minutos mantendo-se até à 2.^a hora.

Apesar de terem restado apenas 20 crianças permitindo comparação entre os 2 grupos, a análise comparativa das médias e desvio padrão, dos valores de FEV₁ e FEF_{25-75%} entre o grupo I e grupo II (tabela 3) pelo teste t de Student emparelhado para comparação de médias, não mostrou diferenças com significado estatístico ($p > 0,07$).

Evolução do FEV₁ com o Salbutamol e com o Procaterol (Média global)

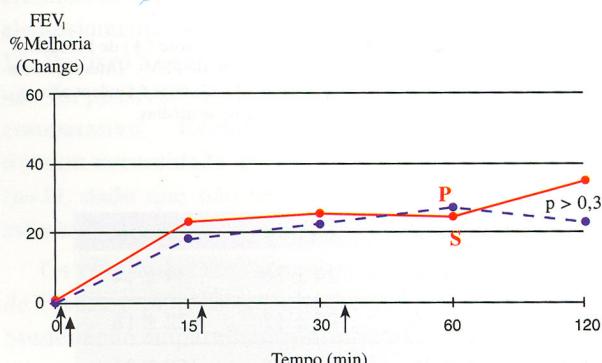


Fig. 5 - Comparação da eficácia entre 1 dose (↑) de Procaterol (P) e 3 doses (↑) de Salbutamol (S), avaliada pela percentagem do valor previsto de FEV₁. Sem diferença com significado estatístico ($p > 0,5$) teste t Student.

Evolução do FEV_{25-75%} com o Salbutamol e com o Procaterol (Média global)

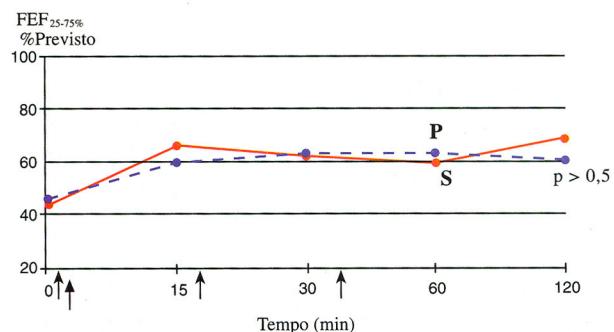


Fig. 7 - Comparação da eficácia entre 1 dose (↑) de Procaterol (P) e 3 doses (↑) de Salbutamol (S), avaliada pela percentagem do valor previsto de FEV_{25-75%}. Sem diferença com significado estatístico ($p > 0,5$) teste t Student.

Evolução do FEV_{25-75%} — percentagem de melhoria com o Salbutamol e com o Procaterol (Média global)

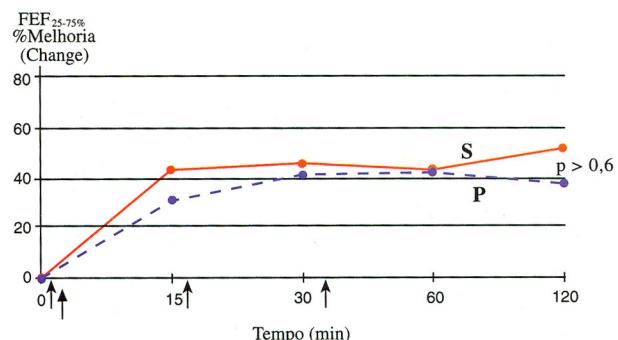


Fig. 8 - Comparação da eficácia entre 1 dose (↑) de Procaterol (P) e 3 doses (↑) de Salbutamol (S), avaliada pela percentagem de melhoria (change) do FEV_{25-75%}. Sem diferença com significado estatístico ($p > 0,6$) teste t Student.

Obtivemos 18 respostas (90%) aos questionários enviados, sendo 6 do grupo I e 12 do grupo II (tabela 4). No grupo do salbutamol, todos os doentes apresentaram sintomas, enquanto que no grupo do procaterol houve 4 crianças que se mantiveram assintomáticas, até à 6.^a hora.

Avaliação até à 6. ^a hora - questionário		
Mantém...	Grupo I (Salbutamol) n=6	Grupo II (Procaterol) n=12
Dispneia	3	4
Pieira	5	4
Tosse	6	6
Sem sintomas	0	4

Tabela 4 - Persistência de sintomas até à 6.^a hora.

Sem diferenças estatisticamente significativas ($p>0,07$) - teste de Fisher.

Os efeitos secundários foram ligeiros em todas as crianças, não tendo justificado a interrupção da terapêutica. Verificaram-se sobretudo tremores e cefaleias, com menor incidência no grupo do procaterol - Tabela 5.

A análise estatística entre os dois grupos não revelou diferenças significativas no respeitante às suas características, à gravidade da crise, aos valores espirométricos (FEV_1 e $FEF_{25-75\%}$), à sintomatologia à 6.^a hora e aos efeitos secundários.

Avaliação dos efeitos secundários		
	Grupo I (Salbutamol) n=7	Grupo II (Procaterol) n=13
Tremores	2	1
Palpitações	0	0
Cefaleias	1	2
Tonturas	1	0
Dor torácica	0	1
Dor abdominal	0	1
Sem efeitos secundários	3 (43%)	8 (62%)

Tabela 5 - Avaliação dos efeitos secundários.

Sem diferenças com significado estatístico ($p>0,1$) - teste de Fisher.

DISCUSSÃO

No estudo prospectivo realizado, que englobou 20 crianças em crise aguda de asma, utilizou-se aleatoriamente a solução respiratória de procaterol ou de salbutamol em aerosol. Verificámos uma eficácia semelhante de ambas as drogas em crises ligeiras e moderadas. Esta eficácia foi sobreponível com uma só dose de procaterol *versus* 3 doses de salbutamol, mantendo-se até à 6.^a hora em ambos os grupos.

A melhoria clínica ocorreu aos 15 minutos e objectivamente persistiu até à 2.^a hora, o mesmo acontecendo com os parâmetros espirométricos, em qualquer dos grupos. A melhoria funcional verificou-se por um aumento significativo na percentagem de variação (Change) do $FEV_1 \geq 15\%$ e do $FEF_{25-75\%} \geq 25\%$, em cada um dos doentes^{3,4}.

A avaliação até à 6.^a hora mostrou que se mantinham assintomáticos 4/12 crianças do grupo do procaterol, enquanto que no grupo do salbutamol todos 6/6 referiram sintomas. Estas diferenças porém não foram estatisticamente significativas.

Os efeitos secundários foram ligeiros em todas as crianças, mas atingiram 57% no grupo do Salbutamol e apenas 38% no grupo do Procaterol.

Neste estudo não foi possível comparar o efeito do procaterol nas obstruções mais graves ($FEV_1 < 40\%$) por escassez da amostra. Seria interessante avaliar a sua eficácia nestas situações, assim como a utilização de doses mais elevadas e/ou repetidas de procaterol, comparando-as com o salbutamol. Teria também

interesse objectivar parâmetros tardios no domicílio, por exemplo recorrendo ao DEMI (Peak Flow Meter).

O procaterol poderá ser eficaz e sem efeitos secundários significativos, mesmo em crianças com idades entre os 3 e 6 anos, como foi demonstrado por Ferres e col.¹¹, apesar de neste grupo etário não ser possível a avaliação pela espirometria.

A dose de 30 μ g por nebulização utilizada no nosso estudo, mostrou-se eficaz e segura. Contudo a inexistência de uma dosagem em função do peso da criança constitui ainda uma lacuna em terapêutica pediátrica.

Podemos concluir deste estudo que na posologia utilizada, uma dose única de procaterol poderá ser uma alternativa cómoda, eficaz e segura às 3 doses de Salbutamol, habitualmente utilizadas, pelo menos em crises leves e moderadas de asma na criança, uma vez que os dois medicamentos mostraram eficácia semelhante.

BIBLIOGRAFIA

1. Laurie Smith. Childhood Asthma: Diagnosis and Treatment. *Curr Probl Pediatr* 1993; 23:272-305.
2. Colin FR, Smith, Beck R, Levinson H. Response to frequent low doses of nebulized salbutamol in acute asthma. *J Pediatrics* 1985; 106 (4): 672-74.
3. Mazza JA, Tashkin DP, Reed CE. Evaluation of procaterol and albuterol (salbutamol) aerosol in the treatment of asthma. *Annals of Allergy* 1992; 68:267-273.
4. Petty TL, Brandon ML, Busse WW, Chervinsky P, Schoenwetter W et al. A comparison of oral procaterol and albuterol in reversible airflow obstruction. *Am Rev Resp Dis* 1988; 138: 1504-1509.
5. Crowe MJ, Counihan HE, O'Malley K. A comparative study of a new selective β_2 - adrenoceptor agonist, procaterol and salbutamol in asthma. *Br J Clin Pharmac.* 1985; 19:787-791.
6. Tinkelman DG, DeJong R, Lutz C, Spangler DL. Evaluation of tremor and efficacy of procaterol in adult patients with asthma. *J. Allergy Clin Immunol* 1990; 85 (4): 719-728.
7. Zanetti CL, Rotman HH, Dresdner AJ. Efficacy and duration of action of procaterol a new bronchodilator. *J Clin Pharmacol* 1982; 22:250-253.
8. Arai Y, Maeda K, Mukoyama T, Iikura Y, Arita M et al. Multicenter study of procaterol inhalation solution in child asthmatics. *Progress in Medicine* 1985; 5(11): 3025-3037.
9. Stempel DA, Szeffler SJ, et al. Asthma. *Pediatr Clin North Am* 1992; 39 (6): 1243 - 58.
10. Pfaff JK, Morgan WJ. Pulmonary function in infants and children. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41(2): 401-423.
11. Ferres J, Llacer MA, Solis MJ, Moran E, Salmeron M et col: Comparative study of salbutamol versus procaterol in the treatment of acute bronchospasm in children. *Cur Therapeutic Research* 1993; 53(2): 215-21.

Agradecimento à Eng^a Margarida Viegas (Assessora de Informática da Faculdade de Economia de Coimbra) pela orientação na avaliação dos cálculos estatísticos.

Correspondência

José António Pinheiro
Serviço de Alergologia
Hospital Pediátrico
3000 COIMBRA

Exposição a Alergénios dos Ácaros em Doentes com Alergia Respiratória aos Ácaros do Pó da Casa

JOSÉ LUÍS PLÁCIDO*, JP MOREIRA DA SILVA**, MÁRIO MIRANDA*, CARLOS CUESTA**, PILAR VENTAS*, MARIANELA VAZ***

RESUMO

Neste trabalho quantificamos os níveis de *Der p I*, *Der f I*, *Der II* e *Lep d I* (anticorpos monoclonais específicos, Abelló SA) nas amostras de pó das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa e estudámos a sua relação com a sensibilização aos ácaros, avaliada por testes cutâneos "prick" (TCP) e IgE sérica específica (slgE). Incluímos 15 doentes (20 ± 12 anos) exclusivamente sensibilizados ao *D. pteronyssinus* (*Dp*) e/ou *farinae*, comparativamente a um grupo controle constituído por 14 doentes não atópicos (27 ± 15 anos), todos portadores de asma e/ou rinite. Todas as 29 amostras continham níveis detectáveis de *Der p I* e *Der II*, verificando-se uma correlação estatisticamente significativa entre os dois alergénios ($r_s = 0,82$ $p < 0,001$), enquanto *Der f I* e *Lep d I* eram indetectáveis em 7 e 38% das amostras respectivamente. Os doentes sensibilizados aos ácaros apresentavam relativamente ao grupo controle uma exposição significativamente mais elevada ao *Der p I* ($14,5$ vs $8,0 \mu\text{g/g}$, $p = 0,03$), *Der II* ($7,1$ vs $3,5 \mu\text{g/g}$, $p = 0,02$) e *Lep d I* ($0,14$ vs $0,08 \mu\text{g/g}$, $p = 0,02$). Níveis de *Der p I* $> 2 \mu\text{g/g}$ (risco de sensibilização) e $> 10 \mu\text{g/g}$ (risco de crises de asma) estavam presentes respectivamente em 100 e 60% das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros. Observamos uma correlação estatisticamente significativa entre a

exposição ao *Der p I* e a sensibilização ao *Dp*, avaliada pela área da pápula obtida nos TCP ($r_s = 0,62$ $p = 0,03$) e pelos níveis de slgE ($r_s = 0,54$ $p = 0,04$). Os nossos resultados vêm reforçar a importância das medidas de evicção aos ácaros na doença alérgica respiratória, com o objectivo de prevenir a sensibilização entre os indivíduos genéticamente predispostos e um melhor controle da doença nos que já se encontram sensibilizados.

PALAVRA-CHAVE: Ácaros do pó da casa, níveis de alergénios, exposição, sensibilização.

SUMMARY

We quantified *Der p I*, *Der f I*, *Der II* and *Lep d I* levels (specific monoclonal antibodies) in house dust samples of asthmatic and/or rhinitic patients, comparing 15 patients exclusively sensitized to *D. pteronyssinus* (*Dp*) and/or *farinae* (mean age 20 ± 12) to 14 non-atopic patients (27 ± 15 years). We also studied the relationship between exposure to these allergens and sensitization to mites, defined by skin "prick" tests ($\geq 7 \text{ mm}^2$) and RAST ($\geq \text{class 2}$). *Der p I* and *Der II* were present in detectable levels in all the 29 dust samples and a significant correlation was found between these two allergens ($r_s = 0.82$ $p < 0.001$). *Der f I* and *Lep d I* were undetectable in 7 and 38% of the samples and were always present in concentrations under $2 \mu\text{g/g}$ of dust. Patients sensitized to dust mites were exposed to significantly higher levels of *Der p I* (14.5 vs $8.0 \mu\text{g/g}$, $p = 0.04$), *Der II* (7.1 vs $3.5 \mu\text{g/g}$, $p = 0.02$) and *Lep d I* (0.14 vs $0.08 \mu\text{g/g}$, $p = 0.02$) than patients from the control group. *Der p I* values $> 10 \mu\text{g/g}$ of dust (regarded as increased risk for acute asthma) were present respectively in 60% and 29% of the house dust samples from mite atopic and non-atopic patients. Levels of *Der p I* $> 2 \mu\text{g/g}$ (under the risk of sensitization) were detected in 36% of the samples from non-atopic patients and in none of the

* Interno Complementar de Imunoalergologia.

** Assistente Hospitalar de Imunoalergologia.

• Alergia e Inmunología, Abelló, SA, Madrid. Espanha.

*** Chefe de serviço de Imunoalergologia.

Directora da Unidade de Imunoalergologia. H. S. João. Porto

Este trabalho foi galardoado com o prémio atribuído às melhores comunicações apresentadas no XVI Congresso Europeu de Alergologia e Imunologia Clínica, Madrid, Junho de 1995. Encontra-se publicado em resumo no Allergy 1995; 50 (Suppl 26): 22-23.

Entregue para publicação em 4.9.95

sensitized patients. We also observed a significant correlation between the magnitude of exposure to Der p I with the degree of sensitization to Dp, assessed both by the wheal area at skin testing ($r_s=0.62$ $p=0.03$) and by the level of serum specific IgE ($r_s=0.54$ $p=0.04$). Our results reinforce the capital importance of mite avoidance measures in the management of allergic diseases, both to prevent sensitization among the genetically susceptible persons and the clinical exacerbations in mite allergic patients.

KEY-WOROS: House dust mites, mite allergen levels, exposure, sensitization.

INTRODUÇÃO

Os ácaros do género *Dermatophagoides* são desde há muito reconhecidos como a principal fonte de alergénios domésticos^{1,2}, representando em todo o mundo, uma importante causa de sensibilização e de doença alérgica³.

A quantificação dos seus alergénios por imunoensaios e anticorpos monoclonais, técnica largamente utilizada dada a sua reproductibilidade, elevada sensibilidade e especificidade⁴, veio abrir novas perspectivas no estudo do ambiente doméstico e modificou radicalmente o nosso conhecimento sobre o papel dos alergénios na doença alérgica respiratória. Estudos realizados em diversos países, vieram definir índices de exposição aos alergénios do Grupo I do *Dermatophagoides*, relacionados quer com o risco de sensibilização em indivíduos genéticamente predispostos ($>2\mu\text{g/g}$ de pó), quer com o de crises de asma ($>10\mu\text{g/g}$ de pó) nos doentes já sensibilizados^{3,5}. A exposição alérgica crónica é também reconhecida como uma importante causa de inflamação e de hiperreactividade brônquica, verificando-se que a redução prolongada desta exposição diminui os sintomas de asma e a hiperreactividade brônquica inespecífica^{6,8}.

Parece evidente que a prevalência das doenças alérgicas e em particular da asma brônquica tem vindo a aumentar de uma forma constante em diversos países^{9,12}. Apesar das razões não se encontrarem ainda totalmente esclarecidas^{13,14}, alguns autores têm sugerido que a exposição cada vez mais intensa e prolongada a alergénios domésticos poderia ser um dos principais factores envolvidos¹⁵. Esta situação resultaria sobretudo das modificações introduzidas no ambiente doméstico e do estilo de vida das populações, com a criação de um microclima favorável ao aumento da densidade alérgénica¹⁶⁻²⁰.

Estes aspectos têm despertado o interesse de numerosos investigadores no estudo da exposição aos alergénios dos ácaros em diferentes áreas geográficas e nos factores ambientais que são determinantes para o crescimento da sua população.

Neste trabalho fomos determinar os níveis de alergénios dos ácaros *Dermatophagoides* (*Der p I*, *Der f I*, *Der II*) e *Lepidoglyphus destructor* (*Lep d I*) presentes no pó das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa e estudamos a sua relação com o grau de sensibilização aos ácaros, avaliada por testes cutâneos "prick" e doseamento da IgE sérica específica.

DOENTES E MÉTODOS

a) Doentes

Neste estudo foram incluídos 15 doentes com asma e/ou rinite peranuais (9 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com idade média de 20 ± 12 anos), exclusivamente sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e/ou *farinae* (Df).

Como critério de sensibilização consideramos a obtenção de uma pápula com área $> 7\text{mm}^2$ nos testes cutâneos "prick" e uma IgE sérica específica para Dp e/ou Df $\geq 0,70$ HRU/ml (Hamlet, Alergia e Inmunología Abelló SA), equivalente a um RAST de classe igual ou superior a 2. Nos testes cutâneos uma bateria de alergénicos comuns biologicamente estandardizada à qual associamos um extracto de *Lepidoglyphus destructor* (Ld), sendo os extractos de Dp, Df e Ld doseados a 100 BU/ml (Alergia e Inmunología Abelló, SA).

Como grupo controle, incluimos 14 doentes não atópicos (10 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, com idade média de 27 ± 15 anos) também portadores de asma e/ou rinite.

Todos os 29 doentes incluídos neste estudo habitam na cidade do Porto ou na sua periferia. Esta cidade caracteriza-se por um clima temperado e húmido, com uma temperatura anual média de 14°C , elevada pluviosidade (1200 mm/ano) e uma humidade relativa anual média de 79% (os dados são relativos a 1992, ano em que decorreu este estudo e foram fornecidos pelo Observatório Meteriológico da Serra do Pilar, Vila Nova de Gaia).

b) Recolha das amostras de pó

A recolha do pó das habitações foi efectuada pelos próprios doentes durante o mês de Abril de 1992, de acordo com instruções verbais e escritas. Utilizaram os seus aspiradores (cuja potência variava entre os 1000 e 1200 W segundo as informações técnicas fornecidas nos aparelhos) providos de um novo saco de papel para recolha do pó aspirado. As amostras foram recolhidas do quarto do doente e sala de estar, aspirando durante 2min/ m^2 o colchão, alcatifas, tapetes e sofás. Terminado o processo de colheita, cada saco de papel contendo as amostras de pó foi retirado do aspirador e guardado dentro de uma bolsa de plástico, hermeticamente fechada e armazenada à temperatura de -20°C até ao seu processamento.

c) Preparação das amostras de pó e determinação dos níveis de alergénios

Foi efectuada a filtragem das amostras através de uma malha com orifícios de 300 μm para obtenção de poeira fina. Seguidamente procedeu-se à extracção de 3 mg de poeira fina em 20 ml de uma solução tampão salina (15%, p/v) com agitação magnética durante 90 mm a 4°C. Após centrifugação a 12 000 rpm durante 5 mn e filtragem por filtro de 0,45 μm (Milipore Flow Rate, Flow Laboratories, Germany) seguiu-se a realização do imunoensaio.

A determinação dos níveis de *Der p I*, *Der f I* e *Lep d I* foi efectuada por ELISA em fase sólida, utilizando anticorpos monoclonais específicos: Pt1513 para o *Der p I*, Fa1511 para o *Der f I* e Le9E4 para o *Lep d I*, segundo método descrito anteriormente^{21,22}. Os níveis de *Der II* foram quantificados por RIA, utilizando o monoclonal CLB-DpX segundo o método descrito por Heymann e colaboradores²³. As curvas-padrão foram obtidas através da utilização do respectivo alergénio purificado mediante cromatografia e com concentração previamente determinada por RIA, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g/g}$ e com o limiar de detecção a situar-se nos 0,01 $\mu\text{g/g}$.

Os níveis de alergénios foram classificados de acordo com um score proposto por Platts-Mills e colaboradores para os alergénios do Grupo I do *Dermatophagoides*²⁴

e que neste trabalho foi alargada aos restantes alergénios: indetectável ($<0,05$), baixo (0,05 - 0,20), moderado (0,21 - 2,00), elevado (2,01 - 10) e muito elevado ($>10\mu\text{g/g}$).

d) Análise estatística

Os resultados são expressos em mediana, mínimo e máximo. Na comparação dos níveis de alergénios entre os dois grupos utilizamos o teste de Mann-Whitney e no estudo da correlação entre variáveis o teste de Spearman. Foi igualmente utilizado o teste de Qui-quadrado no estudo da diferença de distribuição dos níveis de exposição alergénica relacionados com o risco de sensibilização e crises de asma. Foi considerado com significado estatístico um $p < 0,05$.

RESULTADOS

Todas as 29 amostras continham níveis detectáveis de *Der p I* e *Der II*, verificando-se níveis muito elevados destes dois alergénios respectivamente em 45% e 28% das habitações (Quadro I). Observamos uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de *Der p I* e *Der II* ($n=29$; $r_s=0,82$ $p<0,001$) (Fig. 1). Pelo contrário *Der f I* e *Lep d I*, eram indetectáveis respectivamente em 7 e 38% das amostras e estavam sempre presentes em concentrações inferiores a 2 $\mu\text{g/g}$ de pó (Quadro I).

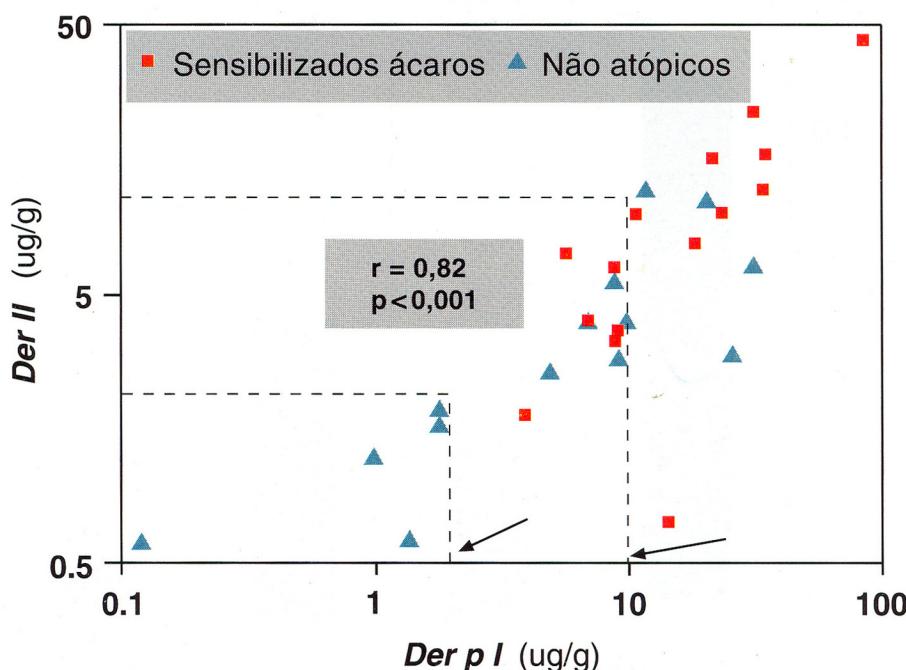


Fig. 1 - Níveis de *Der p I* e *Der II* ($\mu\text{g/g}$) no pó das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros e de doentes não atópicos (grupo controle). Todos os doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa estavam expostos a níveis de *Der p I* $>2\mu\text{g/g}$ de pó (risco de sensibilização), enquanto valores $>10\mu\text{g/g}$ (risco de crises de asma) estavam presentes em 60% das habitações. Verificamos uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de *Der p I* e *Der II* ($r_s=0,82$ $p<0,001$).

	<i>Der p I</i>	<i>Der f I</i>	<i>Der II</i>	<i>Lep d I</i>
<0,05	0	7	0	38
0,05 - 0,20	3	69	3	31
0,21 - 2,00	11	24	28	31
2,01 - 10,00	41	0	41	0
>10	45	0	28	0

Quadro I - Percentagem das 29 amostras com níveis indetectáveis (<0,05), baixos (0,05 - 0,20), moderados (0,21 - 2,00), elevados (2,01) - 10,00) e muito elevados (> 10 μ g/g de pó) dos alergénios *Der p I*, *Der f I*, *Der II* e *Lep d I*.

As amostras de pó provenientes das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros (n=15) apresentavam em relação ao grupo controle (n=14), níveis significativamente mais elevados de *Der p I* (14,5; 3,9 - 88,0 versus 8,0; 0,1 - 32,0 μ g/g: p=0,03), *Der II* (7,8; 0,7 - 49,0 versus 3,0; 0,6 - 12,4 μ g/g: p=0,02 e *Lep d I* (0,14; 0,01 - 1,00 versus 0,08; 0,01 - 1,00 μ g/g: p=0,02) (Fig. 2). Quanto ao *Der f I*, apesar de se encontrar em concentrações mais elevadas nas habitações do doentes sensibilizados, não existiam diferenças estatisticamente significativas em relação aos não atópicos 0,14; 0,05 - 0,4 versus 0,13; 0,01 - 0,9).

Todos os doentes sensibilizados aos ácaros estavam expostos a níveis de *Der p I* >2 μ g/g (risco de sensibilização), enquanto níveis >10 μ g/g (risco de crises de asma) estavam presentes em 60% das habitações (Fig. 1). No grupo controle níveis <2 μ g/g e >10 μ g/g de

pó foram encontrados respectivamente em 36% e 29% das habitações (Fig 1). Assim, o número de doentes que se encontravam expostos a níveis de *Der p I* >2 μ g/g ($\chi^2=11$ p<0,001 e < a 10 μ g/g ($\chi^2=5$ p=0,03) era significativamente diferente entre os doentes sensibilizados e os não atópicos.

Os níveis de *Der p I* a que os doentes sensibilizados aos ácaros se encontravam expostos no interior das suas habitações, correlacionaram-se com o grau de sensibilização ao *D pteronyssinus*, avaliado pela área da pápula (mm²) obtida nos testes cutâneos (n=15; r_s=0,62 p=0,03) (Fig. 3) e pelos níveis de IgE sérica específica (n=15; r_s=0,54 p=0,04) (Fig. 4).

DISCUSSÃO

Estudos realizados em diversas regiões do globo apontam para que a principal fonte de sensibilização ambiental sejam os alergénios domésticos, estando implicados neste processo os alergénios que se encontram em maiores concentrações dentro das habitações¹⁵. Nos últimos anos além dos ácaros do género *Dermatophagoides*, outros alergénios igualmente presentes no pó da casa têm vindo a ser objecto de estudo^{18,25-27}. Os ácaros de armazenamento podem desempenhar um importante papel nesta sensibilização doméstica^{28,29}, uma vez que mesmo em áreas urbanas e com clima temperado a exposição aos

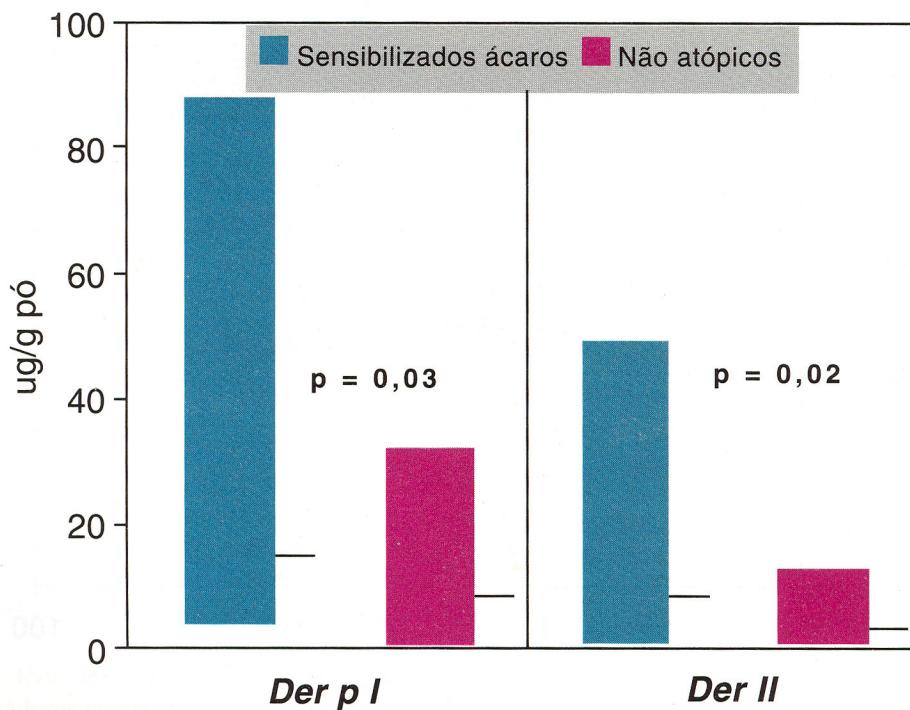


Fig. 2 - Exposição aos alergénios *Der p I* e *Der II* em doentes sensibilizados aos ácaros e não atópicos (grupo controle). Os doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa apresentavam em relação aos doentes do grupo controle, uma exposição significativamente mais elevada aos alergénios *Der p I* (mediana 14,5; 3,9 - 88,0 versus 8,0; 0,1 - 32,0 μ g/g: p=0,03) e *Der II* (7,8; 0,7 - 49,0 versus 3,0; 0,6 - 12,4 μ g/g: p=0,02).

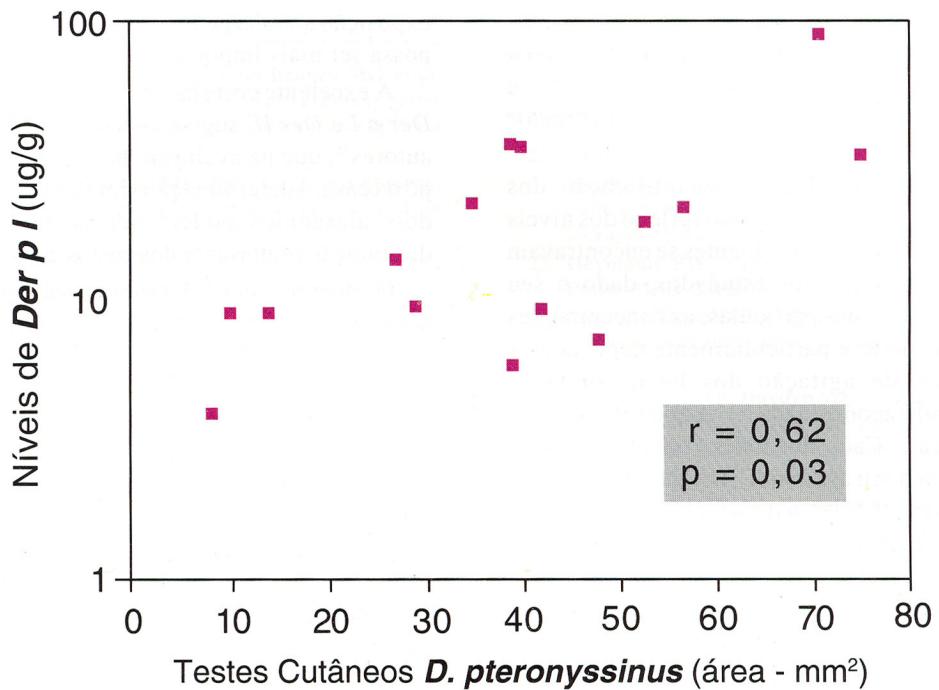


Fig. 3 - Níveis de exposição ao *Der pI* e sensibilização cutânea ao *D. pteronyssinus*. Observamos uma correlação estatisticamente significativa ($r_s=0,62$ $p=0,03$) entre a exposição ao *Der p I* (ug/g) e a área da pápula (mm²) obtida nos testes cutâneos "prick" com um extracto de *D. pteronyssinus* (100 BU/ml; Alergia e Inmunología Abelló SA).

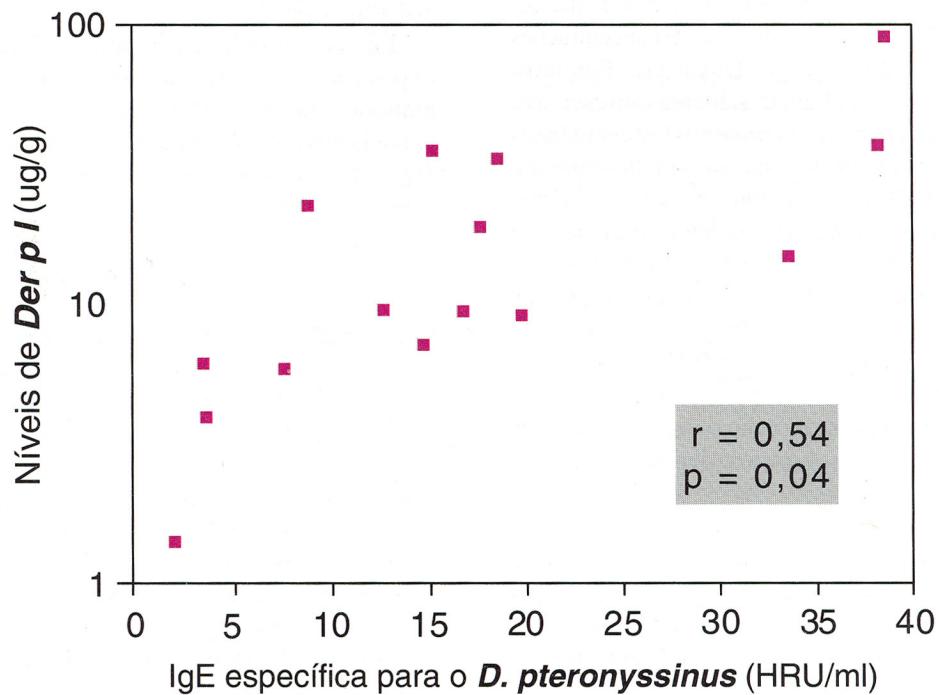


Fig. 4 - Níveis de exposição ao *Der p I* e IgE específica sérica para o *D. pteronyssinus*. Verificamos uma correlação estatisticamente significativa ($r_s=0,54$ $p=0,04$) entre a exposição ao *Der p I* (ug/g) e os níveis da IgE específica para o *D. pteronyssinus* (Hamlet, Alergia e Inmunología Abelló SA).

seus alergénios pode ser relevante^{28,30}. Estes aspectos levaram-nos a incluir neste estudo além dos alergénios dos ácaros *Dermatophagoides* (*Der p I*, *Der f I* e *Der II*), o alergénio major do *Lepidoglyphus destructor* (*Lep d I*).

Neste trabalho utilizamos a quantificação dos alergénios na poeira doméstica como reflexo dos níveis habituais de exposição a que os doentes se encontravam sujeitos. Para os alergénios estudados, dado o seu tamanho e o peso das suas partículas, as concentrações são muito baixas no ar e particularmente dependentes dos movimentos de agitação dos locais onde se depositam³¹, sendo aconselhada a sua quantificação na poeira doméstica⁵. Cada doente procedeu à colheita das amostras com o seu aspirador, método utilizado em trabalhos similares^{18,19,30,32-34}, havendo contudo o cuidado de descrever a maneira como ela foi efectuada, a presença ou ausência de filtros no aspirador, número e local onde foram colhidas as amostras⁵. No nosso estudo a diferença máxima de potência entre os diversos aspiradores utilizados foi de 200W, sendo esta diferença pouco significativa e minimizada pelas unidades em que os alergénios são representados: μ por grama de pó aspirado³¹.

Neste trabalho *Der p I* e *Der II* foram os principais alergénios presentes na poeira doméstica, apresentando concentrações detectáveis em todas as amostras, independentemente de estas serem provenientes das habitações de doentes sensibilizados ou não atópicos. Apresentavam também níveis muito elevados em 45% e 28% das amostras, em oposição ao *Der f I* que foi indetectável em 7% das 29 amostras e com concentrações sempre inferiores a 2 μ g/g de pó (Quadro I). Por outro lado, verificámos que nenhum dos doentes apresentava positividade isolada para o *D. farinae* nos testes cutâneos "prick", enquanto 6/15 doentes estavam simultaneamente sensibilizados ao *D. pteronyssinus* e *farinae*. Estes dados traduzem possivelmente a menor importância do *D. farinae* em relação ao *D. pteronyssinus* no nosso clima temperado e húmido. Já noutras zonas geográficas onde existem invernos prolongados, frios e secos (mais de 3 meses com humidade relativa <60%), esta relação entre as duas espécies de ácaros poderá estar invertida, já que o *D. pteronyssinus* está menos adaptado a manter o balanço hídrico e a sobreviver nestas condições adversas².

O alergénio major do *Lepidoglyphus destructor* (*Lep d I*) foi indetectável em 38% das 29 amostras (Quadro I) e tal como *Der f I* manteve-se sempre em níveis inferiores a 2 μ g/g de pó, apontando para que esta espécie seja pouco frequente no nosso meio urbano. No nosso estudo, a sensibilização a este ácaro foi encontrada em apenas 2 doentes que estavam igualmente sensibilizados ao *D. pteronyssinus* e *farinae*. Contudo, é possível que em ambiente rural a sensibilização e

exposição aos alergénios dos ácaros de armazenamento possa ser mais importante.

A excelente correlação verificada entre os níveis de *Der p I* e *Der II*, sugere tal como proposto por alguns autores³⁵, que na avaliação da exposição aos ácaros do pó da casa, a determinação simultânea dos níveis destes dois alergénios poderá ser dispensável com uma diminuição importante dos custos deste tipo de estudos.

Os doentes sensibilizados aos ácaros apresentavam uma exposição significativamente mais elevada aos alergénios *Der p I*, *Der II* e *Lep d I* que o grupo controle (Fig. 2). Por outro lado, todos os 15 doentes estavam sujeitos a uma exposição ao *Der p I* >2 μ g/g de pó, confirmando que este possa ser de facto o limiar de exposição com risco de sensibilização^{3,5}, enquanto 60% tinham níveis de *Der p I* >10 μ g/g de pó (risco de ataques de asma) no interior das suas habitações (Fig. 1). No grupo controle níveis < 2 e >10 μ g/g de pó foram encontrados respectivamente em 36% e 29% das habitações. Estes resultados estão em acordo com outros estudos^{36,37}, confirmando que os doentes sensibilizados aos ácaros estão sujeitos a uma exposição mais intensa que os não sensibilizados.

Neste trabalho demonstramos que a intensidade da exposição ao alergénio *Der p I*, se correlacionava com o grau de sensibilização ao *D. pteronyssinus*, recorrendo quer a métodos "in vivo" (área da pápula nos testes cutâneos "prick") (Fig. 3), quer a métodos "in vitro" (níveis da IgE sérica específica) (Fig. 4), comprovando a relação existente entre a exposição alergénica e sensibilização³⁸.

Em conclusão, encontrámos elevados níveis de exposição aos alergénios major *Der p I* e *Der II*, embora esta exposição seja significativamente mais elevada nos doentes que estão sensibilizados aos ácaros *Dermatophagoides*, comparativamente aos doentes do grupo controle. Pelo contrário os alergénios *Der f I* e *Lep d I* parecem não ter entre nós a relevância dos outros dois alergénios estudados. Verificamos também que a intensidade da exposição ao *Der p I* está relacionada com o grau de sensibilização ao *D. pteronyssinus*. Estes dados vêm reforçar a importância das medidas de evicção aos ácaros na abordagem das doenças alérgicas respiratórias, com o objectivo de prevenir a sensibilização entre os indivíduos geneticamente predispostos e um melhor controlo da doença nos que já estão sensibilizados. Estudos futuros direcionados para um melhor conhecimento do ambiente doméstico em que vivem os nossos doentes, permitindo que medidas de correcção ambiental possam ser adaptadas a características particulares do nosso meio, poderá ser um factor decisivo na prevenção e controlo da doença alérgica respiratória, contribuindo para a diminuição da sua prevalência, morbilidade e mortalidade.

BIBLIOGRAFIA

1. Azevedo M, Ferraz Oliveira F, Castel-Branco MG et al. Alergia ao pó da casa: correlação entre testes cutâneos, testes de provação nasal, IgE total e IgE específica. *Reumatologia Multidisciplinar* 1985; 16: 35-42.
2. Platts-Mills TAE, Chapman MD. Dust mites: immunology, allergic disease and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 755-75.
3. Platts-Mills TAE, De Weck AL. Dust mite allergens and asthma - a worldwide problem. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 416-27.
4. Chapman MD. Allergen specific monoclonal antibodies: new tools for the management of allergic disease. *Allergy* 1988; 43 (Suppl 5): 7-14.
5. Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1046-60.
6. Vervloet D, Penaud A, Razzouk H, Senft M, Arnaud A, Boutin C, Charpin J. Altitude and house dust mites. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 290-96.
7. Enhert B, Lau-Schadendorf S, Weber A, Buettner P, Schou C, Wahn U. Reducing domestic exposure to dust mite allergens reduces bronchial hypersensitivity in sensitive children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 135-8.
8. Boner AL, Peroni D, Sette L, Valetta EA, Piacentini G. Effects of allergen exposure-avoidance on inflammation in asthmatic children. *Allergy* 1993; 48 (Suppl 17): 119-24.
9. Aberg N. Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 59-63.
10. Robertson CF, Heycock E, Bishop J et al. Prevalence of asthma in Melbourne school children: changes over 26 years. *Br Med J* 1991; 302: 1116-8.
11. Burr L, Limb ES, Andrea S et al. Childhood asthma in four countries: a comparative survey. *Int J Epidemiol* 1994; 23: 341-7.
12. Vicent PM, Rodrigues T, Silva AM, Tzer TS, Barros H. Prevalência de asma em estudantes das escolas secundárias portuguesas. *Arq Med* (em publicação).
13. Burney PGJ. Evidence for an increase in atopic diseases and possible causes. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 484-92.
14. Peat JK. The rising trend in allergic illness: which environmental factors are important? *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 797-800.
15. Platts-Mills TAE, Sporik RB, Chapman MD, Heymann PW. The role of indoor allergens in asthma. *Allergy* 1995; 50 (Suppl 22): 5-22.
16. Feather IH, Warner JA, Holgate ST, Thompson PJ, Stewart GA. Cohabiting with domestic mites. *Thorax* 1993; 48: 5-9.
17. Custovic A, Taggart SCO, Woodcock A. House dust mite and cat allergen in different indoor environments. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 1164-8.
18. Munir AKM, Einarsson R, Kjellman N-IM, Björkstén B. Mite (*Der p I*, *Der f I*) and cat (*Fel d I*) allergens in the homes of babies with a family history of allergy. *Allergy* 1993; 48: 158-63.
19. Lintner TJ, Brame KA. The effects of season climate and air-conditioning on the prevalence of *Dermatophagoides* mite allergens in household dust. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 862-7.
20. Van Strien RT, Verhoeff AP, Brunekreef B, Van Wijnen JH. Mite antigens in house dust: relationship with different housing characteristics in the Netherlands. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 843-53.
21. Ventas P, Lombardero M, Duffort O, Carreira J. Cuantificación de los alergenos *Der p I* and *Der f I* de los ácaros del polvo doméstico Y *Fel d I* de gato mediante un ELISA en fase sólida. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5: 71-5.
22. Ventas P, Carreira J, Polo F. Cuantificación del alergeno mayoritario de *L. destructor* (*Lep d I*) mediante anticuerpos monoclonales. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5 (Suppl 3): 88.
23. Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TAE. Antigenic and structural analysis of group II allergens (*DerfII* and *DerpII*) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 1055-67.
24. Platts-Mills TAE, Hayden ML, Chapman MD, Wilkins SR. Seasonal variation in dust mite and grass-pollen allergens in dust from the houses of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 781-91.
25. Cuesta C, Plácido JL, Miranda M et al. Indoor allergens in patients with respiratory allergy. *Allergy Clin Immunol* 1994; Suppl 2: 194.
26. Plácido JL, Cuesta C, Delgado L, Ventas P, Hernandez D, Vaz M. Cockroach allergy: *Bla g I* and *Bla g II* levels and clinical presentation. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 526.
27. Delgado L, Plácido JL, Cuesta C, Ramos JP, Fleming Torrinha JA. Utilidade da pesquisa "in vitro" de IgE específica para o pó da casa. Relação com a sensibilização a alergénios da Barata. *Cadernos Imuno-alergologia Pediátrica* 1994; 9: 22-6.
28. Spieksma FThM. Domestic mites: Their role in respiratory allergy. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 655-60.
29. Alfarroba E, Casanovas J, Almeida AB. Ácaros da poeira doméstica e alergia respiratória. *Archivos de Bronconeumología* 1993; 29: 73.
30. Echeñecia S, Ventas P, Audicana M, Urrutia I, Gastaminza G, Polo F, Corres LF. Quantitation of major allergens in dust samples from urban populations collected in different seasons in two climatic areas of the Basque region (Spain). *Allergy* 1995; 50: 478-82.
31. Platts-Mills TAE, Chapman MD, Pollart S, Luczynska CM, Ward Jr GW. Specific allergens evoking immune reactions in the lung: relationship to asthma. *Eur Respir J* 1991; 4 (Suppl 13): 68-77.
32. Barber D, Chamorro MJ, Carpizo JA et al. Valoración de la presión alergénica ambiental. Interés de esta determinación en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5: 125-32.
33. Wickman M, Nordvall SL, Pershagen G, Korsgaard J, Johansen N, Sundell J. Mite allergens during 18 months of intervention. *Allergy* 1994; 49: 114-9.
34. Munir AKM, Björkstén B, Einarsson R et al. Mite allergens in relation to home conditions and sensitization of asthmatic children from three climatic regions. *Allergy* 1995; 50: 55-64.
35. Pauli G, de Blay F, Stenger R, Verot A, Ott M. Group I and Group II mite antigen levels in the house dust of mite-allergic patients and control subjects. *Allergy* 1993; 48 (16): 107.
36. Verhoeff AP, Van Strien RT, Van Wijnen JH, Brunekreef B. House dust mite allergen (*Der p I*) and respiratory symptoms in children: a case-control study. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 1061-9.
37. Lau S, Falkenhorst G, Weber A et al. High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 718-25.
38. Kuher J, Frischer T, Meinert R et al. Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 44-52.

Efeito da Imunoterapia Pré e Co-Estacional para Pólens de Gramíneas no Recrutamento Nasal de Eosinófilos e Níveis Séricos de IgG e IgE Específicas

JOSEFINA RODRIGUES****, LUÍS DELGADO***, J P MOREIRA DA SILVA ****, LEONOR CUNHA*,
ISABEL PORTELA**, JOÃO CARDOSO**, MARIANELA VAZ*****

RESUMO

Avaliamos em 32 doentes (17M e 15F; idade média de 31 anos) com história clínica de rinite sasonal, o efeito da imunoterapia no recrutamento de eosinófilos das secreções nasais e nos níveis de IgE e IgG sérica específica para *Phleum Pratensis*. Todos tinham testes cutâneos "prick" positivos para *Phleum Pratensis* (F) e *Dactylis Glomerata* (D). Dez doentes (grupo C) foram exclusivamente tratados com Loratadina 10 mg em SOS, e 22 foram também submetidos a Imunoterapia pré e co-estacional (Grupo IT) com um extracto aquoso estandardizado de F e D (Conjuvac-Bayer/DHS). Os doentes foram avaliados antes, durante e 6 meses após a estação polínica. Efectuou-se contagem de eosinófilos nas secreções nasais em esfregaços de citocentrífuga, corados pelo Wright/Giemsa, doseamento de IgE específica pelo método Cap (Kabi, Pharmacia) e testes cutâneos a F e D. Dezoito doentes continuaram o estudo com o mesmo protocolo de avaliação no ano seguinte (9 IT e 9 C) tendo sido efectuado neste grupo doseamento de IgG específica para F pelo mesmo método em 2 anos consecutivos. Ambos os grupos (IT e C) evidenciaram um aumento dos

eosinófilos nas secreções nasais, particularmente evidente no grupo IT (antes da estação -AE- C=0,13±0,1; IT=0,27±0,1; p=ns; durante a estação -DE- C=6,6±2; IT=16,1±0,7; p<0,04). Os doentes que continuaram o estudo no ano seguinte, mantiveram a subida dos eosinófilos nas secreções nasais durante a estação polínica, embora o aumento observado no 1.º ano quando se comparou o grupo IT com o C (p=0,04), se tivesse esbatido no 2.º ano de observação (p=ns). (1.º ano AE - C= 0,14±0,13; DE C= 6,9±7,3; p= 0,02, AE - IT=0,33±0,31; DE - IT = 19,3±18,5; p= 0,007) (2.º ano AE - -C=0,31±0,63; DE C= 7,5±15,7; p=0,05, AE - -IT=0,2±0,3; DE - IT=11,6±16; p=0,03). Nos 22 doentes (12 IT e 10 C) em que doseamos a IgE específica para F, observamos um aumento não significativo da IgE em todos os doentes, que se acentua 6 meses após a Primavera sendo este aumento estatisticamente significativo no grupo C (p<0,01). Os níveis de IgG específica para F não variaram no grupo C em todo o estudo. Nos doentes submetidos a IT os níveis de IgG subiram significativamente durante a estação polínica nos 2 anos de tratamento (p=0,01). Encontramos correlações estatisticamente significativas entre a IgG específica e os eosinófilos das secreções nasais ($R=0,41$; p<0,05) e a IgG/IgE específica ($R=0,44$; p<0,01). Em conclusão verificamos que a IT a pólenes de gramíneas aumenta o recrutamento de eosinófilos nas secreções nasais durante a exposição natural ao alergénio, particularmente no primeiro ano de tratamento e bloqueia a subida de IgE durante a estação polínica aumentando os níveis de IgG específica apenas no período de imunização activa.

* Interno do Internato Complementar de Imunoalergologia do H.S. João.

** Assistente Hospitalar de Patologia Clínica.

*** Assistente Hospitalar de Imunologia do Serviço de Imunologia do Hospital de S. João e Assistente da Faculdade de Medicina Porto.

**** Assistente Hospitalar de Imunoalergologia Unidade de Imunoalergologia - H.S. João.

***** Chefe de Serviço de Imunoalergologia.

Diretora da Unidade de Imunoalergologia - H. S. João.

A este trabalho foi atribuído o 2.º lugar do prémio SPAIC-UCB/Stallergenes 1994.

In 32 patients with grass pollen allergy (17M, 15F, 31 years old) all with seasonal rhinitis, we studied the effect of immunotherapy on nasal eosinophils recruitment during pollen season and changes in specific IgE and IgG levels. All had positive skin prick tests to Phleum Pratensis (Php) and Dactylis Glomerata (Dg). Ten patients (control group - C) were exclusively treated with Loratadine 10 mg prn and 22 also received pre and co-seasonal immunotherapy (immunotherapy group - IT) with a standardized aqueous extract of both allergens (Conjuvac® - Bayer/DHS). Patients were evaluated before (bs) during (ds) and 6 months after season (as): eosinophils counts (EC) in nasal secretions (cytospins, Wright-Giemsa stain), specific IgE and IgG levels to Php (Cap System® - Kabi Pharmacia) and skin reactivity to Php and Dg. Both groups showed a significant rise in EC ds, specially evident in IT (bs - C= 0,13±0,1; IT=0,27±0,1: p=ns, ds - C= 6,6±2; IT= 16,1±0,7: p<0,04). Patients that continued the study in the following year, maintained the increase in the EC ds, although this was not so evident on the 2nd year of treatment (IT vs C; p=ns) (1st year bs - C=0,14±0,13; ds C=6,9±7,3: p=0,02, bs - IT=0,33±0,31; ds - IT= 19,3±18,5: p=0,007) (2nd year bs - C= 0,31±0,63; ds - C=7,5±15,7: p=0,05, bs - IT=0,2±0,3; ds - IT=11,6±16: p=0,03). A significant increase in specific IgE levels, was only seen 6 months after spring, in C group (p<0,01) when the 22 patients were studied. Specific IgG levels to Php showed no significant differences in C. In IT, specific IgG levels showed a significant rise during pollen season in the two years of treatment (p=0,01). We also found significant correlations between specific IgG levels and EC in nasal secretions ($R=0,41$; p<0,05) and between specific IgG/IgE ($R=0,44$; p<0,01). In conclusion: grass pollen immunotherapy increases eosinophil recruitment in nasal secretions during natural pollen exposure, specially in the first year of treatment, blunts the rise in specific IgE levels during pollen season and increases specific IgG levels in the IT period.

INTRODUÇÃO

A rinite alérgica sazonal é uma patologia muito comum na população geral e uma causa importante de morbidade. Nos últimos trinta anos tem havido um aumento crescente desta doença em quase todos os países industrializados do mundo¹. A sua causa mais comum é a alergia a pólenes de gramíneas mediada por uma reacção de hipersensibilidade tipo I.

A resposta nasal, traduzida clínicamente por espirros, prurido, obstrução nasal e rinorreia, associa-se

por vezes a conjuntivite com ou sem prurido ocular, e caracteriza-se, histopatologicamente, por inflamação da mucosa nasal. O mastócito, com IgE localizada à superfície da célula, tem o papel inicial no desencadear do processo inflamatório². O envolvimento destas células tem sido comprovado em estudos de biópsias nasais efectuadas após provocação experimental e após exposição natural ao antígeno^{3,4,5}. A sua activação inicia uma cascata de reacções, com aumento local de mediadores químicos de hipersensibilidade, como a histamina, TAME esterase, prostaglandina D2^{6,7} e chamada de células inflamatórias, nas quais predominam os eosinófilos³.

O granulócito eosinófilo é uma célula derivada da medula óssea e o seu envolvimento na inflamação alérgica é conhecida há pelo menos um século (cit in 38). O verdadeiro papel desta célula na inflamação alérgica é ainda hoje algo enigmático, havendo no entanto alguns estudos que claramente estabelecem uma relação entre a sua actividade e a gravidade da doença alérgica^{8,9,10}.

Na rinite alérgica, por exemplo, estas células aumentam durante exposição natural ou após a provocação nasal com o antígeno¹¹. A infiltração, activação e desgranulação dos eosinófilos tem uma função primordial na sintomatologia alérgica do nariz, particularmente nas reacções de fase tardia associadas ao edema e hiperreactividade da mucosa nasal^{3,5}. As primeiras descrições da associação entre o influxo nasal de eosinófilos e a rinite alérgica sasonal datam de 1927 por Eyermann¹² e posteriormente por Lindsay e cols¹³ que referiram a ausência de eosinófilos nas secreções nasais em períodos assintomáticos e a inexistência de relação entre os eosinófilos nasais e os periféricos.

A imunoterapia (IT) tem sido utilizada para o tratamento de doentes com polinose há mais de 7 décadas, desde que foi pela primeira vez descrita nos Estados Unidos por Freeman e Noon^{14,15}. Nos últimos 40 anos vários trabalhos têm tentado demonstrar a sua eficácia e apoiam a sua utilização na clínica¹⁶ estando os efeitos terapêuticos dependentes das doses e esquemas de aplicação^{17,18,19}. A eficácia da IT nas polinoses tem sido claramente demonstrada em ensaios duplamente cegos com placebo¹⁶ sendo esta uma das indicações claras para este tipo de tratamento²⁰.

Embora não se conheçam os mecanismos exactos de actuação da IT, ela tem seguramente efeitos de imunomodulação na resposta IgE e/ou na ampliação inflamatória desta resposta. Alguns desses efeitos têm sido demonstrados pela formação de anticorpos IgG após IT²¹, pela redução dos níveis de IgE específica²¹, aumento dos níveis de IgA e IgG nas secreções nasais destes doentes²² e, mais recentemente, na modificação da resposta de linfócitos T (estimulação de linfócitos de tipo TH1)²³.

O objectivo do presente estudo foi o de avaliar, em doentes com rinite alérgica a pólenes de gramíneas, os efeitos da imunoterapia pré e coestacional na inflamação alérgica local. Assim, analisamos o recrutamento local de eosinófilos e acompanhamos as oscilações nos níveis de IgE e IgG específica na circulação com a exposição natural ao antígeno.

DOENTES, MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados trinta e dois doentes, (17 do sexo masculino e 15 do feminino com idade média de 31 anos, compreendidas entre os 16 e os 61 anos), com base numa história clínica de rinite sasonal. Todos tinham testes cutâneos "prick" positivos para as gramíneas *Pheum Pratensis* e *Dactylis Glomerata* (Bayer/DHS, numa concentração de 1/20 PV) e IgE específica positiva para aqueles alergénios ($RAST \geq$ classe 2). Foram excluídos os doentes que apresentassem história de rinite perianal e/ou tivessem sido submetidos a qualquer tipo de imunoterapia prévia, os fumadores e os que tivessem feito corticosteroides tópicos ou sistémicos no mês que antecedeu o início do estudo.

Todos os doentes foram observados em três ocasiões diferentes: imediatamente antes da estação polínica, no pico da estação e cerca de seis meses após aquela data, alturas em que foi aplicado o mesmo protocolo de avaliação: contagem de eosinófilos nas secreções nasais, doseamento de IgE específica, testes cutâneos prick, avaliação do registo de sintomas e medicação nos 15 dias que antecederam cada visita.

Em 22 doentes foi aplicada imunoterapia pré e co-estacional (grupo de imunoterapia - IT) com um extracto estandardizado, aquoso, de *Phleum Pratensis* e *Dactylis Glomerata*, químicamente conjugado com o alginato de sodio (Conjuvac® - Bayer/DHS), constituindo os restantes dez doentes o grupo controlo - C). A todos, foi permitido apenas a utilização de terapêutica sintomática - Loratadina 10 mg, sempre que necessário e com registo das doses utilizadas.

A IT consistiu na administração de injecções semanais do alergénio iniciando-se com doses de 10 PNU que se duplicaram semanalmente durante um período de cerca de três meses, até ser atingida a dose de manutenção de 800 PNU ou a máxima dose tolerada pelo doente. Após atingida a dose de manutenção, as injecções foram aplicadas com intervalo de 2 semanas durante a estação polínica, até fim de Maio. Em, 18 doentes foi possível aplicar o mesmo protocolo de estudo, no ano seguinte, após novo período de imunoterapia, em 9 deles.

Fornecemos a todos os doentes um cartão para registo diário de sintomas e da dose de antihistamínicos

utilizados. Aos sintomas de rinorreia, espirros, obstrução nasal e prurido ocular e nasal foi atribuído uma pontuação de 0 (sem sintomas) a 3 (sintomatologia marcada)²⁴, tendo sido calculado tanto a pontuação média para cada sintoma assim como as doses de antihistamínicos, em cada período de registo.

A colheita de secreções nasais foi realizada utilizando zaragatoas de transporte, colocadas entre o septo nasal e o corneto inferior, em ambas as narinas, tendo a contagem diferencial de células (eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais) sido feita por microscopia óptica, em esfregaços de citocentrífuga (Haeraeus) corados por Wright-Giemsa, e sempre efectuada pelo mesmo observador.

O doseamento da IgE e IgG específica foi feita por fluoro-enzimo-imunoensaio (CAP® RAST FEIA, Kabi Pharmacia), seguindo as instruções do fabricante. Para a IgE específica os resultados são dados em kU/L por referência a uma curva padrão de IgE total (0,35-100 KU/L diluindo-se as amostras superiores a 100 KU/L. Para a IgG específica os resultados são expressos como percentagem de uma referência (%T) - uma mistura de soros contendo IgG específica para o videoiro (*Bétula verrucosa*), obtidos de indivíduos submetidos a imunoterapia com extractos desse pólen.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizada a prova de Wilcoxon para amostras emparelhadas, a prova de Man Witney para amostras não emparelhadas e a prova de Spearman para correlações lineares. São apresentadas as médias dos valores por comodidade na exposição.

RESULTADOS

Contagem de eosinófilos nas secreções nasais - o número relativo de eosinófilos nas secreções nasais aumentou durante a estação polínica em 30 dos 32 doentes estudados ($p<0,0001$, prova não paramétrica de Wilcoxon). Essa elevação foi particularmente evidente nos 22 doentes submetidos a imunoterapia (Fig. 1) que apresentaram, apenas neste período, níveis médios de eosinófilos superiores aos controles ($16,1\pm4,1$ vs $6,6\pm2,0$; $p<0,04$). Em ambos os grupos se verificou uma redução significativa dos eosinófilos nas secreções nasais após a estação polínica (Fig. 1-A e B).

Nos doentes que pudemos seguir no segundo ano de imunoterapia verificamos que, embora se mantivesse o aumento significativo do número de eosinófilos nasais durante a estação polínica em cada grupo (Quadro I) nesse período estes não diferem significativamente quando o grupo IT é comparado com o grupo C ($p=0,3$), em contraste com o observado no primeiro ano.

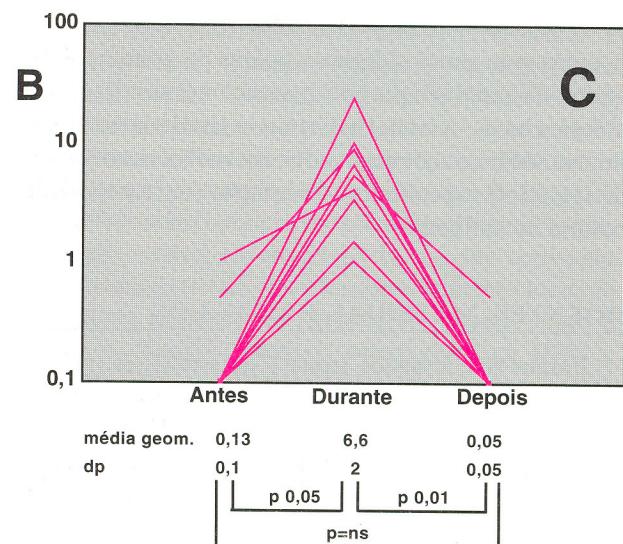
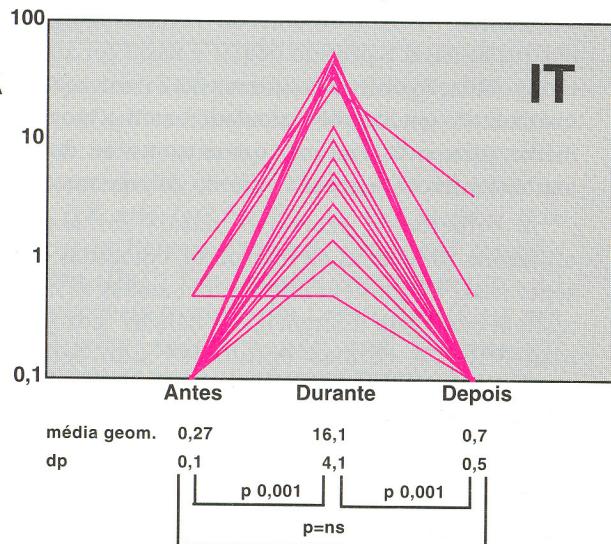


Fig. 1 - Evolução do número relativo de eosinófilos nas secreções nasais em doentes a fazer imunoterapia (IT, esq) e controlos (C, dir). Verifica-se uma subida significativa do número de eosinófilos durante a estação polínica particularmente marcada nos doentes do grupo IT.

	1992		1993	
	Antes	Durante	Antes	Durante
% eosinófilos nas secreções nasais (media ± dp)	Imunoterapia n = 9 $0,33 \pm 0,31$	Controlos n = 9 $0,14 \pm 0,13$	Imunoterapia n = 9 $0,2 \pm 0,3$	Controlos n = 9 $0,31 \pm 0,63$
P C/IT	$p = 0,007$		$p = 0,02$	
	*		**	

Quadro I - Número relativo de eosinófilos nas secreções nasais durante a estação polínica. Os doentes submetidos a imunoterapia apresentavam níveis médios significativamente mais elevados que os controlos apenas no 1.º ano de Imunoterapia (1992) * $p=0,04$; 1993 ** $p = 0,3$.

Níveis de IgE específica - Em 22 doentes (12 IT e 10C), determinamos a IgE específica para dois alergénios (*Dactylis Glomerata* e *Phleum Pratensis*). Nas colheitas de sangue efectuadas antes da estação polínica, as concentrações de IgE para *Phleum Pratensis* não diferiram significativamente nos dois grupos (IT e C), com valores de 34,4 kU/l e 36kU/L respectivamente ($p<0,4$). Durante a estação polínica houve um aumento não significativo dos níveis de IgE para aquele alergénio em todos os doentes, que se acentua 6 meses após a Primavera, sendo este aumento estatisticamente significativo apenas no grupo controle ($p<0,01$). Os valores de IgE foram comparados utilizando a prova de Wilcoxon para amostras emparelhados (Fig. 2).

Nestes doentes, as concentrações de IgE específica para *Dactylis Glomerata* variaram numa forma quase paralela à IgE para o *Phleum Pratensis* (Fig. 2).

Não se encontrou qualquer correlação significativa, quer no grupo IT quer no C, entre os níveis de IgE e a contagem nasal de eosinófilos em qualquer dos períodos de observação.

Nos doentes que pudemos seguir durante dois anos, verificamos que, embora sem significado estatístico, os níveis de IgE foram mais elevados antes da estação polínica, no segundo ano de observação e que esta elevação se mantinha durante a estação polínica. Não se observaram quaisquer variações nos valores da IgE para o grupo controle (Fig. 3).

NÍVEIS DE IgG ESPECÍFICA

Em catorze doentes (8 IT e 6C) em que foi possível dosear a IgG específica para o *Phleum Pratensis* durante dois períodos consecutivos de IT, verificamos que durante todo o estudo não houve variações nos níveis de IgG no grupo controle. Em contraste, nos doentes submetidos a IT, os níveis de IgG aumentaram significativamente durante a estação polínica nos dois anos de tratamento, quando estes valores são comparados com os níveis basais ($p=0,01$). (Fig. 3).

Quando se analisaram as oscilações na contagem de eosinófilos, IgG específica e IgE específica, nos quatro períodos (antes e durante a estação polínica de 1992 e nos mesmos períodos de 1993), nos doentes submetidos

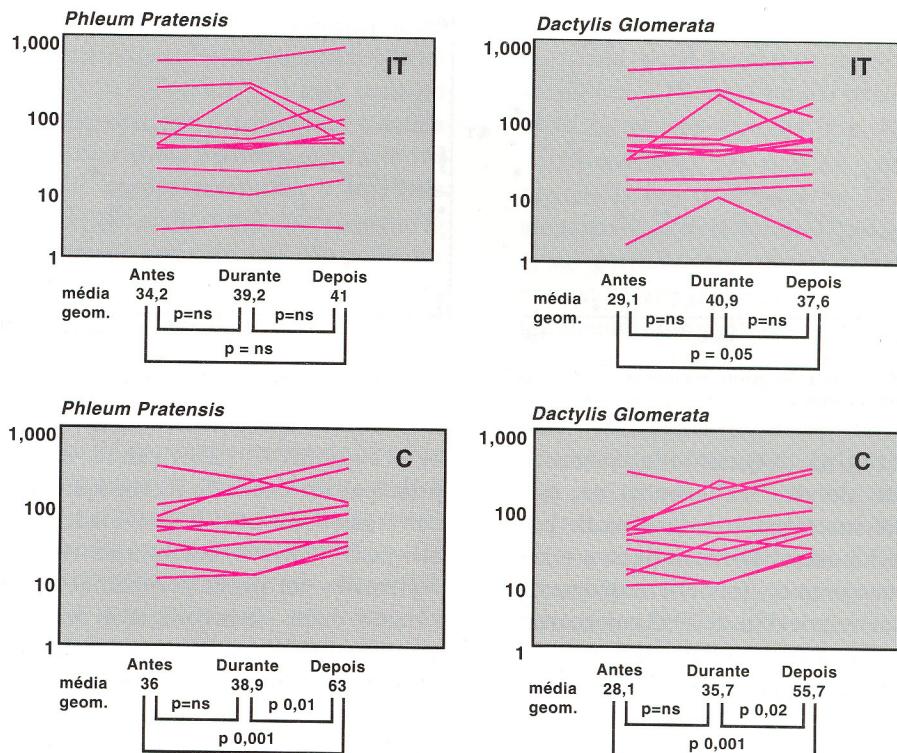


Fig. 2 - Evolução dos níveis de IgE específica para *Phleum Pratensis* (esq.) e *Dactylis Glomerata* (dir.) nos doentes submetidos a Imunoterapia (IT em cima) e Controlos (C em baixo). Apenas nos doentes do grupo C se observa um aumento significativo da IgE específica após a estação polínica.

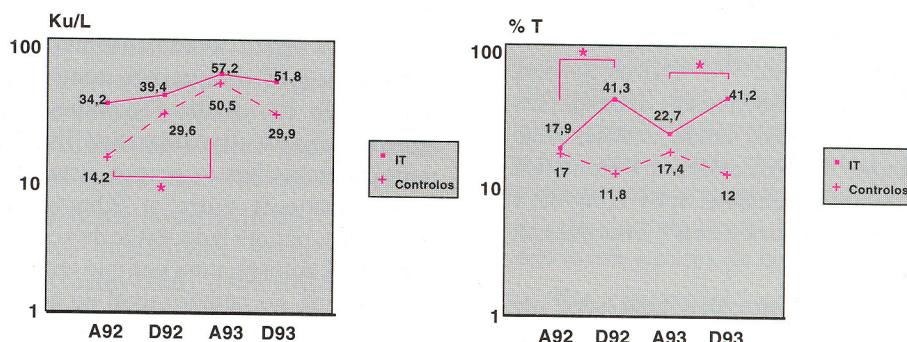


Fig. 3 - Evolução dos níveis de IgE específica (esq.) e IgG específica (dir.) no grupo submetido a IT e C. Apenas no grupo C se observa um aumento significativo da IgE na estação polínica (*p=0,01). O aumento da IgG verifica-se apenas no grupo IT durante a estação polínica nos 2 anos de tratamento (*p=0,01).

a imunoterapia durante dois anos consecutivos, encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de IgG e IgE ($r=0,44$) $p<0,01$) (correlação linear de Spearman), que se manteve quando os dois anos foram analisados separadamente. Observamos também uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de IgG sérica e os eosinófilos das secreções nasais ($r=0,41$ $p<0,05$) (Fig. 4). Esta correlação, encontrada no conjunto de quatro observações, parece dever-se principalmente às elevações encontradas no primeiro ano de IT para os eosinófilos e IgG ($r=0,58$ $p<0,001$), uma vez que deixa de ser aparente no 2.º ano de tratamento IT.

Não se encontrou qualquer relação entre os níveis basais de IgE (antes da estação polínica) e o recrutamento de eosinófilos nas secreções nasais observado durante a estação polínica, tanto no grupo IT como no C.

DISCUSSÃO

A Imunoterapia com pólenes de gramíneas foi introduzida em 1991 por Freeman¹⁴ e Noon¹⁵ que julgavam ser aquela patologia provocada por uma reacção idiosincrásica a uma toxina solúvel com origem nos pólenes, e, partiram do princípio que a simples inoculação de extractos de pólen pudesse originar

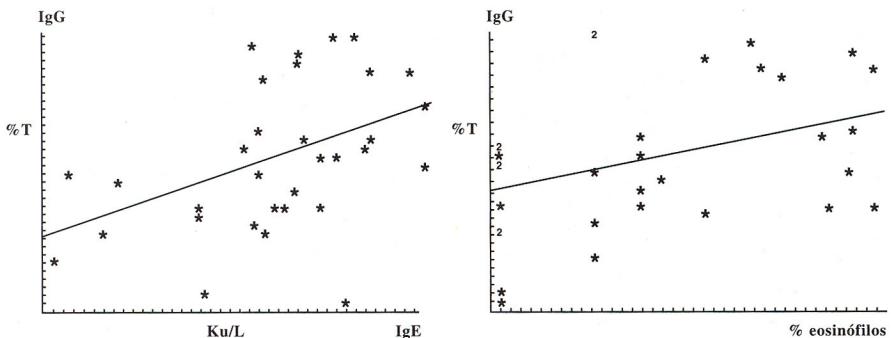


Fig. 4 - Correlações positivas entre os níveis de IgE e IgG específica e os níveis de IgE e os eosinófilos das secreções nasais.

uma resposta antitoxina. Quando a natureza imunológica da rinite alérgica foi reconhecida, este tipo de terapêutica inicialmente designada por dessensibilização ou hiposensibilização passou a ser conhecida como Imunoterapia. Embora amplamente usada desde 1920, somente por volta de 1955 começaram a surgir os primeiros estudos controlados que avaliam a eficácia desta forma de terapêutica. Alguns destes estudos mostraram ser a Imunoterapia uma forma de tratamento eficaz em reacções anafiláticas secundárias a picadas de himnópteros²⁵ e na asma e rinoconjuntivite por pólens^{26,27,28,29}. Esta doença, é aliás uma das indicações mais precisas para a instituição desta forma de terapêutica²⁰. O alívio sintomático que se obtém nesta situação é altamente específico para o alergénio em causa e não altera os sintomas para抗ígenos não relacionados imunologicamente^{30,31}. Outros autores têm sugerido que os efeitos podem estar dependentes das doses de alergénio utilizadas, sendo as doses mais elevadas as mais eficazes^{32,33}. Esta melhoria sintomática foi encontrada muito precocemente após atingida a dose de manutenção por *Urbanek e cols* e *Bousquet* na rinite polínica^{34,35}.

Imunologicamente, a IT provoca uma série de modificações no sangue periférico e na mucosa nasal, que se pensa serem em parte responsáveis pelo alívio dos sintomas. No soro, há um aumento gradual e progressivo dos níveis de IgG^{21,34,36}, um aumento inicial dos níveis de IgE, e bloqueio da elevação da IgE observada durante a estação polínica³³, com redução posterior, gradual e progressiva, ao longo de vários anos, podendo no entanto nunca atingir a normalidade³⁶. A amplitude destas variações parece ter uma fraca associação com o alívio sintomático³⁶.

Vários estudos, utilizando líquido de lavagem nasal, e material de biópsias da mucosa nasal colhidos durante a exposição natural ou provocação experimental com o alergénio, têm tentado esclarecer os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à rinite alérgica. Caracteristicamente, a reacção alérgica nasal, envolve a libertação de mediadores de hipersensibilidade e um infiltrado de células inflamatórias no qual predominam

os eosinófilos^{3,37}. Esta célula, considerada como o principal marcador da inflamação alérgica³⁸ tem sido correlacionada com a gravidade clínica da doença alérgica^{8,9,10} uma vez que para ela tem sido classicamente reclamado um papel prejudicial ao organismo. No entanto, dados de investigação mais recentes indicam que o eosinófilo pode ter outras funções: interferir na proliferação do linfócito T, na produção de anticorpos pela célula B tendo sido mesmo actualmente sugerido que possa interferir na actividade dos fibroblastos e na síntese e catabolismo de proteoglicanos^{39,40,41}.

Os resultados do nosso estudo evidenciam claramente, um recrutamento de eosinófilos nas secreções nasais durante a estação polínica em todos os doentes ($p<0,0001$), sendo no entanto os níveis de eosinófilos significativamente mais elevados no grupo submetido a IT do que nos controlos ($p<0,04$). No decurso do 2.º ano de IT, embora se mantivesse o aumento significativo de eosinófilos durante a estação polínica em ambos os grupos, estes deixam de diferir estatisticamente entre si (Quadro I). Os nossos resultados, por um lado, estão de acordo com o referido por outros autores, uma vez que tem sido demonstrado um aumento no número total de eosinófilos e do seu estado de activação na submucosa e epitélio nasal durante a estação polínica^{32,42}. Esta elevação, que ocorre durante a exposição natural, é semelhante à que surge poucos minutos após a provocação local com o antigénio⁴². *Durham e cols*,⁴² encontraram eosinofilia tecidulares em ambas as circunstâncias que resultariam do facto da exposição natural ao alergénio originar um recrutamento local de eosinófilos e a sua activação, com consequente libertação de mediadores de inflamação. Por outro lado, *Naclério e cols*³² evidenciaram o papel que a IT pode ter na redução do recrutamento eosinofílico no nariz, durante a estação polínica e, a importância que as doses e os esquemas de administração da IT podem ter sobre este recrutamento^{32,42}.

Os nossos resultados, ao contrário do encontrado por *Naclério e cols*³², são consistentes com a hipótese de que, para este esquema de IT (pré-e co-estacional) a

dose de manutenção atingida (800 PNU), o recrutamento eosinófilico observado possa estar dependente não só da exposição natural ao alergénio^{5,32,42} mas também associado à estimulação antigénica sustentada e mantida pela própria IT. A favor desta hipótese, é o facto, de que aos doentes foi apenas permitida a toma de medicação de recurso, que embora influencie, segundo alguns autores a migração eosinofílica⁴³ não podia ser responsável por aquela discrepância uma vez não existirem diferenças significativas no consumo médio de medicação entre os dois grupos (IT e C). O facto de *Naclério e cols* terem encontrado reduções significativas na percentagem de eosinófilos, logo após o pico da estação polínica, ($p<0,04$), apenas no grupo submetido às maiores doses de manutenção de IT (24 mcg), sugere que este efeito pode ter sido influenciado pelas doses de manutenção utilizadas, além de que, este efeito foi apenas estudado, neste grupo, ao fim de três anos de IT. Não foi registado o que se passou no início do tratamento, podendo nessa altura, este autor, ter encontrado outros níveis no recrutamento de eosinófilos no nariz, à semelhança do que parece acontecer no nosso estudo quando os doentes são avaliados no 1.^º e 2.^º ano de imunoterapia, uma vez que a elevação dos eosinófilos encontrada no 1.^º ano de IT se esbate já no 2.^º ano.

Não encontramos nenhuma relação entre os níveis de IgE e o número de eosinófilos, em qualquer dos períodos, e particularmente entre a IgE basal e os eosinófilos durante a estação polínica, sugerindo que o recrutamento destas células no nariz não tem relação directa com a intensidade de sensibilização, quando esta é avaliada pelos níveis séricos de IgE específica.

Assim, o recrutamento dos eosinófilos na mucosa nasal poderia estar aumentado, nesta forma de tratamento (pré e co-estacional), à semelhança do que se passa para as variações dos níveis de IgE durante os primeiros anos de IT^{33,36}, e em relação ao efeito desta, sobre a hiperreactividade brônquica inespecífica, que não sendo modificada, segundo alguns autores^{44,45,46}, pode até ser agravada nas fases iniciais do tratamento⁴⁷, e à reduzida melhoria clínica, observada por outros⁴⁸.

As oscilações encontradas nos níveis de IgE nos dois anos de tratamento (Fig. 2 e 3) estão de acordo com o observado por outros autores na mesma situação³⁶. Assim, apesar de *Sherman e cols*⁴⁹ terem demonstrado em 1940 que alguns doentes com alergia a pólenes de gramíneas tinhham reduções acentuadas nos níveis de IgE, tem sido classicamente descrita a subida de IgE específica nos primeiros meses após início do tratamento, antes da redução daqueles valores ser observado, algumas vezes, apenas alguns anos depois.

No nosso grupo de doentes, as elevações mais marcadas dos níveis de IgE foram observadas no grupo

controle, após a estação polínica ($p<0,001$), tendo-se registado uma atenuação deste aumento no grupo submetido a IT, com subida posterior, antes do início de IT na estação seguinte (Fig. 3).

Nos doentes em que foi possível dosear a IgG específica em dois anos de IT, observamos o seu aumento significativo durante a estação polínica, isto é, no período final de imunização, e de exposição natural ao alergénio, tanto no 1.^º como no 2.^º ano de tratamento. Em contraste, no grupo controle não houve qualquer variação significativa daqueles níveis (Fig. 3). De facto, uma das alterações imunológicas mais consistentes que ocorre durante a imunoterapia é o aumento dos níveis de IgG específica⁵⁰, parâmetro que segundo *Rocklin*⁵¹ melhor se correlaciona com a sua eficácia clínica. Estes resultados sugerem que os efeitos de imunomodulação da IT que aplicamos aos nossos doentes se manifestam particularmente no período de imunização activa (i.e pré e co-estacional), uma vez que os níveis de IgG específica voltam a baixar para valores idênticos aos do início do tratamento, após a sua suspensão.

As correlações positivas encontradas, nos dois anos de estudo, entre os níveis de IgG e de IgE específica, (Fig. 4) estão de acordo com o descrito na literatura quanto aos aumentos iniciais observados para a IgE e a elevação esperada dos níveis de IgG.

A relação estatisticamente significativa encontrada entre os valores séricos de IgG e os eosinófilos nasais ($p<0,05$) nos dois anos de IT, particularmente evidente no 1.^º ano de tratamento ($p<0,001$), tem provavelmente a ver com o facto daquelas células terem tido um aumento mais acentuado durante a estação polínica, no 1.^º ano de tratamento, paralelamente com a elevação dos níveis séricos de IgG específica.

Em conclusão: este estudo evidencia que esta forma de IT, (pré e co-estacional), tem efeitos moduladores sobre o sistema imunológico, comprovados pelas alterações que provoca nas imunoglobulinas, em particular nos níveis de IgG específica, aumentando dum modo estatisticamente significativa os seus valores durante os períodos de imunização activa, e potenciando o recrutamento de eosinófilos nas secreções nasais, que ocorre durante a exposição natural ao antígeno. Embora fosse evidente o efeito da IT sobre os níveis de IgE, quando comparados com os controles, este, não será um bom parâmetro para avaliar os efeitos da IT. Assim, apesar de não serem ainda aparentes os mecanismos envolvidos na possível relação entre a subida de IgG observada e o recrutamento inicial de eosinófilos, estes, parecem ser parâmetros válidos para, em estudos longitudinais, se estudar e compreender os mecanismos envolvidos nesta forma de tratamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Norman PS. Allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:531-546.
2. Okuda M, Otsuda H, Kawabori S. Basophil leukocytes and mast cells in the nose. *Eur J Resp Dis* 1983; 64 (suppl 128): 7-14.
3. Bascom R, Pipkorn U, Lichenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge: effect of corticosteroid pretreatment. *Am Rev Resp Dis* 1988; 138:406-12.
4. 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.
5. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. The cellular response of the human allergic mucosa to natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82:1056-54.
6. Pipkorn U, Proud D, Lichenstein LM, et al. Effect of short term systemic glucocorticoid treatment on human nasal mediator release after antigen challenge. *J Clin Invest* 1987; 80:957-61.
7. Naclerio RM, Meir HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson NF, Meyers DA, Norman PS, Lichenstein LM. Mediator release after nasal and challenge with allergen. *Am Rev Resp Dis* 1983; 128:597-602.
8. Venge P, Hakansson L. Current understanding of the role of the eosinophil granulocyte in asthma. *Clin Exp Allergy* 1991; 21 (supl. 3): 31-37.
9. Rak S, Bjornson A, Hakanson L et al. The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:878-888.
10. Linder A, Venge P, Deuschl H. Eosinophil cationic protein and mieloperoxidase in nasal secretions as markers of inflammation in allergic rhinitis. *Allergy* 1987; 42:583-590.
11. Bascom R, Pipkorn U, Lichenstein LM, Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. *Am Rev Resp Dis* 1988; 138:406-412.
12. Eyermann C. Nasal manifestations of allergy. *Ann Otol Rhin Laryng* 1927;36:808-15.
13. Lindsay Jr, Walsh TE. Nasal secretions - the value of cytologic examination to the rhinologist. *Arch Otol* 1933; 17:83-6.
14. Freeman J. Further observation to the treatment of hay fever by hipodermic inoculation of pollen vaccine. *Lancet* 1911;2:814.
15. Noon L. Prophylactic inoculation for hay fever. *Lancet* 1911; 1:1572.
16. Van Metre T, Adkinson NF jr. Immunotherapy for aeroallergen disease. Middleton E jr, Reed CE, Ellis EF, Addkinson NF jr, Yunginger JW, eds. *Allergy: Principles and Practice*, vol 2. 3rd ed. St. Louis: CV Mosby, 1988; 1327-44.
17. Lowell FC, Franklin W. A double blind study of the effectiveness and specificity of injection therapy in ragweed hay fever. *N Engl J Med* 1975; 273:675.
18. Franklin W, Lowell FC, Comparison of two dosages of ragweed extract in the treatment of pollinosis. *Jama* 1967; 201:91.
19. Norman PS, Winkenwerder WL, Lichenstein LM. Maintenance immunotherapy in ragweed hay fever: booster injections at six weeks intervals. *J Allergy* 1971; 47:273.
20. Weeké, Malling H-J, eds. Immunotherapy. Position Paper of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; Suppl. 14;9-35.
21. Creticos PS, Van Metre TE, Mardiney MR, Rosenberg GL, Norman PS, Adkinson NF jr. Dose response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:94-104.
22. Platts-Mills TAE, Von Maur PK, Ishisaka K, Norman PS, Lichenstein LM. IgA and IgG anti-ragweed antibodies in nasal secretions. *J Clin Invest* 1976; 57:1041-50.
23. Durham SR. Allergic rhinitis: basic mechanism and influence of treatment. *Rev Port Imunoalergol* 1994; 2(2): 85-88.
24. Varney V, Gaga M, Frew AJ, Aber VR, Kay AB, Durham SR. Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *BMJ* 1991; 302:265-269.
25. Hunt KJ, Sobotka AK, Amodio FJ, Valentine M D, Benton AW, Lichenstein LM. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Eng J Med* 1978; 299:257-61.
26. Norman PS. An overview of immunotherapy: implications for the future. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 65:87-96.
27. Lichenstein LM, Norman PS, Winkenwerder WL. A single year of immunotherapy for ragweed hay fever: immunologic and clinical studies. *Ann Intern Med* 1971; 75:663-71.
28. Viander L, Koivikko A. The seasonal symptoms of hyposensitised and untreated hay fever patients in relation to birch pollen counts: correlations with nasal sensitivity, prick tests and RAST. *Clin Allergy* 1978;8:387-396.
29. Pence HL, Mitchell DQ, Greely RL, Selfridge HA. Immunotherapy for mountain cedar pollinosis: a double blind controlled study. *J Allergy Clin Immunol* 1976; 58:39-50.
30. Lowell FC, Franklin W. A "double blind" study of treatment with aqueous allergenic extracts in cases of allergic rhinitis. *J Allergy* 1963; 34:165.
31. Norman PS, Lichenstein LM. The clinical and immunological specificity of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 61:370.
32. Furin M, Norman PS, Creticos PS, Proud D, Kagey-Sobotka A, Lichenstein LM, Naclerio M. Immunotherapy decreases antigen induced eosinophil cell migration into the nasal cavity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88(1): 27-32.
33. Rocklin RE. Clinical and immunologic aspects of allergen specific immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinitis and/or allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 72(4): 323-334.
34. Urbanek R, Holgersson M, Dreborg. Changes in conjunctival provocation test (CPT) and skin prick test (SPT), specific IgE and IgG during immunotherapy (IT) with grass pollen preparations (PP). *Ann Allergy* 1985; 55; 259.
35. Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W, et al. Double blind placebo controlled immunotherapy with mixed grass pollen allergoids. Rush immunotherapy with pollen allergoids and standardized orchard grass pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 391-398.
36. Lichenstein LM, Ishizaka K, Norman PS, et al. IgE antibody measurements in ragweed hay fever: relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* 1973; 52:210.
37. Klemenstsson H. Eosinophils and the pathophysiology of allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:1058-64.
38. Venge P. The eosinophil granulocyte in allergic inflammation. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4(suppl): 19-24.
39. Peterson CG, Skoog V, Venge P. Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation. *Immunology* 1986; 171:1-13.

- 40. Kimata Hiyoshida A, Ioshioka C et al.** Eosinophil cationic protein inhibits immunoglobulin production and proliferation in vitro in human plasma cells. *Cell Immunol* 1992; 141:422-432.
- 41. Pincus SH, Ramesh KS, Wyler DJ.** Eosinophil stimulates fibroblasts DNA synthesis. *Blood* 1987; 70(2): 572-574.
- 42. Bentley AM, Jacobson MR, 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 (4): 877-883.
- 43. Cuss F.** Eosinophilia in nasal and bronchial lavage is inhibited by loratadine. *Clin Exp Allergy* 1990; 1: abstract OP86.
- 44. Warner JO, Soothill JF, Price JF, Hey EN.** Controlled trial of hyposensitization to Dermatophagoides Pteronyssinus in children with asthma. *Lancet* 1978; 2:912-15.
- 45. British Thoracic Association.** A trial of house dust mite in bronchial asthma. *Br J Dis Chest* 1979; 73:260-70.
- 46. Lichtenstein LM, Valentine M, Norman PS.** A reevaluation of immunotherapy for asthma. *Am Rev Resp Dis* 1984; 129:657-659.
- 47. Muray AB, Ferguson AC, Morrisson BJ.** Non allergic hyperreactivity in asthmatic children decreases with age and increases with mite immunotherapy. *Ann Allergy* 1985; 54:541-544.
- 48. Frankland AW.** Anaphylactic reaction to desensitization. *Br Med J* 1980; 281:1429.
- 49. Sherman WB, Stull A, Cooke RA.** Serologic changes in hay fever cases treated over a period of years. *J Allergy* 1940; 11:225.
- 50. Moss RB, Hsu Yao-Pi, Kwasnicki JM, Sullivan MM, Reid MJ.** Isotypic and antigenic restriction of the blocking antibody response to ryegrass pollen: Correlation of rye group I antigen specific IgG1 with clinical response. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79(2): 387-397.
- 51. Gurka G, Rocklin R.** Immunologic responses during allergen-specific immunotherapy for respiratory allergy. *Ann Allergy* 1988; 61:239-243.