SOCIEDADE PORTUGUESA
DE ALERGOLOGIA E
IMUNOLOGIA CLÍNICA

DIRECÇÃO

Presidente

J. Rosado Pinto

Vice-Presidentes

Ana Todo-Bom
Manuel Barbosa
M.ª Graça Castel-Branco

Secretário-Geral

Carlos Nunes

Secretário-Geral Adjunto

J. Ferraz de Oliveira

Tesoureiro

Pedro Lopes da Mata

ASSEMBLEIA GERAL

Presidente

Celso Chieira

Vice-Presidente

Mário Queiroz

Secretário

Jorge Pires

COMISSÃO VERIFICADORA DE CONTAS

Mário Loureiro
Maria Leonor Bento
A. Rodrigues Dias

A 1.ª Semana da Asma e Alergia em Aveiro

No passado mês de Novembro de 1996, coincidindo com a realização em Aveiro da reunião anual da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica, colaboramos na organização de uma «Semana da Asma e Alergia». Tratou-se de uma campanha pública de divulgação e educação sobre asma e alergia, organizada pela Unidade de Imunoalergologia do Hospital de S. João em cooperação com a Associação Portuguesa de Asmáticos (A.P.A.), sendo a primeira grande organização de «rua» da A.P.A..

Esta organização apenas foi possível dado o generoso apoio da Câmara Municipal de Aveiro e dos laboratórios Boerhinger Ingelheim e Pharmacia & Upjohn, que deram o contributo logístico e humano para, no decurso de 5 dias, atender um público tão numeroso. Durante toda a semana, quer na rua quer nos meios de comunicação social, tentou-se chamar a atenção dos cidadãos para a importância destas doenças e divulgar os objectivos e a importância da Associação Portuguesa de Asmáticos. Fizeram parte da acção a entrega do material educativo sobre alergia e asma disponível entre nós e a possibilidade de, voluntariamente, fazer uma colheita de sangue e o preenchimento de um inquérito, para o despiste de alergia respiratória. Simultaneamente, graças à coordenação com o Projecto Pneumobil, foi também possível realizar um rastreio da função respiratória.

Passadas as dificuldades inerentes a qualquer campanha de rua, que só a paciência e dedicação de todos os que para ela contribuiram permitiu aligeirar, pensamos que todos ficaram com a noção de que valeu a pena! A troca de experiência entre doentes, médicos, técnicos de saúde, pais, jornalistas e o cidadão comum, foi muito positiva e ficou como uma memória agradável para todos os que participaram. Para ela contribuiu, sem dúvida, o excelente final da Semana dado pela Orquestra do Norte, no Teatro Aveirense, com o concerto S.P.A.I.C. a favor da A.P.A..

Do ponto de vista técnico, do imunoalergologista, ficou-nos bem marcado o desconhecimento de muitos doentes sobre o âmbito da especialidade, por vezes mesmo da sua existência(!), e, para o significativo número de atópicos com que falamos (51% dos 236 voluntários que colheram sangue), o grande desconhecimento das principais atitudes terapêuticas e das mais elementares de evicção alergénica. Assim, temos cada vez mais noção que muito há ainda a fazer para educar e melhorar a assistência a um grande número de doentes que padecem de enfermidades imuno-alérgicas.

Em nome da Unidade de Imunoalergologia do Hospital de S. João, esperamos que o testemunho passe para os organizadores de futuras Reuniões Anuais da S.P.A.I.C., para que mais e melhores «Semanas da Asma e Alergia» possam atingir esses objectivos. Bem hajam a todos os que, até à data, para isso têm contribuído.

Marianela Vaz
Luís Delgado

Avanços Terapêuticos na Vasculite Urticariana Linfocitária Normocomplementémica

A. CELSO PEREIRA [1], MARIA JOSÉ JULIÃO [2], A. CARLOS LOUREIRO [3], ANA TODO BOM [3], EMÍLIA FARIA[1], PEDRO PESSA [4], J. PINTO MENDES [5], M. IRENE MARTINS [6], CELSO CHIEIRA [7].

RESUMO

Neste estudo procede-se à caracterização clínica, laboratorial e histológica da vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica. Salientam-se as dificuldades diagnósticas, nomeadamente pela semelhança das manifestações clínicas que partilha com a urticária crónica idiopática não vasculítica. O objectivo deste estudo consistiu na procura de um esquema farmacológico eficaz, seguro, bem tolerado e se possível modulador do processo vasculítico imuno-inflamatório observado na derme superior, face ao deficiente controlo com as diferentes formas terapêuticas mais comuns.

Foram estudados 51 doentes de ambos os sexos com o diagnóstico de vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica. Após avaliação clínica, laboratorial e histológica foram submetidos aos seguintes fármacos: Grupo I -15 doentes com sulfassalazina; Grupo II -21 doentes com metilprednisolona; Grupo III -9 doentes com dapsona; Grupo IV -6 doentes com cetirizina. O período de estudo foi de 16 semanas no Grupo I e de 12 semanas nos restantes. Em todos os doentes o estudo histológico foi realizado antes e após o tempo de prescrição medicamentosa, mas nos Grupos I e II procedeu-se a uma avaliação intercalar.

A partir dos fragmentos parafinados de biópsia realizaram-se, numa subamostra de cada um dos grupos, marcações celulares com anticorpos anti--CD3, anti-CD45RO e anti-CD15.

A resposta clínica no Grupo I foi excelente em 14:15 doentes e no final do estudo a histologia cutânea demonstrava normalização em 14 e infiltrado linfocitário perivascular em 1 doente. Nesta fase observou-se uma redução da população $CD3^+$ e a marcação $CD45RO^+$ aproximou-se das histologias de pele normal.

No Grupo II apenas 5 doentes descreveram regressão sintomatológica, mas não se observaram alterações significativas da histologia cutânea ou da população celular dérmica.

A resposta clínica, histológica e celular nos doentes dos Grupos III e IV foi muito insuficiente.

Neste estudo a real eficácia terapêutica da sulfassalazina não acarretou secundarismos farmacológicos, foi bem tolerada e mantida após a suspensão da terapêutica. Em paralelo, o controlo clínico acompanhou-se de evidente modulação celular linfocitária. Os granulócitos não constituem agentes activos no mecanismo fisiopatológico desta entidade.

PALAVRAS CHAVE: vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, urticária crónica, histologia cutânea, linfócitos, sulfassalazina, metilprednisolona, dapsona, cetirizina.

SUMMARY

THERAPHEUTICAL APPROACHES IN NORMOCOMPLEMENTEMIC LYMPHOCYTIC URTICARIAL VASCULITIS

We performed the clinical, laboratorial and histologic characterization of normocomplementemic lymphocyte urticarial vasculitis. The diagnosis limitations result of the similar clinical pattern with non-vasculitis chronic idiopathic

1. Assistente Imuno-Alergologia. HUC
2. Assistente de Anatomia Patológia. HUC
3. Assistente de Imuno-Alergologia. HUC
4. Técnico de Imunocitoquímica. HUC
5. Assistente graduado de Imuno-Alergologia. HUC
6. Directora do Serviço de Anatomia Patológica. HUC
7. Chefe de Serviço de Imuno-Alergologia. HUC.

Unidade de Imuno-Alergologia
Serviço de Anatomia Patológica
Hospitais da Universidade de Coimbra

A este trabalho foi atribuído o 1.º Prémio SPAIC UCB/STALLERGENES 1996.

urticaria. The aim of this study was the research of effective and safe pharmacological therapy and, if possible, with cellular modulation on the immunoinflammatory vascular injury in upper dermis, because there isn´t real control by classic therapies at present time.

51 patients, of both sex, were studied with normocomplementemic lymphocyte urticarial vasculitis diagnosis. After clinical, laboratorial and histological evaluation they were submitted to the following drugs: Group I - sulphasalazine, 15 patients; Group II -methylprednisolone, 21 patients; Group III -dapsone, 9 patients; Group IV -cetirizine, 6 patients. A 16 week prescription was performed in Group I and 12 weeks in the others. In all the groups a beginning study was performed in the beginning and at the final of the therapeutic time, but one aditional biopsy was made in the middle time in Group I and II.

In each group we selected a randomized subgroup in order to phenotyping cells with antibodies anti--CD3, anti-CD45RO and anti-CD15 in a reserve paraffine skin biopsy sample.

A excelent clinical response was obtained in 14:15 patients of Group I at the final study, with a normal skin histology in 14 and sparse lymphocyte perivascular infiltrate in another one. At these time a significant reduction in $CD3^+$ cells has been showed and the $CD45RO^+$ percentual values near normal ranges

Only 5 patients of Group II described complete clinical regression, but no significant histological changes were showed in dermal cell population.

An inadequate clinical, histological and cellular response was observed in patients of Group III and Group IV.

The therapeutical efficacy of sulphasalazine was obtained without side effects and a excelente tolerance, which was maintained after the interruption of the prescription. The clinical control was obtained with a marked cellular modulation effect. The granulocytes didn´t represent a major cell in the pathogenic mechanism in this pathology.

KEY WORDS: normocomplementemic lymphocytic urticarial vasculitis, chronic urticaria, skin histology, lymphocytes, sulphasalazine, methylprednisolone, dapsone, cetirizine.

INTRODUÇÃO

A urticária constitui uma síndrome clínica onde se sobrepõe uma multiplicidade de mecanismos fisiopatológicos, de cujo enquadramento etiopatogénico resulta, na maioria dos doentes estudados, uma impossibilidade de demonstrar uma dualidade causa-efeito ou perspectivar um eficaz esquema terapêutico.

As formas agudas de urticária, com evoluções clínicas inferiores a 6 semanas, representam um acontecimento comum com uma prevalência cumulativa de 15 a 25% na população.[1]

Porém, as formas crónicas com evoluções superiores a 6-8 semanas constituem, maioritariamente, os grupos mais problemáticos, quer do ponto de vista de estudo clínico quer da adequação farmacológica. Efectivamente, nos quadros clínicos sem condicionantes ou desencadeantes supostamente bem definidos, a estratégia e a proposta dos meios complementares de diagnóstico não é plenamente consensual.[1-4]

Nestes doentes propõem-se, classicamente, uma série de exames laboratoriais em consonância com os dados positivos obtidos de um exame físico meticuloso ou, ainda, adequados ao tipo e características da população em estudo. Assim, a abrangência irá depender quer das limitações impostas pelos custos económicos quer da concepção e sensibilização clínica, perante a complexidade multifactorial dos mecanismos fisiopatológicos na urticária. Estas premissas constituem, quanto a nós, os vectores fundamentais da produtividade diagnóstica nos distúrbios com longas evoluções clínicas, e explicam a divergência dos resultados observados em diferentes séries.[2-6]

Em 1995, Ernest Charlesworth escrevia em título que no espectro da urticária nem todas as lesões urticariformes são urticária.[1] Esta afirmação, se bem que consensual, constitui o cerne da extrema dificuldade na comparação e discussão dos resultados de muitas séries. Na verdade, os critérios clínicos da urticária são mais restritivos que os frequentemente aceites, abusivamente, na proposta e emissão diagnóstica.

Assim, no diagnóstico clínico são condições exigíveis a lesão papulosa que consiste numa área de eritema circunscrito, discretamente elevado, de centro claro, que desaparece à digito-pressão, e que, caracteristicamente, se acompanha de prurido. Estas lesões, com distribuição eventualmente generalizada a todo o tegumento cutâneo, têm carácter recorrente e deverão regredir, espontaneamente ou sob acção farmacológica, sem lesão residual em período nunca superior a 24 horas, se bem que possam surgir novas lesões noutros locais. [2,3] Deste modo, cumprindo estas premissas constantes na própria definição de urticária, excluem-se muitas outras dermatoses pruriginosas, as quais numa observação menos cuidada e errónea poderiam vir a englobar-se nesta entidade nosológica.

Face à presença de um doente com o diagnóstico clínico de urticária crónica, esta manifestação cutânea deverá ser entendida e interpretada como um sinal ou sintoma de uma outra patologia orgânica, sistémica ou de tradução exclusiva na pele. Deste modo, no estudo destes doentes é possível a associação a formas subclínicas de patologia autoimune, nomeadamente a

tiroidite autoimune ou conectivopatias, nas quais a sintomatologia cutânea antecede em meses ou anos os critérios clínicos diagnósticos desses distúrbios subjacentes.[2,6] Assim, mesmo nas formas consideradas por muitos como idiopáticas, a ocorrência de fenómenos, ainda que indirectos, de alterações imuno-inflamatórias exclusivas da derme são um acontecimento frequente.[6-10]

O conhecimento paulatino dos mecanismos fisiopatológicos da urticária crónica tem acompanhado, em paralelo, o reconhecimento da importância do sistema imune cutâneo, redefinido em 1993 por Jan D Bos e Martien Kapsenberg.[11] Efectivamente, o orgão cutâneo apresenta todos os elementos necessários a uma resposta imuno-inflamatória, capaz de uma resposta eficaz e completa, podendo conduzir a memória imunológica.[11-13]

Na urticária, o mastócito adquire uma importância relevante quando activado quer por mecanismos IgE quer ainda por factores dependentes de complexos imunes, fracções de complemento, activação do sistema das cininas ou de factores solúveis de mononucleares, HRF, libertadores de histamina.[2,4,14-17] Esta amina, de entre os mediadores pré-formados, detém um papel charneira, condicionando um fenómeno de vasodilatação, de que resulta o eritema e o prurido cutâneo.[2,4] Simultaneamente, a libertação de neuropéptideos das fibras C adjacentes (substância P) e de metabolitos do ácido araquidónico como a PgD_2, o LT-C4 e o PAF, potenciam, de forma sinérgica, o aumento da permeabilidade, coadjuvada pelo efeito da bradicinina resultante da activação do sistema plasmático das cininas.[2,4]

Porém, se o contributo mastocitário é relevante nesta patologia, não deve ser entendido como exclusivo na síntese e libertação de histamina, pois que esta célula é entendida, presentemente, como uma unidade funcional imuno-inflamatória e com repercussões e condicionamentos sobre praticamente todos os elementos celulares intervenientes nos processos alérgicos e neuro-imuno-inflamatórios da pele.[1,18]

A presença, na derme papilar, de mononucleares e linfócitos adjacentes a estruturas vasculares e mastócitos dérmicos tem adquirido um destaque e é assunto de discussão crescente, na tentativa de descrever cabalmente o processo fisiopatológico na urticária. Linfócitos T activados sintetizam IL-3 e GM-CSF com marcada actividade desgranulante do mastócito de ratinho.[1,4,18,19] Da mesma forma, a sua expressão fenotípica é influenciada pela produção diversificada de citocinas e quimiocinas mastocitárias, nomeadamente: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN-γ, TNF-α e GM-CSF, capazes, sob condições particulares, de induzir o switch de TH0 a TH1 ou TH2, com óbvias implicações clínico-patológicas.[20]

Destes pressupostos realça-se um enquadramento celular mais lato no processo imuno-inflamatório na urticária, cujo desenvolvimento ocorre, como referido, na derme papilar, numa unidade morfológica abstracta, denominada a unidade neuro-vascular Fig-1.

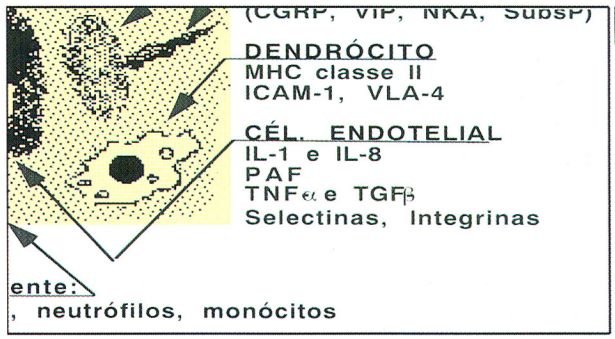


Fig. 1: Unidade neuro-vascular da derme papilar

Este aglomerado celular, centrado em redor de uma ansa vascular, é constituído por todos os elementos celulares fundamentais à prossecução de um diversificado conjunto de processos imunes, alérgicos ou não.[13] Assim, uma activação mastocitária preferencial poderá condicionar, clinicamente, manifestações urticariformes, mas plenamente divergentes dos mecanismos de interactividade celular observados na urticária. Esta é, basicamente, a nossa percepção desde há muito, reforçada em 1995 por Ernest N Charlesworth.[1]

Os estudos de histologia cutânea de biópsia na urticária são fundamentais no esclarecimento fisiopatológico, diagnóstico e terapêutico. Porém, durante vários anos, argumentou-se pela não inclusão deste procedimento na rotina de estudo destes doentes, mas mais recentemente as suas indicações têm sido, progressivamente, alargadas.[1]

Classicamente, na urticária crónica, a histologia da biópsia cutânea é descrita como um edema da derme, dilatação capilar ou venular, associado a um escasso infiltrado perivascular de linfócitos, com presença aumentada de mastócitos mas, ocasional ou esporádico de eosinófilos ou neutrófilos intraluminais aderentes.[2,15,21,22] Porém, do ponto de vista anatomo-patológico, a descrição objectiva das lesões não é pacífica nem concordante. Nas diferentes séries em confronto, e quando comparadas, incorre-se no risco de uma análise de patologias eritemato-papulosas pruriginosas, mas distanciadas, em primeiro lugar, de uma entidade nosológica única.

De facto, correlacionam-se histologias de doentes com processos clínicos *ab initio* de vasculite, com rebate cutâneo predominante das extremidades e com durações médias das lesões superiores a 24 horas, o que, efectivamente, não correponde a um diagnóstico clínico de urticária. Esta condição, básica e fundamental, constitui, quanto a nós, o principal vector da divergência dos resultados nos diferentes estudos.

Por outro lado, as análises comparativas efectuam-se em amostras constituídas por indivíduos com características genéticas e de *habitat* distintas o que não permite excluir eventuais resultados divergentes. Por último, a centralização da leitura dos cortes de histologia cutânea por um ou vários anatomo-patologistas, com responsabilização sistemática dos próprios, constitui critério de estandardização metodológica dos resultados. Parece residir aqui, quanto a nós, a causa dos principais factores de erro na comparação das diferentes séries da literatura.

De forma a ilustrar esta problemática, destaca-se um conjunto de resultados de histologia de biópsia de pele francamente divergentes na urticária crónica idiopática. Assim, Peters e Winkelmann numa série de 241 biópsias referem desde formas *minor* de infiltrados linfocitários perivasculares na derme papilar até formas de infiltrados linfocitários densos e fenómenos de vasculite necrotizante.[23] Nos estudos de Jones são subdivididos em 3 grupos histológicos, nomeadamente: vasculite neutrofílica, infiltrado perivascular polimorfo (neutrófilos, eosinófilos ou mononucleares) e infiltrado linfocitário discreto perivascular.[24] Monroe descreve 20% de fenómenos de vasculite leucocitoclástica numa série de doentes com urticária crónica, sendo os restantes constituídos por infiltrados densos ou escassos de mononucleares.[25] Por outro lado, Phanuphak, de um total de 44 doentes, partindo de uma metodologia menos rigorosa quanto à real lesão vascular, descreve 52% dos doentes com fenómenos de vasculite e 58% com infiltrados perivasculares constituídos por mononucleares (7). No pólo oposto situa-se o grupo de AP Kaplan que em estudo de 1983 descreve numa série de 43 biópsias, apenas 1 caso (2,3%) de fenómenos de vasculite linfocitária.[26]

Como se acaba de descrever, a histologia da urticária crónica idiopática não é uma temática completamente definida e estabelecida. Assim, mesmo em tentativas de catalogação e estandardização mais recentes Murphy considera vários padrões, a saber: urticária propriamente dita, vasculite leucocitoclástica ou venulite de neutrófilos, vasculite urticariana e vasculite linfocitária (Quadro I e Quadro II).[22]

Quadro I:
Critérios histológicos de diagnóstico de dermatite angiocêntrica, eritemato papulosa pruriginosa sem lesão vascular.

Urticária propriamente dita
- infiltrado discreto perivascular:
*linfócitos e neutrófilos
- presença intraluminal de neutrófilos aderentes à membrana endotelial
- edema da derme superior
- ectasia linfática
- lesões ocasionais no interstício de neutrófilos ou fragmentos nucleares.

Quadro II:
Critérios histológicos de diagnóstico de algumas formas de dermatite angiocêntrica, eritemato papulosas pruriginosas com lesão vascular.

Vasculite leucocitoclástica ou venulite de neutrófilos
- infiltrado inflamatório misto superficial:
*com neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (ocasional)
- fragmentos nucleares em redor da parede vascular
- edema endotelial e deposição de fibrina na parede do vaso
- hemorragia perivascular
- alterações epidérmicas secundárias à isquémia:
*vacuolização e/ou necrose da camada basal
Vasculite urticariana
- infiltrado inflamatório misto superficial:
*linfócitos e neutrófilos (ocasional)
- hemorragia perivascular focal
- edema e vacuolização endotelial
- ausência de verdadeira necrose fibrinóide
- persistência clínica superior a 24 horas de cada lesão
Vasculite linfocitária
- infiltrado linfocitário perivenular
- hemorragia perivascular
- depósitos de hemossiderina em formas crónicas
- lesão endotelial variável e necrose fibrinóide.

Os trabalhos de Murphy têm o mérito do enquadramento e definição sistematizada de quadros clínico-anatomo-patológicos. Contudo, continua a denominar de vasculite urticariana lesões clínicas eritemato-papulosas pruriginosas com duração superior a 24 horas, fora, portanto, dos critérios clínicos de urticária. Esta filosofia poderá contribuir, em grande parte, para a enorme contradição dos resultados dos diferentes estudos. De facto, a designação de vasculite urticariforme é muitas vezes colocada abusivamente, tal como refere Kaplan, mas também, ele próprio, entra em confronto e em contradição com as formas de infiltrado e lesão vascular observadas por Phanuphak.[2,7,25]

Importa, pois, fazer-se uma nova tentativa de redefinição nosológica e semântica para a vasculite urticariana. Tal como entendida por Kaplan[2], Monroe[25] ou Soter[27] a redução das fracções do complemento sérico, a presença de complexos imunes circulantes, a relevância de um infiltrado misto de neutrófilos e linfócitos e a persistência clínica de uma lesão em período superior a 24 horas, não deverá ser designada por urticariana (porque não se trata de uma urticária de facto), mas um processo de vasculite com rebate cutâneo exclusivo ou sistémico, quando associada ou no curso clínico de conectivopatia. A vasculite destes doentes deverá, assim, ser designada por urticariforme ou pseudourticariana, mas nunca como urticariana.

Assim, defendemos que o diagnóstico clínico-anatomo-patológico de vasculite urticariana deverá ser atribuído, exclusivamente, a doentes com critérios clínicos de urticária crónica idiopática, nos quais não é possível reconhecer ou definir desencadeantes clínicos e no reconhecimento no estudo histológico da biópsia

cutânea de várias formas de lesão da parede endotelial com necrose fibrinóide, hemorragia perivascular eventual e infiltrado perivascular na derme superior, constituído por linfócitos ou, mais raramente, por neutrófilos. Somente desta forma se poderão explicar quer a baixa incidência de vasculite leucocitoclástica de neutrófilos na série de Kaplan, quer a expressiva incidência (eventualmente excessiva) de vasculite linfocitária observada por Phanuphak.

Nesta perspectiva, e considerando todas as reflexões e requisitos precedentes, o nosso grupo tem vindo a reconhecer na urticária crónica uma área de interesse no âmbito da Imunoalergologia. Assim, de uma série de 184 doentes estudados por esta patologia, anteriormente apresentados[6], com estudo clínico e laboratorial alargado e com estudo histológico sistemático, e realizado sempre pelos mesmos observadores, a presença de vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica constituiu o diagnóstico em 21,2% da totalidade dos doentes. Nesta série, de igual forma foi inexpressiva a vasculite leucocitoclástica ou neutrofílica (1 doente em 184), ainda que a associação a formas subclínicas de patologia auto-imune como tiroidite e conectivopatias fosse de 7,6%.

Numa primeira fase, face à expressão da incidência da vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, com um perfil clínico sobreponível aos restantes doentes com formas crónicas idiopáticas ou outras (de igual modo crónicas) como as associadas a patologia autoimune, procurou-se, sumariamente, a caracterização fenotípica da população celular do infiltrado perivascular e da própria parede endotelial, com recurso a anticorpos monoclonais com especificidade CD20 e CD45RO e policlonais CD3. Assim, compararam-se estes doentes com um grupo testemunha, constituído por doentes com urticárias crónicas idiopáticas não vasculíticas.[28] Nos 14 doentes em estudo foi possível a confirmação de alterações significativas da celularidade em relação aos 5 doentes sem fenómenos de vasculite, nomeadamente pelo aumento absoluto de linfócitos $CD3^+$, pela redução significativa da população de linfócitos T *"priming"* de memória e pela positividade de marcação de linfócitos B, contrastando com a ausência destes no grupo controlo e por uma presença (percentual) predominante de $CD45RO^+$, tal como o observado em histologias de pele normal.

O estudo da celularidade cutânea nestes doentes afastou-se, significativamente, dos observados na urticária crónica idiopática. De facto, nestes últimos observa-se um aumento absoluto de mastócitos, muitos dos quais com aspectos morfológicos de desgranulação, mas também de mononucleares, eles próprios favorecedores de mediadores solúveis histaminolibertadores (HRF).[2,14,29,30] A população de mononucleares é constituída, fundamentalmente, por linfócitos T, com predomínio do fenótipo $CD4^+$, ainda que o índice $CD4^+/CD8^+$ se apresente com valores normais.[2,30] Aparentemente, a população linfocitária T não apresenta marcadores de activação de superfície, nomeadamente IL2R, HLA-DR ou expressão do receptor de transferrina, e representam linfócitos de memória, previamente submetidos a *"priming"*, à semelhança do observado em pele normal de indivíduos saudáveis.[11,28,30] A presença de neutrófilos ou eosinófilos é sempre ocasional e esporádica e estão ausentes, caracteristicamente, linfócitos B.[1,2,28] Nos estudos de Jules Elias e col não foi possível a identificação fenotípica de cerca de 20% dos mononucleares presentes no infiltrado perivascular, questionando-se a presença eventual de linfócitos com receptor de superfície do tipo gd ou, eventualmente, células NK.[2,11,28,31] Assim, genericamente, a histologia cutânea na urticária crónica idiopática é caracterizada por um infiltrado perivascular de maior ou menor densidade, com localização à derme papilar, com integridade da parede do vaso, constituído por linfócitos T e mastócitos[2].

Estes resultados vieram corroborar a diferenciação celular e fisiopatológica dos doentes com formas crónicas de urticária idiopática, em relação aos doentes com formas de vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, ainda que, clinicamente, as lesões cutâneas apresentem uma concordância e similitudes absolutas[28]. Porém, nestes, a resposta clínica às terapêuticas convencionais com antihistamínicos H1 revela-se marcadamente inferior no controlo sintomático das lesões cutâneas e, habitualmente, não apresentam rebate orgânico ou sistémico.[7,8,28,32-35]

Recentemente, na literatura, surgiam de forma paulatina relatos clínicos, não controlados, de instituição de terapêuticas alternativas aos antihistamínicos H1 em formas resistentes, mas não perfeitamente caracterizadas laboratorialmente.[1,36] Da análise dos diferentes trabalhos, ainda que não abordando esta temática, foi patente a tentativa de instituição e prescrição de fármacos alternativos no controlo de formas severas de urticária e/ /ou angioedema, vasculites leucocitoclásticas ou vasculites cutâneas pruriginosas (pseudourticariana ou urticariformes).

Assim, o reconhecimento em doentes com formas severas de urticária crónica idiopática de um auto-anticorpo-IgG para o receptor de alta afinidade de IgE ($Fc\varepsilon RI\alpha$) presente no mastócito dérmico, descrito em 1993 por Malcon W Greaves, resultou na instituição de novas abordagens terapêuticas.[37-39] A utilização de plasmaferese como tentativa de redução desta IgG anti-$Fc\varepsilon RI$, além do elevado custo de hospitalização, revelou-se eficaz no controlo sintomatológico, mas com efeito transitório e fugaz.[40]

Numa série de 4 doentes, resistentes aos anti-histamínicos H1 e com necessidades diárias ou muito frequentes de corticosteróides sistémicos para controlo sintomático, a prescrição de estanazol foi eficaz num grupo de 4 doentes[41]. Outra estratégia consistiu no recurso à administração de imunoglobulinas intravenosas, com os

resultados muito díspares e acarretando elevados custos terapêuticos.[42] Também a ciclosporina A em baixas doses, ainda que bem tolerada, apresentou um marcado efeito *"rebound"*, após a suspensão.[43]

Em relação às formas cutâneas de vasculite leucocitoclástica hipocomplementémica pseudourticariana, associada na maioria dos casos a conectivopatias, a corticoterapia sistémica é a terapêutica de eleição.[2,44,45] As doses requeridas são elevadas até ser obtida a remissão sintomatológica, mas muitos doentes apresentam recorrência após o *terminus* de longos períodos de tratamento e outros, ainda, não descrevem melhoria.[1,4] Desta forma, foram sendo ensaiados, sucessivamente, outros fármacos, a maioria dos quais provavelmente em tentativas de recurso.

A colchicina, com um marcado efeito inibidor do neutrófilo, possibilitou o controlo clínico em várias séries de doentes estudados.[32,46,47] A associação de dapsona, particularmente em doentes com lupus sistémico, parece constituir uma boa opção na remissão das queixas cutâneas.[44,48] Outros autores associaram quer hidroxicloroquina, com resultados favoráveis em alguns doentes, quer imunossupressores, em formas graves corticodependentes ou corticorresistentes (metotrexato, azatioprina ou ciclofosfamida) quer terapêuticas empíricas com indometacina, pressupondo ser relevante a inibição enzimática da ciclooxigenase sintetase no processo fisiopatológico dessa vasculite.[34,44,49,50]

Como anteriormente descrito, os doentes com vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica são resistentes aos esquemas clássicos com antihistamínicos H1, não sendo consensual ou sistematizado um esquema farmacológico adequado. Torna-se, pois, urgente e aliciante a procura de uma resposta clínico-terapêutica eficaz.

Face às múltiplas alternativas terapêuticas nas manifestações cutâneas de urticária crónica, vasculite urticariana e formas de pseudourticária (com fenómenos de vasculite leucocitoclástica) pretendemos, neste trabalho, avaliar comparativamente a eficácia de 4 fármacos na vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica. Os critérios de escolha assentaram, basicamente, no prévio conhecimento da população celular do infiltrado, tentando adequar tanto quanto possível a selectividade de mecanismos de acção farmacológica.[28] Assim, seleccionamos a cetirizina, a metilprednisolona, a dapsona e a sulfassalazina.

A cetirizina representa um antihistamínico H1 não sedativo pela relativa insolubilidade lipídica, resultante da modificação química da molécula original, a hidroxizina.[1,16,51-53] Constitui um fármaco de referência na terapêutica da urticária e outras dermatoses pruriginosas pela potência farmacológica efectiva, pelo rápido início de acção e pela eventual actividade antialérgica na inibição do influxo de eosinófilos por redução da expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1.[54,55] Desta forma, o potente antagonismo com a histamina, responsável pelo prurido e iniciadora do arco reflexo subjacente ao eritema e pápula, e as implicações no tráfico celular, por regulação das moléculas de adesão, constituiram factores consentâneos com esta opção terapêutica nos nossos doentes. O prévio conhecimento de uma significativa população linfocitária não específica para $CD45RO^+$ representou um argumento adicional.[28] Efectivamente, a cetirizina, ao inibir a fase inicial do fluxo linfocitário aos tecidos, resultante da selectividade de linfócitos *"naïve"*, $CD45RA^+$, e células NK às moléculas endoteliais VCAM-1, poderá, eventualmente, constituir um mecanismo bloqueador da posterior ligação tecidular ao contrarreceptor VLA-4, do grupo das integrinas.[55,56]

Neste estudo, a selecção da metilprednisolona assentou, basicamente, na própria imagem histológica da vasculite linfocitária, ainda que as determinações das fracções séricas do complemento fossem normais e inexistentes alterações sistémicas ou do exame físico. Este corticosteróide, com potente actividade anti-inflamatória e baixa retenção salina, por isso mesmo adequado a terapêuticas relativamente prolongadas, apresenta um potente efeito inibitório na célulaT, mais evidente na célula $CD4^+$.[57-59] Porém, ainda que em estudo anterior não fosse efectuada esta marcação fenotípica, o diferencial de linfócitos não $CD45RO^+$ permite inferir da presença quer de células T *"naïve"* quer de células NK, ambas negativamente influenciadas por estes fármacos nas funções secretora, moduladora e efectora específica.[28,57] Em relação ao tráfico celular, se os estudos *in vitro* não provam, isoladamente, a inibição da expressão de ICAM-1 ou VCAM-1, *in vivo*, a eventual redução dos estímulos activadores endoteliais (IL-1, IL-4 e TNF-α) poderá constituir factor fundamental na contenção linfocitária presente na derme destes doentes.[56,57]

Em relação à dapsona, instituída nos doentes deste estudo, a fundamentação farmacológica deveu-se ao efeito imunossupressor no linfócito T, com inibição da proliferação induzida *in vitro* pela fitohemaglutinina e à inibição da desgranulação mastocitária.[60-63] Porém, o efeito inibitório mais importante parece exercer-se no neutrófilo, nomeadamente no efeito redutor da síntese e libertação de enzimas lisossomais e hidrolíticas, bem como na regulação negativa da própria maturação celular por supressão da quimiocina macrofágica, IL-8, necessária quer à viabilidade celular quer ao quimiotactismo e diapedese tecidular.[60,61] Estes mecanismos são de algum modo justificativos da eficácia desta sulfona em doentes portadores de outras formas de vasculite cutânea, com potente infiltração neutrofílica, fenómenos de leucocitoclasia e quadros clínicos pseudourticarianos, habitualmente descritos em doentes com quadros clínicos evolutivos de conectivopatias, com marcadas reduções das fracções

circulantes do complemento sérico.[4,48] Neste contexto, a nossa expectativa inicial, nestes doentes com vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, no que concerne à eficácia deste fármaco foi, desde início, moderada, pelo que foi incluído um grupo diminuto.

A sulfassalazina, desenvolvida na década de 30 para tratamento da "poliartrite reumática", entendida até então como patologia de etiologia infecciosa, rapidamente assumiu um lugar charneira na terapêutica da doença inflamatória crónica intestinal.[64,65] A ampla aplicação farmacológica na artrite reumatóide e na colite ulcerosa tem permitido uma aquisição progressiva no conhecimento da farmacodinâmica, margem de segurança, indicações, secundarismos farmacológicos e mecanismos de acção.[66,67]

Para além da actividade anti-inflamatória dependente da *clearance* de radicais livres de oxigénio e da intervenção no metabolismo do ácido araquidónico dos fosfolípidos de membrana, com inibição dupla da ciclo e da lipooxigenase, são reconhecidas múltiplas implicações celulares.[65,66] A quimioluminiscência, a actividade mieloperoxidase e a libertação lisossómica do neutrófilo são significativamente reduzidas, mas quer a activação plaquetar quer o quimiotactismo e a capacidade fagocítica dos mononucleares são, da mesma forma, negativamente influenciados.[65] Outras células envolvidas no mecanismo de acção são o linfócito e o mastócito. Este último apresenta, *in vitro*, uma maior resistência à desgranulação induzida e é menor a concentração de histamina libertada.[68,69] Em relação ao linfócito, a célula B sofre inibição da anticorpopoiese, demonstrada pela resposta ao *pokeweed*, e a célula T uma redução da proliferação à fitohemaglutinina e da activação subsequente, nomeadamente na síntese citocínica, ainda que sem interferência nas contagens celulares totais.[65,66,70-72]

A publicação de Adrian Jaffer, em 1991, representou, efectivamente, uma enorme surpresa e um estímulo à reflexão das novas-velhas potencialidades farmacológicas da sulfassalazina.[73] Em 2 dos 3 doentes, sumariamente apresentados com formas severas e corticodependentes, sem referência a histologia de biópsia cutânea, foi negada a presença de vasculite. Em todos eles foram descritos valores normais do complemento sérico, mas o controlo clínico-terapêutico careceu de uma explicação consistente. Neste contexto, presumimos pela presença eventual de um processo de vasculite linfocitária e estabelecemos um programa de estudo prospectivo no âmbito da terapêutica desta patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes

Foram seleccionados, aleatoriamente, da consulta de urticária e alergia cutânea, da Unidade de Imuno-Alergologia, 51 doentes, de ambos os sexos, com o diagnóstico de vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica. Nesta série, 33 do sexo feminino e 18 do sexo masculino, a duração média dos sintomas foi de 22±27 meses. A média de idades nesta amostra foi de 36,8±14,5 anos, sem diferença estatística entre os sexos (F= 36,2±10,4 anos e M= 37,9±20,4 anos; p=0,72).

Todos os doentes cumpriam, em simultâneo, os critérios clínicos e histológicos consentâneos com este diagnóstico.

Critérios clínicos:

- Lesões eritemato-papulosas pruriginosas recorrentes.
- Duração de cada lesão inferior a 24 horas.
- Desaparecimento à digito-pressão.
- Duração clínica superior a 8 semanas.
- Ausência de lesão residual.
- Deficiente *compliance* à terapêutica anti-histamínica sistémica.

Critérios histológicos:

- Lesões localizadas à derme papilar.
- Presença de necrose da parede vascular.
- Infiltração linfocitária da parede vascular.
- Hemorragia perivascular
- Presença de infiltrado celular, linfocitário, perivascular.

A totalidade dos doentes descrevia quadro clínico indistinguível dos restantes indivíduos observados em consulta com o diagnóstico de urticária crónica não vasculítica. Porém, a resposta terapêutica aos anti-histamínicos sistémicos foi, sistematicamente, considerada parcial ou ineficaz e não foram reconhecidos desencadeantes clínicos. Para a caracterização nosológica procedeu-se a exame clínico exaustivo, de modo a excluir patologia sistémica concomitante. Da mesma forma, estes doentes foram submetidos a estudo laboratorial alargado e dirigido aos mecanismos fisiopatológicos condicionantes mais frequentes na urticária:

- Fórmula leucocitária e hemograma.
- Bioquímica sanguínea (glicémia, ionograma, exame da função renal e da função hepática).
- Imunoglobulinas séricas IgG, IgA, IgM (nefelometria) e IgE (CAP-system).
- Estudo do complemento: C3 e C4 (nefelometria) e actividade hemolítica total (CH100).
- Autoanticorpos em imunofluorescência em células HEp2.
- Estudo da função tiroideia: T3, T4 e TSH (RIA); anticorpos anti-TMS e anti-HTG (RIA).
- Testes cutâneos de alergia por *Prick* a aeroalergénos comuns.

Nos 51 doentes seleccionados, as determinações de C3, C4 e CH100 apresentavam valores reportados aos limites de referência técnica. Em relação às concentrações de IgE total obteve-se um valor médio de 135±98KU/L [<70KU/L] sendo negativos os testes cutâneos por *prick*. Os restantes parâmetros analíticos não apresentaram alterações.

METODOLOGIA

Na sequência da caracterização clínica, laboratorial e enquadramento diagnóstico foram consideradas 4 estratégias terapêuticas com os seguintes fármacos: sulfassalazina, metilprednisolona, dapsona e cetirizina. O período de estudo previamente definido foi de 12 semanas excepto nos doentes submetidos a sulfassalazina, o qual se estendeu por um período de 16 semanas. O decurso desta avaliação clínica ocorreu em períodos distintos, razão porque, face ao desconhecimento da eficácia desta última terapêutica, se ponderou e se decidiu por este prolongamento.

De forma independente do sexo, idade ou da duração das lesões, foram estudados os seguintes grupos:

Grupo I: 15 doentes submetidos a sulfassalazina na dose de 1500mg diários, divididos em três tomas.

Grupo II: 21 doentes submetidos a metilprednisolona na dose média de 16mg diários nas primeiras 6 semanas e uma dose média de 8mg diários nas restantes 6 semanas.

Grupo III: 9 doentes submetidos a dapsona na dose de 100mg diários, em toma única matinal.

Grupo IV: 6 doentes submetidos a cetirizina na dose de 15mg diários, divididos em duas tomas (10 + 5mg).

Todos os doentes foram submetidos a vigilância clínica periódica, cada 15 dias, com monitorização dos sintomas, exame físico, *compliance* terapêutica e avaliação laboratorial de hemograma, fórmula leucocitária, bioquímica sanguínea (glicémia, ionograma, exame da função renal e da função hepática).

A biópsia cutânea foi realizada sob anestesia local com lidocaína a 2%, utilizando um *skin punch biopsy* (Stiefel Lab SRL, Italy) de 8mm de diâmetro, obtendo-se, posteriormente, 2 fragmentos: um sujeito a fixação por formol a 2% e outro submetido a ultracongelação a -70°C (fragmento de reserva). Na amostra fixada procedeu-se à manipulação e coloração com hematoxilina-eosina, segundo as técnicas comuns, seguida de observação em microscopia óptica (Zeiss) em ampliação de 200 vezes. Estes procedimentos foram realizados em todos os doentes do Grupo I (sulfassalazina) às 0, 8 e 16 semanas, no Grupo II (metilprednisolona) às 0, 6 e 12 semanas, e nos Grupos III e IV (respectivamente dapsona e cetirizina) às 0 e 12 semanas.

Num mesmo tempo, mas numa fase subsequente, procedeu-se, aleatoriamente, à selecção de uma subamostra, constituída pelo estudo dos fragmentos parafinados de histologia cutânea de biópsia de 9 doentes submetidos a sulfassalazina, 5 doentes com metilprednisolona, 4 doentes com cetirizina e 3 doentes com dapsona. Nestas amostras, nas 3 fases do estudo (inicial, intercalar e final) dos Grupos I e II e nas 2 fases do estudo (inicial e final), nos Grupos III e IV, foram desenvolvidos estudos de imunocitoquímica.

A partir do fragmento parafinado foram realizados cortes finos para posterior marcação celular de linfócitos e polimorfonucleares, com recurso a anticorpos monoclonais com afinidade específica para o receptor CD45RO e CD15 e policlonais específicos CD3, do Laboratório Dako A/S Denmark, respectivamente M-742 (clone UCHL-1), M-733 (clone C3D-1) e A452.

A tipagem celular foi efectuada pelo método de Avidina-Biotina-HRP que consiste em 74:

1 - Desparafinação e hidratação
2 - Digestão enzimática (só para CD3) com protease a 0,1%: 10 minutos
3 - Lavagem em PBS
4 - Incubação em H2O2 a 3% em água destilada: 15 minutos
5 - Lavagem em PBS
6 - Bloqueio das ligações não específicas com soro de porco normal: 20 minutos
7 - Aplicação do anticorpo: 30 minutos.
CD3 (DAKO A-452) 1/100 em PBS
CD45RO (DAKO M742) 1/70 em PBS
CD15 (DAKO M733) 1/70 em PBS
8 - Lavagem em PBS
9 - Incubação em soro de porco anti-cabra, coelho, ratinho biotinilado (DAKO E453) 1/120 em PBS: 30 minutos
10 - Lavagem em PBS
11 - Incubação com Avidina/HRP (DAKO P 364) 1/400: 30 minutos
12 - Lavagem em PBS
13 - Incubação com solução de substracto cromogénico DAB-3mg/5ml de PBS+100µl de H2O2: 10 minutos
14 - Lavagem com água destilada
15 - Contrastação com Hematoxilina de Meyer: 10 minutos
16 - Lavagem em água corrente, deixando azular
17 - Desidratação e montagem em meio sintético
18 - Marcação a castanho das ligações específicas.

O controlo de qualidade da marcação linfocitária foi efectuado em cortes de amígdala para as ligações CD3 e CD45RO e em medula óssea para CD15.

A leitura das lâminas foi efectuada em microscopia óptica (Zeiss), com ampliação de 400 vezes, com contagem dos linfócitos e polimorfonucleares cutâneos, em 3 campos consecutivos da direita para a esquerda, sob monitor de TV, sempre com os mesmos dois observadores em simultâneo. O resultado final foi expresso em número absoluto por lâmina, por marcador e em valor percentual para cada marcador e em cada doente.

O estudo estatístico foi realizada em Statview graphics, com análise e determinação da média aritmética, desvio padrão e aplicação de *t-teste* para variáveis não emparelhadas e análise das variâncias por ANOVA.

RESULTADOS

Durante o período de estudo, nos 4 grupos submetidos aos esquemas terapêuticos descritos, não foram observados secundarismos farmacológicos significativos ou alterações dos parâmetros laboratoriais em análise: hemograma, fórmula leucocitária, bioquímica sanguínea (glicémia, ionograma, exame da função renal e da função hepática).

Em relação à evolução clínica destes doentes, em resposta aos diferentes grupos terapêuticos em estudo, observou-se o seguinte:

- **Grupo I:** sulfassalazina, 15 doentes.
  - 12 doentes assintomáticos após 2 semanas do início da terapêutica.
  - 2 doentes assintomáticos após 3 semanas do início da terapêutica.
  - 1 doente com controlo clínico parcial durante todo o período terapêutico.
  - 1 doente com reinício dos sintomas, após 15 dias do *terminus* do período terapêutico, descrevendo, anteriormente, uma excelente resposta clínica.
- **Grupo II:** metilprednisolona, 21 doentes
  - 5 doentes assintomáticos após 1 semana do início da terapêutica.
  - 11 doentes com controlo clínico parcial durante todo o período terapêutico.
  - 5 doentes sem resposta terapêutica durante todo o período de estudo.
  - 12 doentes com retorno ao perfil clínico anterior ao início do período terapêutico.
- **Grupo III:** dapsona, 9 doentes
  - 6 doentes com controlo clínico parcial durante todo o período terapêutico.
  - 2 doentes com retorno ao perfil clínico anterior ao início do período terapêutico.
- **Grupo IV:** cetirizina, 6 doentes
  - 1 doente assintomático após 3 semanas do início da terapêutica.
  - 4 doentes com controlo clínico parcial durante todo o período terapêutico.
  - 1 doente sem resposta terapêutica durante todo o período terapêutico.

Em relação ao estudo histológico de biópsia cutânea, com coloração por hematoxilina-eosina, observou-se, no decurso do estudo, a evolução expressa na Fig-2.

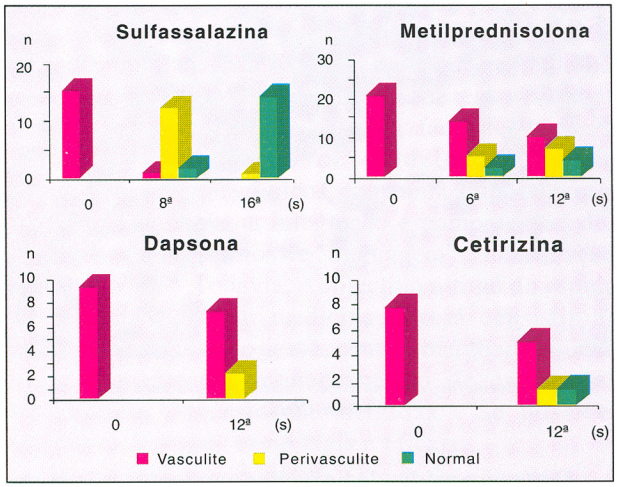


Fig. 2: Evolução da histologia de biópsia cutânea por hematoxilina-eosina nos 4 grupos de doentes

De facto, dos 15 doentes submetidos a sulfassalazina com vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica observou-se uma resolução histológica total em 14 indivíduos. Na biópsia intercalar, realizada à 8.ª semana, somente um doente persistia com fenómenos de vasculite linfocitária, tendo ocorrido um *switch* de lesão da parede vascular para infiltrado perivascular em 12 dos 15 doentes. Nesta fase, 2 indivíduos apresentavam um estudo histológico compatível com histologia normal.

Nos 21 doentes do Grupo II, medicados com metilprednisolona, no *terminus* da 12.ª semana, 10 mantinham lesões de vasculite linfocitária mas 4 apresentavam histologias normais, 2 dos quais já observadas no estudo realizado à 6.ª semana de tratamento.

A terapêutica com dapsona, Grupo III, não condicionou modificações histológicas significativas, pois que 7 dos 9 doentes mantinham lesões de vasculite após 12 semanas de tratamento. Da mesma forma, nos doentes com cetirizina, Grupo IV, ainda que 1 doente revertesse para uma histologia normal, 2/3 dos doentes mantinham vasculite linfocitária no final do período terapêutico.

Em relação aos estudos de imunocitoquímica, realizados respectivamente em 9:15 doentes do Grupo I (sulfassalazina), 4:21 doentes do Grupo II

(metilprednisolona), 3:9 doentes do Grupo III (dapsona) e 4:6 doentes do Grupo IV (cetirizina), nas diferentes fases do estudo, para a marcação celular de polimorfonucleares por CD15, somente em 1 doente na biópsia inicial, posteriormente submetido a sulfassalazina, foi possível demonstrar a presença de eosinófilos Fig-3.

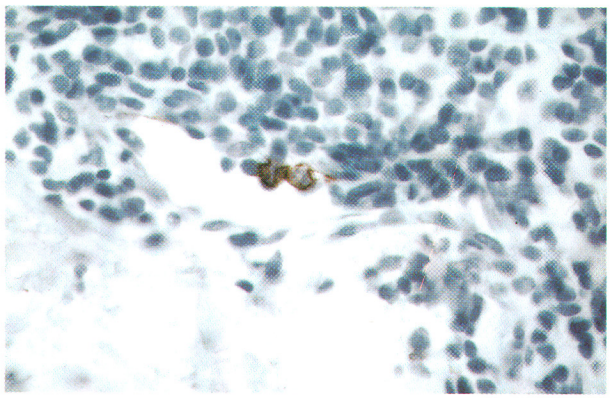


Fig. 3: Eosinófilo, com marcação celular positiva para o anticorpo anti-CD15⁺

O número médio de linfócitos por doente foi obtido, em cada uma das fases de estudo, a partir do número total de linfócitos presentes nas 3 lâminas (para cada marcação fenotípica). A análise dos resultados permite observar uma redução significativa e progressiva nos doentes do Grupo I (sulfassalazina), com significância estatística, (p=0.0001), aplicando o ANOVA-test. Nos restantes grupos, após terapêutica, somente nos indivíduos submetidos a cetirizina o número médio final de linfócitos foi inferior, mas sem significância estatística, Fig-4.

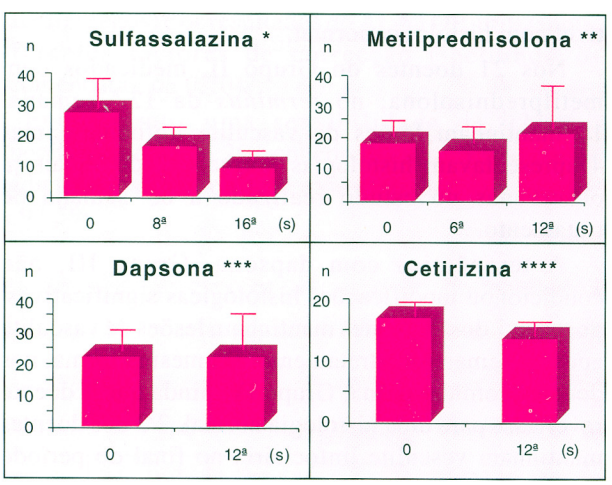


Fig. 4: Número médio de linfócitos presentes nas 3 lâminas (estudo de imunocitoquímica) por doente nos 4 grupos de estudo, no decurso das diferentes fases. (p=0,0001; **p=0,704; ***p=0,966; ****p=0,408)*

A análise das marcações CD3 e CD45RO, em valor absoluto e percentual em relação ao número total de mononucleares presentes em cada lâmina e, nas diferentes fases do estudo, apresentou diferenças em relação aos diferentes grupos.

Nos indivíduos do Grupo I, sulfassalazina, observou-se uma redução do número absoluto de CD3⁺, de forma progressiva e com significância estatística, porém sem diferença quando considerado o valor percentual médio por doente e por lâmina, Fig-5. Da mesma forma, o número absoluto de CD45RO⁺ reduziu progressivamente, nas 3 fases de estudo, e assistiu-se a uma elevação percentual da marcação positiva, em relação ao número total de mononucleares linfócitos, Fig-5.

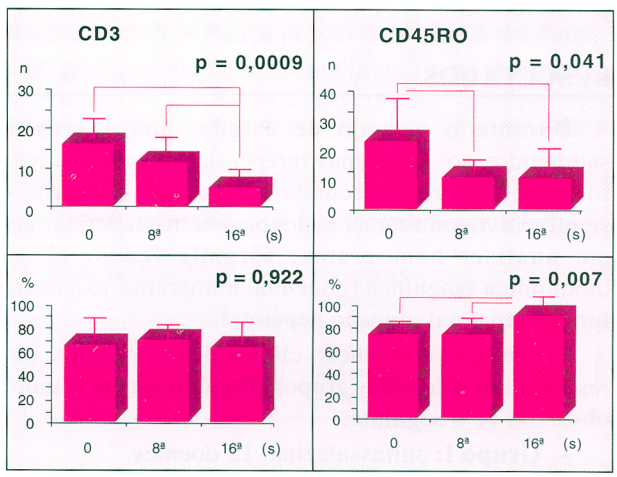


Fig. 5: Tipagem celular na biópsia cutânea com anticorpos anti-CD3 e anti-CD45RO nos doentes do Grupo I (sulfassalazina), nas diferentes fases de estudo: inicial, 8.ª semana e 16ª semana.

No Grupo II, metilprednisolona, a redução do número absoluto e percentual de linfócitos T, CD3⁺, não apresentou diferenças estatisticamente significativas nas 3 fases de estudo. Para os linfócitos com fenótipo de memória, CD45RO⁺, o valor percentual foi semelhante, Fig-6.

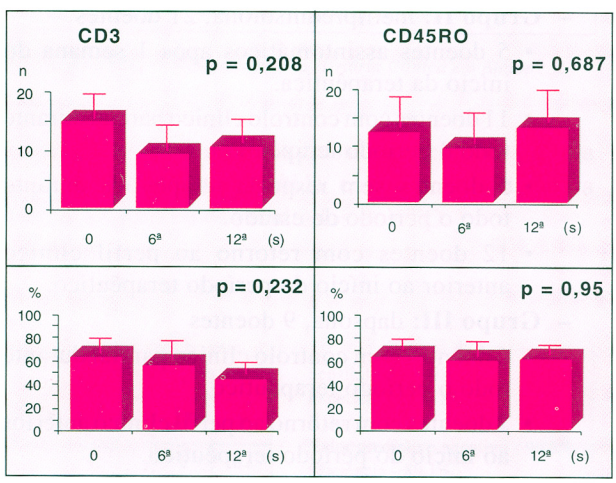
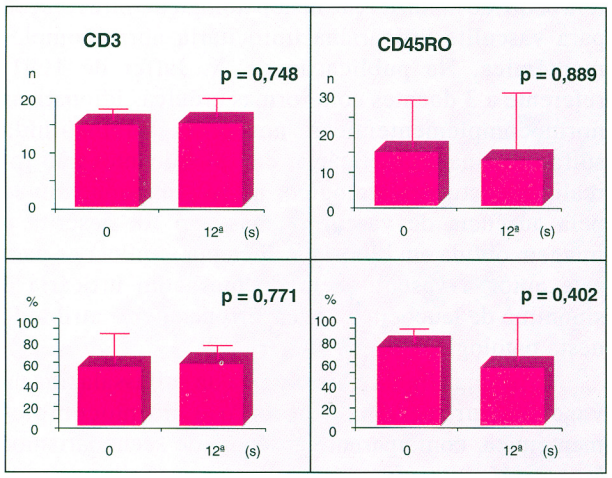


Fig. 6: Tipagem celular na biópsia cutânea com anticorpos anti-CD3 e anti-CD45RO nos doentes do Grupo II (metilprednisolona), nas diferentes fases de estudo: inicial, 6ª semana e 12ª semana.

Nos doentes do Grupo III, dapsona, assistiu-se, mesmo, a uma elevação do número total de células $CD3^+$ e a uma redução do valor percentual de linfócitos CD45RO, Fig-7.

1
2
3



1
2
3

Fig. 7: Tipagem celular na biópsia cutânea com anticorpos anti-CD3 e anti-CD45RO nos doentes do Grupo III (dapsona), nas duas fases de estudo: inicial e 12.ª semana.

Nos doentes submetidos a cetirizina, Grupo IV, ainda que se tenha observado uma redução do número total de linfócitos $CD3^+$ e uma elevação do valor percentual de $CD45RO^+$, esses resultados não apresentaram significância estatística, embora o número de doentes estudados tenha sido muito reduzido, Fig-8.

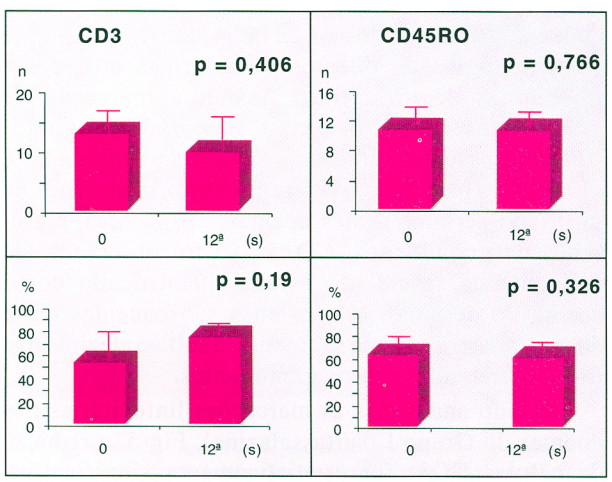


Fig. 8: Tipagem celular na biópsia cutânea com anticorpos anti-CD3 e anti-CD45RO nos doentes do Grupo IV (cetirizina), nas duas fases de estudo: inicial e 12.ª semana.

DISCUSSÃO

Este estudo assenta, basicamente, na aplicação clínico-terapêutica de um programa protocolado, desde há alguns anos em execução, no âmbito da investigação clínico-laboratorial da pele como orgão relevante em Alergologia e Imunologia Clínica, quer pela diversidade de patologias intrínsecas quer, ainda, porque é muitas vezes espelho de distúrbios sistémicos ou específicos de orgão.

O reconhecimento, desde 1986, da pele como o mais extenso sistema imune (organizado nas diferentes vertentes celulares e de todo o conjunto de mediadores, co-sinais e estímulos possibilitadores de resposta imune completa e de memória) e o seu fácil acesso, tem permitido a execução de modelos de estudo experimentais e/ou clínicos com uma importância e relevância ímpares na integração e compreensão dos complexos mecanismos de "linguagem" e interrelação celular. [11,12,75-78] Todavia, o objectivo último do estudo da fisiopatologia em medicina deverá consistir na aplicação da aquisição desses conhecimentos ao doente, nomeadamente no enquadramento de estratégias terapêuticas concertadas, dirigidas e se possível selectivas, seguras, exequíveis e eficazes.

Neste contexto, a prévia caracterização clínica e tipagem, sumária, da população celular envolvida na vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, a prevalência significativa e a efectiva insatisfação na proposta terapêutica, até então instituída nestes doentes, constituiram o vector major na procura de metodologias dirigidas ao controlo clínico e sintomático.

Como anteriormente reafirmamos, as lesões cutâneas de eritema papuloso, circunscrito, pruriginoso, recorrente, com regressão à digito pressão e com duração de cada lesão inferior a 24 horas, são, clinicamente, indistinguíveis das observadas em doentes com formas crónicas de urticária idiopática. Por conseguinte, o diagnóstico surge, na primeira abordagem, exclusivamente por presunção face à significativa incidência, uma vez que se torna imperioso um estudo histológico e avaliação clínica e laboratorial abrangente. Assim, atendendo a estas premissas, são excluídos quase todos os falsos diagnósticos de urticária, os quais, esses sim, se acompanham de activação e hipocomplementémia, cursam, habitualmente, com fenómenos de vasculite leucocitoclásica, dependentes quase sempre de patologia sistémica auto-imune. [1,2,8,44,45]

Este espectro multicelular abrangente e os resultados iniciais de Jaffer foram indiscutivelmente decisivos na concepção protocolada do presente estudo, numa entidade nosológica com características clínicas, laboratoriais e histológicas muito particulares, ainda não completamente bem caracterizada, mas para a qual não existia, em absoluto, uma resposta clínico-terapêutica adequada, segura e eficaz.

Nos 15 doentes do grupo I (sulfassalazina) a resposta clínica à terapêutica foi excelente e com uma rápida regressão sintomatológica. Este efeito foi observado e mantido em 13 doentes nos 6 meses posteriores ao *terminus* do período de tratamento. Nas doses instituídas, como de alguma forma era previsível, não foram observados secundarismos farmacológicos ou alterações nos parâmetros laboratoriais estudados.[66] Em relação aos doentes do Grupo II, submetidos a metilprednisolona sistémica, a resposta clínica foi manifestamente insuficiente, pois que apenas 5 dos 21 doentes obtiveram remissão sintomatológica. Dos restantes 76,2%, 11 doentes, ainda que persistissem lesões cutâneas durante o período de estudo, estas foram de menor intensidade e gravidade. Porém, quando comparados os Grupos I e II é notório um aparente efeito *"rebound"* post terapêutico, com 12:21 doentes do Grupo II e 1:15 doentes do Grupo I a descreverem um retorno ao perfil clínico inicial.

Em relação aos doentes do Grupo III e Grupo IV, submetidos respectivamente a dapsona e cetirizina, a resposta clínica foi muito limitada, ainda que mais favorável com este último.

A avaliação clínica dos doentes do Grupo I (sulfassalazina) no decurso do período de tratamento, comprovativa de uma eficaz adequação farmacológica era, ela própria, sugestiva de uma favorável evolução histológica. No controlo de biópsia realizado à 8.ª semana em 12 doentes observava-se um infiltrado perivascular de linfócitos, em outros 2 uma histologia cutânea descrita como normal e somente em 1 doente persitiam imagens de vasculite urticariana linfocitária. No final do estudo 14 doentes apresentavam histologias consideradas normais e apenas em um existia um infiltrado linfocitário perivascular com densidade considerável, mas sem lesões ou infiltração da parede vascular.

Estes resultados, tal como a evolução clínica, contrastam com os observados nos doentes do Grupo II (metilprednisolona). Nestes, no estudo histológico intermédio, à 6.ª semana, a presença de vasculite urticariana linfocitária persitia em 14, ainda que imagens de infiltrados perivasculares de linfócitos e histologias normais fossem observados, respectivamente em, 5 e 2 doentes. No estudo de biópsia realizado no *terminus* do período terapêutico, cerca de metade dos doentes (10:21) apresentavam lesões vasculíticas. Ainda que fosse previsível uma mais eficiente evolução histológica sob corticoterapia sistémica, a resposta clínica, manifestamente insuficiente, pressupunha a validação destes resultados.

Em relação aos doentes sob dapsona (Grupo III) e cetirizina (Grupo IV) a evolução histológica foi também ela concordante com a resposta clínica, persitindo, após a suspensão farmacológica, lesões de vasculite urticariana linfocitária na maioria dos indivíduos.

Na descrição clínica de R Engler em 1995, um doente com uma forma severa de urticária e angioedema corticodependente, com modificação temporal das características clínicas das lesões, apresentava inicialmente um estudo histológico com edema da derme superior e infiltrado perivascular de linfócitos e eosinófilos.[79] A posterior instituição de sulfassalazina, cerca de um ano depois da avaliação inicial, resultou eficaz. Também, neste doente, fica por esclarecer se terá ocorrido modificação histopatológica com evolução para vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica. Na publicação de A. Jaffer de 1991, referente a 3 doentes com formas crónicas idiopáticas normocomplementémicas, nos quais foi instituída sulfassalazina com eficácia, em dois doentes não foi realizado estudo histológico; no restante concluiu-se pela ausência de vasculite, mas não foi descrita a imagem obtida em biópsia.[73] Fica por explicar se para este autor a vasculite em doentes com urticária é sinónimo de leucocitoclástica, erroneamente atribuída nesta patologia.

A eficácia clínica e histológica da sulfassalazina na vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, com aparente ausência de secundarismos farmacológicos, interpelou-nos a respeito do seu mecanismo de acção e da eventualidade de permitir uma modulação celular. Assim, a caracterização celular nos fragmentos histológicos de reserva, nas diferentes fases do estudo, constituía a forma mais adequada e objectiva à interpretação fisiopatológica dos acontecimentos ocorridos sob o efeito das diferentes terapêuticas.

Os estudos de imunocitoquímica em tecido de histologia cutânea foram realizados, aleatoriamente, em 20 dos 51 doentes de todos os grupos em estudo e de forma independente da resposta clínica e da evolução da histologia em hematoxilina-eosina. Porém, como se referiu anteriormente, nesta entidade patológica a população celular era sumariamente conhecida, sendo o aumento absoluto de células mononucleares maioritariamente $CD3^+$, ainda que o valor percentual de linfócitos T de memória se distanciasse do observado quer em histologias de pele de indivíduos normais quer em histologias de doentes com formas crónicas e idiopáticas de urticária.[28] Assim, a marcação de granulócitos em tecidos com anticorpo anti-$CD15^+$ pareceu-nos uma atitude correcta, tanto mais que é discutível a presença de eosinófilos e/ou neutrófilos no infiltrado dérmico destes doentes.[2,15,21,22] Mas, a presença de granulócitos, $CD15^+$, só foi observada em 1 doente na fase 0 do estudo, identificado como eosinófilo dérmico. Nos exames subsequentes deste doente, posteriormente submetido a sulfassalazina, não foram observados outros granulócitos.

Quando analisadas as marcações linfocitárias nos doentes do Grupo I (sulfassalazina), Fig-5, a redução de células $CD3^+$ foi estatisticamente significativa. Porém, o valor percentual mantém-se inalterável. O número absoluto de linfócitos de memória $CD45RO^+$ sofre uma redução significativa, sendo evidente um

retorno percentual para valores considerados normais no final do período de estudo. Estes resultados comprovam a normalização histológica e a excelente resposta terapêutica, consubstanciada pela presença de $CD45RO^+$ em valores percentuais semelhantes aos observados em histologias de indivíduos normais, tal como se apresenta na evolução histológica de um doente do Grupo I, Fig-9.

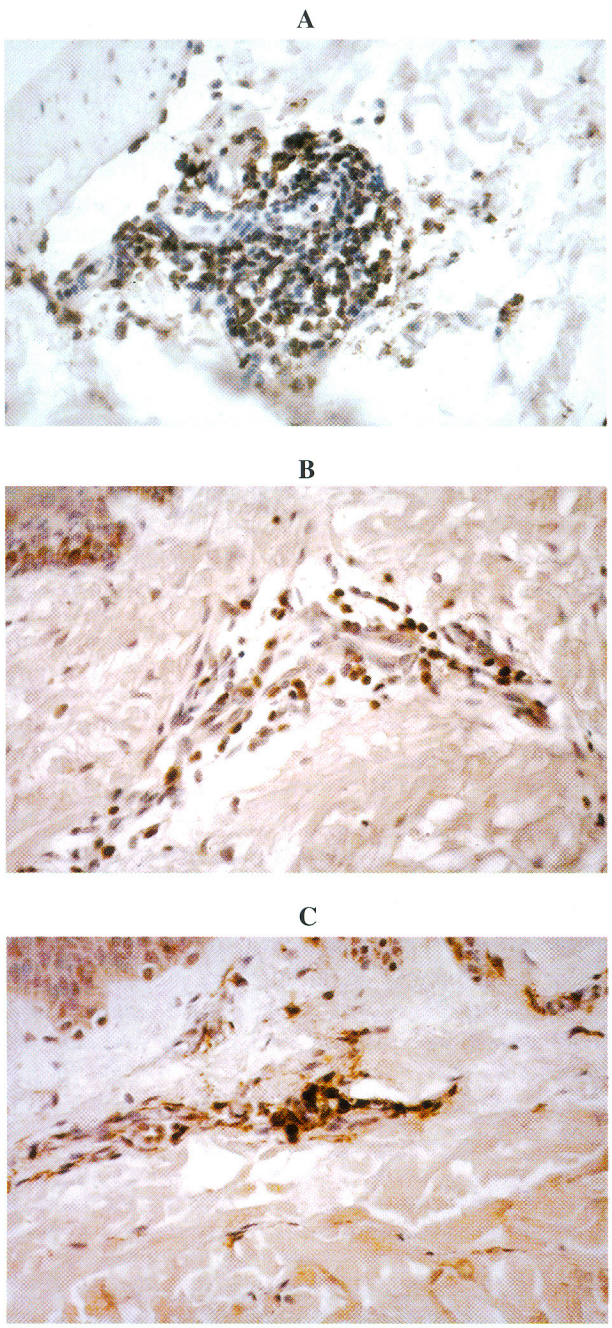


Fig. 9: Estudo sequencial de marcação com anticorpo monoclonal anti-CD45RO, num doente submetido a sulfassalazina
A: Estudo inicial, imagem de vasculite linfocitária em hematoxilina-eosina (HE)
B: Estudo às 8 semanas, imagem de infiltrado perivascular em HE
C: Estudo às 16 semanas, histologia normal em HE

De facto, em condições normais, na unidade neuro--vascular-dérmica a presença de linfócitos *naïve* é esporádica ou ocasional e é pressuposta a existência de uma população específica de células T, a *cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)*, elas próprias de memória, mas com caracterização fenotípica mal definida.[11] Assim, a presença destas células ou a existência de uma população T com TCR-γδ ou, ainda, a presença de outros linfócitos NK poderão justificar o diferencial numérico da marcação fenotípica e o número total de mononucleares linfócitos observados nestes doentes, em fase anterior à instituição terapêutica.

A discriminação das populações $CD4^+$ e $CD8^+$ não foi efectuada neste estudo e desconhecemos o predomínio absoluto ou relativo de cada uma delas. Mas, face à morfologia do infiltrado e à presença maioritária de células $CD3^+$, admitimos a existência de citotoxicidade T , dependente de células NK para a maturação e diferenciação e, ela própria, exercendo uma regulação negativa na actividade NK.[80] Estes mecanismos constituem um argumento que fundamenta a necessidade de estudos adicionais nesta patologia, promovendo a identificação, o reconhecimento e participação eventual destas células no processo fisiopatológico.

Em relação aos linfócitos B, embora não testados neste trabalho, coexistem no infiltrado de doentes com esta patologia, ainda que em valores percentuais modestos, tal como verificamos em estudo anterior.[28]

Na vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica os valores séricos da IgE total são elevados, sem existirem, concomitantemente, estigmas de doença atópica ou positividade a aeroalergénios por IgE específicas (CAP ou por testes cutâneos por *Prick*).[6,10,28] Desconhece-se o significado ou a importância fisiopatológica deste acontecimento ou, ainda, se é admissível a presença de um auto-anticorpo anti-IgE como o identificado nos estudos de M. Hide.[37,38] Porém, a processar-se uma produção local de IgE por linfócitos B activados por um alergénio exógeno ou autólogo cuja repercussão possa, de alguma forma, ser relevante no processo fisiopatológico desta vasculite, a sulfassalazina poderá, eventualmente, inibir essa síntese. Esta interpretação resulta da efectiva redução da anticorpopoiese e da resposta proliferativa B à concavalina-A, observada em doentes com artrite reumatóide medicados com este fármaco.[70]

Para além do efeito modulador da população linfocitária T de memória nestes doentes submetidos a sulfassalazina, a eventual inibição da síntese de IgE por linfócitos B activados, a inibição da desgranulação mastocitária por mecanismo dependente desta imunoglobulina poderá constituir o acontecimento final subjacente ao efectivo controlo clínico.[69]

A corticoterapia partilhava *ab initio* uma expectativa que não veio, posteriormente, a demonstrar-se. Como grupo observou-se uma redução do número de células $CD3^+$, mas globalmente, no final do estudo, não existiram diferenças nos valores médios percentuais da população T de memória (Fig-4 e Fig-6). De facto, a discreta redução a este nível resultou de um doente que apresentou um agravamento clínico marcado, acompanhado de um infiltrado linfocitário maciço na parede do vaso e em áreas adjacentes. Genericamente, nesta patologia esta estratégia terapêutica não demonstrou eficácia clínica nem efeito de modulação celular, resultante da reconhecida multiplicidade de mecanismos sequenciais na resposta imuno-inflamatória exercida a vários níveis.[57-59]

Nos doentes submetidos a dapsona e cetirizina, a inexistência de granulócitos nos infitrados vasculares e perivasculares era, de alguma forma, predictiva da má resposta clínica, pois é conhecida a relativa selectividade celular, respectivamente na inibição de neutrófilos e eosinófilos.[51,52,60,61] Do mesmo modo, ainda que o número de doentes seleccionado tenha sido reduzido, a tipagem nos dois tempos de estudo não permitiu observar modificações celulares relevantes, consentâneas com a modulação linfocitária verificada sob efeito da sulfassalazina. Efectivamente, nos doentes do Grupo IV era previsível um marcado aumento da população $CD45RO^+$ no decurso da terapêutica, na sequência da inibição da expressão endotelial de VCAM-1.[55] Porém, a confirmar-se na pele esta regulação do tráfico celular não constituirá um vector suficiente na contenção do processo patogénico.

Quer na urticária crónica idiopática quer na vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica, a presença de lesões clínicas de eritema, pápula e prurido cutâneo traduzem a importância da histamina libertada pelo mastócito dérmico, mas a cetirizina, com uma potente actividade nos receptores H1 histaminérgicos, não representou uma estratégia terapêutica adequada, pelo que fica demonstrada a relevância dos mononucleares do infiltrado vascular e perivascular nos doentes do nosso estudo.

No contexto fisiopatológico da vasculite urticariana linfocitária, a importância do mastócito não deverá ser desprezível , não só porque este depende de factores de maturação linfocitários T como IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10 (esta última também sintetizada por linfócitos B e queratinócitos), mas também porque é portador de equipamento enzimático capaz de uma polarização da população $CD4^+$ a TH2 e indução da síntese de IgE.[17,81,82]

Para além da importância na defesa às infestações parasitárias e mecanismos de hipersensibilidade imediata, a IgE apresenta um espectro mais vasto, com implicações multicelulares a diferentes níveis, mas com significância fisiopatológica mal definida em muitos distúrbios.[83] Questionamos, assim, qual o significado e repercussão dos valores séricos elevados de IgE nos nossos doentes, para os quais se excluiram os principais condicionantes etiológicos!

Neste estudo a maioria dos doentes são do sexo feminino, não se distanciando, globalmente, da prevalência observada na urticária crónica.[1,6] Também, a idade e a duração dos sintomas não permitem diferenciar a vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica de outras formas não vasculíticas, pelo que uma avaliação alargada é mandatória. Porém, a eventual ineficácia da instituição terapêutica clássica de antihistamínicos H1 é predictiva deste diagnóstico. A divergência clínica e da população celular do infiltrado foi previamente definida e não pretendemos comparar a eficácia das terapêuticas farmacológicas em estudo, com formas crónicas de urticária idiopática.[28] Aliás, um dos agentes, a sulfassalazina, é francamente ineficaz nesses doentes com estudos histológicos não vasculíticos (resultados pessoais não publicados).

Este estudo constituiu um contributo na caracterização clínico-laboratorial, na definição da população celular dérmica e na proposta de um esquema terapêutico eficaz neste distúrbio, embora não esclarecendo em concreto o mecanismo fisiopatológico subjacente. Defendemos a autonomia *ab initio* desta entidade, mas reconhecemos a eventualidade de representar uma forma evolutiva bidireccional de urticária crónica não vasculítica.

Foi nosso propósito encontrar uma metodologia terapêutica adequada, segura, bem tolerada e se possível redutora do processo celular. Face ao conhecimento actual, a ciclosporina-A, a rapamicina ou o FK506 constituem os agentes com uma implicação mais selectiva no linfócito T, mas representam terapêuticas muito agressivas.[84] Os nossos resultados com sulfassalazina preencheram todos os requisitos: o controlo clínico, a facilidade da administração, a ausência de secundarismos farmacológicos, o baixo custo, a modulação histológica e, globalmente, a inexistência de efeito *rebound* pós-tratamento nos 6 meses posteriores. Necessitamos, todavia, de *follow up* mais prolongado para a validação desta metodologia em doentes com vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica.

BIBLIOGRAFIA

1. **Charlesworth EN.** The spectrum of urticaria. All that urticates may not be urticaria. In Urticaria. *Immunology and Allergy Clinics of North America. E.N. Charlesworth Ed.* 1995; 15: 641-57.
2. **Kaplan AP.** Urticaria and Angioedema. In: **Midleton E, Reed CE, Adkinson NF, et al (eds).** *Allergy: Principles and Practice. St. Louis, CV Mosby 4th Ed,* 1993; 1553-80.

3. **Soter NA.** Acute and chronic urticaria and angioedema. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 146-54.
4. **Huston DP, Bressler RB.** Urticaria and Angioedema. *Med Clin North Am* 1992; 76(4): 805-40.
5. **Quaranta JH, Rohr AS, Rachelefsky GS, et al.** The natural history and response to therapy of chronic urticaria and angioedema. *Ann Allergy* 1989; 62:421-4.
6. **Pereira AC, Faria E, Julião MJ, Silva MR, Teixeira Dias E, Pinto Mendes JA.** Urticária crónica: rentabilidade do estudo clínico e laboratorial. *Rev Port Imunoalergol* 1993; 2: 61.
7. **Phanuphak P, Kohler PF, Stanford RE, et al.** Vasculitis in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 65:436-44.
8. **Mehregan DR, Hall MJ, Gibson LE.** Urticarial Vasculitis: a histopathologic and clinical review of 72 cases. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26:441-8.
9. **Cardoso PA, de Oliveira ZP, Alves VA, et al.** Urticarial vasculitis. *Allergol-Immunopathol-Madr* 1990; 18:191-5.
10. **Pereira AC, Loureiro AC, Todo Bom A, Faria E, Pinto Mendes J, Chieira C, Robalo Cordeiro AJA.** Asma e urticária em dissociação clínica. *Rev Port Imunoalergol* 1994; 2: 161-8.
11. **Bos JD, Kapsenberg ML.** The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunology Today* 1993; 14: 75-8.
12. **Charlesworth EN.** The skin as a model to study the pathogenesis of IgE-mediated acute and late-phase responses. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 1240-50.
13. **Holbrook KA, Pincus S, Parker F et al.** Structure function, and immunology of the skin. In: **Midleton E, Reed CE, Ellis FE, Adkinson NF, et al** (eds). *Allergy: Principles and Practice. St. Louis, CV Mosby,* 1993; 390-427.
14. **Palma-Carlos AG, Jordão AL.** Immunopathology of urticaria. *Allergie et Immunologie* 1991; 23(10):443-6.
15. **Bressler RB.** Pathophysiology of chronic urticaria. Immunology and *Allergy Clinics of North America* 1995; 15: 659-77.
16. **Monroe EW.** The role of antihistamines in the treatment of chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 662-5.
17. **Claveau J, Lavoie A, Brunet C, Bédard PM, Hébert J.** Chronic idiopathic urticaria: possible contribution of histamine-releasing factor to pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 132-7.
18. **David B.** New insights into mast cell biology. In Proceedings I of the XVI Eur Cong of Allergology and Clin Immunol. *Ed* **A Basomba and J Sastre**. *Monduzzi Editore, Bologna Italy.* 1995; 49-54.
19. **Wasserman SI.** Mast cell biology. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 590-2.
20. **Church MK, Okayama Y.** Human mast cell surface membrane receptor expression and cytokine production. In Proceedings I of the XVI Eur Cong of Allergology and Clin Immunol. *Ed* **A Basomba and J Sastre**. *Monduzzi Editore, Bologna Italy.* 1995; 55-62.
21. **Lever WF, Schamburg-Lever G.** Histopathology of the skin. *Ed 75 Philadelphia, JB Lippincott.* 1990; 152-3.
22. **Murphy GF.** Angiocentric Dermatitis. In Dermatopathology. **George F Murphy Ed**. *WB Saunders Company Philadelphia USA.* 1995; 123-138.
23. **Peters MS, Winkelmann RK.** Neutrophilic urticaria. *Br J Dermatol* 1985; 113: 25-30.
24. **Jones RR, Bhogal B, Dash A et al.** Urticaria and vasculitis: a continum of histological and imunopathological changes: *Br J Dermatol* 1983; 108: 695-703.
25. **Monroe EW.** Urticarial vasculitis: an updated review. *J Am Acad Dermatol.* 1981; 5: 88-95.
26. **Natbony SF, Phillips M, Elias JM et al.** Histologic studies of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 177-83.
27. **Soter NA.** Urticarial vasculitis. In Urticarias. **Chmpion RH Greaves MW, Kobza-Black A et al Eds.** *Churchill Livingstone, Edimburg.* 1985; 144-7.
28. **Pereira AC, Todo Bom A, Julião MJ et al.** Fenotipagem linfocitária na vasculite urticariana. *Rev Port Imunoalergol* 1995; 3: 77-83
29. **Rosenstreich DL.** Chronic urticaria, activated T cells, and mast cell releasability. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 1099-1102.
30. **Barlow RJ, Ross EL, MacDonald DM, Black AK, Greaves MW.** Mast cells and T Lymphocytes in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 317-22.
31. **Elias J, Boss E, Kaplan AP.** Studies of the cellular infiltrate of chronic idiopathic urticaria: prominence of T-lymphocytes, monocytes, and mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 914-8.
32. **Asherson RA, Buchanan N, Kenwright S, et al.** The normocomplementemic urticarial vasculitis syndrom: report of a case and response to colchicine. *Clin Exp Dermatol* 1991; 16: 424-7.
33. **Hassan ML, Perez-Cejudo JA, del Pino EY, Schroh RG.** Vasculitic urticaria: study of 12 cases. *Med Cutan Ibero Lat Am* 1990; 18:179-84.
34. **Sanchez NP, Winkelmann RK, Schroeter AL, et al.** The clinical and histopathologic spectrums of urticarial vasculitis: a study of forty cases. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 599-605.
35. **Epstein MM, Watsky KL, Lanzi RA.** The role of diet in the treatment of a patient with urticaria and urticarial vasculitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 30: 414-5.
36. **Lawrence ID.** Traditional therapy in chronic urticaria. In Interest section symposia. *Am Acad of Allergy Asthma an Immunol, 52nd Annual Conference* 1996; 83-6.
37. **Hide M, Francis DM, Grattan CEH, et al.** The pathogenesis of chronic idiopathic urticaria: new evidence suggests an auto--immune basis and implications for treatment. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 624-7.
38. **Hide M, Francis DM, Grattan CEH, et al.** Auto antibodies against the high affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *New Eng J Med* 1993; 328: 1599-604.
39. **Greaves MW, O´Donnell BF, Winkelmann RK.** Chronic urticaria-evidence for autoimmunity. *ACI News* 1995; 7: 36-8, 64.
40. **Grattan CEH, Francis DM, Slater NGP, Barlow RJ, Greaves MW.** Plasmapheresis for severe unremitting chronic urticaria. *Lancet* 1992; 339: 1078-80.
41. **Brestel EP, Thrush LB.** The treatment of glucocorticosteroid-dependent chronic urticaria with stanozolol. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 265-9.
42. **O´Donnell BF, Barlow RJ, Black AK, Greaves MW.** Response of severe chronic urticaria to intravenous immunoglobulin (IVIG). *Br J Dermatol* 1994; 131: 23-4.
43. **Barlow RJ, Black AK, Greaves MW.** Treatment of severe chronic urticaria with cylosporin A. *Eur J Dermatol* 1993; 3: 273-5.
44. **Venzor J, Baer SC, Huston DP.** Urticarial vasculitis. In Urticaria. Immunology and Allergy Clinics of North America. *E.N. Charlesworth Ed.* 1995; 15: 761-74.
45. **Stafford CT.** Urticaria as a sign of systemic disease. *Ann Allergy* 1990; 64: 264-70.
46. **Werni RM, Schwartz TH, Gschnait F.** Colchicine treatment of urticarial vasculitis. *Dermatologica* 1986; 172: 36-40.
47. **Wiles JC, Hansen RC, Lynch PJ.** Urticarial vasculitis treated with colchicine. *Arch Dermatol* 1985; 121: 802-5.
48. **Fortson JS, Zone JJ, Hammond ME, et al.** Hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome responsive to dapsone. *J Am Acad Dermatol 1986;* 15: 1437-42.
49. **Lopez LR, Davis KC, Kohler PF, et al.** The hypocomplementemic urticarial-vasculitis syndrome: therapeutic response to hydroxychloroquine. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 600-3.

50. **Stack PS.** Methotrexato for urticarial vasculitis. *Ann Allergy* 1994; 72: 36-8.

51. **Broide D.** Clinical studies with cetirizine in allergic rhinitis and chronic urticaria. *Allergy* 1995; 50: 31-35.

52. **Andri L, Senna GE, Betteli C, Givanni S, Andri G.** A comparison of the efficacy of cetirizine and terfenadine. A double blind controlled study of chronic idiopathic urticaria. *Allergy* 1993; 48: 358-65.

53. **Kennard CD.** Evaluation and treatment of urticaria. In Urticaria. Immunology and Allergy Clinics of North America. *E.N. Charlesworth Ed.* 1995; 15: 785-801.

54. **Estelle F, Sussman GL, Simons KJ.** Effect of the H_2-antagonist cimetidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H1-antagonists hydroxyzine and cetirizine in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 685-93.

55. **Bagnasco M, Canonica GW.** Influence of H1-receptor antagonists on adhesion molecules and cellular traffic. *Allergy* 1995; 50: 17-23.

56. **Picker LJ.** Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secundary lymphoid tissues. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: s47-s54.

57. **Schleimer RP.** Glucocorticosteroides. Their mechanisms of action and use in allergic diseases. In: **Midleton E, Reed CE, Adkinson NF, et al (eds).** *Allergy: Principles and Practice. St. Louis, CV Mosby* 4th Ed, 1993; 893-925.

58. **Dickler HB, Albright FJ.** Immunossupression in the treatment of disease. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 669-76.

59. **Detjen PF.** Corticosteroids in the treatment of allergic diseases. In: **Roy Patterson, Leslie C Grammer, Paul A Greenberger, C Raymond Zeiss (eds).** *Allergic Diseases, diagnosis and management. JB Lippincott Company, Philadelphia,* 4th Ed, 1993, 853-90.

60. **Dapsone Systemic.** *US Pharmacopeial Convention* 1991; 570-3.

61. **Sulfones. Dapsone.** *AHFS Drug Information* 1992; 445-9.

62. **Ghei SK, Sengupta U, Desikan KV.** In vitro effect of DDS on phytohaemagglutinin (PHA)-induced lymphocyte transformation. *Hansen Int* 1980; 5:112-8.

63. **Ruzicka T, Wasserman SI, Soter NA, Printz MP.** Inhibition of rat mast cell arachidonic acid cyclooxygenase by dapsone. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:365-70.

64. **Watkinson G.** Sulphasalazine: a review of 40 years´experience. *Drugs* 1986; 32: 1-11.

65. **Gaginella TS, Walsh RE.** Sulfasalazine. Multiplicity of action. *Digestive Dis and Sciences* 1992; 37: 801-12.

66. **Rains CP, Noble S, Faulds.** Sulfasalazine. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 1995; 50: 137-56.

67. **Cash JM, Klippel JH.** Second-line drug therapy for rheumatoid arthritis. *New Eng J Med* 1994; 330: 1368-75.

68. **Wolf EJ, Fox CC, Kagey-Sobaotka A, Bayless TM, Lechtentstien LM.** Inhibition of histamine release from human mucosal mast cells by drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1985; 88: 1631-5.

69. **Barret KE, Tashof TL, Metcalfe DD.** Inhibition of IgE--mediated mast cell desgranulation by sulphasalazine. *Eur J Pharmacol* 1985; 107: 279-81.

70. **Symmons DP, Salmon M, Farr M, et al.** Sulfasalazine treatment and lymphocyte function in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988; 15: 575-9.

71. **Comer SS, Jasin HE.** In vitro immunomodulatory effects of sulfasalazine and its metabolites. *J Rheumatol* 1988; 15: 580-6.

72. **Samanta A, Webb C, Grindulis KA, et al.** Sulphasalazine therapy in rheumatoid arthritis: qualitative changes in lymphocytes and correlation with clinical response. *Br J Rheumatol* 1992; 31: 259-63.

73. **Jaffer AM.** Sulfasalazine in the treatment of corticosteroid--dependent chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 964-5.

74. **Lathan GR, D´Ardenne AJ.** Routine Laboratory Methods. In: **Stansfeld Ag, D´Ardenne AJ (eds).** Lymph Node Biopsy Interpretation. *London, Longman Group* 1992; 469-81.

75. **Okayama Y, Church MK.** Comparison of the modulatory effect of ketotifen, sodium cromoglycate, procaterol and salbutamol in human skin, lung and tonsil mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97: 216-25.

76. **Church MK, Skinner SP, Burrows LJ, Bewley AP.** Microdialysis in human skin. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 1027-9.

77. **Michel L, Dubertret.** La chambre cutanée: une fenêtre ouverte sur l´inflammation. *Médicine sciences* 1988; 4: 109-14.

78. **Luger TA, Schwarz T.** The role of cytokines and neuroendocrine hormones in cutaneous immunity and inflammation. *Allergy* 1955; 50: 292-302.

79. **Engler RJM, Squire E, Benson P.** Chronic sulfasalazine therapy in the treatment of delayed pressure urticaria and angioedema. *Ann of Allergy, Asthma Immunol* 1995; 74: 155-9.

80. **Kos FJ, Engleman EG.** Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunology Today* 1996; 17: 174-6.

81. **Luger TA.** Cytokine regulation in the skin. Postgraduate course in allergological aspects of dermatology. *EAACI´94, Stockolm.* 1994; 26-34.

82. **Mecheri S, David B.** Mast cells as antigen presenting cells. In Proceedings I of the XVI Eur Cong of Allergology and Clin Immunol. Ed **A Basomba and J Sastre**. *Monduzzi Editore, Bologna Italy.* 1995; 79-86.

83. **Capron AR, Dessaint JP, Joseph M, Capron M.** The immunobiological functions of immunoglobulin E (IgE) and IgE receptors. In Advances in Allergology and clinical Immunology. **Ph Godard, J Bousquet, FB Michel Eds**. *The Parthenon Publishing Group, England.* 1992; 49-58.

84. **Michel G, Kemény L, Homey B, Ruzicka T.** FK506 in the treatment of inflammatory skin disease: promises and perspectives. *Immunology Today* 1996; 17: 106-8.

Testes Cutâneos por *Prick* - Normalização e Aplicações

MÁRIO MORAIS DE ALMEIDA*, GRAÇA PIRES**, SARA PRATES***, CRISTINA SANTA MARTA**, PAULA LEIRIA PINTO*, JOAQUIM ABREU NOGUEIRA*, JOSÉ EDUARDO ROSADO PINTO****

NOTA PRÉVIA:

Este trabalho pretende compilar um considerável volume de resultados, reflexo dos estudos que se têm vindo a desenvolver no Serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia versando os aspectos metodológicos relacionados com a normalização e aplicação dos testes cutâneos por *prick*, quer na prática clínica, quer em projectos de investigação. Apresenta-se em anexo a listagem dos estudos comunicados em congressos nacionais ou internacionais, incluídos no presente trabalho.

Expressa-se um particular agradecimento à totalidade dos investigadores participantes neste vasto conjunto de estudos, bem como a um numeroso grupo de firmas ligadas ao exercício da Especialidade de Imunoalergologia, sem o apoio dos quais dificilmente teria sido possível concretizar a totalidade da investigação desenvolvida.

RESUMO:

A utilização dos testes cutâneos (TC) por *prick* ou em picada, como meio de diagnóstico *in vivo*, assume-se desde os primórdios da prática imunoalergológica como o meio mais simples para a identificação, se existente, do alergénio sensibilizante. A variabilidade aceite na literatura tornava impossível medir alterações finas das reacções que poderiam ocorrer com diferentes extractos, diferentes dispositivos para *prick*, sob efeito da medicação, bem como o estabelecer correlações com outros métodos de diagnóstico numa base quantitativa e não qualitativa. Foi objectivo deste projecto o desenvolvimento de metodologia de leitura fiável e reproductível que permitisse uma avaliação rigorosa das variações das áreas das pápulas. Com o desenvolvimento do método - leitura computadorizada das pápulas em mesa digitalizadora - - verificou-se uma excelente reproductibilidade intra e inter-utilizador. A sua precisão permitiu: avaliar a reactividade das diferentes regiões do antebraço; verificar diferenças nas áreas das pápulas resultantes de uma mesma concentração de histamina, bem como potências diferentes de extractos diferentes de um mesmo alergénio; validar lancetas para TC por *prick* e mostrar que as sintéticas do tipo Morrow-Brown com limite de penetração a 1mm dão falsos-negativos, sendo aquelas com limite de penetração a 1.4mm adequadas; comparar quantitativamente com os resultados das determinações *in vitro* de IgE específica, bem como reformular *cut-offs* de testes multialergénicos para despiste de atopia; estimar o valor predictivo dos testes cutâneos nos primeiros anos de vida, em doentes com clínica de asma brônquica. Aborda-se o desenvolvimento da técnica de leitura alargando as possibilidades para colheita directa do antebraço, bem com medições volumétricas e não somente de áreas.

* Assistente Hospitalar de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia

** Assistente Hospitalar Eventual de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia

*** Interno do Internato Complementar de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia

**** Director do Serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia

Serviço de Imunoalergologia - Hospital de Dona Estefânia
Rua Jacinta Marto, 1150 Lisboa

A este trabalho foi atribuído o 2.º Prémio SPAIC UCB/STALLERGENES 1996.

ABSTRACT:

SKIN PRICK TESTS - STANDARDIZATION AND APPLICATIONS.

The use of skin prick tests (SPT) as an in vivo diagnostic tool, is assumed from the beginning of allergy practice as the more simple method for the identification, if exists, of the sensitizing allergen. The variability accepted in the literature maked impossible the measurements of small variations of wheal due to allergen extracts, devices for SPT, medications, as well as the correlations with other diagnostic methods as a quantitative basis. It was a main purpose of this project

the development of a reading method precise and reproducible, that allow the measurements of small variations in wheal areas. With the development of the computorized digitalized graphics tablet for the reading of wheal areas, it was shown that the method has an excelent reproducibility inter and intra users, as well as a high precision. This allowed: the study of the reactivity of the different regions of the forearms with precision; the identification of significant differencies in wheal areas from the same histamine concentrations and from different extracts of the same allergen; the validation of lancets for SPT, showing that the synthetic Morrow-Brown device with 1mm gave rise to false negative results and that 1.4mm should be used; the quantitative correlation with specific IgE as well with screening multiallergenic tests that gave rise to the establishment of different cut-offs to noncaucasian populations; estimate the predictive value of SPT in young children with complains of bronchial asthma. We analise the development of the technic for the measurements of wheal areas enlarging the possibilities to volumetric measurements and direct reading from the forearm to the computer.

INTRODUÇÃO

A pele serve como uma barreira fisiológica, protegendo o indivíduo do ambiente exterior, actuando passivamente através das suas características próprias tecidulares ou mesmo activamente através do desencadear de respostas inflamatórias. A sua inclusão no sistema imunitário inato, não específico, deverá ser sempre realçada.

Atendendo ao seu fácil e imediato acesso, bem como devido à sua grande extensão, a pele tem sido utilizada como modelo de estudo de numerosas entidades clínicas referentes a outros orgãos alvo, envolvendo diversas áreas do conhecimento médico. A possibilidade de efectuar técnicas de diagnóstico e/ou terapêutica minimamente invasivas reforçam a sua utilização como modelo de estudo *in vivo.*

Na caracterização das doenças alérgicas e sendo estas nosologias multifactoriais, resultado da interacção de factores do hospedeiro (genéticos e outros) e do ambiente, tem sido desde há muitas décadas utilizada a pele como "monitor" das reacções que ocorrem não só neste orgão como em diversos outros, como sejam o aparelho respiratório e o gastro-intestinal quando expostos a alergénios.

Embora tenha sido Charles Blackley[10] o primeiro autor a descrever a utilização dos testes cutâneos por arranhadura *(scratch)* no diagnóstico das sensibilizações a pólens, foi de facto Lewis[44] que em 1924 introduziu os testes cutâneos (TC) por *prick*. Na prática clínica, o método manteve-se pouco divulgado até há cerca de 20 anos, quando os trabalhos publicados por Pepys,[77] versando a modificação da técnica, melhorando a sua fiabilidade e reproductibilidade, vieram dar um impulso fundamental elevando os TC por *prick* à qualidade de *gold standard,* primeiro passo no estudo das sensibilizações alergénicas quer em crianças quer em adultos.[64]

Sem dúvida que os trabalhos de Ishizaka[39], publicados em 1966, implicando o envolvimento de imunoglobulinas do isotipo IgE nos fenómenos reagínicos, deram um suporte substancial ao conhecimento da fisiopatologia dos TC, até então efectuados numa base empírica.[71]

A recente introdução de extractos alergénicos estandardizados, infelizmente quase exclusiva para os aeroalergénios comuns, veio reforçar a qualidade dos testes, tornando-os fundamentais não só na investigação clínica de atopia, mas também para a realização de projectos de investigação clínica, farmacológica, laboratorial ou epidemiológica.[32,66,73,82,83] Sai fora do âmbito deste trabalho a revisão sobre estandardização de alergénios, in vivo e in vitro, embora existam diversas publicações sobre o tema cuja leitura se recomenda.[2,5,16,24,26,33,38,40,46,47,72,80,82,85,86,93] Mantém-se alguma controvérsia sobre os diferentes modos de estandardização e respectivo significado de utilização prática das unidades que se obtêm, reflexo não só dos diferentes métodos de estandardização mas também de opiniões diversas quantos aos objectivos da mesma.[27,80] O sistema ideal estará ainda por definir.

Para que se possa considerar a utilização de rotina dos extractos alergénicos comercialmente disponíveis importa que os mesmos sejam testados e validados, afastando-se também a hipótese de contaminação por outros alergénios, bem como variações de potência entre diferentes lotes.[6,25,34,88] Novos métodos de estudo *in vitro* da potência de extractos alergénicos, mais simples do que o clássico método de inibição de RAST, como a competição imunoenzimática reversa (REINA-C) poderão vir a facilitar o processo de estandardização alergénica.[16] Devem também ser realçados os aspectos relacionados com a conservação dos extractos.[3,7,17] A utilização de extractos liofilizados deve ser considerada mandatória em estudos longitudinais.[42,82]

A introdução do alergénio nas camadas superficiais da pele leva ao aparecimento de uma reacção imediata, dependente da desgranulação dos mastócitos e envolvendo também factores neurogénicos; numa pequena percentagem de indivíduos pode também ocorrer uma resposta tardia, correspondendo a uma infiltração celular por células mononucleadas e também por eosinófilos, basófilos e neutrófilos.[82,97] Esta reacção não tem na maioria dos casos expressão macroscópica, embora possa ter interesse o seu estudo pela possibilidade de se poder reproduzir a inflamação brônquica induzida pela inalação de alergénios em asmáticos. Na nossa experiência são extremamente

raros os casos em que ocorre uma resposta cutânea tardia após a realização de TC por *prick*, praticamente limitadas a alguns doentes sensibilizados a fungos, pólens de gramíneas e parietária.

Importa referir que a positividade de um TC por *prick* não implica a existência de patologia. O diagnóstico da doença alérgica baseia-se na clínica, podendo o estímulo desencadeante ser alergénico ou não. A realização dos TC deve ser encarada como um meio auxiliar de diagnóstico a efectuar, quando clinicamente indicado, desde os primeiros meses de vida, sendo a correlação com a clínica excelente, como será referido adiante. Os extractos alergénicos deverão ter uma potência suficiente para obter a máxima sensibilidade (revelando os verdadeiros-positivos) sacrificando alguma menor especificidade (falsos--positivos) pois estes últimos serão identificados pela história clínica.[5,35]

A facilidade de execução, segurança e baixo custo dos TC por *prick*, contrasta com a execução dos TC intra-dérmicos, mais invasivos, menos específicos e com um risco de ocorrência de reacções adversas graves em até 2% dos casos, o que deverá contra-indicar a sua utilização por rotina.[13,14,82,85,93]

A identificação do alergénio suspeito, poderá obviamente ser também efectuada por métodos *in vitro*, que permitem determinar as concentrações de IgE específica para o alergénio em causa.[13,36,51,76,82,100] No entanto, devido à sua menor sensibilidade e ao seu custo, a sua utilização deverá ser reservada para os casos de limitação à execução dos TC ou para a tentativa de esclarecimento de casos discordantes ou duvidosos. A possibilidade da ocorrência de falsos-negativos é particularmente importante quando se estudam quadros clínicos de reacções adversas relacionadas, por exemplo, com picadas de himenópteros, fármacos ou alimentos[13]; em relação a estes últimos, pode ocorrer uma percentagem significativa de falsos-positivos, não permitindo estabelecer o diagnóstico etiológico na generalidade dos casos.[14,28,82]

Os testes cutâneos por *prick* são, no entanto, influenciados por diversos factores, que podem determinar os resultados e condicionar a precisão dos mesmos.[13,14,22,68,85,97,98] Segundo S Dreborg[22] os factores que podem interferir com a qualidade do método poderão agrupar-se em:

1. Factores técnicos:

Preparação do alergénio (potência, qualidade, composição, estabilidade), metodologia do teste, variação inter-utilizador, precisão.

2. Factores biológicos:

Inter-doentes (grau de sensibilização, reactividade aos mediadores, características dos mastócitos, idade, sexo), intra-doente (dose do alergénio introduzida na pele, diferentes ocasiões ou localizações anatómicas, hora, estação do ano, exposição alergénica).

3. Factores externos não alérgicos:

Medicação, infecção, exposição a factores externos não alérgicos.

Importa então definir correctamente o método dos TC por *prick* que se utiliza, sempre que possível dando informação sobre a reproductibilidade e precisão do mesmo.[8,22,64,82] O treino do pessoal envolvido na execução dos TC, permitirá uma redução significativa das variações dos resultados.[1,12]

Na literatura nacional, não têm sido significativas as referências aos aspectos metodológicos seguidos na execução dos TC por *prick*. Faltam de igual modo informações na nossa população sobre a reactividade cutânea, quer a alergénios, quer às referências utilizadas.

OBJECTIVOS

Conscientes das dificuldades metodológicas da realização dos TC, baseados nos pressupostos referidos anteriormente e fazendo parte de uma linha de investigação iniciada no Serviço desde há vários anos, foram objectivos deste trabalho:

A. Estudar a reproductibilidade (intra e inter--utilizador) e a precisão de um método computadorizado de leitura das áreas das pápulas obtidas com os TC por *prick* (Trabalho 1);

B. Comparar a reactividade cutânea intra-individual em diferentes regiões dos antebraços, utilizando TC quadruplicados com histamina a 1mg/ml, 10mg/ml e fosfato de codeína (Trabalhos 2 e 3);

C. Estudar a fiabilidade de lancetas sintéticas, com limite de penetração de 1mm, 1.4mm e 1.6mm, através da correlação dos resultados com aqueles obtidos com uma lanceta metálica, com limitador de penetração a 1mm, estandardizada e previamente validada (Trabalho 4);

D. Em populações de doentes adultos e pediátricos, correlacionar os resultados obtidos com os TC por *prick*, utilizando extractos alergénicos diferentes para os mesmos alergénios e as determinações de IgE específica (Trabalhos 5, 6 e 7);

E. Numa população de crianças atópicas, sensibilizadas exclusivamente a ácaros do pó doméstico, correlacionar os resultados quantitativos dos TC por *prick* e das determinação de IgE específica (Pharmacia CAP System) em várias doenças alérgicas respiratórias com gravidade clínica semelhante (Trabalho 8);

F. Validar um teste de despiste de atopia - Alatop DPC - através do estudo de duas populações (uma de raça caucasiana e outra de raça negra) de doentes atópicos e não atópicos, caracterizados pela concordância entre a clínica e o resultado dos TC (Trabalho 9);

G. Avaliar a utilidade dos TC por *prick* como método de diagnóstico de sensibilização alergénica nos primeiros 6 anos de vida, bem como estimar o seu valor predictivo em relação à evolução clínica da asma brônquica infantil, através de um estudo prospectivo de 3 anos de duração (Trabalho 10).

MATERIAL E MÉTODOS

População: Os doentes participantes nos diversos estudos são seguidos regularmente na Consulta Externa do Serviço, envolvendo diversos grupos etários, com idades compreendidas entre os 6 meses e os 65 anos.

As investigações efectuadas in vivo foram integradas, sempre que possível, na avaliação clínica efectuada aos doentes. Na realização dos TC por *prick*, respeitaram-se os períodos de evicção habitualmente recomendados para os medicamentos relevantes.[13,59,67,82,97]

Em todos os casos e, após informação dos objectivos a que se propunham os protocolos, foi obtido o consentimento oral do doente ou do encarregado de educação.

Testes cutâneos por *prick*: Como será referido, foram utilizados extractos de diversas proveniências, estandardizados e não estandardizados. Como referências positivas usaram-se o cloridrato de histamina e o fosfato de codeína. Como referências negativas utilizaram-se soluções de fenol e de glicerina. Detalham-se seguidamente os aspectos metodológicos gerais.

Metodologia:

* Referência positiva - utilizaram-se extractos de histamina a 1e 10 mg/ml e fosfato de codeína a 9%; excepto quando referido, utilizou-se por rotina a histamina na concentração de 10mg/ml,[29,50] obtendo-se 100% de resultados positivos;

* Referência negativa - soluções de fenol a 0.5% e glicerina a 50%; com qualquer dos controles negativos utilizados não obtivemos pápulas mensuráveis, o que difere dos resultados encontrados por outros autores que não utilizam lancetas de aplicação perpendicular na pele do tipo Morrow-Brown, referindo problemas importantes quanto ao *cut-off* de positividade a utilizar;[12,64,65]

* Extractos alergénicos em solução - distância mínima de aplicação entre extractos 2cm; 3cm para as referências positivas[92]; TC efectuados na face anterior dos antebraços, respeitando uma distância mínima de 3cm em relação às articulações do punho e do cotovelo; sem contaminação das gotas de cada alergénio e limpeza do excesso imediatamente após a aplicação da lanceta; TC em duplicado no Trabalho 4;

* Lanceta metálica com limitação de penetração a 1mm - Prick Lancetter - Dome Hollister Stier; lancetas sintéticas Morrow-Brown - todas de aplicação perpendicular na pele;[61,62] utilização de uma lanceta para cada extracto, obviando-se a ocorrência do fenómeno de arrastamento do alergénio *(carryover)*;[4,22,63]

* Avaliação dos resultados aos 15 minutos - solução de compromisso entre as pápulas máximas que se conseguem com os extractos de histamina (+/-10`) e com os extractos alergénicos (+/-20`)[82]; avaliou-se apenas as áreas das pápulas, não considerando a área de eritema, tal como proposto por outros autores;[22]

* Transcrição dos resultados, após delimitação com marcador fino para adesivo poroso - 3M; colagem em papel para arquivo permanente;

* Leitura das áreas das pápulas através de método computadorizado descrito no Trabalho 1. Considerou-se o limiar de positividade de $7mm^2$. Uma área superior a $7mm^2$ é considerada pela maioria dos autores como um resultado verdadeiro-positivo, observando-se uma excelente correlação com a clínica e as provas de provocação específicas.[5,81]

Métodos laboratoriais in vitro: Nos Trabalhos 4A, 5, 6, 7, 8, 9A e 9B, foram efectuadas exames laboratoriais, seguindo os princípios técnicos indicados para cada método. As amostras séricas para cada determinação foram iguais para qualquer um dos testes, consistindo em 50µl.

Metodologia:

* Pharmacia Phadebas RAST - Kabi Pharmacia (Trabalhos 4C e 5) - Método que utiliza alergénios em fase sólida, descrito inicialmente por Johansson, permitindo a detecção de IgE específica para múltiplos alergenos;

* Pharmacia CAP System - Kabi Pharmacia (Trabalhos 5, 6, 7 e 8) - Consiste num teste em fase sólida (ImmunoCAP). A fase sólida é um polímero flexível, hidrofílico, permitindo 3X maior ligação proteica do que o RAST, o que permite uma maior apresentação do alergeno, factores que contribuem para uma maior amplitude de medições, aumentando a sensibilidade do teste. A utilização de anti-IgE mono e policlonal permite uma maior reactividade com baixa interferência inespecífica e uma reactividade cruzada com outras imunoglobulinas inferior a $2x10^6$;[41,43,75]

* Alatop - Amerlab / Diagnostic Products Corporation (DPC) (Trabalhos 9A e 9B) - Método imunoenzimático que permite a detecção de múltiplos anticorpos IgE específicos. Utiliza uma fase líquida na qual os alergénios estão ligados a uma matriz de polímeros solúveis. Os resultados são apenas qualitativos (positivo/negativo);

* Alastat - Amerlab / DPC (Trabalho 9B) - Método que recorre a alergénios em fase líquida, permitindo a detecção de múltiplas IgE específicas.

Os aspectos metodológicos mais detalhados e particulares de cada um dos estudos, nomeadamente o tratamento estatístico efectuado, encontram-se discriminados nas referências respectivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Desenvolveu-se e validou-se um método computadorizado de leitura de áreas das pápulas dos TC, com uma excelente variabilidade inter e intra-utilizador. Consideramos ter sido o princípio fundamental que esteve na génese de todos os estudos efectuados e analisados neste trabalho. A introdução na rotina do mesmo revelou-se enriquecedora, tal como a possibilidade de ter um arquivo de imagem permanente dos TC, permitindo nomeadamente comparações intra-doente.

B. A análise dos resultados obtidos com os testes quadruplicados utilizando histamina a 1 e 10mg/ml e fosfato de codeína permitiram-nos verificar a inexistência de diferenças significativas da reactividade cutânea a nível da face anterior dos antebraços; o coeficiente médio de variação para os quatro testes foi de cerca de 25%, valor inferior aquele que é habitualmente aceite como indicador de boa qualidade dos TC por *prick* (40 a 50%); a histamina na concentração de 1mg/ml deverá ser definitivamente abandonada como referência positiva, pois apresentou resultados negativos de um modo sistemático em mais de 10% dos indivíduos testados.

Destes resultados realça-se ainda a diferença existente na potência de histamina na concentração de 10mg/ml de fabricantes diferentes, situação inesperada e que revela variabilidade da qualidade de fabrico.

C. Das lancetas sintéticas estudadas (do tipo Morrow-Brown), comprovamos a inadequação da lanceta com limite de penetração a 1mm; simultaneamente comprovamos a eficácia da lanceta com limite de penetração a 1.4mm; contactados pelo fabricante das lancetas, foi-nos possível testar o interesse da utilização de uma lanceta com limite de penetração superior (1.6mm), tendo-se concluído que um aumento na profundidade de introdução do alergénio não alterava significativamente os resultados, ao mesmo tempo que tornava mais traumático o método. A possível explicação para a necessidade de se ter uma lanceta sintética com limite de penetração a 1.4mm, poderá residir no facto de à lanceta metálica ser possível uma penetração mais profunda de todo o dispositivo e não apenas da ponta do mesmo.

D. A utilização de extractos alergénicos de fontes comerciais distintas, comprovadamente relacionou-se com diferentes resultados dos TC por *prick*, quer em termos de positividades, quer em termos das próprias áreas obtidas, sugerindo diferenças de potência e qualidade muito significativas. Obtiveram-se em alguns casos melhores resultados com extractos não estandardizados. A análise dos resultados do conjunto destes trabalhos realça a importância de testar e validar os extractos alergénicos que se utilizam quer em rotina, quer em projectos de investigação.

Para o *Dermatophagoides pteronyssinus*, o Pharmacia CAP System, revelou excelentes resultados, podendo ser utilizado para validar extractos cutâneos para este alergénio. Verificou-se uma excelente correlação entre o limiar de positividade dos TC por *prick* arbitrariamente aceite para a nossa população (pápula de área superior a 7mm^2) e a positividade do doseamento de IgE específica (>0.35KU/l) o que permitiu validar este *cut-off*.

E. As determinações quantitativas dos TC por *prick* são habitualmente correlacionadas com a gravidade de sensibilização. Demonstramos que numa população de crianças monossensibilizadas a ácaros do pó doméstico foi possível discriminar entre diversas patologias atópicas das vias aéreas (asma e/ou rinite) através do doseamento das concentrações séricas de IgE específica, parecendo verificar-se uma correlação entre a extensão anatómica do processo alérgico e as concentrações de um marcador do processo imunoreactivo; tal fenómeno não foi possível encontrar quando se estudaram os resultados quantitativos dos TC utilizando 2 extractos alergénicos distintos.

F. O despiste *in vitro* de patologia atópica, tem-se baseado habitualmente no doseamento da concentração sérica de IgE total e também, incorrectamente, através do doseamento de múltiplas IgE específicas, atitude extremamente onerosa, habitualmente com pouca adequação e relevância clínica. O doseamento de IgE total, de relativa baixa sensibilidade e especificidade, levou ao desenvolvimento de testes multialergénicos, a serem utilizados não como factor adicional aos doseamentos já anteriormente efectuados, mas como uma alternativa única (evitando a duplicação de custos) a ser requisitado em centros não diferenciados. A comparação dos resultados obtidos numa população de doentes atópicos e não atópicos permitiu validar a utilização do Alatop como método de despistagem de atopia, revelando-se mais específico e sensível do que a determinação de IgE total. Estudos efectuados numa população não caucasiana, permitiram demonstrar que o *cut-off* utilizado para a população caucasiana não era adequado, obrigando à sua adaptação permitindo melhorar a especificidade e sensibilidade do teste, o que realça a importância da validação dos próprios testes laboratoriais em relação às populações que se pretendem estudar.

G. É habitualmente consensual o princípio de que os TC por *prick* são de pouca utilidade no estudo da patologia alérgica em crianças de idade igual ou inferior a 3 anos. Este trabalho, baseado numa amostra muito significativa de crianças com clínica de asma brônquica (n=308), de idade inferior a 6 anos, permitiu-nos verificar o interesse da realização dos TC desde o primeiro ano de vida, obtendo-se uma percentagem significativa de positividades mesmo em crianças com idade inferior a 3 anos (28%). Mais importante foi verificar, através de um estudo

prospectivo de 3 anos, o excelente valor predictivo positivo para a ocorrência posterior da doença, em ambos os grupos etários; foi também aproximadamente a mesma, a percentagem de doentes dos dois grupos (41 e 46%) que positivaram os TC.

A existência de sibilância nos primeiros anos de vida, estará associada a um pior prognóstico se coexistente com sensibilização alergénica demonstrada pelos TC por *prick*.[96] A considerável percentagem de crianças que positivaram os TC reforça a importância da instituição de medidas preventivas de controle ambiental, já que na maioria dos casos se relacionaram com sensibilizações a ácaros do pó doméstico.[91] Estudos controlados longitudinais deverão ser aplicados a estas crianças com clínica de asma brônquica, mas ainda sem evidência de sensibilização alergénica, permitindo estimar riscos e estabelecer medidas preventivas.

Tal como é defendido por Silverman,[101] nos primeiros anos de vida as queixas de hiperreactividade brônquica estariam intimamente associadas às infecções respiratórias virais, independentemente do estatuto atópico, embora apenas os que desenvolvem sensibilização alergénica mantêm sintomas de asma brônquica de um modo persistente. No nosso trabalho pudemos igualmente comprovar que as manifestações clínicas podem preceder a sensibilização atópica numa percentagem significativa de crianças.

DESENVOLVIMENTO FUTURO

No âmbito da colheita de áreas para medição, o erro ligado ao contorno da pápula com marcador para decalque com adesivo transparente, tentou ser ultrapassado com colheita directa do antebraço. Experiências anteriores com termografia cutânea mostraram falta de fiabilidade.

Na ausência de método estabelecido para este fim, iniciou-se um processo de consulta junto de empresa especializada - EID (Empresa de Inovação e Desenvolvimento) - para que com tecnologias disponíveis ou a desenvolver se ultrapassasse a situação.

O ensaio com captação de imagens vídeo de alto contraste a distância fixa com incidência perpendicular e oblíqua, mostraram necessitar-se do aperfeiçoamento do sistema de alto contraste, atendendo à zona de eritema não permitir uma delimitação inequívoca. Para além disto a combinação com colheita de imagens rasantes permitiram identificar volumetrias diferentes.[89] O custo do desenvolvimento da aplicação é elevado, aguardando-se financiamento para a sua implementação - técnica de alto contraste e comparação de áreas com volumetrias. Do nosso conhecimento, não existem dados ou conhecimentos disponíveis nesta área.

A colheita com *scanner* directamente do antebraço, necessita de maior investimento, dado que os dispositivos existentes fazem a leitura baseada no contraste dos objectos, situação não existente a nível das pápulas. Não colheriam também volumetrias.

Assim, parece-nos que o desenvolvimento se deva fazer na área da captação de imagens vídeo, sua imobilização e transferência directa para o micro-computador.

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos, permitem-nos reflectir sobre a qualidade dos TC por *prick*, sem dúvida auxiliares fundamentais e insubstituíveis na abordagem do doente atópico. A divulgação do conjunto destes estudos permitirá motivar a generalidade dos autores nacionais que abordam as questões da atopia a referirem a metodologia que utilizam na execução e interpretação dos TC por *prick*, permitindo a comparação de resultados entre grupos e a consequente troca de experiências.

Uma maior precisão na análise dos resultados dos TC evidenciou uma importância significativa a diversos níveis:

- Que nos anos 90, os resultados obtidos com referências positivas (histamina a 10mg/ml) variam entre os diferentes fabricantes e assim de centro para centro conforme o extracto que se utilizar.

- Que existem no mercado lancetas sintéticas que dão origem a falsos-negativos, continuando a ser utilizadas.

- Que para alergénios estandardizados e com referências padrão internacionais (caso do *D. pteronyssinus*) os resultados obtidos mostram que para um mesmo alergénio e dependendo do fabricante, o grau de erro/variação é extremamente elevado, mantendo-se no entanto a sua comercialização.

- Que um dos objectivos mais elementares dos meios de diagnóstico não é cumprido, isto é, que quer *in vivo* quer *in vitro* se devem utilizar os mesmos determinantes alergénicos, necessitando de validação.

- Que generalizar conceitos pode ser abusivo. *Cut-offs* diferentes em populações distintas para a aplicação de um teste *in vitro* de despiste de atopia, sugerem a necessidade de validação de outros meios de diagnóstico nessas populações, nomeadamente dos TC por *prick*.

Recentemente temos vindo a participar em diversos estudos em que a utilização dos TC por *prick* se tem revelado de importância extrema, nomeadamente na caracterização epidemiológica de diferentes populações (figura 1) através da aplicação de uma bateria de TC com cerca de 20 aeroalergénios a aproximadamente 2000 crianças com idades compreendidas entre os 6 e os 10 anos, permitindo estimar prevalências de atopia (variáveis nas diferentes amostras populacionais estudadas entre os 6 e os 54%), as quais servirão de referência a estudos posteriores (dados pessoais). Após a realização de cerca de 40 000 TC por *prick*, nunca se

verificou nenhuma reacção adversa, o que vem confirmar a sua segurança.

Na prática clínica, se bem que incluído num projecto de investigação, destacaríamos os resultados dos TC por *prick* efectuados em cerca de 200 crianças com idades compreendidas entre as primeiras semanas de vida e os dois anos, referenciadas a uma consulta de especialidade por suspeita de intolerância às proteínas do leite de vaca, num período de 3 anos (1993/96), obtendo-se uma excelente correlação entre a apresentação clínica sugestiva de doença IgE mediada e a positividade dos testes cutâneos por *prick* / provas de provocação abertas (dados em fase de análise, não comunicados).

A tentar normalizar, evidenciaram-se questões e problemas ainda hoje não normalizados e sem tendência para a normalização. Fica o contributo do trabalho realizado e do que se quer realizar, pelo que há muito defendem esta normalização.

TRABALHO 1:

MESA DIGITALIZADORA COMPUTADORIZADA: REPRODUCTIBILIDADE E PRECISÃO NA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TC POR *PRICK*

RESUMO

Os TC por *prick* constituem um método de diagnóstico essencial na prática alergológica. Variam segundo os diferentes autores os critérios de avaliação dos resultados, não sendo habitualmente fornecidos dados sobre a precisão do método de leitura. Conscientes da importância que tem a avaliação quantitativa da áreas das pápulas obtidas, essencial para a utilização dos TC não só na rotina clínica, mas também em projectos de investigação clínica, laboratorial e epidemiológica, pretendeu-se determinar a reproductibilidade e precisão de um equipamento computadorizado, através da medição das áreas de 40 pápulas (7 a 220 mm^2), por dois utilizadores em três ocasiões distintas, correlacionando os resultados com as áreas reais determinadas pelo peso das mesmas, reproduzidas em papel. Obtiveram-se excelentes coeficientes de variação intra e inter-utilizador, sendo o erro estimado em relação às áreas reais inferior a 3%. Os resultados obtidos permitiram a validação do método e a sua aplicação posterior em diversos projectos de investigação.

INTRODUÇÃO

A realização dos TC por *prick* deve ser encarada como um meio auxiliar de diagnóstico desde o lactente, devendo constituir a abordagem inicial de despiste de sensibilização alergénica em centros diferenciados. De fácil execução, pouco invasivos, de elevada segurança e baratos, são no entanto influenciados por uma série de variáveis que determinam o resultado final do exame, tendo implicações óbvias na conduta perante o doente alérgico.[82,84]

Considerando apenas a expressão dos resultados, sendo aceite que apenas se deve avaliar a área das pápulas e não o eritema obtido,[22] varia entre os autores o método mais adequado para a quantificação dos resultados: diâmetro máximo, diâmetro médio, medição da área (valor absoluto ou relação com uma determinada referência; utilização de papel milimétrico transparente, comparação com áreas conhecidas ou planimetria...), espessura, volume ou fluxo sanguíneo da pápula...[22]

É no entanto consensual que a utilização dos TC por *prick* em projectos de investigação, como sejam estudos longitudinais da reactividade cutânea, comparações inter-individuais, estandardização biológica de alergénios, estudo de factores que podem influenciar os resultados dos TC, entre outros, passam pela utilização de um método de leitura de resultados quantificados comprovadamente preciso e reproductível.[23,70] Quando se pretendiam iniciar estudos envolvendo a utilização dos TC por *prick*, pareceu-nos que este deveria ser o ponto de partida, até porque as referências bibliográficas na literatura de especialidade eram particularmente escassas.[70,84]

OBJECTIVOS

Determinar a reproductibilidade (intra e inter-utilizador) e a precisão de um método computadorizado (mesa digitalizadora gráfica conectada a microcomputador utilizando software especializado para desenho assistido por computador - CAD) na avaliação dos resultados dos TC por *prick*.

MATERIAL E MÉTODOS

I) Resultados dos TC por *prick* - Seleccionaram-se ao acaso 40 resultados de TC, delimitados com marcador fino, transcritos para adesivo poroso e fixados em papel (figura 1-1).

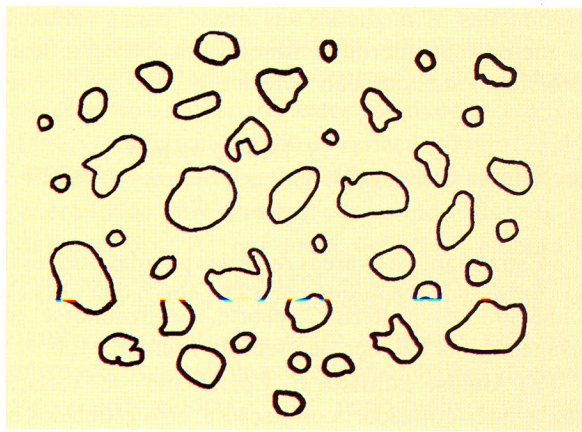


Figura 1-1

II) Metodologia do método de leitura: Utilizou-se uma mesa digitalizadora gráfica conectada a um microcomputador (figura 1-2) utilizando software CAD, sendo as áreas das pápulas reproduzidas independentemente por dois utilizadores em três ocasiões diferentes, permanecendo em arquivo no microcomputador (figura 1-3).

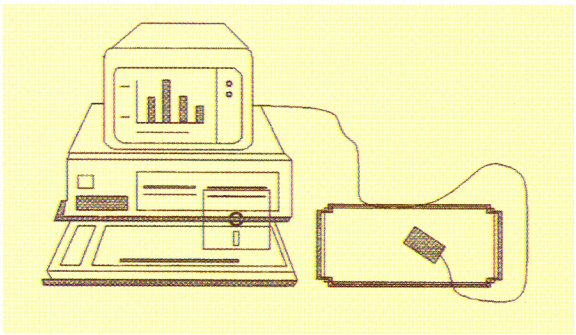


Figura 1-2

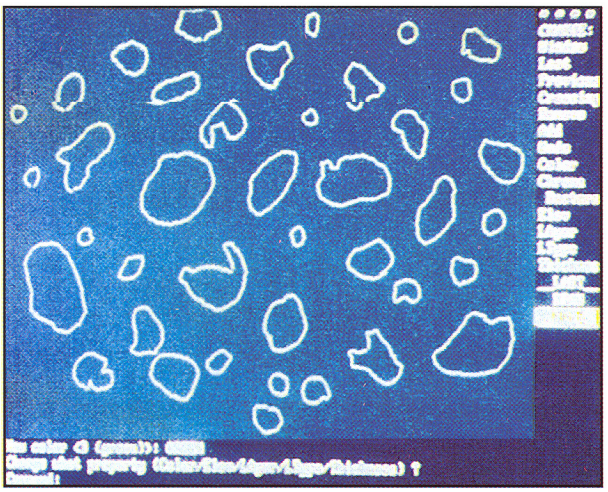


Figura 1-3

III) Metodologia da validação do método de leitura:

- Determinou-se o coeficiente de variação intra e inter-utilizador pela análise das diferentes reproduções e medições das áreas; para a validação do método considerou-se desejável a obtenção de um coeficiente de variação inferior a 5%;

$$\text{Coeficiente de variação} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{média}} \times 100\%$$

- Estimaram-se as áreas reais das pápulas através da sua reprodução e ampliação (8X) em papel de peso conhecido e posterior recorte, utilizando-se na pesagem uma balança de precisão Mettler P300.

IV) Análise estatística - Coeficiente de variação intra e inter-utilizador; correlação e erro estimados em relação às áreas reais; teste qui quadrado (Microstat).

RESULTADOS

A análise dos resultados das 40 áreas estudadas (7 a 220mm^2) permitiu obter excelentes coeficientes de variação médios (quadro 1-1), sempre inferiores a 5%, para áreas superiores ou inferiores a 30mm^2. Considerando os coeficientes de variação individuais intra e inter-utilizador, obtiveram-se resultados inferiores a 10%.

Quadro 1-1 Resultados

	T1	T2
Coeficiente de variação intra-utilizador	3.1% (0.3-7.11)	3.5% (1.34-6.88)
Áreas < 30 mm^2 (n = 15)	4.1%	4.2%
Áreas ≥ 30 mm^2 (n = 25)	2.5%	3.08%

Coeficiente de variação inter-utilizador	2.93% (0 - 8.95)	p > 0.05

Correlação com áreas reais	r = 0.97
Erro relacionado com áreas reais	T1 = - 2.4%
	T2 = - 2.6%

As áreas determinadas pelo computador correlacionaram-se quase em absoluto com as obtidas indirectamente pelo método de pesagem (r = 0.97), sendo o erro estimado para cada um dos utilizadores de -2.4 e -2.6%, sem diferenças estatisticamente significativas entre as determinações dos dois operadores.

DISCUSSÃO

A utilização do método em estudo permitiu obter resultados precisos e reproductíveis. A capacidade de converter formas irregulares em áreas quantificadas permite a utilização dos TC por *prick* não só na prática clínica, mas também e fundamentalmente em projectos de investigação.[84] Pode ser considerado desprezível o erro atribuído ao método de leitura, quando se consideram todos os outros factores que podem influenciar os resultados dos TC por *prick*. No futuro poderá ser importante o recurso a um *scanner* mecanizado de varrimento contínuo ou a um sistema de vídeo, que poderia tornar o método de leitura significativamente mais rápido e preciso, colhendo as pápulas directamente do braço do doente, embora actualmente não tenhamos conhecimento da existência de tal dispositivo que possa funcionar com o *software* adaptado a esta aplicação.

TRABALHO 2

COMPARAÇÃO DA REACTIVIDADE CUTÂNEA INTRA - INDIVIDUAL EM DIFERENTES REGIÕES DOS ANTEBRAÇOS

RESUMO

Para avaliar a capacidade em obter reacções cutâneas positivas com histamina a 1 mg/ml, bem como a reactividade de diferentes regiões dos antebraços, estudaram-se 116 indivíduos submetidos a testes cutâneos por *prick* com histamina nesta concentração, comparando-se as áreas das pápulas obtidas nos 4 locais do antebraço onde os testes foram efectuados. Encontrou-se uma percentagem de resultados positivos de 90.6%, o que limita a utilização da histamina nesta concentração como referência positiva. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das áreas das pápulas dos testes cutâneos efectuados nos vários locais do antebraço.

INTRODUÇÃO

A qualidade dos extractos alergénicos, a substância utilizada como referência positiva e o local do antebraço onde os testes cutâneos são efectuados, são factores que podem influenciar os resultados devendo por isso ser avaliados. A histamina tem sido utilizada como controlo positivo numa concentração de 1mg/ml, embora alguns autores recomendem a concentração de 10mg/ml.[22,50,85] O local onde os testes cutâneos são efectuados é outro factor a ter em conta na interpretação dos resultados, tendo sido encontrado por Taudorf et al (citado por S. Dreborg na ref.[a 22]) valores de áreas mais elevados no antebraço esquerdo, o que poderia condicionar a interpretação dos testes efectuados em diferentes localizações. A influência da lateralização cerebral nestes resultados está ainda por esclarecer, sendo defendido por Wise[102] que a lateralização cerebral predominante implicaria assimetrias nas respostas aos TC por *prick* com histamina.

OBJECTIVOS

O objectivo deste trabalho foi estudar as possíveis diferenças intra-individuais na reactividade cutânea do antebraço, através da realização de testes cutâneos com histamina em 4 regiões, bem como avaliar a capacidade em obter resultados positivos com histamina a 1mg/ml.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Estudaram-se 116 doentes, 61 do sexo masculino e 55 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 3 e os 65 anos.

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Particularidades:

Histamina a 1mg/ml (Bencard) em quadruplicado, nas regiões proximal e distal de ambos os antebraços.

III) Análise estatística - Análise de variância - - ANOVA

Foram consideradas para tratamento estatístico apenas as áreas com $\geq 3mm^2$.

RESULTADOS

Dos testes efectuados com histamina, 11 doentes (9.4%) apresentaram resultados negativos em dois ou mais locais, pelo que não foram incluídos na análise dos resultados.

A média das áreas dos resultados positivos foi de $10.66mm^2$. Relativamente à reactividade cutânea, não encontrámos diferenças estatisticamente significativas entre os testes cutâneos nas quatro regiões (quadro 2-1), embora alguns doentes apresentassem valores diferentes individualmente.

Quadro 2-1 Resultados - Histamina a 1mg/ml

Resultados negativos - 11 (9.4%)			
Áreas médias (DP) - 10.66 (5.31) mm^2 **Coeficiente médio de variação** - 25.5%			
Análise de variância	Global	F = 0.2151	ns F < 2.6
	Regiões proximais	F = 0.0014	
	Regiões distais	F = 0.0633	ns F < 3.8
	Braço direito	F = 0.4768	
	Braço esquerdo	F = 0.1526	

DISCUSSÃO

A considerável percentagem de resultados negativos obtidos com a histamina a 1mg/ml (9.4%), limita a sua utilização como controlo positivo nesta concentração, o que já havia sido referido por alguns autores,[22,26,85] que recomendam a concentração de 10mg/ml, aumentando o número de testes positivos para cerca de 100%. O coeficiente médio de variação obtido (25.5%), é inferior ao que é habitualmente aceite pela generalidade dos autores como indicador de boa qualidade dos TC por *prick* (<50%),[23] embora um pouco superior aos 20% propostos pela *Nordic Society of Allergology*.[2] Não se encontraram diferenças com significado estatístico entre as várias regiões do antebraço, o que está de acordo com trabalhos efectuados por outros autores,[22,49,54,58] permitindo a utilização indiscriminada da face anterior dos antebraços, pelo menos quando se estudam amostras significativas.

TRABALHO 3

COMPARAÇÃO DA REACTIVIDADE DOS TESTES CUTÂNEOS POR *PRICK* EFECTUADOS COM HISTAMINA A 1mg/ml E 10mg/ml E FOSFATO DE CODEÍNA EM QUADRUPLICADO

RESUMO

Efectuaram-se testes cutâneos por *prick* com histamina a 1mg/ml, histamina a 10mg/ml de origens diferentes e fosfato de codeína em 100 doentes com idades compreendidas entre os 3 e os 60 anos, com igual distri-buição por sexos, tendo-se correlacionado os valores de áreas obtidos. Avaliaram-se também as diferenças intra-individuais na reactividade cutânea ao fosfato de codeína através de testes cutâneos em prick efectuados em quadruplicado. Os resultados mostraram não haver diferenças com significado estatístico entre as áreas dos testes efectuados nas diferentes regiões do antebraço. A codeína apresentou uma boa correlação com a histamina a 10mg/ml, tendo apresentado diferenças estatisticamente significativas quando comparada com a histamina a 1mg/ml. Estes resultados tornam a codeína uma referência positiva altamente reproductível. As duas histaminas a 10mg/ /ml também apresentaram resultados significa-tivamente diferentes.

INTRODUÇÃO

A estandardização dos TC por *prick* é importante em situações de rotina e principalmente na área da investigação.[82] Vários factores, nomeadamente técnicos, podem influenciar os resultados, pelo que é fundamental a utilização de um controlo positivo e negativo. Como controlo positivo podem usar-se a histamina em várias concentrações (1 e 10mg/ml), que avalia apenas a sensibilidade do órgão alvo, ou o fosfato de codeína, que por provocar desgranulação dos mastocitos, origina uma resposta cutânea mais semelhante à obtida com os alergénios (quadro 3-1).[13]

Quadro 3-1 — Comparação de parâmetros avaliados pelos TC com histamina e codeína

	Histamina	Codeína
Densidade dos mastócitos	-	+
Capacidade de libertação de mediadores	-	+
Quantidade de IgE nos mastócitos	-	-
Sensibilidade dos órgãos alvo	+	+
Reacção com edema e eritema	+	+

Adaptado de Bousquet J e Michel F.[13] In "Allergy Principles and Practice", 4.ª ed, 1993

OBJECTIVOS

Avaliar possíveis diferenças intra-individuais na reactividade cutânea ao fosfato de codeína, através da realização de testes cutâneos em quadruplicado; correlacionar os resultados obtidos com histamina a 1mg/ml e a 10mg/ml de origens diferentes, com os resultados obtidos com o fosfato de codeína.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Estudaram-se 100 doentes entre os 3 e os 60 anos, com igual distribuição por sexos.

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Particularidades:

- Referências positivas:
  - Fosfato de codeína, solução a 9% em glicerol a 50% (Stallergenes)
  - Histamina 1mg/ml (Bencard)
  - Histamina 10mg/ml (DHS)
  - Histamina 10mg/ml (Leti)
- Testes com codeína em quadruplicado, nas regiões proximal e distal de ambos os antebraços.

III) Análise estatística

- Determinação das médias e desvios padrão
- Análise de variância
- Matriz de correlação

RESULTADOS

Os testes cutâneos efectuados com fosfato de codeína foram positivos em 100% dos casos, havendo uma boa correlação entre as áreas dos testes efectuados nas diferentes regiões do antebraço, sem diferenças estatisticamente significativas (quadro 3-2).

Estes resultados são comparáveis aos obtidos com histamina a 10mg/ml (Leti), mas significativamente diferentes dos encontrados com a histamina da DHS e com a histamina a 1mg/ml (Bencard), com a qual se obtiveram 12% de resultados negativos (quadros 3-3, 3-4).

Quadro 3-2 — Resultados - Codeína

Áreas médias - mm² (DP)			
Braço direito -	Proximal: 28.88 (13.89)		
	Distal: 28.74 (14.70)	→	correlação > 0.90
Braço esquerdo -	Proximal: 26.65 (13.33)		
	Distal: 26.89 (15.24)		

Análise de variância			
Global	F = 0.328 p = 0.8048		
Regiões proximais	F = 0.564 p = 0.8048	→	sem diferenças
Regiões distais	F = 0.425 p = 0.5183		estatisticamente
Braço direito	F < 0.001 p = 0.9826		significativas
Braço esquerdo	F < 0.001 p = 0.9544		

Quadro 3-3 — Resultados - Histamina

Áreas médias - mm² (DP)		
10 mg/ml (Leti): 27.64 (11.68)		
10 mg/ml (DHS): 21.99 (6.74)		
1 mg/ml (Bencard): 9.95 (6.13)	➜ 12% de resultados negativos	
Análise de variância		
Codeína/Histamina (Leti)	F = 0.301 p = 0.5866	➜ sem diferenças estatisticamente significativas
Codeína/Histamina (DHS)	F = 20.27 p < 0.05	
Codeína/Histamina (Bencard)	F = 31.09 p < 0.05	
Hist (Leti)/Hist (DHS)	F = 21.30 p < 0.05	➜ com diferenças estatisticamente significativas
Hist (Leti)/Hist (Bencard)	F = 31.24 p < 0.05	
Hist (DHS)/Hist (Bencard)	F = 34.98 p < 0.05	

Quadro 3-3 — Matriz de correlação

	Codeína	H - 10mg/ml Leti	H - 10mg/ml DHS
H - 10mg/ml Leti	0.88		
H - 10mg/ml DHS	0.71	0.77	
H - 1mg/ml Bencard	0.57	0.49	0.43

DISCUSSÃO

Obtiveram-se 100% de resultados positivos com ambas as histaminas a 10mg/ml, bem como com o fosfato de codeína, mostrando-se esta uma referência positiva altamente reproductível, expressando dum modo mais fisiológico a reacção cutânea positiva.

A histamina a 1mg/ml originou 12% de resultados negativos, devendo abandonar-se como controlo positivo.

Embora seja geralmente aceite que não se devem comparar os resultados obtidos com os TC por *prick* utilizando histamina com aqueles obtidos com outras referências,[82] são no entanto extremamente relevantes as diferenças de potência encontradas entre dois extractos de histamina, teoricamente com a mesma concentração. Realçam-se as dificuldades que têm sido descritas quanto ao processo de fabricação de extractos de histamina, nomeadamente no referente à sua micronização, dificultando a interpretação dos TC em histamina-equivalente-*prick* (HEP).[12]

TRABALHOS 4

VALIDAÇÃO DE LANCETAS PARA TESTES CUTÂNEOS POR *PRICK*

INTRODUÇÃO

Uma das variáveis que influencia a sensibilidade e a reproductibilidade dos testes cutâneos é o tipo de lanceta utilizado, uma vez que dele pode depender a quantidade de alergénio e a profundidade a que este é introduzido na pele, obtendo-se resultados diferentes como tem sido demonstrado por diversos autores.[4,8,21,30,48,55,61,65,69]

Numa tentativa de estandardizar a lesão da pele e a quantidade de alergeno introduzida Morrow-Brown desenvolveu uma lanceta que limita a penetração da pele a uma profundidade determinada. No seu trabalho inicial, utilizando lancetas de aço foi estabelecido 1mm como limite de penetração óptimo,[61] devendo o dispositivo produzir uma lesão punctiforme e não incisa como acontecia com os dispositivos propostos por outros autores.[55,77,99] Visando uma melhor estandardização foram desenvolvidas lancetas com limite de penetração a 1mm, previamente recobertas com o alergénio,[18,79,87] cujos resultados não foram encorajadores, não estando actualmente disponíveis comercialmente.

Nos trabalhos que se seguem comparamos os resultados obtidos por lancetas de tipo Morrow-Brown (MB) de aço com 1mm de penetração e de material sintético com 1mm, 1.4mm e 1.6mm de penetração.

TRABALHO 4A

LANCETA METÁLICA *VERSUS* SINTÉTICA COM LIMITAÇÃO DE PENETRAÇÃO A 1mm

RESUMO

Compararam -se os resultados obtidos nos TC por *prick* efectuados em 43 doentes, com idades compreendidas entre os 3 e os 57 anos, 20 do sexo masculino e 23 do sexo feminino, utilizando duas lancetas com o limite de penetração de 1mm, uma em material sintético e outra em aço. Verificamos que a média das áreas obtidas foi significativamente menor para a lanceta sintética, tendo-se encontrado resultados falsos negativos em 11.8% dos casos para o *D.pt* e 30.2% para a histamina. Concluímos que a lanceta sintética com o limite de penetração de 1mm tem menor sensibilidade que a lanceta metálica.

OBJECTIVO

Comparar os resultados obtidos com duas lancetas do tipo MB (uma em material sintético e a outra em aço) ambas com limite de penetração de 1mm.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram estudados 43 doentes (20 do sexo masculino e 23 do sexo feminino), com idades compreendidas entre os 3 e os 57 anos, consecutivamente referenciados à consulta de Imunoalergologia, apresentando sensibilização aos ácaros do pó doméstico (TC positivos).

II) Metodologia dos testes cutâneos Particularidades:

- Lancetas: duas lancetas de tipo MB, uma em aço (*Prick* Lancetter DHS) outra em material sintético, ambas com limitador de penetração a 1mm.
- Extracto alergénico: *Dpt* (Bencard).
- Referência positiva: histamina a 1mg/ml (Bencard).

III) Método *in vitro* -

IgE específica sérica - Pharmacia Phadebas RAST
Efectuada em todos os doentes para *Dpt*
Valor de *cut off* +/- de 0.35 PRU/l.

IV) Análise estatística - *Package* SPSS-PC determinando-se as médias das áreas, sendo correlacionadas através do teste dos sinais, testes de Wilcoxon e de Spearman.

RESULTADOS

A média das áreas foi significativamente menor para a lanceta sintética (quadro 4-1).

Quadro 4A-1 — Áreas médias (mm²)

	Metálica	Sintética	test de Sign	test de Wilcoxon
Dpt	28.19	21.06	p = 0.004	p = 0.002
Hist.	10.90	7.83	p = 0.001	p < 0.001

A correlação entre as áreas (teste de Spearman) foi forte para o *Dpt* (r = 0.874) e fraca para a histamina (r = 0.402), ambas com diferenças estatisticamente significativas (p < 0.01).

Os resultados foram discordantes em 11.8% dos casos para o *Dpt* e em 30.2% para a histamina (figura 4A-2).

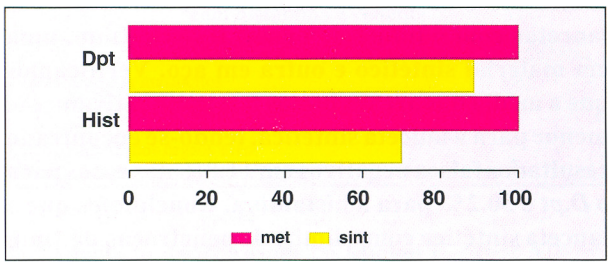


Figura 4A-2 – Resultados positivos

A determinação de IgE específica foi positiva para *Dpt* (Classe III/IV) em 100% dos doentes.

DISCUSSÃO

As duas lancetas mostraram resultados discordantes com diferenças estatisticamente significativas. Os resultados negativos obtidos com a lanceta sintética correspondiam a falsos negativos, uma vez que todos estes doentes tiveram valores positivos com a IgE específica determinada por RAST, com classes III e IV. Demonstrou-se assim que a lanceta sintética com limite de penetração a 1mm tem significativamente menor sensibilidade que a lanceta metálica, não se podendo considerar adequada para a utilização em rotina. Resultados semelhantes foram também referidos por outros autores.[8,21,48,78]

TRABALHO 4B

LANCETA METÁLICA *VERSUS* LANCETA SINTÉTICA COM LIMITE DE PENETRAÇÃO A 1.4mm

RESUMO

Compararam-se os resultados obtidos nos TC por *prick* efectuados com uma lanceta em material sintético com 1.4mm de penetração com uma lanceta metálica com 1mm de penetração. Foram estudados 104 doentes (59 do sexo masculino e 45 do sexo feminino) com idades compreendidas entre os 4 e os 73 anos. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as áreas obtidas com os dois tipos de lancetas, concluindo-se que a lanceta sintética com 1.4mm de penetração é adequada para a realização de testes cutâneos por *prick*.

OBJECTIVO

Comparar os resultados obtidos por uma lanceta do tipo MB em material sintético com 1.4 mm de penetração com os obtidos por uma lanceta metálica com limite de penetração de 1mm, previamente validada.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram estudados 104 doentes (59 do sexo masculino e 45 do sexo feminino), com idades compreendidas entre os 4 e os 73 anos, consecutivamente referenciados à consulta de Imunoalergologia.

II) Metodologia dos testes cutâneos - Particularidades:

- Lancetas: duas lancetas de tipo MB, uma em aço com limite de penetração a 1mm (*Prick* Lancetter

DHS), outra em material sintético com limite de penetração a 1.4mm.

- Extracto alergénico: *Dpt* (Merck - 50000 SBU/ml em fenol a 0.5%).

- Referências positivas: histamina a 10mg/ml (DHS e Leti).

III) Análise estatística - Determinação das médias das áreas e desvios padrão

Análise de variância - ANOVA

Matriz de correlação

RESULTADOS

Estatisticamente não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as áreas obtidas com os dois tipos de lanceta tendo-se verificado uma boa correlação (quadros 4B-1, 4B-2 e 4B-3).

Quadro 4B-1 — Áreas médias mm² (± DP)

	metálica	sintética
Dpt (n=65)	37.93 (± 28.20)	34.70 (± 26.72)
Hist. Leti (n=104)	27.99 (± 10.78)	26.60 (± 10.35)
Hist. DHS (n=104)	21.99 (± 8.42)	20.65 (± 8.07)

Quadro 4B-2 — Análise de variância

Lanceta metálica/sintética

Dpt	F = 0.277	p = 0.5993
Hist. Leti	F = 0.900	p = 0.3439
Hist. DHS	F = 1.384	p = 0.2408

Quadro 4B-3 — Matriz de correlação

Lanceta metálica/sintética

Dpt	r = 0.89	p < 0.001
Hist. Leti	r = 0.77	p < 0.001
Hist. DHS	r = 0.84	p < 0.001

DISCUSSÃO

A lanceta tipo MB sintética com limite de penetração a 1.4mm tem resultados sobreponíveis aos obtidos com a lanceta metálica com limite de penetração a 1mm, previamente validada, sendo por isso considerada adequada para realização de testes cutâneos. Poderá ser particularmente interessante a sua utilização em doentes de idade pediátrica.

TRABALHO 4C

LANCETAS SINTÉTICAS COM LIMITE DE PENETRAÇÃO A 1.4 E 1.6mm

RESUMO

Os autores compararam os resultados obtidos nos TC por *prick* efectuados com duas lancetas em material sintético, uma com 1.4mm e a outra com 1.6mm de penetração. Foram estudados 40 doentes (24 do sexo masculino e 16 do sexo feminino) com idades compreendidas entre os 3 e os 19 anos. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as áreas obtidas com os dois tipos de lancetas, verificando-se no entanto maior frequência de efeitos irritativos com a lanceta a 1.6mm. Concluiu-se que a lanceta sintética com 1.6mm de penetração não é adequada para a realização de TC por *prick*.

OBJECTIVO

Efectuar um estudo de pré-comercialização para determinar a adequação de uma lanceta do tipo MB em material sintético com limite de penetração de 1,6mm para realização de testes cutâneos, correlacionando os resultados obtidos com os de lanceta similar com limitação de penetração a 1.4 mm (previamente validada - trabalho 4B).

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram incluídos 40 doentes (24 do sexo masculino e 16 do sexo feminino) com idades compreendidas entre os 3 e os 19 anos, consecutivamente referenciados à consulta de Imunoalergologia.

II) Metodologia dos testes cutâneos - Particularidades:

- Lancetas: duas lancetas de tipo MB e em material sintético, uma com um limite de penetração a 1.4mm (*Prick* Lancetter DHS) e a outra com limite de penetração a 1.6mm.

- Extracto alergénico: *Dpt* (50000 SBU/ml em fenol a 0,5% - Merck - Alergopharma).

- Referência positiva: histamina a 10 mg/ml (Leti).

III) Análise estatística -

Determinação das médias das áreas e desvios padrão

Análise de variância - ANOVA

Matriz de correlação

RESULTADOS

Estatisticamente não se encontraram diferenças significativas entre as médias das áreas obtidas com os dois tipos de lanceta (quadro 4C-1) tendo-se verificado

uma boa correlação entre os resultados obtidos com as duas. A lanceta com 1.6mm de penetração originou maior lesão traumática (hemorragia punctiforme), pelo que se mostrou ser mais invasiva e com menor aceitação pelos doentes, particularmente em crianças.

Quadro 4C-1 — Áreas médias mm² (± DP)

	lanceta 1.4 mm	lanceta 1.6 mm
Dpt (n=26)	28.79 (± 23.89)	26.91 (± 21.86)
Hist (n=40)	25.23 (± 13.44)	27.01 (± 11.27)

Quadro 4C-2 — Análise de variância

	Lanceta 1.4 mm	Lanceta 1.6 mm
Dpt	F = 0.377	p = 0.4893
Hist	F = 1.078	p = 0.2921

Quadro 4C-3 — Matriz de correlação

	Lanceta 1.4 mm	Lanceta 1.6 mm
Dpt	r = 0.93	p < 0.001
Hist. Leti	r = 0.91	p < 0.001

DISCUSSÃO

A lanceta sintética com limite de penetração a 1.6mm não apresentou benefícios relativamente à anteriormente estudada tendo maior efeito traumático pelo que não se recomendou a sua produção em série com fins comerciais.

CONCLUSÃO

Da análise dos resultados obtidos, pode concluir-se que das lancetas estudadas, as que se mostraram mais adequadas para realização de testes cutâneos foram a lanceta em aço com 1mm de penetração e a lanceta em material sintético com 1.4 mm de penetração, parecendo esta última ser mais adequada para a realização de testes cutâneos na criança.

Diversos trabalhos têm investigado as diferenças dos TC por *prick* efectuados com diferentes lancetas, parecendo que os resultados discordantes se relacionam mais com a capacidade traumática do dispositivo em estudo, como se pode comprovar pela elevada percentagem de resultados positivos que se obtêm com as referências negativas (falsos positivos), obrigando a aumentar os *cut offs* de positividade.[64] Nos nossos estudos, foi sistemática a inexistência de pápulas mensuráveis com a referência negativa, o que realça a elevada especificidade do método, associada à boa sensibilidade obtida com a lanceta sintética com limite de penetração de 1.4mm.

TRABALHO 5

CAP SYSTEM: CORRELAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS COM TESTES CUTÂNEOS POR PRICK USANDO TRÊS EXTRACTOS ALERGÉNICOS DIFERENTES

RESUMO

Comparam-se os resultados dos TC com três extractos alergénicos diferentes, dois já utilizados de rotina (S1 e S2) e um numa base experimental (S3) e correlacionaram-nos com a concentração sérica de IgE específica determinada por CAP, em 164 doentes, com idades compreendidas entre os 3 e os 60 anos e com igual distribuição por sexos. Os alergénios testados foram *D. pteronyssinus, Lolium* e Parietária. Os resultados da Parietária foram também comparados com o RAST. Os extractos S1 e S3 não mostraram diferenças estatisticamente significativas, enquanto que S2 originou valores mais baixos para o *Dpt* e o *Lolium*, mostrando não ser adequado para diagnóstico. Verificou-se uma boa correlação entre os extractos S1 e S3 para o *Dpt* com o CAP, em termos de positivo/ /negativo, pelo que este método poderá ser usado para validação de novos extractos. Com a Parietária, os três extractos originaram valores sobreponíveis, tendo-se encontrado uma forte correlação entre S1/S3 e entre CAP/RAST.

INTRODUÇÃO

Os TC por *prick* são considerados como primeira linha no diagnóstico de alergia.[85] A qualidade e a potência relativa dos extractos podem influenciar os resultados, pois o número e qualidade dos epitopos administrados poderá variar em diferentes ocasiões, incluindo no mesmo doente, pelo que diferentes extractos do mesmo alergeno poderão formalmente originar resultados diferentes. Dos testes *in vitro,* o CAP SYSTEM quando comparado com o RAST parece ter maior sensibilidade com a mesma especificidade, bem como uma excelente correlação com os TC.[9,11,31,43,45,75]

OBJECTIVOS

Comparar os resultados dos TC por *prick* (em termos de média de áreas e positivo/negativo) usando 3 extractos alergénicos diferentes, 2 já utilizados na prática clínica (S1, S2) e um numa base experimental

(S3), para *Dermatophagoides pteronyssinus (Dpt), Lolium (L)* e Parietária (P) e correlacioná-los com as determinações de IgE específica por CAP SYSTEM (valores quantitativos e positivo/negativo) e para a Parietária também com RAST.

Estabelecer a prevalência de positividade dos testes cutâneos com extractos de Parietária.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram incluídos 164 doentes, consecutivamente observados em primeiras consultas, 50% do sexo masculino e 50% do feminino, com idades compreendidas entre os 3 e os 60 anos (média ± DP: 17.55 ± 15.65), 71.3% dos quais apresentavam idade inferior a 16 anos.

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Referida anteriormente.

III) Extractos alergénicos:

Os TC foram efectuados com 3 extractos alergénicos para o *Dpt, L* e P:

S1 (B) - Bencard: *Dpt* (1.2% em fenol a 0.5%); *L* (2.5% em fenol a 0.5%); P (1.0% em fenol a 0.5%).

S2 (D) - DHS: *Dpt, L,* P (400 AUR/ml glicerina a 50% em fenol a 0.4%).

S3 (M) - Merck Allergopharma: *Dpt, L,* P (50000 SBU/ml em fenol a 0.4%)

IV) Métodos *in vitro*

- Pharmacia CAP System

Determinação feita para todos os alergenos em todos os doentes

Cut off +/- 0.35 KU/l

- Pharmacia Phadebas RAST

Exame efectuado em todos os doentes para a Parietária

Cut off +/- 0.35 PRU/l

V) Análise estatística - *Package* SSPS-PC

RESULTADOS

O número de doentes incluído para cada extracto foi baseado em pelo menos um teste positivo: 106 para o *Dpt,* 53 para o *Lolium* e 29 para a Parietária (figuras 5-2, 5-3 e 5-4).

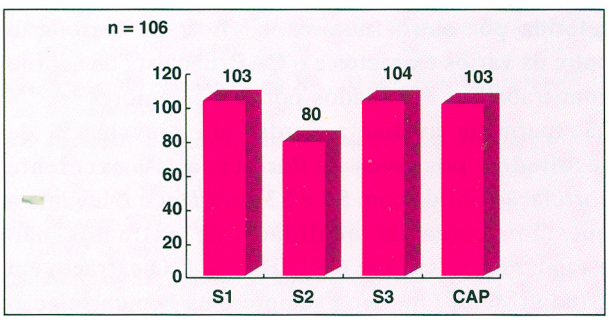


Figura 5-2 – Testes positivos - D. pteronyssinus

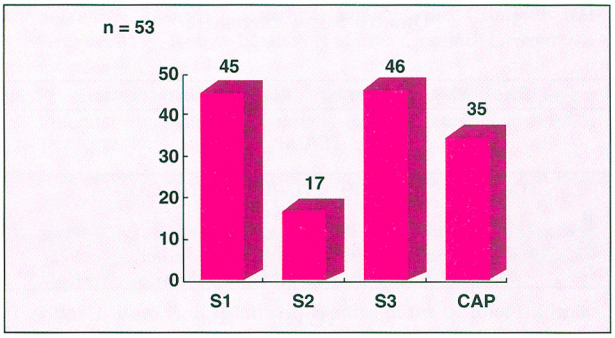


Figura 5-3 – Testes positivos - Lolium

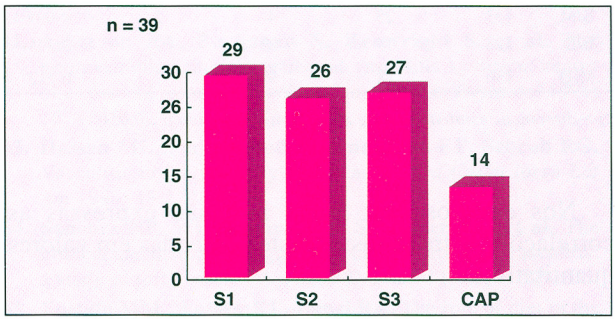


Figura 5-4 – Testes positivos - Parietária

Os resultados concordantes e discordantes entre todos os testes, expressos como +/-, são apresentados nos quadros 5-1, 5-2 e 5-3.

Quadro 5-1 D. pteronyssinus

	Resultados concordantes		Resultados discordantes		p*
TC/CAP					
	TC-/CAP-	**TC+/CAP+**	**TC+/CAP-**	**TC-/CAP+**	
B	58	100	3**	3**	0.022
M	58	101	3**	2**	0.01
D	59	78	2	25	**0.222**
TC/TC					
	-/-	**+/+**	**+/-**	**-/+**	
B/M	59	102	1	2	0.001
B/D	59	78	25	2	**0.222**
M/D	59	79	25	1	**0.082**

**p - diferenças estatisticamente significativas quando p >0.05*
*** - resultados discordantes devido a valores limite*

Quadro 5-2 — Lolium

	Resultados concordantes		Resultados discordantes		p*
TC/CAP					
	TC-/CAP-	**TC+/CAP+**	**TC+/CAP-**	**TC-/CAP+**	
B	115	31	14	4**	**0.298**
M	112	29	17	6**	**0.238**
D	122	10	7	25	**0.446**
TC/TC					
	-/-	**+/+**	**+/-**	**-/+**	
B/M	115	42	3	4	< 0.001
B/D	119	17	28	0	**0.089**
M/D	117	17	30	0	**0.129**

**p - diferenças estatisticamente significativas quando p >0.05*
*** - resultados discordantes devido a valores limite*

Quadro 5-3 — Parietária

	Resultados concordantes		Resultados discordantes		p*
TC/CAP					
	TC-/CAP-	TC+/CAP+	TC+/CAP-	TC-/CAP+	
B	132	11	18	3	0.652
M	133	10	17	4	0.824
D	133	9	17	5	0.813
TC/TC					
	-/-	+/+	+/-	-/+	
B/M	133	25	4	2	< 0.001
B/D	128	19	10	7	0.795
M/D	130	18	9	7	0.712

**p - diferenças estatisticamente significativas quando p >0.05*

Nos quadros 5-4, 5-5 e 5-6, são expressas as correlações entre todos os testes baseadas em valores quantitativos.

Quadro 5-4 — Matriz de correlação - *Dpt*

	Bencard		
Dome	0.384	**Dome**	
Merck	0.640	0.320	**Merck**
CAP	0.276	0.096*	0.208

** p > 0.05*

Quadro 5-5 — Matriz de correlação - *Lolium*

	Bencard		
Dome	0.716	**Dome**	
Merck	0.910	0.821	**Merck**
CAP	0.745	0.511	0.764

Quadro 5-6 — Matriz de correlação - Parietária

	Bencard			
Dome	0.449	**Dome**		
Merck	0.894	0.480	**Merck**	
CAP	0.232*	0.445	0.238*	**CAP**
RAST	0.345	0.492	0.352	0.942

** p > 0.05*

1 - *Dermatophagoides pteronyssinus*

Os resultados foram concordantes entre B, M e CAP, tendo o extracto da DHS mostrado valores estatisticamente diferentes (quadro 5-1). Encontrámos uma boa correlação em termos quantitativos entre B e M; fraca correlação entre o CAP e os extractos B e M e ausência de qualquer correlação com o extracto da DHS (quadro 5-4).

2 - *Lolium*

Verificámos existir correlação entre B, M e D em termos de áreas (quadro 5-5), embora relativamente à análise +/- o extracto da DHS apresentasse valores estatisticamente diferentes (menos positivos). Os resultados discordantes para TC (B e M)-/CAP+, apresentaram valores limite (quadro 5-2).

Verificou-se também uma fraca correlação entre D e o CAP.

3 - Parietária

Encontrámos uma prevalência de positividades de 19.8% para indivíduos com idade <16 anos e 33.3% para doentes com mais de 15 anos. Os únicos resultados concordantes foram entre B e M (quadro 7-3). A correlação foi boa apenas entre B e M e entre CAP e RAST (quadro 5-6).

DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostraram que para o *Dpt* existe uma boa correlação entre S1 e S3, apresentando resultados similares, bem como uma boa correlação de cada um deles com o CAP em termos +/-, o que indica que este método pode ser usado para validação de TC. Dados sobreponíveis foram encontrados por outros autores.[11,20] O extracto da DHS (S2) - extracto estandardizado - mostrou resultados que sugerem não ser adequado para diagnóstico quer para o *Dpt*, quer para o *Lolium*, sugerindo que este extracto deverá ser reavaliado. Provavelmente o problema poderá estar relacionado com a fracção α por si e não com a qualidade da estandardização. Os resultados discordantes TC+/CAP- deverão ser validados por testes de provocação para determinar se o CAP é menos sensível para o *Lolium*. Relativamente à Parietária encontrou-se uma forte correlação entre S1/S3 e entre CAP/RAST, a última das quais já foi referida por outros autores.[11,74] A fraca correlação entre os vários extractos e o CAP, não está de acordo com trabalhos efectuados por outros autores[11,20,74] e não permitiu avaliar a verdadeira prevalência de resultados positivos à Parietária. A excelente correlação obtida com S1 e S3 para *Dpt* e *L* levanta a questão acerca da qualidade de extractos não estandardizados como o S1- Bencard. O extracto em estudo (Merck) mostrou sempre uma boa correlação com Bencard e /ou CAP.

TRABALHO 6

TESTES CUTÂNEOS POR *PRICK* E IgE ESPECÍFICA (CAP SYSTEM) PARA *D. PTERONYSSINUS* - CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS NUMA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA

RESUMO

Avaliaram-se os resultados obtidos com testes cutâneos por *prick* efectuados com dois extractos alergénicos diferentes (Bencard e Merck/ /Allergopharma) para *D. Pteronyssinus (Dpt)* e correlacionaram-se com IgE específica (CAP System) em 122 indivíduos com idades compreendidas entre os 3 e os 19 anos, 72 do sexo masculino e 50 do sexo feminino. Os resultados mostraram boa capacidade em originar resultados positivos, bem como uma excelente correlação para os TC quantitativos, entre Bencard e Merck/Allergopharma. Comparando os TC com as determinações de IgE específica (resultado quantitativo e +/-), também foi encontrada uma boa correlação para Bencard/CAP e Merck/CAP.

INTRODUÇÃO

O uso de extractos alergénicos para o diagnóstico *in vivo* de alergia, levanta alguns problemas relacionados com a sua qualidade e potência relativa. Extractos diferentes de um mesmo alergeno poderão originar resultados diferentes, levantando-se a questão: como interpretar um resultado positivo? A determinação *in vitro* de IgE específica por determinado método é comparada com a clínica e com os TC considerando estes como o *gold standard.*

OBJECTIVOS

Os autores compararam os resultados dos TC por *prick* de dois extractos alergénicos diferentes (Bencard e Merck/Allergopharma) para *D. Pteronyssinus (Dpt)* e correlacionaram-nos com as determinações de IgE específica (CAP System). Pretendia-se determinar se os valores obtidos com estes diferentes extractos eram similares (áreas e +/-) e se os resultados do CAP (quantitativo e +/-) se correlacionavam com os dos TC.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram incluídos 122 doentes com idades compreendidas entre os 3 e os 19 anos (média ± DP): 9.67 ± 3.58), 72 do sexo masculino e 50 do sexo feminino. Destes doentes, 60% apresentavam asma e rinite; 22% apenas asma e 18% apenas rinite.

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Referida anteriormente.

III) Extractos alergénicos

Os TC foram efectuados com 2 extractos alergénicos para o *Dpt*:

1 - Bencard: *Dpt* (1.2% em fenol a 0.5%).

2 - Merck/Allergopharma: *Dpt* (50000 SBU/ml em fenol a 0.4%).

IV) Método *in vitro* - CAP SYSTEM Pharmacia

Determinação feita para o *Dpt* em todos os doentes

Cut off +/- 0.35 KU/l

V) Análise estatística- *Package* SPSS-PC

RESULTADOS

Entre os 122 doentes, 34 foram considerados não atópicos (história familiar negativa, TC e CAP negativos para os aeroalergénios mais comuns). Os restantes 88 doentes apresentavam pelo menos um teste positivo para o *Dpt*, sendo incluídos neste estudo (figura 6-1).

Os resultados concordantes e discordantes entre os testes, expressos como +/-, são apresentados no quadro 6-1. Obtiveram-se resultados concordantes para Bencard, Merck e CAP e quando eram discordantes, tratava-se de valores limite.

No quadro 6-2 estão representadas as correlações entre todos os testes baseadas em valores quantitativos. Obteve-se uma boa correlação entre Bencard e Merck e uma fraca correlação entre estes dois extractos e o CAP.

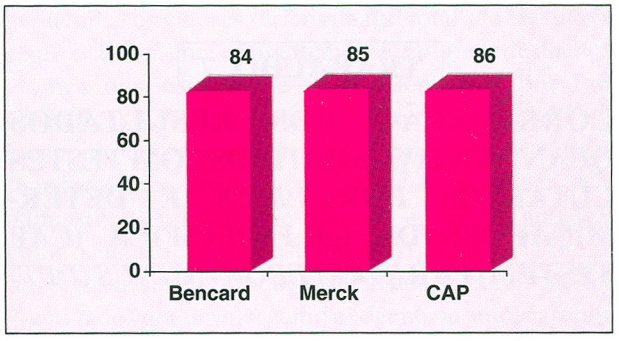


Figura 6-1 – Dpt positivos

Quadro 6-1

	Resultados concordantes		Resultados discordantes		p*
TC/CAP					
	TC-/CAP-	TC+/CAP+	TC+/CAP-	TC-/CAP+	
Bencard	35	83	1**	3**	0.02
Merck	35	83	2**	2**	0.02
TC/TC					
	+/+	-/-	+/-	-/+	
Bencard/Merck	83	36	1	2	0.01

**p - diferenças estatisticamente significativas quando p >0.05*

*** - resultados discordantes devido a valores limite*

Quadro 6-2 — Matriz de correlação

	Bencard	
Merck	0.639*	Merck
CAP	0.238*	0.184*

**p <0.05 - correlações com significado estatístico*

DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostraram que para o *Dpt* existe uma boa correlação entre os dois extractos, sem diferenças estatisticamente significativas. Cada um deles correlaciona-se bem com o CAP em termos de +/-, podendo verificar-se que o CAP foi positivo em 98.8% dos positivos da Bencard e 97.6% dos positivos da Merck. Outros autores já anteriormente haviam referido excelentes correlações.[11,20] Os resultados discordantes (em número e valor), apresentam valores limite, sugerindo boa especificidade para o CAP e suporta os excelentes resultados obtidos. A mínima área dos TC que se relacionou com a positividade do CAP (≥ 0.35 KU) foi de 3mm^2, embora em mais de 95% dos casos as áreas foram superiores a 7mm^2.

Com base nestes resultados, o CAP pode ser usado para validação de TC de extractos de *Dpt*. A correlação quantitativa entre TC e CAP foi fraca quando analisada globalmente, embora estatisticamente significativa.

Estes resultados sugerem o interesse de estudos alargados a outros extractos diferentes para testar a sua validade.

TRABALHO 7

CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS QUANTITATIVOS OBTIDOS COM TESTES CUTÂNEOS POR *PRICK* E DETERMINAÇÕES DE IgE ESPECÍFICA (CAP SYSTEM) PARA *D. PTERONYSSINUS (DPT)*

RESUMO

Num estudo feito previamente, compararam-se os resultados quantitativos de dois extractos alergénicos para *Dpt* com os resultados quantitativos de IgE específica por CAP, em 88 indivíduos sensibilizados ao *Dpt*, tendo-se obtido uma boa correlação. Baseados na mesma metodologia, efectuou-se um estudo com sete extractos diferentes para *Dpt*, comparando os resultados com os obtidos pela IgE específica determinada por Pharmacia CAP System. Encontraram-se boas correlações entre os extractos Bencard e Leti e entre Merck e Stallergenes. O CAP correlacionou-se bem com todos os extractos, excepto com o da DHS.

INTRODUÇÃO

Extractos alergénicos diferentes podem originar resultados diferentes, mesmo quando são utilizados extractos estandardizados. Vários estudos têm mostrado uma boa correlação entre os valores de IgE específica determinados por CAP e os testes cutâneos por *prick* com vários extractos de *Dpt*.[11,20]

OBJECTIVOS

Comparar os resultados quantitativos dos TC utilizando sete extractos alergénicos diferentes para *Dpt* e correlacioná-los com a IgE específica determinada por CAP System, para validar esses extractos.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram incluídos 60 doentes com idades compreendidas entre os 7 e os 53 anos,

35 do sexo masculino e 25 do sexo feminino, sensibilizados a ácaros do pó doméstico.

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Referida anteriormente.

III) Extractos alergénicos - Os TC foram efectuados com 7 extractos alergénicos para o *Dpt*:

Abelló (Ab), Bencard (Be), Dome (Do), Leti (Le), Lofarma (Lo),

Merck (Me) e Stallergenes (St).

IV) Método *in vitro* - CAP SYSTEM Pharmacia

Determinação feita para o *Dpt* em todos os doentes

Cut off +/- 0.35 KU/l

V) Análise estatística - *Package* SPSS-PC

RESULTADOS

Todos os testes foram positivos em todos os doentes.

As maiores áreas de pápulas foram obtidas com os extractos Ab e Be (figura 7-1).

Figura 7-1 – Resultados quantitativos - áreas médias ± DP

No quadro 7-1 estão representadas as correlações entre todos os testes baseadas em valores quantitativos. As melhores correlações estabeleceram-se entre os extractos Be e Le e entre Me e St.

Quadro 7-1 — Matriz de correlação - TC quantitativos

	Ab	Be	Do	Le	Lo	Me
Be	0.684					
Do	0.675	0.626				
Le	0.523	**0.787**	0.491			
Lo	0.644	0.596	0.596	0.546		
Me	0.479	0.709	0.494	0.680	0.532	
St	0.668	0.708	0.477	0.692	0.562	**0.847**

No quadro 7-2 estão representadas as correlações de todos os extractos com o CAP (+/- e quantitativo), tendo-se encontrado uma boa correlação com a IgE específica em todos os extractos, excepto o da Dome.

Quadro 7-2 — Matriz de correlação TC/CAP System

	Ab	Be	Do	Le	Lo	Me	St
CAP	0.267	0.366	0.224	0.392	0.397	0.375	0.315

valor de significância r > 0.267

DISCUSSÃO

A análise dos resultados permitiu verificar que para o *Dpt* existe uma boa correlação entre os vários extractos entre si e quando comparados com o CAP System, embora se encontrassem diferenças significativas nas áreas das pápulas obtidas.

Estes resultados realçam a importância da validação dos extractos para os TC, sugerindo a necessidade de se efectuarem estudos com outros alergénios.

TRABALHO 8

DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS DE IgE ESPECÍFICA (CAP SYSTEM) E DE TESTES CUTÂNEOS POR *PRICK* - - CORRELAÇÃO COM DIFERENTES DOENÇAS ALÉRGICAS

RESUMO

Os autores pretenderam determinar a correlação entre os resultados quantitativos dos TC (Bencard e Merck) e determinação de IgE específica (CAP System) em várias doenças alérgicas com a mesma gravidade clínica, numa população pediátrica constituída por 73 crianças com idades entre os 4 e os 15 anos, sensibilizadas ao *Dpt*. A população foi dividida em três grupos: Rinite (R) - 13; Asma (A) -16 e Asma + Rinite (A+R) - 44. Relativamente aos TC não se encontraram diferenças significativas entre os três grupos com ambos os extractos. Quanto aos valores de IgE específica determinada por CAP, encontraram-se diferenças com significado estatístico entre os vários grupos, com valores mais elevados no grupo com asma e rinite e mais baixos nas crianças apenas com rinite.

INTRODUÇÃO

Tem sido referido por diversos autores[9,15,37,105] a existência de correlação entre as concentrações séricas de IgE total e a gravidade da patologia atópica (asma e/ou rinite). Trabalhos que relacionem os níveis de IgE específica e/ou os resultados quantitativos dos TC por *prick* para um só alergénio, em indivíduos com diferentes patologias atópicas são escassos. O CAP System mostrou ter uma elevada sensibilidade e especificidade, bem como excelente correlação com os TC.[43]

OBJECTIVO

Determinar a correlação existente entre os resultados quantitativos dos TC e das determinações de IgE específica (Pharmacia CAP System) e várias doenças alérgicas respiratórias com gravidade clínica semelhante, numa população pediátrica sensibilizada ao *D. pteronyssinus*.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Estudaram-se 73 doentes entre os 4 e os 15 anos (idade média ± DP: 9.70 ± 3.24), 47 do sexo masculino e 26 do feminino. Os doentes foram divididos em 3 grupos: Rinite (R) - 13, Asma (A) - 16; Asma e Rinite (A+R) - 44, apresentando sintomatologia clínica nasal e/ou brônquica de moderada gravidade, todos em corticoterapia inalada (nasal - 100 a 200 µg por dia e/ou brônquica - 200 a 400 µg por dia).

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Particularidades:
Extractos alergénicos para *Dpt*: Merck (50000 SBU/ml em fenol a 0.5%) e Bencard (1.2% em fenol a 0.5%).

III) Método *in vitro* -
Pharmacia CAP System *(D. pteronyssinus)*.
Cut off +/- 0.35 KU/l.

IV) Análise estatística - Determinação da média das áreas dos TC e concentrações séricas de IgE específica; teste T de Student.

RESULTADOS

O valor médios das áreas dos TC e CAP quer na população geral quer nos vários grupos encontram-se apresentados nos quadros: 8-1 e 8-2 e figuras 8-1 (Bencard) e 8-2 (CAP).

Quadro 8-1 — Resultados - população global

n	73
Idade média (± DP)	9.70 (3.24)
TC - mm^2 (área média ± DP)	
Merck	46.57 (28.95)
Bencard	49.09 (30.12)
CAP - KU/l (valores médios ± DP)	31.98 (28.90)

Quadro 8-2 — Resultados

	Rinite	Asma	Asma e Rinite
n	13	16	44
Idade média (± DP)	11.31 (2.72)	9.26 (2.56)	9.48 (3.50)
TC - mm^2 (área média ± DP)			
Merck	36.72 (22.18)	50.70 (35.24)	47.98 (39.34)
Bencard	43.20 (20.69)	50.48 (25.11)	51.93 (28.30)
		p > 0.05	
CAP - KU/l (valores médios ± DP)	13.92 (12.44)	27.01 (26.26)	39.12 (29.35)
		p < 0.05	

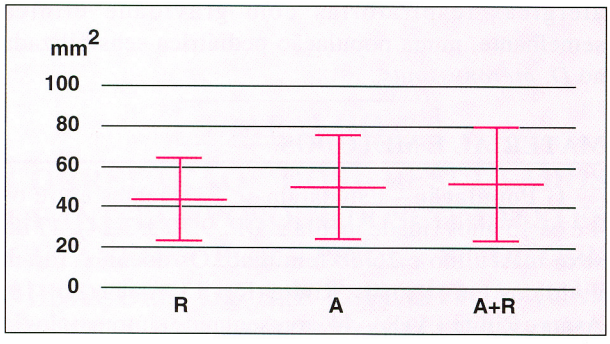


Figura 8-1 – Resultados TC (Bencard) - áreas médias ± DP

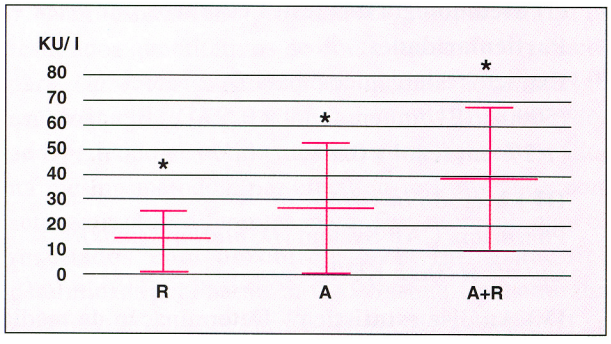


Figura 8-2 – CAP System - concentrações médias ± DP
** p < 0.05 - diferenças estatisticamente significativas*

DISCUSSÃO

Os resultados dos TC quantitativos com ambos os extractos, não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos: asma, rinite e simultaneamente asma e rinite. Com as determinações quantitativos de IgE específica (Pharmacia CAP System), pelo contrário, encontrámos valores mais baixos no grupo de rinite e mais elevados no grupo com asma e rinite, com diferenças estatisticamente significativas. Com base em trabalhos prévios,[9,37,105] sugerindo que na mesma patologia, uma maior gravidade clínica está relacionada com altos títulos de IgE específica para vários alergénios (ácaros, gato, bétula...), estes resultados poderão apoiar a hipótese que em doentes monosensibilizados a alergénios de ácaros do pó doméstico, a associação asma e rinite apresenta maior gravidade que a asma e que esta é mais grave que a rinite, observando-se uma relação directa entre a área de mucosa com processo inflamatório e os níveis de IgE específica encontrados, que poderiam então ser considerados marcadores do processo alérgico.

TRABALHO 9

ALATOP: VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO MULTIALERGÉNICO *IN VITRO* DE DESPISTE DE ATOPIA

INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência das doenças alérgicas e as limitações da IgE total no despiste de atopia, originaram o aparecimento de testes multiespecíficos para os alergénios mais comuns, nomeadamente o Phadiatop e o Stallerscreen.[53,57,103] Estes, quando comparados com a IgE total, deverão apresentar maior sensibilidade e especificidade. O Alatop - DPC é um novo teste *in vitro* multialergénico que inclui aero-alergenos e alergénios alimentares comuns em fase líquida. Está disponível para populações pediátricas e para adultos e o resultado é expresso apenas em termos de positivo/negativo. Não existem ainda estudos efectuados em populações não caucasianas, nomeadamente em relação ao *cut off* +/- a utilizar.

TRABALHO 9A

ALATOP: SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALOR PREDICTIVO DE UM TESTE *IN VITRO* DE DESPISTE DE ATOPIA NUMA POPULAÇÃO CAUCASIANA

RESUMO

Determinou-se a sensibilidade, a especificidade, o valor predictivo positivo e negativo e a eficácia do Alatop - um novo método de despiste de atopia- - comparando os resultados obtidos entre o Alatop e os TC por *prick*, em 266 doentes pediátricos que apresentavam uma boa correlação entre a História Clínica e os TC. Obtiveram-se bons resultados (sensibilidade - 89% e especificidade - 98%), o que valida a utilização do Alatop - DPC como teste de rastreio de atopia.

OBJECTIVOS

O objectivo deste estudo foi validar o Alatop como teste de despiste de atopia, com base na determinação da sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo e negativo e eficácia do teste, quando comparado com dados clínicos e TC por *prick*. Determinou-se também a reproductibilidade do método.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Estudaram-se 266 doentes com idades compreendidas entre os 1 e os 15 anos, 170 do sexo masculino (64%) e 96 do sexo feminino (36%). Destes doentes 163 foram considerados atópicos com base numa boa correlação entre os dados clínicos e os testes cutâneos e 103 não atópicos.

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Particularidades:

Extractos alergénicos - bateria de aeroalergénios e alergénios alimentares mais comuns da Bencard: *D. pteronyssinus, D. farinae*, Pólens (B2, B3, B5), Fungos (A13), Gato, Cão, Leite, Ovo e Cereais.

III) Metodologia do Alatop - DPC:

- O Alatop consiste numa mistura de 15 alergenos em fase líquida (matriz de polímeros/co-polímeros solúveis): D1 - *D. pteronyssinus*; E1 - Epitélio de Gato; E3 - Pelo de Cavalo; E5 - Pelo de Cão; F1 - Clara de Ovo; F2- Leite de Vaca; F14 - Soja; G6 - Erva do Prado; G10 - *Johnson grass*; M2 - *Cladosporium herbarum*; M6 - *Alternária tenuis*; T3 Vidoeiro; T17 - Cedro Japonês; W1 - *Short Ragweed*; W6 - Artemísia.

- Os resultados são expressos em termos qualitativos (positivo/negativo).

IV) Parâmetros analisados:

- Sensibilidade - proporção de casos positivos de Alatop relativamente aos casos positivos por TC.

- Especificidade - proporção de casos negativos de Alatop por TC negativos.

- Concordância - número de indivíduos correctamente classificados (positivos e negativos) em percentagem do total de testados.

- Valor predictivo positivo - proporção de verdadeiros positivos em relação ao total de positivos.

- Valor predictivo negativo - proporção de verdadeiros negativos em relação ao total de negativos.

RESULTADOS

Na figura 9A-1 estão expressas as relações entre os testes cutâneos e o Alatop. Foram incluídos 266 doentes, 163 atópicos e 103 não atópicos.

Encontramos os seguintes valores: sensibilidade - 89.57%; especificidade - 98.06%; concordância - 92.86%; valor predictivo positivo - 98.65; valor predictivo negativo - 85.59%. A reproductibilidade do teste foi de 5.65%.

		ALATOP	
		+	-
TC	+	146	17
	-	2	101

Figura 9A-1 — Correlação dos resultados com base em testes +/-

TRABALHO 9B

ALATOP-RIA: VALIDAÇÃO DE UM TESTE *IN VITRO* DE DESPISTE DE ATOPIA NUMA POPULAÇÃO NÃO CAUCASIANA

RESUMO

Estudou-se um novo teste comercial de despiste de atopia *in vitro*, numa população não caucasiana, comparando os resultados obtidos com os dos TC e com a história clínica, em 208 doentes de raça negra (crianças e adultos) das Consultas de Imuno-alergologia instaladas em Cabo Verde - África. Obtiveram uma boa sensibilidade e uma menor especificidade, podendo estes resultados reflectir os elevados valores de IgE total sérica encontrados.

O recurso a um diferente factor de correcção (0.85) melhorou a especificidade e eficiência do teste, sugerindo-se a sua utilização em populações não caucasianas.

OBJECTIVOS

Foi objectivo deste trabalho validar a utilidade do ALATOP-RIA, como teste de despiste de atopia, numa população não caucasiana, com base na determinação da sensibilidade, especificidade, valor predictivo positivo e negativo e eficiência do teste, quando comparado com os TC e a História Clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

I) População - Foram incluídos 208 doentes de raça negra, com idades compreendidas entre os 1 e 77 anos (média: 16.2 A), 89 do sexo masculino (43%) e 119 do sexo feminino (57%).

II) Metodologia dos testes cutâneos por *prick* - Referida em 9A.

III) Metodologia do ALATOP - RIA (DPC) - Particularidades:

Utilização de vários factores de correcção - o proposto (0.70) e outros

IV) IgE total sérica - ALASTAT (DPC).

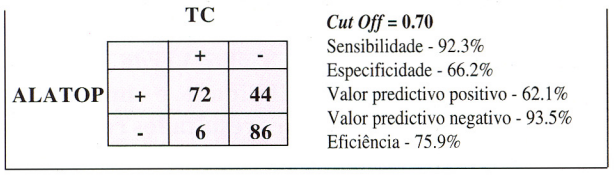
V) Comparação do ALATOP com os resultados dos TC e da História Clínica (Clin), utilizando diferentes factores de correcção; comparação da História clínica com os TC.

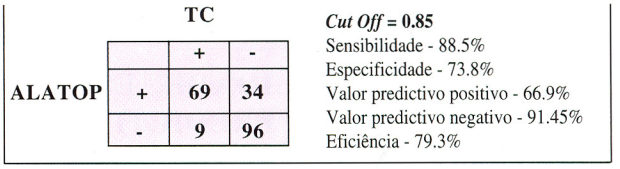
VI) Parâmetros analisados - Referido em 9A.

RESULTADOS

Na figura 9B-1 estão expressas para a totalidade da população estudada, as relações entre a presença de atopia (definida como positividade dos TC para um ou mais alergenos) e os resultados do ALATOP, utilizando diferentes factores de correcção (incluindo o recomendado, de 0.70).

Encontrámos uma sensibilidade de 92.3%, especificidade de 66.2%, concordância - 75.9%, valor predictivo positivo de 62.1% e valor predictivo negativo de 93.5%.





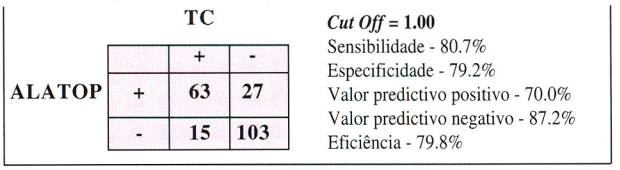
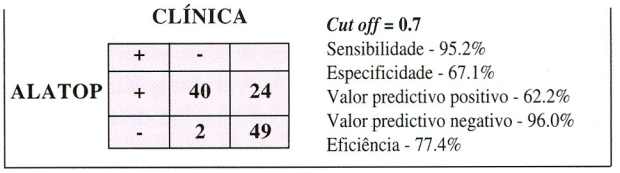
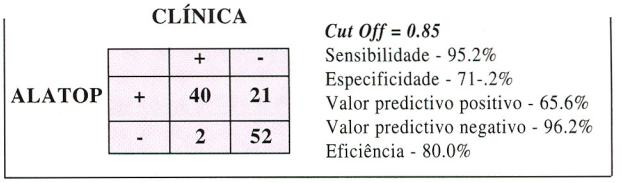


Figura 9B-1 — Relações entre os testes cutâneos e o Alatop

Na figura 9B-2 estão expressas para 115 doentes as relações entre a presença provável de atopia (definida como positividade da história clínica) e os resultados do ALATOP, utilizando diferentes factores de correcção.





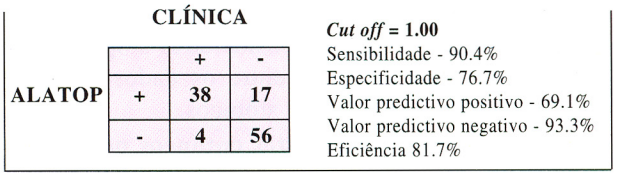


Figura 9B-2 — Relações entre a História Clínica e o Alatop

Na figura 9B-3 estão expressas as relações entre a presença de atopia (definida como positividade da História Clínica) e os resultados dos TC.

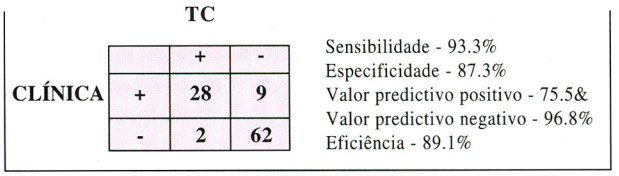


Figura 9B-3 — Relações entre os testes cutâneos e a história clínica

Na figura 9B-4 estão expressos os valores séricos de IgE total.

ALATOP+/TC+	699.4	p < 0.05
ALATOP+/TC-	469.1	
ALATOP-/TC-	334.8	
TOTAL	406.0	

Figura 9B-4

DISCUSSÃO

Na abordagem do doente alérgico é importante distinguir o indivíduo atópico do não atópico. A história clínica, o exame físico e a determinação de IgE total são o primeiro passo na investigação de alergia, embora em muitas situações a história clínica seja atípica e os níveis séricos de IgE podem ser influenciados por um grande número de situações nomeadamente a existência de doenças parasitárias.

Os testes cutâneos por *prick* devem ser efectuados apenas por especialistas, para evitar incorrecta interpretação. A determinação de IgE específica para diversos alergénios torna-se um teste caro, que não deve ser usado indiscriminadamente e o seu uso deve ser reservado também ao alergologista.

No trabalho 9A encontrámos valores elevados de sensibilidade e especificidade, bem como uma boa concordância, o que valida o Alatop como um teste *in vitro* eficaz na detecção múltipla de IgE específica.

A população não caucasiana estudada no trabalho 9B apresentava valores de IgE total sérica elevados, mesmo no grupo com resultados negativos para o Alatop e os TC. Encontrámos tal como no trabalho 9A uma boa sensibilidade para o Alatop; o valor mais baixo da especificidade poderá ser atribuído à utilização do *cut off* +/- usado em populações caucasianas, que pode não ser o adequado para a população em estudo, atendendo aos valores elevados de IgE encontrados. Através da determinação das relações entre os testes cutâneos e/ou história clínica com os resultados do Alatop, sugere-se a utilização de um factor de correcção diferente (de 0.85) em populações não caucasianas.

Os valores tão elevados da IgE total sérica encontrados deverão ser melhor esclarecidos com um estudo das infestações parasitárias destes pacientes.

Por tratar-se de um teste simples, barato e de fácil interpretação, o Alatop poderá ser requisitado de um modo isolado por médicos não especialistas, como primeira linha na investigação de atopia.

TRABALHO 10

ASMA E SENSIBILIZAÇÃO ALERGÉNICA NOS PRIMEIROS ANOS DE VIDA

RESUMO

Com o objectivo de avaliar a utilidade dos testes cutâneos por *prick* como método de diagnóstico de sensibilização alergénica em crianças e o seu valor predictivo em relação à evolução clínica, efectuou-se uma avaliação dos resultados dos TC por *prick* de uma população de 308 crianças asmáticas com idade ≤6 anos, divididas em dois grupos etários consoante tinham mais ou menos de 3 anos, 61% do sexo masculino e 39% do sexo feminino, observadas na consulta de Imunoalergologia em 1993. Três anos depois (1996) foram reavaliados clinicamente 233 dessas crianças, tendo-se efectuado TC naquelas em que inicialmente eram negativos. Os testes cutâneos foram positivos em 28% das crianças com menos de 3 anos e 56% das crianças com 3 a 6 anos (47% no total). Os ácaros do pó doméstico foram os alergénios predominantes em ambos os grupos etários (93% no grupo A e 98% no grupo B). Encontrámos um valor predictivo relativamente à evolução clínica da asma, positivo de 95.2% e negativo de 59.3% para a totalidade das crianças, sobreponível nos dois grupos etários.

INTRODUÇÃO

É globalmente reconhecida a importância de um diagnóstico precoce de asma brônquica nas crianças com episódios de sibilância nos primeiros anos de vida, de forma a permitir a instituição de medidas terapêuticas adequadas, prevenindo assim o aparecimento de sequelas no futuro. Daí surge a necessidade de procurar critérios que permitam prever a evolução da situação clínica neste grupo de crianças.[52]

Um dos factores que tem sido associado a evolução para asma brônquica crónica é a existência de sensibilização alergénica precoce. Por este motivo discute-se a utilidade e o valor predictivo dos testes cutâneos nos primeiros anos de vida. Alguns autores questionam a sua utilidade nos grupos etários mais baixos, dada a hiporreactividade cutânea que existe nos primeiros meses de vida[19] embora alguns advoguem a sua execução, utilizando como critério de positividade valores de *cut off* +/- de 1 ou 2mm de diâmetro das pápulas.[56]

Mais controversa ainda é a importância dos pneumoalergenos, nomeadamente dos ácaros do pó doméstico neste grupo etário.[94,95] Está também por esclarecer se em crianças de risco atópico a clínica pode preceder a sensibilização.[101]

OBJECTIVO

Avaliar a utilidade dos TC por *prick* como método de diagnóstico de sensibilização alergénica nos primeiros anos de vida e o seu valor predictivo em relação à evolução clínica da asma brônquica.

MATERIAL E MÉTODOS

Fez-se uma avaliação dos resultados dos TC de uma população de 308 crianças com clínica de asma de idade ≤6 anos, 61% do sexo masculino e 39% do sexo feminino, observadas na consulta de Imunoalergologia em 1993.

Em 1996 foram reavaliadas clinicamente 233 dessas crianças, tendo-se efectuado TC naquelas em que inicialmente eram negativos.

Os testes cutâneos incluíam, de acordo com a situação clínica e o grupo etário da criança, os pneumoalergenos e os alergénios alimentares mais frequentes.

Utilizou-se como *cut off* +/- 7mm² de área das pápulas.

A população estudada foi dividida em dois grupos: A - crianças com idade inferior a 3 anos (n = 102); B - crianças com idade superior ou igual a 3 anos (n = 206).

Análise estatística: Qui-quadrado - Pearson
Coeficiente fi (FI)
Determinação do valor predictivo positivo e negativo

RESULTADOS

A distribuição etária é apresentada na figura 10-1. Os testes cutâneos foram positivos em 28% das crianças com menos de 3 anos e 56% das crianças com 3 a 6 anos (figura 10-2).

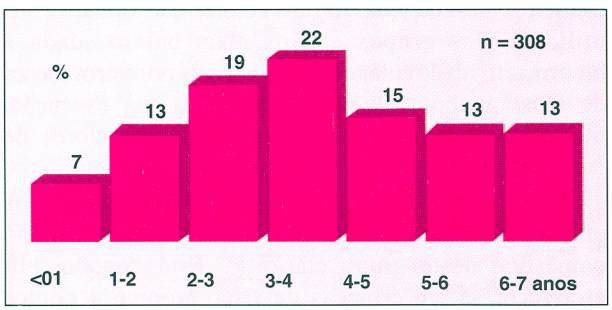


Figura 10.1 – Distribuição etária

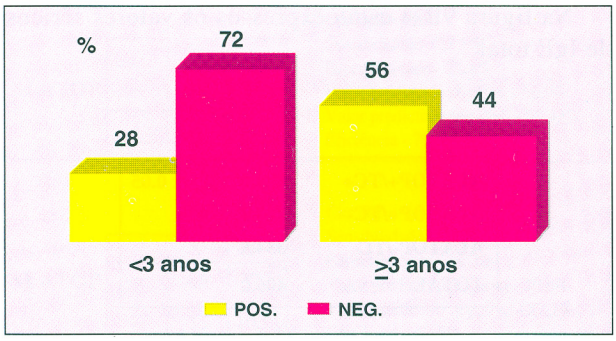


Figura 10.2 – Testes cutâneos

No total os testes foram positivos em 145 crianças (47%). Os ácaros do pó doméstico foram os alergénios predominantes em ambos os grupos etários (93% no grupo A e 98% no grupo B). Encontravam-se sensibilizados a outros alergénios 31% das crianças atópicas do grupo A (predominantemente alergénios alimentares) e 18% do grupo B (predominantemente pólens, faneras e fungos).

Passados 3 anos foram reavaliadas 233 (76%) das crianças inicialmente estudadas, 82 com < 3 anos e 151 com ≥ 3 anos.

Em ambos os grupos quase todas as crianças que tinham testes cutâneos positivos inicialmente, permaneciam sintomáticas, enquanto que mais de metade das crianças com TC inicialmente negativos se encontrava assintomática há pelo menos um ano (quadro 10-4).

Quadro 10-4 — Evolução clínica (n = 233)

		n	Sintomáticos	Assintomáticos	p	FI
Total	TC +	125	119 (95%)	6 (5%)	< 0.00005	0.59
	TC -	108	44 (41%)	64 (59%)		

Relativamente às crianças inicialmente com TC negativos verificámos na reavaliação, que quase metade das que permaneciam sintomáticas, apresentavam agora TC positivos, em ambos os grupos etários. As crianças que estavam assintomáticas permaneciam na quase totalidade com testes negativos (quadro 10-5).

Quadro 10-5 — Reavaliação - TC inicialmente negativos (n = 108)

		n	TC +	TC -	p	FI
Total	sintomáticos	44	19 (43%)	25 (57%)	0.013	0.43
	assintomáticos	64	5 (8%)	59 (92%)		

Encontramos um valor predictivo positivo de 95.2% e negativo de 59.3% para a totalidade das crianças, sobreponível aos valores encontrados para cada grupo etário (quadro 10-6).

Quadro 10-6 — Valor predictivo dos TC

	valor predictivo +	valor predictivo -
total	95.2%	59.3%
< 3 anos	100%	60.7%
≥ 3 anos	93.9%	57.7%

DISCUSSÃO

Encontramos uma elevada prevalência de atopia (identificada pela positividade dos testes cutâneos) em crianças asmáticas nos primeiros anos de vida. Ao termos usado um método de TC por *prick* correctamente validado, exclui-se a possibilidade dos resultados encontrados se poderem relacionar com questões técnicas.

Os alergénios mais frequentemente positivos foram os ácaros domésticos, mesmo nos grupos etários mais baixos. Estes resultados estão em desacordo com alguns estudos que mostraram não haver associação entre asma e sensibilização a aeroalergénios nos primeiros anos de vida e que salientam a importância dos alergénios alimentares.[90,94,95,104]

A existência de um elevado valor predictivo positivo dos TC, relativamente à evolução clínica da asma brônquica, mesmo abaixo dos 3 anos de idade (sobreponível ao encontrado no grupo de crianças mais velhas), sugere que a sensibilização a aeroalergénios é um factor que favorece a manutenção da sintomatologia, embora muitas agudizações possam ser desencadeadas por infecções virais, tal como é defendido por Silverman et al.[101] A sibilância nos primeiros anos de vida teria um melhor prognóstico se não associada a sensibilização alergénica.[52]

O baixo valor predictivo negativo encontrado poderá estar relacionado com a existência nesta população de um grupo de asmáticos em que a sensibilização alergénica se fará mais tardiamente, bem como com alguns casos de asma brônquica não atópica.

Este dados sugerem que a idade não deverá ser um factor limitante à execução de TC por *prick* na criança, devendo pelo contrário ser considerados como rotina na investigação de atopia neste grupo etário, tendo em conta o referido anteriormente quanto aos critérios de positividade. A demonstração de sensibilização deverá ser mais um elemento a favor do diagnóstico de asma.[96]

BIBLIOGRAFIA

1. **Aas K.** Some variables in skin prick testing. *Allergy.* 1980; 35: 250-2.
2. **Aas K, Backman A, Belin L et al.** Standardization of allergen extracts with appropriate methods. *Allergy.* 1978; 33: 130-7.
3. **Abou P, Bousquet J, Charpin J et al.** Durée de vie d'un extrait de dactyle (Dactylis glomerata) lyophilisé et reconstitué. *Rev Fr Allergol.* 1984; 24: 81-3.
4. **Adinof A, Rosloniec DM, McCall LL et al.** A comparison of six epicutaneous devices in the performance of immediate hypersensitivity skin testing. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 84: 168-74.
5. **Adinof A, Rosloniec DM, McCall LL et al.** Immediate skin test reactivity to Food and Drug Administration approved standardized extracts. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 86: 766-74.
6. **Anderson MC, Baer H.** Antigenic and allergenic changes during storage of a pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 1982; 69: 3-10.
7. **Ayuso R, Rubio M, Herrera T et al.** Stability of lolium perenne extract. *Ann Allergy.* 1984; 53: 426-31.
8. **Basomba A, Sastre A, Pelaez A et al.** Standardization of the prick test. A comparative study of three methods. *Allergy.* 1985; 40: 395-9.
9. **Bauer CP.** Clinical allergy and specific IgE determination in children. Comparison of RAST and Pharmacia CAP System. In Clinical workshop IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis. *A report of an international workshop; Uppsala, Sweden.* 1988: 21-4.
10. **Blackley CH:** Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay-fever or hay-asthma). *Editores: Baillere, Tindal and Cox. Londres,* 2nd ed, 1880: 84-5.
11. **Bousquet J, Michel F-B.** Comparison of Phadebas RAST and a new, automated specific IgE test. In Clinical workshop IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis. *A report of an international workshop; Uppsala, Sweden.* 1988: 8-9.
12. **Bousquet J, Michel F-B.** Precision of prick and puncture tests. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 90: 870-2.
13. **Bousquet J, Michel F-B.** In vivo Methods for Study of Allergy - Skin Tests, Techniques and Interpretation. In: **Middleton E, Reed CE, Ellis EF et al**. *Allergy, Principles and Practice,* 4th ed, 1993, cap 22: 573-94.
14. **Brunet D, Rufin P, Paty E et al.** Exploration Clinique. *In Allergologie Pédiatrique. Editores:* **Paupe J, Scheinmann P, De Blic J**. 2e ed, 1994: 129-36.
15. **Burrows B, Martinez FD, Halonen M et al.** Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med.* 1989; 320: 271-7.
16. **Casanovas M, Marañón F, Bel I.** Comparison of skin prick test assay and reverse enzyme immunoassay competition (REINA-C) for biological activity of allergens. *Clin Exp Allergy.* 1993; 24: 134-9.
17. **Center G, Shuller N, Zeleznick LD.** Stability of antigen E in commercially prepared ragweed pollen extracts. *J Allergy Clin Immunol.* 1974; 54 (5): 305-10.
18. **Chanal I, Horst M, Segalen C et al.** Comparison between modified skin prick test with standardized allergen extracts and Phazet. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 82: 878-81.

19. **Chipps BE, Talamo RC, Mellitis ED et al.** Immediate (IgE--mediated) skin testing in the diagnosis of allergic disease. *Ann Allergy.* 1978; 41: 211.

20. **Dal Monte A, Zaccherini P, Tomasini C.** Comparison between CAP System and skin prick test in allergic disease. *Schweiz Med Wschr.* 1991; 121 (Suppl 40/II): 76.

21. **Demoly P, Bousquet J, Madersheid JC et al.** Precision of skin prick and puncture tests with nine methods. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 88: 758-62.

22. **Dreborg S.** The skin prick test - Methodological studies and clinical applications. *Linkîping University Medical Dissertation.* N.º 239. 1987; 8-41.

23. **Dreborg S.** Evaluation of immunotherapy by skin prick test methods. *Cadernos Imun Alergol Ped.* 1989; 4 (1): 10-5.

24. **Dreborg S.** Precision of biological standardization of allergenic preparations. *Allergy.* 1992; 47: 291-4.

25. **Dreborg S.** The batch-to-batch variation of the potency of dog- and cat-allergen-coated lancets. Evaluation by skin prick testing. *Allergy.* 1993; 48: 373-6.

26. **Dreborg S, Basomba A, Belin L et al.** Biological equilibration of allergen preparations: methodological aspects and reproductibility. *Clin Allergy.* 1987; 17: 537-50.

27. **Dreborg S, Belin L, Eriksson NE et al.** Results of biological standardization with standardized allergen preparations. *Allergy.* 1987; 42. 109-16.

28. **Dreborg S, Foucard T.** Allergy to apple, carrot and potato in children with birch-pollen allergy. *Allergy.* 1983; 38: 167-73.

29. **Dreborg S, Holgersson M, Nilsson G et al.** Dose response relationship of allergen, histamine releasers in skin prick test and precision of the skin prick test method. *Allergy.* 1987; 42: 117-25.

30. **Engler DB, DeJarnatt AC,** Sim TC et al. Comparison of the sensivity and precision of four skin test devices. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 90: 985-91.

31. **Ewan P W, Coote D.** Evaluation of a new in vitro diagnostic method for allergy. *Proceedings of the XIII International Congress of Allergology and Clinical Immunology; Montreux.* 1988: 21.

32. **Frew AJ.** Skin tests in clinical practice and epidemiology. *Clin Exp Allergy.* 1992; 22: 881-2.

33. **Grater WC, Dockhorn R, Boggs P et al.** Report of the American College of Allergists' Committee on standardization of allergenic extracts. *Ann Allergy.* 1982; 49: 49-54.

34. **Harold S.** Effect of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts. J *Allergy Clin Immunol.* 1981; 67 (1): 64-9.

35. **Harris RI, Stern MA, Watson HK.** Dose response curve of allergen and histamine in skin prick tests. *Allergy.* 1988, 43. 565-72.

36. **Homburger HA, Katzmann JA.** Methods in Laboratory Immunolgy - Principles and Interpretation of Laboratory Tests for Allergy. In Allergy, Principles and Practice. *Editores:* **Middleton E, Reed CE, Ellis EF et al.** 4 th ed, 1993, cap 21: 554-72.

37. **Ihre E, Zetterstrîm O.** Relation of clinical severity of allergy to birch pollen and cat and serum specific IgE titer measured by Phadebas RAST and by a new in vitro method. In Clinical workshop IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis. **A report of an International Workshop; Uppsala, Sweden.** 1988: 33-4.

38. **Ipsen H, Klysner SS, Larsen JN et al.** Allergenic extracts. In Allergy, Principles and Practice. *Editores:* **Middleton E, Reed CE, Ellis EF et al.** 4 th ed, 1993, cap 20: 529-53.

39. **Ishizaka K, Ishizaka T.** Physiochemical properties of reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier reaginic activity. *J Immunol.* 1966; 97: 75-85.

40. **Kay AB, Holgate ST.** Position Paper on Allergen Immunotherapy - Report of a BSAIC Working Party. *Allergen Standardization. Clin Exp Allergy.* 1993; 23: 23-6.

41. **Kleine-Tebbe J, Eickholt M, Gätjen M et al.** Comparison between Magic Lite and CAP System: two automated specific IgE antibody assays. *Clin Exp Allergy.* 1992; 22: 475-84.

42. **Kuehr J, Karmaus W, Frischer T et al.** Longitudinal variability of skin prick test results. *Clin Exp Allergy.* 1992; 22: 839-44.

43. **Leimgruber A, Mosimann B, Claeys M et al.** Clinical evaluation of a new in-vitro assay for specific IgE, the Immuno CAP System. *Clin Exp Allergy.* 1991; 21: 127-31.

44. **Lewis T, Grant RT.** Vascular reactions of the skin to injury. *Heart.* 1926; 13: 219-25.

45. **Lopez LR, Noriega Y, Losno R.** Immediate skin test reactivity to common aeroallergens in patients with respiratory allergies: a comparative analysis of allergen-induced skin reactions and their histamine controls. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 81. 1143-8.

46. **Maasch HJ, Marsh DG.** Standardized extracts modified allergens - Allergoids. *Clin Rev Allergy.* 1987; 5: 89-106.

47. **Maasch HJ, Wahl R, Fuchs T.** Application of the First International Standard of Dermatophagoides pteronyssinus (House Dust Mite) in the evaluation of allergen extracts produced from two different source materials. *Int Archs Allergy Appl Immun.* 1987; 84: 363-72.

48. **Mahan C, Spector S, Siegel S et al.** Validity and reproducibility of multi-test skin test device. *Ann Allergy.* 1993; 71: 25-8.

49. **Malling J.** Skin prick testing and the use of histamine references. *Allergy.* 1984; 39. 596-601.

50. **Malling J.** Quantitative skin prick testing: dose-response of histamine and allergen induced wheal reactions. *Allergy.* 1987; 42: 196-204.

51. **Mariotta S, Mannino F, Torrelli L et al.** Prick and intradermal tests compared with specific IgE in allergic assessment. *Allergol Immunopathol.* 1995; 23: 121-6.

52. **Martinez FD, Wright AL, Taussig LM et al.** Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med.* 1995; 332: 133-8.

53. **Matricardi PM, Nisini R, Pizzolo JG et al.** The use of phadiatop in mass-screening programmes of inhalant allergies: advantages and limitations. *Clin Exp Allergy.* 1990; 20: 151-5.

54. **Menardo JL, Bousquet J, Bataille A et al.** Effects of diluents on skin tests. *Ann Allergy.* 1983; 51: 535-8.

55. **Menardo JL, Bousquet J, Michel F-B.** Comparison of three prick test methods with the intradermal test and with the RAST in the diagnosis of mite allergy. *Ann Allergy.* 1982; 48: 235-9.

56. **Menardo JL, Bousquet J, Rodier M et al.** Skin test reactivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 1985; 75: 646-51.

57. **Merrett J, Merrett TG.** Phadiatop - a novel IgE antibody screening test. *Clin Allergy.* 1987; 17: 409-16.

58. **Michel F-B, Skassa-Broci W, Segalen C et al.** Reproducibility of six methods of skin prick tests (Abstract). *J Allergy Clin Immunol.* 1986; 77: 222.

59. **Miller J, Nelson HS.** Suppression of immediate skin tests by ranitidine. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 84: 895-9.

60. **Morgan WJ, Martinez FD.** Risk factors for developing wheezing and asthma in childhood. *Pediatr Clin North Am* 1992; 39: 1185-203.

61. **Morrow-Brown H.** Standardisation de la méthode du Prick à l'aide d'une aiguille de précision. *Rev Franç Allerg.* 1980; 20 (4-5): 185-7.

62. **Morrow-Brown H, Su S, Thantrey N.** Prick testing for allergens standardized by using a precision needle. *Clin Allergy.* 1981; 11. 95-8.

63. **Morrow-Brown H.** Morrow-Brown skin test needle (letter). *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 85: 529.

64. **Nelson HS.** Quality assurance in allergy skin testing. *Ann Allergy.* 1993; 71:3-4.

65. **Nelson HS, Rosloniec DM, McCall LI et al.** Comparative performance of five commercial prick skin test devices. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92: 750-6.

66. **Neuman I, Amran D.** Variations in skin tests before and after immunotherapy in allergic asthma. *Ann Allergy.* 1988; 61 180-3.

67. **Olson R, Karpink MH, Shelanski S et al.** Skin reactivity to codeine and histamine during prolonged corticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 86: 153-9.

68. **Oppenheimer JJ, Nelson HS.** Seasonal variation in immediate skin test reactions. *Ann Allergy.* 1993; 71: 227-9.

69. **Osterballe O, Weeke B.** A new lancet for skin prick testing. *Allergy.* 1979; 34: 209-12.

70. **Ownby DR.** Computorized measurement of allergen-induced skin reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 1982; 69: 356-8.

71. **Ownby DR.** Clinical significance of IgE. In Allergy, Principles and Practice. *Editores:* **Middleton E, Reed CE, Ellis EF et al.** 4th ed, 1993, cap 41: 1059-76.

72. **Ownby DR.** Tests for IgE antibody. In Allergy, Asthma and Immunology from Infancy to Adulthood. *Editores:* **Bierman CW, Pearlman DS, Shapiro GG et al.** *3rd ed,* 1996, cap 11: 144-56.

73. **Paggiaro PL, Bacci E, Amran DL et al.** Skin reactivity and specific IgE levels in the evaluation of allergic sensitivity to common allergens for epidemiological purposes. *Clin Allergy.* 1986; 16: 49-55.

74. **Pastorello E A, Sillano V.** Evaluation of the diagnostic capacity of a new allergy test in comparison with Phadebas RAST in patients with suspected allergy. In Clinical Workshop IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis. ***A report of an Internacional Workshop, Uppsala, Sweden.*** 1988: 16-20.

75. **Pastorello E A, Incorvaia C, Pravettoni V et al.** Clinical evaluation of CAP System and RAST in the measurement of specific IgE. *Allergy.* 1992; 47: 463-6.

76. **Paupe J, Scheinmann P.** Exploration Immuno-Allergologique in vitro. In Allergologie Pédiatrique. *Editores*: **Paupe J, Scheinmann P, De Blic J**. 2e ed, 1994, cap 11: 137-49.

77. **Pepys J.** Skin testing. *Br J Hosp Med.* 1975; 14: 412-6.

78. **Perrin F, Dechamp CH, Deviller P et al.** Reproducibility of skin tests: a comparative study of the Pepys prick test and Morrow - Brown needle and their correlation with the serum IgE level. *Clin Allergy.* 1984; 14: 581-8.

79. **Phagoo B, Wilson NM, Silverman M.** Skin prick testing using allergen-coated lancets: a comparison between a multiple lancet device and a single lancet applied with varying pressures. *Clin Exp Allergy.* 1991; 21: 589-93.

80. **Platts-Mills TAE, Chapman MD.** Allergen standardization. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 87: 621-5.

81. **Popa VT.** Correlation Between History, Skin Test and Inhalation Test Results in Allergic Asthma. In Bronchial Asthma - Mechanisms and Therapeutics. *Editores:* **Weiss EB, Stein M**. 3 rd ed, 1993: 517-32.

82. **Position Paper:** Allergen Standardization and Skin Tests (EAACI). Editores: Dreborg S, Frew A. *Allergy.* 1993; 14 (suppl): 48-82.

83. **Position Paper: Immunotherapy (EAACI).** Editores: Malling HJ, Weeke B. *Allergy.* 1993; 14 (suppl): 7-35.

84. **Poulsen LK, Liisberg C, Bindslev-Jensen C et al.** Precise area determination of skin prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer. *Clinical Exp Allergy.* 1993; 23: 61-8.

85. **Proceedings on the Task Force on Guideline for Standardizing Old and New Technologies used for the Diagnosis and Treatment of Allergic Diseases.** *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 82 (suppl 3): 487-525.

86. **Reed CE, Yunginger JW, Evans R.** Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 84 (1): 4-8.

87. **Roovers MH, Gerth van Wijk R, Dieges PH et al.** Phazet skin prick tests versus conventional prick tests with allergens and histamine in children. *Ann Allergy.* 1990; 64: 166-9.

88. **Santilli J et al.** Skin reactivity to purified pollen allergens in highly ragweed-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol.* 1980; 65: 406-12.

89. **Serup J. Diameter,** thickness, area and volume of skin prick histamine weals. *Allergy.* 1984; 39: 359-64.

90. **Skassa-Brociek W, Manderscheid JC, Michel F-B et al.** Skin test reactivity to histamine from infancy to old age. *J Allergy Clin Immunol.* 1987; 80: 711-6.

91. **Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills T.** Exposure to house--dust mite allergen and the development of asthma in childhood. *N Engl J Med.* 1990; 323: 502-7.

92. **Terho EO, Husman K, Kivekäs J et al.** Histamine control affects the weal produced by the adjacent diluent control in skin prick tests. *Allergy.* 1989; 44: 30-2.

93. **Turkeltaub PC.** Biological standardization of allergenic extracts. *Allergol Immunopathol.* 1989; 17 (2): 53-65.

94. **Van Asperen PP, Kemp AS, Melis CM.** A prospective study of the clinical manifestations of atopic disease in infancy. *Acta Paed Scand.* 1984; 73: 80-5.

95. **Van Asperen PP, Kemp AS, Melis CM.** Skin test reactivity and clinical allergen sensitivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 1984; 73: 381-6.

96. **Van Asperen PP, Kemp AS, Mukhi A.** Atopy in infancy predicts the severity of bronchial hyperresponsiveness in later childhood. *J. Allergy Clin Immunol.* 1990; 85: 790-5.

97. **Van Metre TE, Adkinson F, Kagey - Sobotka A et al.** How should we use skin testing to quantify IgE sensitivity? *J. Allergy Clin Immunol.* 1990; 86: 583-6.

98. **Vichyanond P, Nelson HS.** Circadian variation of skin reactivity and allergy skin tests. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 83: 1101-6.

99. **Voorhorst RH, Van Krieken H.** Atopic skin test reevaluated. I. Perfection of skin testing technique. *Ann Allergy.* 1973; 31: 137-42.

100. **Warner JA, Little SA.** Comparison of two IgE antibody tests with skin test and clinical history in asthmatic patients. *Pediatr Allergy Immunol.* 1990; 1: 34-40.

101. **Wilson NM, Phagoo SB, Silverman M.** Atopy, bronchial responsiveness, and symptoms in wheezy 3 year olds. *Arch Dis Child.* 1992; 67: 491-5.

102. **Wise SL , Meador KJ, Thompson WO et al.** Cerebral lateralization and histamine skin test asymmetries in humans. *Ann Allergy.* 1993; 70: 328-32.

103. **Wood RA, Schubert NC, Sampson HA.** Value of a multiantigen radioallergosorbent test in disease in young children. *J Pediatr.* 1990; 117: 882-5.

104. **Zeiger RS.** Atopy in infancy and early childhood: Natural history and role of skin testing. *J Allergy Clin Immunol.* 1985; 75. 633-9.

105. **Zimmerman B.** Atopic burden (specific IgE) and severity of allergic disease in children. In Clinical workshop IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis. ***A report of an international workshop; Uppsala, Sweden.*** 1988: 29-30.

ANEXO

COMUNICAÇÕES

"Testes cutâneos por *PRICK* - Validação de métodos" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, José Rosado Pinto - Apresentado na *Reunião Anual da SPAIC,* Póvoa do Varzim, Dezembro de 1990; publicado no Boletim Clínico dos Hospitais Civis de Lisboa, 1994;1/4:9-14.

"Computorized digitalized graphics tablet: Reproductibility and precision in the assessement of the wheal areas of skin *prick* tests (SPT)" - Mário Morais de Almeida, Cristina Santa Marta, Joaquim Abreu Nogueira, José Rosado Pinto - Apresentado no *II International Symposium on Paediatric Allergy and Clinical Immunology in Portugal / IX Jornadas Nacionais de Imunoalergologia Infantil,* Lisboa, Maio de 1991.

"Intrasubject comparison of skin sensitivity in different regions of the forearm and estimation of relative potency of allergen extracts" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, Graça Bastos, José Rosado Pinto - Apresentado no *II International Symposium on Paediatric Allergy and Clinical Immunology in Portugal / IX Jornadas Nacionais de Imunoalergologia Infantil,* Lisboa, Maio de 1991.

"Skin prick tests - Assessement of wheal areas by digital processing technics" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, José Rosado Pinto - Apresentado no *Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology,* Zurique, Maio de 1991.

"CAP system - Correlation with results obtained by skin *prick* tests using three different allergen extracts" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, Cristina Santa Marta, Paula Leiria Pinto, Graça Bastos, José Rosado Pinto - Apresentado na *Annual Conference of the British Society for Allergy and Clinical Immunology,* Londres, Setembro de 1991; publicado nos Cadernos de Imunoalergologia Pediátrica, 1991;4:5-12.

"Reliability of devices to skin *prick* tests" - Mário Morais de Almeida, Harry Morrow-Brown, Joaquim Abreu Nogueira, José Rosado Pinto - Apresentado nas *2.as Jornadas Pneumológicas do Porto,* Porto, Fevereiro de 1992 e na *British Society for Allergy and Clinical Immunology Annual Conference,* Southampton, Setembro de 1992.

"Validação de um novo teste de rastreio *"in vitro"* de atopia - ALATOP" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, Jorge Guimarães Fernandes, Cristina Santa Marta, Paula Leiria Pinto, José Rosado Pinto - Apresentado no *III Congresso Português de Pediatria,* Lisboa, Maio de 1992 e no *XV European Congress of Allergology and Clinical Immunology,* Paris, Maio de 1992; publicado em Allergie et Immunologie - Annales Européenes d`Allergie et d`Immunologie Clinique, 1994;3:99-101.

"Comparision of the skin *prick* test reactivity obtained by codein phosphate and histamine in quadruplicate tests, measured by a digitalized computorized graphics tablet" - Mário Morais de Almeida, Joaquim Abreu Nogueira, José Rosado Pinto - Apresentado no *XV European Congress of Allergology and Clinical Immunology,* Paris, Maio de 1992.

"Quantitative measurements of skin *prick* tests and specific IgE - Relation between values and different respiratory allergic diseases" - Mário Morais de Almeida, Cristina Santa Marta, Paula Leiria Pinto, Joaquim Abreu Nogueira, José Rosado Pinto - Apresentado no *Annual Meeting of the European Society for Pediatric Research,* Uppsala, Junho de 1992 e na *Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica,* Curia, Novembro de 1992.

"Testes cutâneos por *prick* - Contributos para a estandardização" - Mário Morais de Almeida, Cristina Santa Marta, Joaquim Abreu Nogueira, José Rosado Pinto - Apresentado no *VII Congresso Luso-Brasileiro de Alergia e Imunologia, XIX Reunião Internacional do GAILL,* Lisboa, Outubro de 1993.

"Alatop-RIA in the screening of atopy in a non--caucasian population" - Joaquim Abreu Nogueira, Paula Leiria Pinto, Mário Morais de Almeida, Manuela Cachulo, Virgínia Loureiro, José Rosado Pinto - Apresentado no *Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology,* Roterdão, Setembro de 1993 e na *IV Reunião da Associação dos Pediatras do Hospital de Dona Estefânia,* Lisboa, Outubro de 1993.

"Quantitative skin *prick* tests and specific IgE (CAP System) for *D.Pteronyssinus* - correlation of results in a pediatric population" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, Cristina Santa Marta, Paula Leiria Pinto, José Rosado Pinto - Publicado em Allergie et Immunologie - Annales Européenes d`Allergie et d`Immunologie Clinique, 1994;3:102-6.

"Correlation of quantitative results between skin *prick* tests and specific IgE (CAP System) for *D.Pteronyssinus*" - Joaquim Abreu Nogueira, Mário Morais de Almeida, Cristina Santa Marta, Paula Leiria Pinto, Graça Pires, José Rosado Pinto - Apresentado no *Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology,* Estocolmo, Junho de 1994 e na *XVI Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica,* Curia, Fevereiro de 1996.

"Asma e sensibilização alergénica nos primeiros anos de vida" - Rita Câmara, Sara Prates, Ângela Gaspar, Edna Rosa, Mário Morais de Almeida, Joaquim Abreu Nogueira, José Rosado Pinto - Apresentado na *XVI Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica,* Curia, Fevereiro de 1996.