

José Eduardo Rosado Pinto

Fez em Junho 20 anos que Portugal aderiu à Comunidade Europeia. A partir dessa data muito mudou nos hábitos e na prática de vida dos portugueses, sendo a abertura ao exterior uma necessidade e uma obrigação. Na Medicina estas práticas também se foram instalando embora estranhamente se continue nalguns meios a pensar que este país periférico poderá passar despercebido no contexto dos 25 países que hoje a integram.

Ao longo dos últimos meses vários foram os factos que aconteceram a nível internacional no que à Imunoalergologia Nacional e à SPAIC dizem respeito. A começar o reconhecimento por comissões, primeiro do Parlamento Europeu e depois da Comunidade Europeia da existência de especialidades de dimensão europeia entre as quais a Alergologia. Isto permitirá no futuro uma maior deslocação de especialistas e jovens na procura de centros europeus reconhecidos de formação e investigação, onde possam desenvolver as suas capacidades, ou ainda na procura de outros locais de trabalho, onde possam exercer a sua especialidade.

Paralelamente, esta abertura europeia, que se vai alargar a outras profissões, irá forçosamente obrigar a uma melhor avaliação da qualidade dos profissionais médicos e dos seus centros nacionais de formação e investigação. Se, por enquanto, esta atribuição é da exclusiva responsabilidade das autoridades nacionais, num futuro próximo é bem possível que, fruto das pressões já existentes e de experiências já anteriormente efectuadas, as certificações e os exames europeus, bem como a avaliação por peritos europeus dos centros de formação e investigação - nacionais, se venham a concretizar oficialmente.

Será então que Portugal terá de mostrar perante os outros países de como funcionam realmente as suas instituições ligadas à Medicina, bem como a qualidade dos serviços que prestam e a qualidade individual dos seus profissionais.

Em relação à Imunoalergologia não parece que haja receio nesta futura política de "porta aberta", não só pela qualidade individual dos nossos especialistas que, embora não possa ser (infelizmente) quantificada, por não haver uma política nacional de Educação Médica Contínua, mas sobretudo pela excelente prestação que os mesmos têm quando chamados a trabalhar a nível internacional.

Nos últimos anos a SPAIC tem procurado consolidar a sua participação internacional, como se pode confirmar na página internacional deste número. Chamamos particularmente a atenção para duas áreas de relacionamento científico internacional como são o Brasil, com a aproximação científica cada vez mais sustentada com o seu prolongamento latino-americano, e o sul da Europa. A criação para breve de uma associação científica envolvendo as Sociedades de Alergologia Portuguesa, Espanhola, Italiana e Francesa será seguramente uma forma de juntarmos a nossa experiência científica com a clínica e ainda a qualidade da formação dos nossos especialistas, permitindo ao mesmo tempo uma melhor e mais significativa divulgação do trabalho a nível internacional.

Nesta perspectiva a RPIA trabalhará para que esta estratégia da maior importância para a viabilidade da Imunoalergologia Portuguesa se consolide, contribuindo assim na aposta feita há 20 anos para que a nossa integração europeia nesta área da Medicina também seja uma realidade consolidada.

Hipersensibilidade ao trigo: formas de apresentação e proteínas alergénicas

Wheat hypersensitivity: clinical manifestations and allergenic proteins

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 133-140

Ana Teresa Silva, Cristina Santa Marta, Sara Prates, Mário Morais-Almeida, José Rosado Pinto

Serviço de Imunoalergologia. Hospital de Dona Estefânia, Lisboa

RESUMO

Os cereais constituem a base alimentar da maior parte dos habitantes a nível mundial, fornecendo cerca de metade das proteínas incluídas na dieta das diferentes populações; o trigo (*Triticum aestivum*), cereal pertencente à família das *Poaceae*, seguido do arroz e do milho, são os cereais mais consumidos. A prevalência das doenças alérgicas depende em grande parte da exposição a determinado alérgeno e, sendo o trigo um alimento de largo consumo, tal justifica o seu aparecimento na lista dos alimentos mais frequentemente envolvidos em quadros de hipersensibilidade alimentar. O contacto com farinha de trigo, quer por via inalatória quer por via digestiva, tem a capacidade de desencadear sintomas reprodutíveis que desaparecem quando se cumprem medidas estritas de evicção. As formas de apresentação clínica são variadas e a rentabilidade dos exames auxiliares de diagnóstico depende da sua adequação aos alérgenos envolvidos na etiopatogenia destas entidades clínicas.

Palavras-chave: trigo, alergia, manifestações clínicas, diagnóstico, gliadina

ABSTRACT

*Cereal grains constitute the staple food for most of the world's population, providing approximately half of the world's supply of human dietary proteins; wheat (*Triticum aestivum*), cereal belonging to Poaceae family, followed by rice and corn, are the most consumed cereals. Allergy prevalence depends in a large scale to allergen exposure, wheat being among the foods responsible for the majority of food allergies. Wheat flour contact, either by ingestion either by inhalation route, had the capacity of eliciting reproducible symptoms, that disappear when strict eviction measures are performed. There are several different clinical manifestations of wheat hypersensitivity and the efficiency of diagnosis evaluation depends on the allergenic proteins responsible for these clinical entities.*

Key-words: *wheat, allergy, clinical manifestations, diagnosis, gliadin*

INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade alimentar é definida como uma reacção adversa imunológica à ingestão de proteínas alimentares¹. É um problema clínico mais frequente na infância do que nos adultos; 5 a 10% das crianças apresentam alergia clinicamente significativa a um ou mais alimentos, sendo a prevalência estimada para os adultos em cerca de 2%. Parece verificar-se nas últimas décadas um aumento gradual destas percentagens, tal como tem ocorrido com a generalidade das doenças alérgicas, sendo a prevenção primária a única medida capaz de contrariar esta tendência².

Nos primeiros anos de vida, cerca de 90% das reacções alérgicas a alimentos estão dependentes do leite, do ovo, do peixe, dos frutos secos, dos cereais e das leguminosas, variando a importância clínica relativa de cada um dos alimentos com a população estudada, diferenciando assim aqueles que devem ser considerados os alergénios alimentares *major*^{2,3}. No adulto, os alimentos mais frequentemente responsáveis por reacções de alergia são os frutos secos, os mariscos e o peixe, os vegetais e os frutos frescos⁴.

Pelas suas características próprias e pela frequência com que é consumido, o trigo encontra-se no grupo de alimentos que, em conjunto, são responsáveis pela maioria de reacções alérgicas alimentares, especialmente na criança²⁻⁵.

A generalidade dos indivíduos sensibiliza-se durante o primeiro ano de vida, evoluindo para a tolerância imunológica cerca de 1 a 3 anos mais tarde⁵.

Os cereais constituem a base alimentar da maior parte dos habitantes a nível mundial, fornecendo cerca de metade das proteínas incluídas na dieta das diferentes populações. O trigo, seguido do arroz e do milho, são os cereais mais consumidos, em conjunto com a cevada, o centeio e a aveia. A farinha de trigo é utilizada em grande quantidade na indústria de panificação e pastelaria, na produção de massas alimentícias e como agente espessante em diferentes confeccções culinárias⁶.

O trigo (*Triticum aestivum*) – Quadro 1 – pertence à subfamília *Festucoideae*⁷ e, à semelhança de outros cereais, é composto por proteínas de quatro tipos, consoante o seu comportamento perante distintos solventes: **albuminas** (solúveis em água), **globulinas** (solúveis em soluções salinas), **gliadinas** (solúveis em

álcool) e **gluteninas** (solúveis em meio ácido ou alcalino)⁶ Enquanto as albuminas e as globulinas são proteínas de estrutura com funções enzimáticas, como a alfa, a beta amilase e os seus inibidores, as gliadinas e as gluteninas (em conjunto constituem o glúten ou prolaminas) são as proteínas de armazenamento dos grãos de trigo e conferem à farinha de trigo a viscoelasticidade suficiente para que se transforme em pão⁸. Relativamente às gliadinas, é ainda possível agrupá-las em diferentes tipos consoante a sua mobilidade electroforética (α , β , γ e ω). As prolaminas do trigo (extremamente ricas em prolina e glutamina) apresentam grande homologia sequencial e de estrutura, quer entre si, quer com as homónimas do centeio e da cevada^{6,8}.

Tal como proposto pela Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica na última caracterização das doenças alérgicas¹, a alergia ao trigo representará uma reacção adversa imunológica durante ou após a exposição ao mesmo. As diferenças entre a capacidade alergizante de cada fracção proteica, as vias de sensibilização e a resposta específica de cada órgão, que justificam a variedade de manifestações clínicas, ainda não são bem conhecidas. Tem sido proposto contudo que as albuminas e as globulinas são as proteínas mais relevantes nas reacções de hipersensibilidade mediadas por anticorpos específicos da classe IgE⁵. Assim exemplificando, a sensibilização à farinha de trigo por via inalatória é seguida de quadros de asma do padeiro, enquanto a sensibilização por via digestiva, por ingestão, estará na origem de quadros de alergia alimentar (IgE-mediada ou não IgE-mediada), podendo ainda relacionar-se com quadros de anafilaxia alimentar induzida pelo exercício⁹.

Neste trabalho revimos sumariamente as manifestações clínicas de hipersensibilidade associadas à exposição ao trigo, relacionando-as com as diferentes fracções proteicas alergénicas deste cereal, visando a identificação e indicação dos testes de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade, isto é, eficiência. Não é nosso propósito aprofundar aspectos clínicos,

Quadro 1. Relação taxonómica entre cereais e gramíneas da família *Poaceae* (Adaptado da ref. 7)

Subfamília	(Tribo) Espécie	Nome comum
<i>Festucoideae</i>	(<i>Triticeae</i>) <i>Triticum aestivum</i>	Trigo
	<i>Hordeum leporinum</i>	Cevada
	<i>Secale cereale</i>	Centeio
	(<i>Avenae</i>) <i>Avena sativa</i>	Aveia
<i>Agrostideae</i>	<i>Phleum pratense</i>	Erva timótea
	(<i>Festuceae</i>) <i>Lolium perenne</i>	Lólio
	<i>Poa pratensis</i>	Espiguilhas
	<i>Dactylis glomerata</i>	Gramma
	<i>Festuca pratensis</i>	Festuca
<i>Eragrostoideae</i>	(<i>Chlorodeae</i>) <i>Cynodon dactylon</i>	Gramma comum
<i>Oryzoideae</i>	(<i>Oryzeae</i>) <i>Oryza sativa</i>	Arroz
<i>Panicoideae</i>	(<i>Tripsaceae</i>) <i>Zea mays</i>	Milho
	<i>Saccharum officinarum</i>	Cana-de-açúcar

sendo estes comuns a outros agentes etiopatogénicos.

Assim, abordam-se os quadros envolvendo mecanismos de hipersensibilidade imediata ou IgE-mediados (urticária, angioedema, asma, anafilaxia), os quadros com componente de hipersensibilidade imediata e retardada (síndrome de eczema / dermatite atópica) e a anafilaxia induzida pelo exercício e dependente da ingestão de alimentos (AIEDA), constituindo uma forma particular de anafilaxia induzida pelo exercício, na qual é essencial a ingestão de um determinado tipo de alimento para que ocorram manifestações clínicas, sendo o trigo um dos alimentos mais frequentemente envolvidos neste tipo de reacções¹⁰.

Citam-se ainda os quadros com predomínio de reacções de hipersensibilidade retardada (doença celíaca), bem como alguns casos mais atípicos, classicamente não associados a fenómenos alérgicos, onde a maior eficiência, nomeadamente em termos de sensi-

bilidade, de alguns testes diagnósticos permitiu um repensar recente sobre a sua etiologia.

APRESENTAÇÕES CLÍNICAS E CARACTERIZAÇÃO ALERGÉNICA

As reacções de hipersensibilidade imediata subsequentes à ingestão de trigo são características dos grupos etários pediátricos. Tipicamente ocorrem durante a primeira hora após a ingestão do mesmo e incluem manifestações cutâneas e/ou gastrointestinais e/ou respiratórias (asma, rinite), tendo como manifestação temida, embora rara, a anafilaxia; em geral as queixas são transitórias, sendo excepcionais os casos que se estendem à idade adulta.

Na nossa experiência clínica, em idade pediátrica, a urticária induzida pelo trigo ocorre com uma frequência superior à da exacerbação de dermatite atópica relacionada com este alergénio, ocorrendo inclusive predomínio desta manifestação em crianças com SEDA¹¹.

Ao contrário do que se verifica relativamente a outras alergias alimentares frequentes, IgE mediadas, como ao leite e ao ovo, onde a identificação de alergénios está bem caracterizada^{12,13}, permitindo a obtenção de extractos diagnósticos de grande sensibilidade, no que ao trigo diz respeito a realidade não é semelhante, existindo até recentemente escassa produção científica⁶.

Como citado, as albuminas e as globulinas parecem ser as proteínas mais envolvidas nos processos de hipersensibilidade imediata ao trigo, tendo sido encontrados doseamentos de IgE específica (sIgE) para as referidas proteínas no soro de crianças com alergia ao trigo e em doentes com asma do padeiro, mas não em indivíduos com doença celíaca⁷.

Posteriormente⁵, foram identificados alergénios de trigo com peso molecular de 15kd, a partir de amostras de soro de doentes com reacções alérgicas bem documentadas após a ingestão deste cereal. Esta informação está de acordo com dados obtidos em populações de

doentes com asma do padeiro, onde através de técnicas de *imunoblot* se identificaram IgE específicas para alergénios de 15, 17 e 47kd, a maioria dos quais da família dos inibidores da alfa-amilase¹⁴. Outro grupo¹⁵, identificou uma proteína de 16kd, uma unidade glicosilada do inibidor da alfa-amilase, como importante alergénio na etiopatogenia da asma do padeiro. Nesta sequência, o inibidor da alfa-amilase foi reconhecido como alergénio capaz de sensibilizar indivíduos tanto por via inalatória como digestiva⁵.

Embora a maioria das reacções IgE-mediadas tenha por base proteínas solúveis em soluções neutras, o envolvimento de IgE específica dirigida para fracções insolúveis parece não ser desprezível¹⁶. Assim, a gliadina, classicamente associada a quadros de doença celíaca, neste caso com envolvimento de anticorpos de isotipos IgA e IgG, foi também identificada como sendo a principal responsável no desencadear de quadros de anafilaxia alimentar induzida pelo exercício, ao implicar a produção de anticorpos IgE contra esta proteína¹⁷.

Durante a última reunião anual da EAACI, foram apresentados 7 casos de crianças tailandesas com história de 2 a 10 reacções anafiláticas num ano após ingestão de alimento contaminado com trigo; os testes cutâneos (TC) efectuados com ómega-5 gliadina e o doseamento sérico de IgE específica para a referida proteína foram positivos em todas as crianças e negativos em todos os indivíduos do grupo-controlo¹⁸.

Varjonen e colaboradores¹⁹ estudaram a importância da IgE específica anti gliadina em doentes com SEDA e alergia ao trigo. Não só encontraram uma excelente correlação entre as positividade das provas de provocação TC e das sIgE para o glúten, como, através de técnicas de *imunoblot*, identificaram, por um lado, bandas de proteínas com pesos moleculares já associados a esta patologia e, por outro, bandas não previamente identificadas, correspondentes a pesos moleculares inferiores a 14kd, em soro de doentes com provas de provocação e TC positivos para a gliadina. Concluíram que TC para gliadina e sIgE para glúten são testes de rastreio impor-

tantes em caso de SEDA associada a hipersensibilidade ao trigo.

Palosuo e colaboradores, tendo identificado a gama-gliadina¹⁰ e a ómega-5 gliadina²⁰ como alergénios *major* nos quadros de anafilaxia ao trigo induzida pelo exercício, e sendo escassa a informação no que diz respeito aos alergénios responsáveis por reacções de hipersensibilidade subsequentes à ingestão de trigo, tentaram identificar num grupo de crianças com alergia ao trigo na infância a presença de anticorpos IgE para ómega-5 gliadina. Estudaram 40 crianças com quadros clínicos de SEDA e/ou sintomas gastrintestinais e/ou respiratórios, tendo encontrado uma especificidade e um valor preditivo positivo de 100%, relativamente aos doseamentos de IgE para ómega-5 gliadina, no que diz respeito a reacções imediatas, sendo estas determinações negativas quando ocorriam apenas reacções retardadas (correlacionado com o resultado das provas de provocação controladas com placebo)²¹.

Recentemente, foi publicada a sequenciação molecular de sete epitopos da ómega-5 gliadina, abrindo novas perspectivas em termos de abordagem diagnóstica e intervenção terapêutica específica nestas doenças²².

A asma do padeiro é uma reacção que ocorre em resposta à inalação de farinhas, sob a forma de sintomas de dificuldade respiratória que traduzem hiperreactividade brônquica; habitualmente, a exposição ocorre no local de trabalho, constituindo uma doença ocupacional; estes doentes, em regra, não têm qualquer sintomatologia desencadeada pela ingestão de cereais, conhecendo-se com relativa profundidade os alergénios envolvidos (Quadro 2).

A doença celíaca constitui uma enteropatia não-IgE-mediada que se deve a uma reacção imunológica desencadeada pela fracção gliadina presente no trigo e em outros cereais. Caracteriza-se por induzir atrofia grave das vilosidades intestinais, condicionando quadros clínicos de malabsorção intestinal e atraso de crescimento nas crianças.

Simonato e colaboradores²³ estudaram 20 doentes

(10 atópicos e 10 não atópicos) com síndrome do cólon irritável associado à ingestão de trigo; os TC e os doseamentos séricos de IgE específica para o trigo foram positivos em todos os indivíduos atópicos e em apenas um dos não atópicos; 10/11 soros dos doentes com sIgE positiva e 2/9 soros respeitantes a doentes com sIgE negativa apresentaram *imunoblot* com banda na zona dos 16kd; 19/20 soros reconheceram proteínas correspondentes à fracção prolamina ou glúten (insolúvel em soluções neutras). Tal como vem sendo realçado ao longo deste trabalho, estes autores concluem que os extractos comerciais, e correspondente caracterização proteica, no que diz respeito ao trigo, deve ser aprofundada; neste estudo concluíram também que, nesta sequência, a prevalência de alergia alimentar associada à síndrome de cólon irritável estará a ser subestimada.

São assim várias as doenças que se relacionam com a exposição ao trigo, tendo já sido possível determinar alguma relação entre o perfil de manifestações clínicas e os principais alergénios implicados em cada uma delas (Quadro 2).

EXAMES AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO

Após uma anamnese cuidada para se confirmar a presença de qualquer destes diagnósticos, é útil a

Quadro 2. Alergénios identificados nas reacções de hipersensibilidade ao trigo^{5,9,10,21,24}

Entidade clínica	Alergénios implicados
Alergia alimentar	Inibidor da α -amilase, ω -5 gliadina
AIEDA*	γ -gliadina, α -gliadina, ω -5 gliadina
Asma do padeiro	Inibidor da α -amilase, peroxidase, prolamina insolúveis, ω -5 gliadina, γ -gliadina
Doença celíaca	Gliadina

*AIEDA = Anafilaxia Induzida pelo Exercício e Dependente da Ingestão de Alimentos

realização criteriosa de exames auxiliares de diagnóstico (Quadro 3).

Os testes cutâneos por picada (*prick*) podem ser realizados com extractos comerciais ou com a farinha em natureza; são considerados positivos quando o diâmetro médio da pápula é igual ou superior a 3 mm ou 7 mm²; o valor preditivo positivo é máximo no primeiro ano de vida, altura em que a possibilidade de ter havido desenvolvimento de tolerância é ainda reduzida, diminuindo o valor preditivo deste teste com a idade. Actualmente, no estudo da patologia por sensibilização ao trigo, devem ser também usados extractos de gliadina e, se possível, ómega-5 gliadina.

A realização de testes em *patch* com farinha de trigo parece aumentar a probabilidade de detecção precoce de alergia ao trigo em crianças com dermatite atópica, tal como verificado em algumas séries²⁵⁻²⁷.

Para os quatro primeiros diagnósticos (Quadro 3), o estudo laboratorial permite identificar IgE específicas contra fracções da farinha de trigo, sendo que nos casos de doença celíaca são anticorpos da classe IgA e IgG anti-gliadina os que têm maior sensibilidade para o diagnóstico.

Para documentar o diagnóstico de asma do padeiro, doença ocupacional, é de grande valor a monitorização

do débito expiratório máximo instantâneo e a realização de espirometrias no local de trabalho e sua comparação com outras realizadas em condições basais, nomeadamente em períodos de não exposição; as provas de provocação brônquica podem estar igualmente indicadas. No que respeita à AIEDA, esta poderá ser confirmada após reprodução das condições necessárias ao aparecimento de sintomas, o que poderá passar pela realização de uma prova de esforço, embora esta possa envolver alguns riscos. Para se estabelecer o diagnóstico definitivo de doença celíaca é indispensável, até ao momento, a obtenção de uma biópsia jejunal e o seu estudo histológico.

Por fim, é importante realçar que, de todas as provas, a de provocação alimentar, aberta ou em ocultação, é a que tem maior rentabilidade no diagnóstico de alergia alimentar²⁷.

MEDIDAS DE EVICÇÃO

Uma vez confirmada a presença de hipersensibilidade ao trigo, recomenda-se que o indivíduo cumpra rigorosas medidas de evicção deste cereal e também de todos os

Quadro 3. Exames auxiliares de diagnóstico indicados no estudo das reacções de hipersensibilidade ao trigo

Entidade clínica	Métodos auxiliares de diagnóstico						
	<i>Prick</i>	<i>Patch</i>	PPA	PFR	Prova esforço	Histologia (biópsia)	Laboratório imunologia
Alergia alimentar IgE mediada	X		X				X
SEDA	X	X	X				X
AIEDA	X		X		X		X
Asma do padeiro	X			X			X
Doença celíaca						X	X

SEDA-Síndrome de Eczema / Dermatite Atópica; AIEDA- Anafilaxia Induzida pelo Exercício e Dependente da ingestão de Alimentos; *prick* - teste cutâneo por picada; *patch* - teste cutâneo em oclusão; PPA- Prova de Provocação Alimentar; PFR- Provas Funcionais Respiratórias.

que com ele têm reactividade cruzada (exs.: centeio, cevada); no entanto, embora os doentes com alergia alimentar ao trigo tenham reactividade cruzada *in vitro* com outros cereais numa percentagem relativamente elevada, pode não ser concordante com os resultados das provas de provocação alimentar; assim, considera-se que a evicção de cereais taxonomicamente relacionados deverá ser orientada após a realização de provas de provocação específicas⁷.

Em termos práticos, quando se pretende fazer uma dieta de evicção total ao trigo recomenda-se o consumo de alimentos que contenham no rótulo da embalagem o símbolo de ausência de glúten. Ainda assim, os doentes deverão ser instruídos quanto à leitura atenta e sistemática dos rótulos para que se possam evitar ingestões acidentais, que poderão ser graves. No entanto, a contaminação de alguns alimentos com proteínas de trigo pode ser suficiente para o desencadear de sintomas graves, não sendo neste caso preveníveis²⁸.

Dos doentes com alergia alimentar ao trigo só uma pequena percentagem apresenta sensibilização e manifestações clínicas respiratórias quando exposto a pólenes de gramíneas, tal como os doentes com polinose só excepcionalmente não toleram a ingestão de cereais⁷.

PREVENÇÃO

Como regra geral, a identificação de grupos de risco é essencial para que se possam implementar medidas de prevenção primária. No entanto, e até ao momento, não foi ainda possível definir quais as crianças em risco de desenvolver alergia ao trigo, pelo que estas medidas não podem ser aplicadas. O mesmo não se passa na prevenção desta sensibilização no contexto de patologia ocupacional.

COMENTÁRIOS FINAIS

A expressão clínica da alergia ao trigo tem vindo a aumentar nos últimos anos na nossa prática clínica, sendo previsível que se mantenha esta tendência.

As formas de manifestação clínica são variadas, diferindo consoante a população estudada, incluindo o grupo etário, pelo que é muito importante conhecer o perfil de apresentação alérgica em cada país ou região.

Entre os exames complementares, os testes cutâneos e/ou as determinações de IgE específica com utilização de extractos mais sensíveis e com maior especificidade (ex.omega-5 gliadina) devem ser incluídos na investigação etiopatogénica dos quadros de hipersensibilidade ao trigo, em que a mediação por IgE específica seja provável. São necessários mais trabalhos para consolidar este conhecimento.

Contacto:

Cristina Santa Marta
Serviço de Imunoalergologia
Hospital de Dona Estefânia
Rua Jacinta Marto
1169-045 Lisboa
Telefone: +351919601015
Fax: +351213126654
E-mail: csantamarta@netcabo.pt

BIBLIOGRAFIA

1. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for Allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813-24.
2. Hasan Arshad S. Food allergen avoidance in primary prevention of food allergy. *Allergy* 2001;56(Suppl.67):113-6.
3. Morais-Almeida M, Prates S, Pargana E, et al. Alergia alimentar em crianças numa consulta de Imunoalergologia. *Rev Port Imunoalergol* 1999;7:167-71.
4. Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Murphy R, Wood R, Sampson HA. Symposium: Pediatric Food Allergy. *Pediatrics* 2003;111:1591-4.
5. James JM, Sixbey JP, Helm RM, Bannon GA, Burks AW. Wheat a-amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization; *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:239-44.

6. Palosuo K. Update on wheat hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:205-9.
7. Jones SM, Magnolfi CF, Cooke SK, Sampson HA. Immunologic cross-reactivity among cereal grains and grasses in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:341-51.
8. Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 2002;53:947-58.
9. Armentia A, Rodriguez R, Callejo A, et al. Allergy after ingestion or inhalation of cereals involves similar allergens in different ages. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1216-22.
10. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, et al. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:912-17.
11. Urticaria induced by wheat in children. Silva A, Santa-Marta C, Prates S, Pires G, Morais-Almeida M, Rosado-Pinto J. *Allergy* 2004;59 (Suppl.): 296 (abstract).
12. Wal JM. Cow's milk allergens. *Allergy* 1998;53:1013-22.
13. Burks W, Helm R, Stanley S, Bannon GA. Food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:243-8.
14. Pfeil T, Schwabl U, Ulmer WT, Konig W. Western blot analysis of water-soluble wheat flour (*Triticum vulgare*) allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;91:224-31.
15. Sanchez-Monge R, Gomez L, Barber D, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. Glycosylated subunits of the alpha-amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochem J* 1992;281(Pt 2):401-5.
16. Sandiford CP, Tatham AS, Fido R, et al. Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1120-9.
17. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Life-threatening, recurrent anaphylaxis caused by allergy to gliadin and exercise. *Clin Exp Allergy* 1997;27:162-6.
18. Daengsuwan T, Palosuo K, Vichyanond P, Reunala T. IgE antibodies to omega-5 gliadin in children with wheat-induced anaphylaxis. *Allergy* 2004;59 (Suppl.):296 (abstract).
19. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Antigliadin IgE - indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy* 2000;55:386-91.
20. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Kalkkinen N, Reunala T. Rye gamma-70 and gamma-35 secalins and barley gamma-3 hordein cross-react with omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:466-73.
21. Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, et al. Wheat w-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:634-8.
22. Matsuo H, Morita E, Tatham AS, et al. Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 2004;279: 12135-40.
23. Simonato B, De Lazzari F, Pasini G, et al A. IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1771-8.
24. Smith TA, Parker G, Hussain T. Respiratory symptoms and wheat flour exposure: a study of flour millers. *Occup Med* 2000;50:25-9.
25. Majamaa H, Moisio P, Holm K, Turjanmaa K. Wheat allergy: diagnostic accuracy of skin prick and patch tests and specific IgE. *Allergy* 1999;54:851-6.
26. Roehr CC, Reibel S, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107: 548-53.
27. Strömberg L. Diagnostic accuracy of the atopy patch test and the skin-prick test for the diagnosis of food allergy in young children with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Acta Paediatr* 2001;91: 1044-9.
28. Matsumoto T, Miyazaki T. Systemic urticaria in an infant after ingestion of processed food that contained a trace quantity of wheat. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:98-100.

Citocinas T1 e T2 na doença atópica: avaliação do contributo relativo de diferentes subpopulações celulares T periféricas

Type 1 and type 2 cytokines in atopic disease: assessment of different peripheral T cells relative contribution

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 141-152

Manuela Rebordão¹, Luís Delgado², Helena Pinto⁴, Augusto Remédios¹, Luís Taborda-Barata³

¹Hospital Militar, Bélem

²Hospital de S. João. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

³Hospital Pêro da Covilhã. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior

RESUMO

O equilíbrio entre a produção de citocinas do perfil T1 e T2 pelos linfócitos T tem sido considerado um dos factores que influencia a patogénese da doença alérgica, genericamente favorecida por um "ambiente" T2. **Objectivo:** Caracterizar o perfil de citocinas T1 e T2 em linfócitos periféricos de um grupo de doentes atópicos, comparativamente a um grupo-controlo, e avaliar o contributo das subpopulações CD4 e CD8 para essa produção. **População e métodos:** Estudaram-se 14 indivíduos atópicos, com sensibilização a alergénios ambientais comuns e 7 indivíduos sem história de doença alérgica. A marcação dos linfócitos T de sangue periférico foi feita com anticorpos monoclonais CD3 e CD8. Fez-se a activação *in vitro* com PMA, ionomicina e brefeldina durante 4 horas, 37°C, 5%CO₂. A avaliação das citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ , IL-4 e IL-5 foi feita por citometria de fluxo. Na análise estatística

usaram-se testes não paramétricos *Mann-Whitney U Test* e *Wilcoxon-Signed Ranks Test*. Para o estudo das correlações usou-se o teste de *Spearman*. Considerou-se significativo o valor de $p \leq 0,05$. **Resultados:** O grupo atópico expressou nos linfócitos CD3 periféricos um significativo aumento de citocinas de perfil T2 relativamente ao grupo não atópico sendo respectivamente para a IL-4 [13,8% (3,1 - 31,8) versus 5,1% (4,1 - 6,9), $p = 0,002$] e IL-5 [6,7% (1,0 - 20,4) versus 1,0% (0,4 - 2,1), $p = 0,004$]. Só nos linfócitos T CD8 do grupo atópico se constatou também o aumento significativo destas citocinas em relação ao grupo não atópico. Observou-se apenas nos doentes atópicos uma correlação significativa entre a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+ e o número de eosinófilos circulantes ($r_s = 0,629$; $p = 0,028$) e os níveis séricos de ECP ($r_s = 0,570$; $p = 0,03$). Não se encontraram diferenças significativas na expressão de IFN- γ nas populações de linfócitos periféricos, nos dois grupos em estudo (atópicos e controlos). No grupo-controlo a produção de IFN- γ e IL-4 foi significativamente diferente entre linfócitos T CD4 e CD8, sendo maioritariamente expresso pelos CD4. **Conclusão:** Destaca-se no grupo atópico um aumento de citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5) produzidas predominantemente em linfócitos T CD8 periféricos (Tc2). No grupo-controlo (não atópico) as citocinas de perfil T2 são essencialmente produzidas pelos linfócitos T CD4.

Palavras-chave: citocinas, atopia, linfócitos Th1, Th2, Tc1, Tc2.

ABSTRACT

Background: The unbalanced of type 1 (T1) and type 2 (T2) pattern of cytokines produced by T lymphocytes has been considered the primary abnormality of atopy which is characterized by a biased T cell T2 activation. **Objective:** To characterize the T1 and T2 pattern of cytokines production by CD4+ and CD8+ T cells in whole blood in atopic and nonatopic (control) subjects. **Population and methods:** Fourteen atopic subjects, sensitised to common environmental allergens, and 7 nonatopic subjects were included in this study. In each blood sample T lymphocytes were marked with monoclonal antibodies: CD3 and CD8. Cell culture was performed at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂, in the presence of phorbol 12-myristate acetate (PMA), ionomycin and brefeldina, during 4h. Cells were then fixed and permeabilized and detection of intracytoplasmic cytokines IFN- γ , IL-4 and IL-5 was achieved. Flow cytometric analysis was performed. Statistical analysis was undertaken by using the Mann-Whitney Test, the Wilcoxon-Signed Ranks test and the Spearman test. Values of $p \leq 0,05$ were accepted as statistically significant. **Results:** The atopic group expressed a significant increase in T2 pattern of cytokines produced by peripheral CD3 lymphocytes compared with nonatopic group: IL-4 [13,8% (3,1 - 31,8) versus 5,1% (4,1 - 6,9), $p = 0,002$] and IL-5 [6,7 (1,0 - 20,4) versus 1,0% (0,4 - 2,1), $p = 0,004$] respectively. Just in CD8 T cells of the atopic group were also detected a significant correlation between the percentage of IL-5 producing CD8 T cells and the number of circulating eosinophils ($r_s = 0,629$; $p = 0,028$) and the level of ECP ($r_s = 0,570$; $p = 0,03$). No significant difference was seen in IFN- γ expression in T lymphocytes of both groups. However, IFN- γ and IL-4 expression by CD4 and CD8 T cells differ significantly in the nonatopic group (control), being expressed mainly by CD4 T cells. **Conclusion:** These data support a T2 cytokine (IL-4 and IL-5) predominance, in the peripheral blood of atopic subjects, produced mainly by CD8 T lymphocytes (Tc2). In the control group the T2 pattern of cytokines was mainly produced in CD4 T cells.

Key-words: Cytokines, atopic, lymphocytes, Th1, Th2, Tc1, Tc2.

INTRODUÇÃO

Os linfócitos T podem ser caracterizados pela sua expressão fenotípica em células CD4+ ("Helper"-Th) e CD8+ (citotóxicas-Tc) ou pelo perfil de citocinas que predominantemente sintetizam. As citocinas IFN- γ , TNF e IL-2 caracterizam o perfil T1 (quer Th1 quer Tc1), enquanto a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 estão ligadas ao perfil T2 (Th2 ou Tc2)^{1,2}. As manifestações clínicas da atopia estão, pelo menos parcialmente, associadas à produção de IgE e ao recrutamento e activação de células como sejam os mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos³. Por outro lado, estudos em doentes asmáticos têm evidenciado o papel dos linfócitos T CD4+ como orquestradores da resposta inflamatória através da produção de citocinas que caracterizam as suas diferentes funções efectoras². Por exemplo, está descrito que uma baixa produção de IFN- γ pelos linfócitos T em doentes asmáticos alérgicos se correlaciona positivamente com a gravidade da doença⁴, e que, experimentalmente, a terapêutica com IFN- γ inibe a eosinofilia alérgica e a hiperreactividade brônquica⁵. Magnan descreve na atopia um enfraquecimento da expressão de IFN- γ e uma elevada produção de IL-4 correlacionada com os níveis de IgE⁶. A IL-4 parece ser crucial no desenvolvimento do perfil Th2. Demonstrou-se já que a inalação de IL-4 por doentes asmáticos pode levar a uma hipersecreção de muco e aumento de eosinófilos na expectoração⁷. Num modelo animal, o bloqueio do receptor da IL-4 associou-se a uma diminuição da hiperreactividade brônquica específica, assim como a eosinofilia pulmonar, induzidas por alérgenos⁸. Por outro lado, a IL-4 aumenta a expressão vascular de moléculas de adesão e selectinas, responsáveis pelo recrutamento selectivo de eosinófilos⁵. A IL-5 influencia também a produção, maturação, activação e sobrevivência dos eosinófilos, assim como a hiperreactividade brônquica, tendo uma actividade essencialmente eosinopoiética^{9,10}.

Estudos mais recentes têm evidenciado o papel das células T CD8 na doença alérgica e das suas diferentes

populações, Tc1 e Tc2, definidas através do perfil de citocinas¹. Foi demonstrado que um número elevado de células T CD8+ participa na inflamação alérgica, com aumento da sua activação e diferenciação em células produtoras de IL-5^{11,12}. Magnan descreve elevados níveis de IFN- γ associados aos linfócitos T CD8 na asma⁶. Em doentes com dermatite atópica foi demonstrado aumento de frequências de linfócitos T CD4 e T CD8 produtores de citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5) em sangue periférico¹³. Por outro lado, Akdis *et al*¹² evidenciaram que linfócitos T CD4 e T CD8 de sangue periférico de doentes com dermatite atópica eram equipotentes na indução da produção de IgE pelos linfócitos B, bem como no aumento da sobrevivência do eosinófilo.

Num estudo retrospectivo¹⁴ e utilizando técnicas imuno-histoquímicas, foi possível caracterizar, em tecidos peribrônquicos de doentes falecidos por asma aguda, uma população de linfócitos T CD8 activados (CD25+) com fenótipo citotóxico (exprimindo perforina) e com elevados níveis de IL-4, comparativamente com um grupo-controlo de doentes falecidos com outra patologia.

Em estudo anterior evidenciámos, em linfócitos T periféricos de doentes atópicos (com asma e rinite) e clinicamente estáveis, a expressão intracelular de citocinas T1 e T2, sendo este último perfil particularmente evidente na subpopulação T CD8+¹⁵.

Neste estudo pretendemos avaliar se a expressão de citocinas T1 e T2 nas subpopulações CD4 e CD8 é semelhante nos indivíduos atópicos e não atópicos (controlos normais) e se algum destes perfis se correlaciona particularmente com os marcadores da atopia (IgE, eosinófilos circulantes e proteína catiónica do eosinófilo - ECP). Assim, fomos avaliar, por citometria de fluxo, a expressão de citocinas nos linfócitos de sangue periférico (estimulados policlonalmente) num grupo de doentes atópicos, comparativamente com indivíduos saudáveis não atópicos.

MATERIAL E MÉTODOS

População

Estudámos 14 indivíduos atópicos, sensíveis a ácaros do pó da casa (*Dermatophagoides pteronyssinus*), sendo 4 também sensíveis (em menor grau) a pólenes de gramíneas. Apresentavam uma média de idades de 22,3¹³⁻⁵⁸ anos, sendo 9 do sexo masculino e 5 do sexo feminino. Onze tinham asma brônquica e três rinite alérgica. Cinco destes doentes estavam a fazer corticosteróides de inalação oral, oito corticosteróides de inalação nasal, dois broncodilatadores e três anti-histamínicos. Todos estes doentes eram seguidos na consulta de Alergologia de um hospital.

O grupo não atópico era constituído por sete indivíduos, com uma média de idades 25,6 (20-38) anos, sendo cinco do sexo masculino e dois do sexo feminino. Foram recrutados no Hospital Militar de Belém com aceitação voluntária de participação no estudo e tendo como critérios de exclusão qualquer doença concomitante, local ou sistémica, que afecte o sistema imunitário (neoplasia, doença auto-imune ou inflamatória crónica, insuficiência renal crónica, diabetes *mellitus*, atopia, imunodeficiência). A todos foram feitas provas de sensibilidade cutânea, doseamentos de IgE total e específicas, avaliação da função renal, hepática e raios X de tórax.

Quadro 1. Características das duas populações estudadas: População controlo não atópica e população com doença atópica.

	Controlos n=7	Atopia n=14
Idade	25,6 (20-38)	22,3 (13-58)
Sexo M/F	5 : 2	9 : 5
IgE total KU/L	46 (7-104)	787 (100-4265)
Eosinófilos/ mm ³	266,0 (105-432)	272,3 (100-931)
ECP µg/L	11,1 (1,9-18)	14,3 (8,9-53)

Colheita de sangue

Foram colhidos 20 mL de sangue total por punção venosa, que foram distribuídos em fracções de 5 mL para tubos com dois tipos diferentes de anticoagulante: EDTA e heparina, para tubo SST® Vacutainer® e para tubo seco.

Determinações séricas

IgE total – Determinou-se no soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (*Enzyme Linked Fluorescent Assay* - ELFA), no equipamento VIDAS-bioMerieux. O limite de detecção deste método é de 0,50 kU/L e 95% da população não atópica adulta tem valores inferiores a 120 kU/L.

IgE específica – Determinaram-se no soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (*Fluoro-enzyme-immunoassay* - FEIA) no equipamento Cap-System da Pharmacia Diagnostics.

Proteína catiónica eosinofílica (ECP) – Executou-se a colheita em tubos SST® Vacutainer® (Becton Dickinson) de acordo com normas estabelecidas: punção venosa até enchimento do tubo, coagulação do sangue de 60-120 minutos à temperatura ambiente e centrifugação 1000-1300 g durante 10 minutos. A determinação foi feita em soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (FEIA) no equipamento Cap-System. O valor a partir do qual se considera o resultado positivo é de 15 µg/L.

Eosinófilos – Contagem no contador hematológico Coulter-GenS, a partir de sangue total colhido em EDTA. É considerado valor de referência para adultos normais o compreendido entre 0-400/mm³.

Estudo da expressão de citocinas nos linfócitos T

Activação

Ao sangue total colhido em heparina juntou-se, em partes iguais, RPMI 1640 (GibcoBRL) enriquecido com L-glutamina 200mM (GibcoBRL). A activação fez-se em presença de brefeldina A (Sigma) na concentração de 10µg/mL com Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-PMA

(Sigma) na concentração final de 25 ng/mL e ionomicina (Sigma) na concentração de 1 µg/mL. Utilizou-se como controlo negativo da activação uma amostra de sangue incubada com tudo o descrito anteriormente, excepto PMA e ionomicina. A activação fez-se durante 4 horas a 37°C em atmosfera húmida e com 5% CO₂.

Marcação de superfície

Os linfócitos foram estudados usando como marcadores de superfície o anticorpo monoclonal CD3 marcado com o fluorocromo PC5 – ficoeritrina-cianina 5.1 (excitação a 486-580 nm e emissão a 660-680 nm) e o anticorpo monoclonal CD8 marcado com FITC-isotiocianato de fluoresceína (excitação a 486-580 nm e emissão a 504-541 nm), ambos da Immunotech (Izasa). As células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente com 10 µL de anticorpo monoclonal CD3 e 20 µL de CD8.

Fixação e permeabilização

Efectuou-se a fixação e permeabilização dos linfócitos T de acordo com as instruções do produtor (Fix e Perm, Caltag Laboratories). Após a marcação de superfície, lavaram-se as células com um tampão fosfato salino (PBS) durante 5 minutos a 2000 rpm. Após fixação durante 15 minutos à temperatura ambiente, fez-se a permeabilização e a marcação das citocinas intracelulares.

Marcação de citocinas intracelulares

Utilizaram-se anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 (PharMingen) todas conjugadas com o fluorocromo PE – ficoeritrina (excitação a 486-575 nm e emissão a 568-590 nm). Para avaliação da activação *in vitro* estudou-se também a expressão intracitoplasmática de CD69 PE (Becton Dickinson). A quantidade de anticorpos usados foi de 3 µL para as citocinas e 20 µL para CD69. O tempo de incubação foi de 15 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se lavagens para posterior análise.

Análise por citometria de fluxo

Para a análise por citometria de fluxo utilizou-se um citómetro de fluxo Epics®Elite equipado com um *laser* de 15 mW e com filtros apropriados para leitura de FITC (525 nm), PE (575 nm) e PC-5 (675 nm). O número de células adquirido foi de 20 000 e a informação computorizada foi guardada em *listmode* para mais tarde ser avaliada de acordo com o *software* de análise do próprio equipamento. Os resultados foram expressos em % de células (linfócitos T totais ou CD4 ou CD8) que coraram de forma positiva para uma dada citocina. O *gate* de linfócitos foi feito a partir do CD3 PC-5. Os linfócitos T CD4+ foram identificados como CD3+CD8- devido à diminuição da expressão do CD4 nos linfócitos T na presença de estéres do Phorbol^{16,17}. Foram utilizados como controlos negativos os linfócitos não estimulados.

Estudo estatístico

Após análise estatística descritiva e verificação da distribuição não normal dos dados, foram utilizados testes não paramétricos para avaliação dos resultados: *Mann-Whitney U test* (comparação de uma variável entre 2 grupos) e *Wilcoxon-Signed Ranks Test* (comparação de uma variável no mesmo grupo). Para o estudo das correlações usou-se o teste de correlação de *Spearman*. O valor de p foi considerado significativo quando inferior a 0,05. Os resultados foram expressos em medianas, valor máximo e mínimo.

RESULTADOS

Expressão de interferon gama (IFN- γ)

A avaliação da expressão do IFN- γ nos dois grupos em estudo (atópicos e controlos) permitiu constatar que não existiam diferenças significativas entre estes grupos, quer para os linfócitos T CD3 quer para as subpopulações T CD4 e T CD8. Apesar disso, observou-se sempre uma menor percentagem de linfócitos T que expressavam IFN- γ no grupo atópico em relação ao grupo-con-

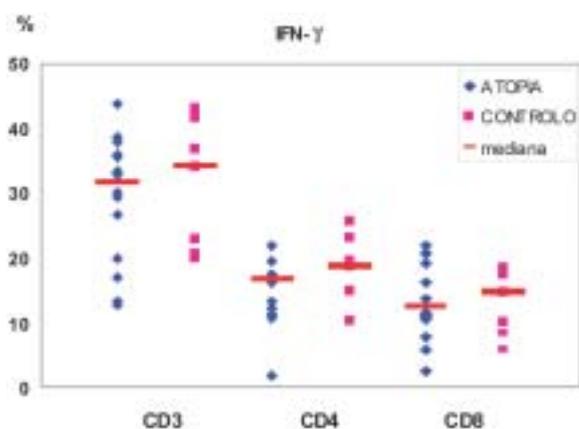


Fig. 1. A expressão de IFN- γ nos linfócitos T e subpopulações de sangue periférico foi maior no grupo-controlo relativamente ao grupo atópico, mas sem diferença significativa.

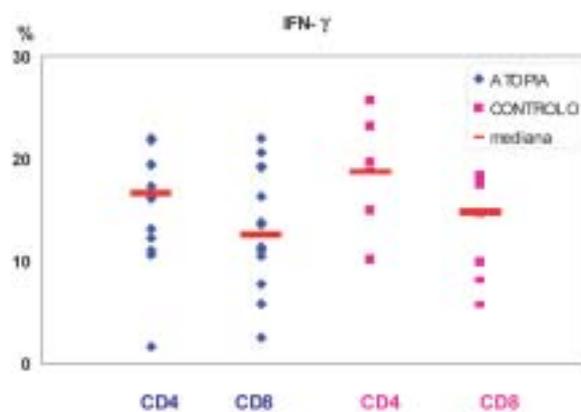


Fig. 2. Os linfócitos T CD4 do grupo-controlo não atópico expressaram de forma significativa maior quantidade de IFN- γ relativamente aos linfócitos T CD8 ($p=0,018$). No grupo atópico não existe diferença significativa na expressão desta citocina entre linfócitos T CD4 e T CD8.

trola. Na população atópica, o IFN- γ foi expresso em 31,5 % (12,7-43,9) dos linfócitos T CD3 enquanto o valor na população-controlo foi de 34,0% (20,0-43,0). Os linfócitos T CD4 expressaram 16,6% (1,7-22,0) no grupo atópico e 18,6 (10,1-23,1) no grupo controlo, sendo respectivamente para os linfócitos T CD8 o valor de 12,5 (2,6-21,9) e 14,6 (5,7-18,4) (Fig.1).

Quer em doentes atópicos quer em controlos saudáveis, a expressão de IFN- γ ocorreu maioritariamente em linfócitos T CD4 (Fig. 2), quando se comparou a expressão nas subpopulações linfocitárias. No grupo controlo, observou-se uma percentagem significativamente maior de células T CD4 IFN- γ + do que células T CD8 IFN- γ + [18,6% (10,1 - 23,1) *versus* 14,6% (5,7 - 18,4); $p = 0,018$]. No entanto, no grupo atópico não se observaram diferenças significativas entre as percentagens de células T CD4 e T CD8 que expressavam IFN- γ [16,6% (1,7 - 22,0) *versus* 12,5 (2,6 - 21,9)].

Expressão de IL-4

A percentagem de linfócitos T CD3 que expressaram IL-4 foi significativamente superior no grupo de doentes atópicos em relação ao grupo de controlos não atópicos

[13,8% (3,1-31,8) *versus* 5,1% (4,1-6,9), $p = 0,002$]. Não se observaram diferenças significativas na percentagem de células T CD4 que expressavam IL-4 entre o grupo com doença atópica e o grupo-controlo [6,0% (2,9 - 9,1) *versus* 4,2% (3,1 - 5,6)]. No entanto, a percentagem de células T CD8 IL-4+ foi significativamente superior no grupo atópico, em relação ao grupo-controlo [8,4% (0,5 - 22,7) *versus* 1,3% (0,9 - 1,8), $p=0,009$] (Fig. 3).

No grupo de doentes com doença atópica, não foram observadas diferenças significativas entre a percentagem de linfócitos T CD4 e T CD8 que expressavam IL-4, [6,0% (2,0 - 9,1) *versus* 8,4% (0,5 - 22,7)]. É de destacar, no entanto, que foram os linfócitos T CD8 que expressaram maior quantidade de IL-4. No grupo-controlo, a percentagem de linfócitos T CD4 que expressavam IL-4 foi significativamente superior à dos linfócitos T CD8 positivos para a mesma citocina [4,2% (3,1 - 5,6) *versus* 1,3% (0,9-1,8), $p= 0,018$] (Figs. 4 e 5).

Ao agruparem-se os dados dos doentes atópicos e dos controlos não atópicos, observou-se uma correlação significativa entre a percentagem de linfócitos T CD3 que expressavam IL-4 e os níveis de IgE sérica total ($r_s=0,448$ e $p=0,04$) (Fig. 6).

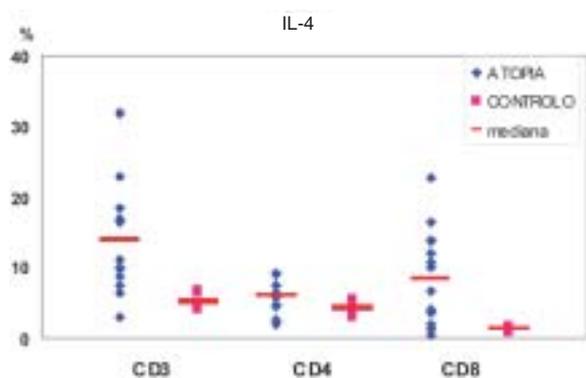


Fig. 3. A expressão de IL-4 nos linfócitos T foi manifestamente superior no grupo atópico relativamente ao grupo-controlo ($p=0,002$), contribuindo particularmente para essa diferença os linfócitos T CD8 ($p=0,009$).

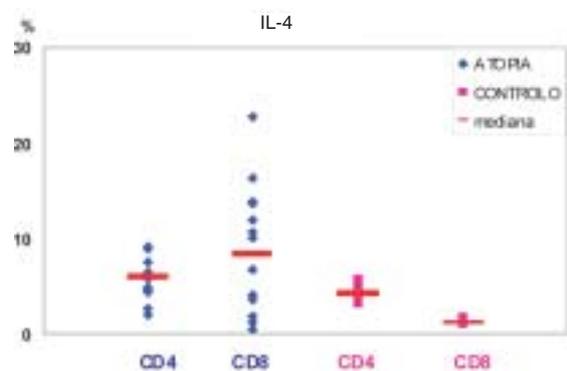


Fig. 4. No grupo-controlo, a IL-4 foi predominantemente expressa nos linfócitos T CD4 relativamente aos linfócitos T CD8 ($p=0,018$). No grupo atópico não se encontraram diferenças significativas na expressão desta citocina nas subpopulações de linfócitos T periféricas.

Expressão de IL-5

A avaliação da expressão da IL-5 pelos linfócitos T CD3 revelou uma diferença significativa entre os dois grupos estudados. No grupo atópico, a percentagem de linfócitos T que expressavam IL-5 foi de 6,7% (1,0-20,4) enquanto que no grupo controlo foi de 1,0% (0,4-2,1), $p=0,004$. Quando se avaliou o contributo das subpopu-

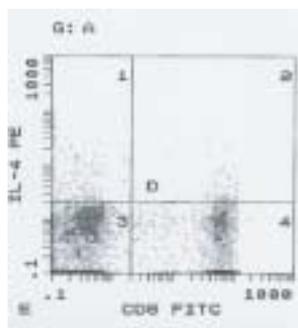


Fig. 5a

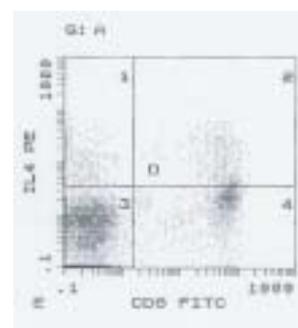


Fig. 5b

Fig. 5. Histogramas *dot-plot* obtidos por citometria de fluxo (EPICS-Elite), exemplificando a expressão de IL-4 de um indivíduo saudável (Fig. 5a) e de um doente atópico (Fig. 5b). No quadrante superior esquerdo (1) temos a percentagem de células CD3+CD8- (referidas como CD4+) que expressam IL-4 e no quadrante superior direito (2) as células CD3+CD8+ que expressam IL-4. Nos quadrantes inferiores esquerdo e direito temos respectivamente as células CD3+CD8- e CD3+CD8+ que não expressam IL-4. No controlo são os linfócitos T CD4 que produzem maior quantidade de IL-4, em contraste com o atópico, em que são os linfócitos T CD8.

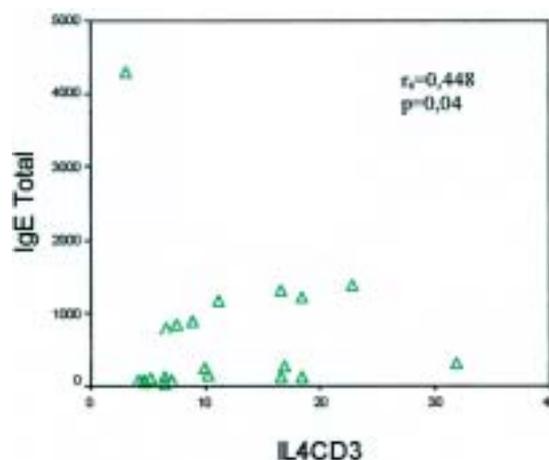


Fig. 6. Correlação da percentagem de linfócitos T CD3 que expressavam IL-4 e os níveis de IgE sérica total na população total (atópicos e não atópicos).

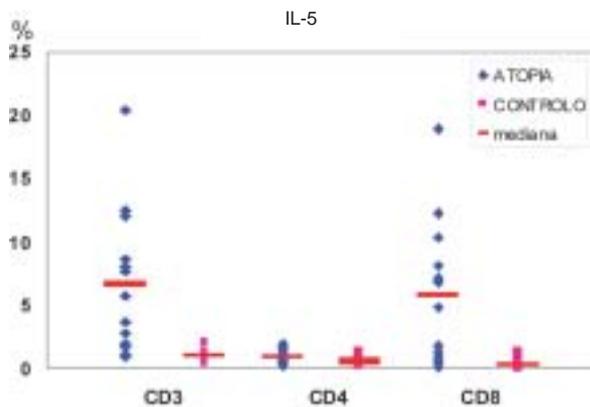


Fig. 7. A IL-5 expressou-se maioritariamente nos linfócitos T de sangue periférico no grupo de doentes atópicos relativamente ao grupo-controlo, não atópico ($p=0,004$), tendo sido a subpopulação de linfócitos T CD8 que mais contribuiu para essa expressão.

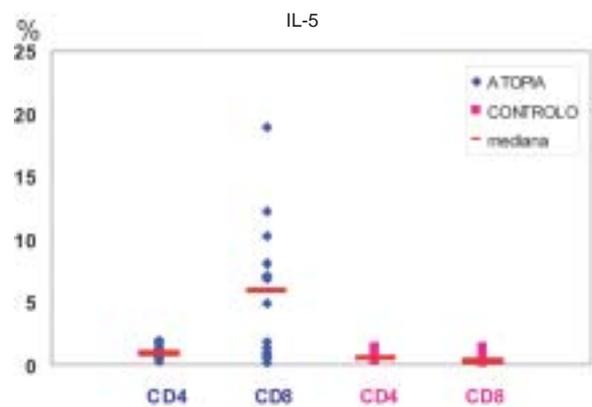


Fig. 8. No grupo atópico foram os linfócitos T CD8 que mais contribuíram para a expressão de IL-5 relativamente aos linfócitos T CD4 ($p=0,026$). No grupo não atópico não se encontraram diferenças significativas na expressão de IL-5 entre as subpopulações linfocitárias de sangue periférico.

lações linfocitárias, verificou-se que a percentagem de linfócitos T CD4 IL-5+ não diferia significativamente entre o grupo atópico e o grupo-controlo: 0,9% (0,3 - 1,9) *versus* 0,5% (0,3-1,3). No entanto, a percentagem de linfócitos T CD8 que expressavam IL-5 foi significativamente superior no grupo de doentes atópicos em relação aos controlos não atópicos [5,9% (0,1-18,9) *versus* 0,3% (0,1-1,3), $p=0,008$] (Fig. 7).

No grupo de doentes atópicos, a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+ foi significativamente superior à percentagem de linfócitos T CD4 IL-5+ [5,9% (0,1-18,9) *versus* 0,9% (0,3-1,9), $p=0,026$]. No grupo-controlo, a percentagem de linfócitos que expressavam IL-5 foi muito baixa, quer nos CD4 quer nos CD8, e sem diferenças significativas entre estas duas subpopulações linfocitárias (Fig. 8).

Observou-se apenas nos doentes atópicos uma correlação significativa entre a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+, os níveis séricos de ECP ($r_s=0,570$; $p=0,03$) e o número de eosinófilos circulantes ($r_s=0,629$; $p=0,028$) (Fig. 9).

No grupo de doentes atópicos, encontrou-se uma

correlação significativa entre a percentagem de células IL-4+ e a de células IL-5+, quer a nível de linfócitos T CD4 ($r_s=0,739$; $p=0,001$) quer a nível de linfócitos T CD8 ($r_s=0,837$; $p=0,001$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, em que avaliámos por citometria de fluxo a expressão de citocinas T1 e T2 em linfócitos circulantes de doentes atópicos e controlos saudáveis após estimulação policlonal, verificámos que a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD3 não diferiu entre os dois grupos, sendo expresso tanto pelos linfócitos T CD4 como T CD8. A expressão de IFN- γ no grupo atópico não mostrou diferenças significativas entre subpopulações linfocitárias T CD4 e T CD8, o que contrastou com o grupo-controlo, onde a expressão de IFN- γ foi significativamente mais elevada nos linfócitos T CD4.

Já a expressão de IL-4 e IL-5 nos linfócitos T CD3 diferiu significativamente nos doentes atópicos e controlos, estando associada esta diferença aos linfócitos T

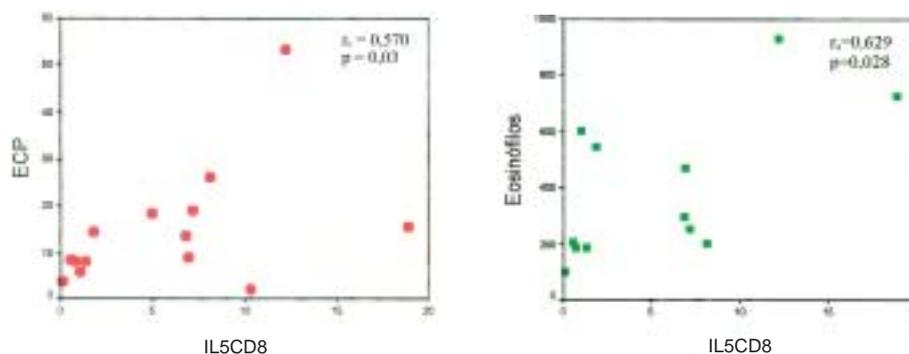


Fig. 9. Correlação entre a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+ e os níveis séricos de ECP e o número de eosinófilos circulantes apenas observada nos doentes atópicos.

CD8. No grupo atópico, a avaliação da produção de IL-4 entre as subpopulações linfocitárias T CD4 e CD8 não foi significativamente diferente (apesar de ser maior nos linfócitos T CD8), enquanto a produção de IL-5 foi significativamente diferente, com maior expressão nos linfócitos T CD8. Em contraste, nos controlos não atópicos, a avaliação da produção de IL-4 entre as subpopulações linfocitárias T CD4 e T CD8 foi significativamente diferente, com maior expressão nos CD4, enquanto a expressão de IL-5 foi muito baixa, não revelando diferenças significativas.

Além disso, apenas nos doentes atópicos se verificou uma correlação significativa dos linfócitos T produtores de IL-4 com a IgE sérica total e dos linfócitos T CD8+ produtores de IL-5 com os eosinófilos circulantes e com os níveis séricos de ECP.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação da expressão de citocinas (ELISPOT, hibridação *in situ*, ensaios de diluição limite)¹⁸. A grande limitação de todos estes métodos é a incapacidade de avaliar simultaneamente a expressão de diferentes citocinas e as células que as expressam. A citometria de fluxo tem a vantagem de avaliar a frequência de células produtoras de citocinas, permitindo demonstrar a co-expressão de

diferentes citocinas em células de fenótipo conhecido após um curto tempo de activação. Por outro lado, a possibilidade de usar sangue total tem a vantagem de não haver prévia manipulação e a activação celular ser feita no próprio meio onde as células se encontram¹⁷. Usou-se uma activação inespecífica com mitogénios em vez da activação específica com alergénios, que seria mais fiel à realidade biológica; no entanto, alguns estudos demonstram que a produção de citocinas é muito semelhante quando se usa PMA e ionomicina ou o alergénio¹⁷. Contudo, estes métodos não estão ainda estandardizados e a discrepância de resultados intracelulares pode ser devida a diferentes protocolos de estimulação, fixação e permeabilização¹⁹.

A percentagem de linfócitos T CD3 que expressavam IFN- γ não foi significativamente diferente entre doentes atópicos e controlos não atópicos. No entanto, nos controlos não atópicos, a percentagem de linfócitos que expressavam IFN- γ era significativamente superior na subpopulação T CD4, em relação à CD8. Esse perfil de predomínio Th1 (e não Tc1) dos controlos não foi encontrado no grupo atópico, no qual não se observou diferença significativa, em termos de percentagem de expressão de IFN- γ , entre as subpopulações CD4 e CD8

(Fig. 2). Entre o grupo de doentes atópicos e o grupo-controlo não houve diferenças significativas quanto à percentagem de linfócitos T CD8 que expressavam IFN- γ . São vários os artigos que referem uma expressão de IFN- γ invariável ou diminuta em relação aos controlos numa população atópica, tanto em sangue periférico como em lavados broncoalveolares^{4,6,20,21,22}. No entanto, a avaliação das células T que contribuem para este facto é muito controversa, e em nenhum deles se destacou o papel preferencial do perfil Th1 dos controlos em relação à expressão Th1 e Tc1 na doença atópica. Shirai e colaboradores fizeram a caracterização da frequência de linfócitos T CD4 que expressavam IFN- γ em sangue periférico e não encontraram diferenças significativas entre a população atópica e não atópica, constatando também uma menor expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4 dos doentes²³. Magnan descreveu em doentes atópicos que a diminuição do IFN- γ pelos linfócitos T CD4 estava directamente relacionada com a atopia e o aumento associado aos linfócitos T CD8 à asma⁶. No mesmo modelo e num outro estudo foi demonstrado existir uma diminuição significativa da expressão de IFN- γ em relação ao grupo-controlo nos linfócitos T CD4 e, nas fases mais tardias e graves da doença, a expressão do IFN- γ era maior nos linfócitos T CD8¹³. Isto sugere que no decurso desta patologia vários estádios poderão ser encontrados e que só um estudo longitudinal permitiria avaliar. Num estudo recente avaliou-se a expressão de IFN- γ de linfócitos de sangue periférico, LBA e biópsias brônquicas, verificando-se só existir um aumento nos linfócitos T CD8 do sangue periférico, sendo este atribuído a um processo inflamatório sistémico inerente à patologia em causa e não a uma característica sistémica²⁰.

No presente estudo, a IL-4 e IL-5 expressaram-se significativamente em maior quantidade nos linfócitos T CD3 na população atópica, estando associadas aos linfócitos T CD8, o que define claramente o perfil preferencial Tc2 nesta patologia. No grupo não atópico, a produção de IL-4 estava associada aos linfócitos T CD4, ou seja, a um perfil Th2. A frequência de células T CD3 pro-

ductoras de IL-4 correlacionou-se de forma significativa com os níveis de IgE, bem como a frequência de células T CD8 produtoras de IL-5 com os níveis de ECP e eosinófilos. Estes dados evidenciam a relação entre marcadores clínicos da asma ou da atopia com a frequência de células T produtoras de citocinas de perfil T2 e com funções biológicas relevantes nesta patologia. Foi também encontrada uma correlação significativa entre IL-4 e IL-5 nos linfócitos T CD4 e T CD8 no grupo atópico, sugerindo que a expressão destas citocinas é feita na mesma direcção, o que faz pensar na potenciação de uma em relação à outra, como já tem sido referido noutros estudos²⁴. Um número elevado de células T CD8 que expressam IL-5 tem sido observado em infiltrados inflamatórios de asma alérgica²⁵ e em dermatites atópicas¹². A importância das células T CD8 na patogénese e exacerbação da doença alérgica tem sido também recentemente ilustrada pela identificação de células T CD8 específicas de alérgeno em vários estudos^{26,27}. Num outro estudo, postula-se que a grande vantagem das células Tc2 é a capacidade de exercerem a sua actividade citolítica em ambiente T2, ou seja, em locais onde a proliferação das células Tc1 está comprometida ou mesmo ausente¹. Em modelos de infecção vírica também se verificou a presença de células Tc2, correlacionando-se curiosamente com parâmetros que habitualmente estão associados à atopia: aumento de IgE e eosinófilos. Assim, foi demonstrado que indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana tinham níveis elevados de IgE, sendo atribuída a sua síntese à capacidade de os linfócitos T CD8 produzirem IL-4 e IL-5 e expressarem CD40L^{28,29,30}. Outros estudos têm referido a existência de infecções virais (*Vírus Sincicial Respiratório* - RSV) concomitantes com exacerbações agudas de asma³¹. Nestes modelos de infecção, as células T CD8 são estimuladas a produzir IL-5 resultando uma acumulação de eosinófilos no tracto respiratório, bem como uma hiperreactividade das vias respiratórias. A população por nós estudada não apresentava qualquer sinal clínico sugestivo de infecção viral no momento do estudo. Para uma resposta imune

normal, o balanço Th1/Tc1 e Th2/Tc2 parece fulcral, mas até ao momento está por esclarecer todo o mecanismo que leva à alteração deste equilíbrio.

Assim, e apesar das limitações da metodologia que não nos permite avaliar a quantidade de citocina com efeitos biológicos, constatámos que, após activação, os linfócitos T circulantes de doentes atópicos expressam predominantemente citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5). Esse perfil, em contraste com o dos controlos não atópicos, caracteriza particularmente os linfócitos T CD8 (fenótipo Tc2). Estes também se correlacionam com os marcadores clínicos da atopia (IgE, ECP e eosinófilos).

Em conclusão, o nosso estudo permitiu verificar um aumento do perfil T2 (sobretudo Tc2) nos linfócitos circulantes de doentes atópicos. A monitorização destes parâmetros em diferentes fases da doença e/ou do seu tratamento (ex. imunoterapia), poderá vir a contribuir para um melhor esclarecimento do significado biológico destes achados laboratoriais.

BIBLIOGRAFIA

- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P et al. Human Tc1 and Tc2 / Tc0 CD8 T cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; 95: 231-40.
- Krug N, Madden J, Redington A E et al. T - cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:319-26.
- Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 450-63.
- Leonard C, Tormey V, Conor Burke and Poulter L W. Allergen - induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 368-75.
- Chung K F, Barnes P J. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54: 825-57.
- Magnan AO, Mély LG, Camilla CA et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1790-6.
- Shi H Z, Deng J M, Xu H et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1818-21.
- Gavett. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol* 1997; 272:1253-61.
- Shi H Z, Xiao G Q, Zhong D et al. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 204-9.
- Menzies-Gow A, Flood-Page P, Schmi K et al. Anti IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 714-9.
- Wahlstrom J, Dahlén B, Ihre E et al. Selective CD8+ T cells accumulate in the lungs of patients with allergic asthma after allergen bronchoprovocation. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 1-9.
- Akdis M, Simon H V, Weigh L et al. Skin homing CD8+ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 1999; 163: 466-75.
- Farrell A M, Antrobus P, Simpson D et al. A rapid flow cytometric assay to detect CD4+ and CD8+ T - helper (Th)0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. *British Journal of Dermatology* 2001; 144: 24-33.
- O'Sullivan S, Cormican L, Faul L, Ichinohe S, Johnston L, Burke M, Poulter W. Activated, cytotoxic CD8+ T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:560-4.
- Rebordão M, Silva M, Remédios A, Alvares E, Pinto H, Alfarroba E. Estudo de citocinas de linfócitos T e de Imunoglobulinas E e G em doentes atópicos candidatos a imunoterapia. *Rev Portuguesa Imunoalergologia* 2003;XI: 370-9.
- Pieker LJ, Singh MK, Zdraveski Z et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory effector T cells by flow cytometry. *Blood*1995; 86:1408-19.
- Pala P, Hussell T, Openshaw P. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000;243:107-24.
- Bienvenu J, Monneret G, Fabien N, Revillard JP. The Clinical Usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab, Med* 2000; 38:267-85.
- Brown V, Warke T J, Shields M D, Ennis M. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax* 2003; 58: 311-6.
- Brightling CE, Symon F, Birring SS et al. Th2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial sub-mucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 899-905.
- Becky Kelly E, Busse W W, Jar gour N N. A comparison of the airway response to segmental antigen bronchoprovocation in atopic asthma and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: 79-86.
- Smart J M, Horak E, Kemp A S, Robertsan C F, Tang M L. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN- γ responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 450-6.
- Shirai T, Suzuki K, Inui N et al. Th1 / Th2 profile in peripheral

- blood in atopic cough and atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 84-9.
24. Pène Y, Rousset F, Brière F, Chretien I, Wideman J, Bonnefoy J Y, Vries J E. Interleukin-5 enhances interleukin-4 induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur J Immunol* 1998; 18: 929-35.
 25. Shiota Y, Arikita H, Horita N et al. Intracellular IL-5 and T-lymphocyte subsets in atopic and nonatopic bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 294-8.
 26. Seneviratne S L, Jones L, King Abigail et al. Allergen-specific CD8+ T cells and atopic disease. *J Clin Invest* 2002; 110: 1283-91.
 27. Wahlstrom J, Dahlén B, Ihre E et al. Selective CD8+ T cells accumulate in the lungs of patients with allergic asthma after allergen bronchoprovocation. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:1-9.
 28. Paganelli R, Scala E, Ansotegui I J et al. CD8 T lymphocytes provide helper activity for IgE synthesis in human immunodeficiency virus infected patients with hyper IgE. *J Exp Med* 1995; 181: 423-8.
 29. Schwarze J, Mäkelä M, Cieslewicz G, Dakhama A, Lahn Michael, Ikemura T, Joetham A and Gelfand E. Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitisation by T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 163: 5729-34.
 30. Coyle A J, Erard F, Bertrand C, Walti S, Pircher H, Gros G. Virus specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *J Exp Med* 1995; 181: 1229-33.
 31. Yutaro Bardin P G, Fraenkel D J, Sanderson G, Schalkwyk E M; Holgate S T, Johnston S L. Peak expiratory flow changes during experimental rhinovirus infection. *Eur Respir J* 2000; 16: 980-5.

Aplicação do teste de activação dos basófilos no estudo de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos

Basophil activation test in the study of food and drug hypersensitivity reactions

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 153-164

Isabel Carrapatoso¹, Susana Cadinha², María Luiza Sanz³

¹ Serviço de Imunoalergologia, Hospitais da Universidade. Coimbra

² Serviço de Imunoalergologia, Hospital de São João. Porto

³ Departamento de Alergologia e Imunologia Clínica, Clínica Universitária de Navarra. Pamplona.

RESUMO

O aumento da frequência das reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos constitui um desafio permanente ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Os autores efectuam uma meta-análise da aplicação do teste de activação dos basófilos (TAB) no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos. Os diversos estudos publicados sustentam uma elevada sensibilidade e especificidade do método desde que se observem, na sua execução, determinados requisitos técnicos. Estão descritas correlações positivas e com significado estatístico entre os resultados do TAB e os de outros métodos de diagnóstico de uso corrente, tais como testes cutâneos, doseamentos de IgE específica e prova de provocação oral controlada. A utilização combinada do TAB com outros méto-

dos parece favorecer a eficácia diagnóstica. Actualmente, o conhecimento da aplicabilidade do TAB, assim como das suas vantagens e limitações, é fundamental. Numa abordagem que se pretende economicamente viável, a eficiência no diagnóstico definitivo das reacções de hipersensibilidade será condicionada, seguramente, pela utilização correcta dos diversos métodos disponíveis.

Palavras chave: Teste de activação dos basófilos, hipersensibilidade, alimentos, fármacos, testes cutâneos, IgE específica, prova de provocação oral.

ABSTRACT

The increase in the prevalence of adverse reactions to foods and drugs represents a constant challenge to the development of new methods of diagnosis. A meta-analysis on published studies concerning the clinical usefulness of the Basophil activation test (BAT) in these reactions was performed. High sensibilities and specificities can be achieved if certain technical requirements are observed. BAT results have a positive and high significant correlations with other routine diagnostic methods such as skin tests, serum specific IgE and oral controlled challenge. Efficacy of diagnosis can be improved with the combined use of BAT and other techniques. In order to achieve a well-conducted evaluation on the diagnosis of hypersensitivity reactions to foods and drugs the best options should be chosen. Concerning BAT, the present knowledge of its usefulness, advantages and limitations is therefore relevant.

Key-words: *Basophil activation test, hypersensitivity, foods, drugs, skin tests, serum specific IgE, oral challenge test.*

INTRODUÇÃO

As reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos são cada vez mais frequentes, constituindo um problema de saúde pública relevante.

Considerando a actual classificação proposta pelo Comité de nomenclatura da Academia Europeia de

Alergologia e Imunologia Clínica, as reacções devem denominar-se alérgicas, sempre que se demonstre um mecanismo imunológico subjacente, mediado por anticorpos ou por células¹.

Os mecanismos de estimulação celular iniciam-se, habitualmente, pela activação de receptores de membrana, desencadeando cascatas de eventos intracelulares conducentes à desgranulação, libertação de mediadores

inflamatórios pré-formados, assim como síntese de novo de metabolitos de membrana e citocinas, responsáveis pelas manifestações clínicas de alergia². Nas reacções mediadas pela IgE, a activação do basófilo e do mastócito resulta da ligação do alergénio a duas moléculas de IgE específica adjacentes².

O CD63 é uma glicoproteína de 53 kDa presente nos grânulos citoplasmáticos de diversas células inactivas, em particular dos basófilos³. A sua expressão na membrana de basófilos humanos, após activação *in vitro* por alergénios ou anticorpos IgE via receptor de alta afinidade (FcεRI), foi demonstrada por diversos investigadores^{4,7}. A desgranulação dos basófilos correlaciona-se fortemente com esta expressão, o que permite considerar o CD63 um marcador ideal para o estudo de activação dos basófilos^{8,9}.

No estudo das reacções alérgicas, a recolha de uma anamnese detalhada é fundamental para o diagnóstico correcto, orientando o pedido de exames complementares. Por este motivo, a realização de testes objectivos *in vivo* e/ou *in vitro* é essencial para confirmar a suspeita clínica.

Os métodos disponíveis para o diagnóstico de reacções mediadas pela IgE incluem a realização de testes cutâneos, determinação de IgE específica, testes funcionais *in vitro* e prova de provocação oral controlada¹⁰.

Os testes cutâneos por picada podem não ser exequíveis, particularmente se existem lesões cutâneas generalizadas, sendo mesmo contra-indicados em situações que envolvam o risco de choque anafiláctico. Também poderão, por vezes, conduzir a resultados falsamente negativos ou positivos^{10,11}.

O doseamento de IgE específica, apesar de apresentar, de um modo geral, uma especificidade relativamente elevada no diagnóstico das reacções mediadas pela IgE, tem frequentemente uma sensibilidade inferior à dos testes cutâneos por picada¹². No entanto, existem situações em que, lamentavelmente, os alergénios necessários à determinação da IgE específica não se encontram disponíveis¹³.

As restrições apontadas anteriormente impõem que, em certos casos, só um teste de provocação permita a demonstração clínica da reactividade. A prova de provocação oral estandardizada e controlada por placebo, apesar de constituir o método mais fidedigno no diagnóstico definitivo das reacções de hipersensibilidade, não é isenta de riscos, sendo a anafilaxia uma contra-indicação absoluta à sua execução. Tratando-se de um método moroso e dispendioso, a sua utilização como método de rotina torna-se, na prática, incomportável.

Os testes para diagnóstico de alergia, baseados na activação *in vitro* dos basófilos sanguíneos em presença do alergénio suspeito, foram descritos na literatura há já muitos anos². Alguns baseiam-se na libertação de mediadores, como a histamina e os sulfidoleucotrienos (CAST – *Cellular Allergen Stimulation Test*), e outros na observação microscópica directa da desgranulação dos basófilos^{14,15}.

A identificação do aumento da expressão de marcadores de superfície dos basófilos por citometria de fluxo, após estimulação com alergénios ou fármacos, é um método recente na investigação da alergia¹⁴. A descoberta do marcador de activação dos basófilos, CD63, foi responsável pelo desenvolvimento do FAST (*Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test*). Esta técnica, também denominada teste de activação dos basófilos (TAB), baseia-se na detecção, por citometria de fluxo, de CD63 em basófilos estimulados, como indicador da activação induzida em presença de alergénios ou fármacos¹⁴. Em casos particulares, a combinação deste teste com outros, nomeadamente com a libertação de sulfidoleucotrienos pelos basófilos estimulados por alergénios (CAST), demonstrou maior sensibilidade e especificidade relativamente a outros testes *in vitro*, incluindo a determinação de IgE específica².

Sanz *et al* validaram o TAB como método de diagnóstico nas reacções mediadas pela IgE a alergénios inalantes, comparativamente a outros métodos convencionais utilizados por rotina, tais como testes cutâneos, determinação de IgE específica e testes de libertação de

histamina e leucotrienos³. Num estudo efectuado em atópicos sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Lolium perenne* estabeleceram-se, como resultado positivo do TAB para os alérgenos inalantes, o ponto de *cut-off* de 15% de basófilos activados, mediante a análise de curvas ROC (*receiver operating characteristic*). A análise destas curvas permite determinar os valores de *cut-off* que conduzem à obtenção de percentagens mais elevadas de sensibilidade e especificidade.

Vários estudos publicados demonstraram a utilidade do TAB na detecção de reacções alérgicas mediadas pela IgE a alérgenos inalantes comuns^{3,16,17}, alérgenos alimentares^{8,18}, látex^{19,20} e veneno de himenópteros²¹. Esta técnica é também importante no diagnóstico de reacções alérgicas a fármacos, como relaxantes musculares^{22,23}, beta-lactâmicos²⁴⁻²⁶ e metamizol²⁷. Num estudo realizado recentemente por Sanz *et al*, o TAB revelou-se como um método com elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)^{28,29}.

DESCRIÇÃO SUMÁRIA DA TÉCNICA

O TAB constitui actualmente uma técnica de fácil execução. Contudo, De Weck *et al* sublinharam a necessidade de observação de determinados pormenores para obtenção de sensibilidades e especificidades óptimas². Assim, a utilização de leucócitos isolados em vez de sangue total, a optimização do processamento das amostras de sangue, o uso de controlos positivos e negativos adequados e a escolha das concentrações de alérgenos e fármacos mais convenientes são premissas essenciais à eficiência da técnica.

I. Processamento da amostra

O sangue é recolhido em tubos de 7 ml com anti-coagulante ACD (adenina-citrato-dextrose), podendo ser conservado a 4° C, durante 24 horas. Deve solicitar-se um tubo por cada três alérgenos.

2. Separação de células

A amostra é submetida a centrifugação a 4° C durante 10 minutos a 1600 rpm. Após retirar o sobrenadante, recolhe-se o halo de células com agulha e seringa, colocando-o num tubo de plástico.

O halo de células é centrifugado a 4° C durante 10 minutos a 1600 rpm. Retira-se de novo o sobrenadante, com agulha e seringa, mantendo aproximadamente um volume de 500µl. A cada tubo adicionam-se 500µl de *Stimulation Buffer* (SB) e 10 µl de heparina, agitando suavemente. O SB contém heparina e interleucina 3.

3. Preparação das diluições de alérgenos

3.1 Alimentos e inalantes

As diluições preparam-se a partir de uma concentração dos alérgenos de 10µg/ml.

$$1/8 = 10\mu\text{l (alergénio)} + 70\mu\text{l (SB)} = 80\mu\text{l}$$

$$1/32 = 20\mu\text{l (diluição 1/8)} + 60\mu\text{l (SB)} = 80\mu\text{l}$$

3.2 Fármacos

As diluições dos fármacos preparam-se a partir das formulações utilizadas na clínica, excepto para os antibióticos β-lactâmicos, em que se utilizam as concentrações a seguir indicadas:

Fármaco	Conc. Inicial	Conc. Final
Bencilpenicilina	4 mg/ml	2 mg/ml
	1 mg/ml	0.5mg/ml
Ampicilina	2.4 mg/ml	1.2 mg/ml
	0.6 mg/ml	0.3 mg/ml
Amoxicilina	2.4 mg/ml	1.2 mg/ml
	0.6 mg/ml	0.3mg/ml
MDM	1 mg/ml	0.5 mg/ml
	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml
PPL	50 microg/ml	25 microg/ml
	25 microg/ml	12.5 microg/ml
Cefuroxima	2.4 mg/ml	1.2 mg/ml
	0.6 mg/ml	0.3 mg/ml

Quando se pretendem investigar novos fármacos, é imprescindível testá-los em pelo menos duas concentrações diferentes, preferencialmente em cinco. Deve ainda proceder-se à execução de estudos de viabilidade celular, para excluir concentrações potencialmente citotóxicas. Nos estudos de viabilidade celular indirectos ou funcionais determina-se a percentagem de activação de basófilos em indivíduos atópicos, em presença do alergénio inalante a que se encontram sensibilizados. Posteriormente, procede-se à comparação dos resultados com os que se obtêm utilizando diferentes concentrações do fármaco a testar. A diminuição do número total de células ou de basófilos activados sugere citotoxicidade, permitindo a selecção das concentrações ideais a utilizar no TAB para o fármaco em questão. Os estudos de viabilidade celular directos são aqueles em que se procede à contagem de células vivas, após estimulação com diferentes concentrações do fármaco. Se a percentagem de células vivas for superior a 70%, a concentração testada não é considerada citotóxica.

4. Fase de incubação com o alergénio

Preparam-se os tubos de citometria com 50 µl das diferentes diluições de alergénio. A técnica utiliza sempre dois controlos negativos (SB) e um positivo (SC- *Stimulation control*), que contém anti-IgE para receptores de alta afinidade.

A cada tubo adicionam-se 50 µl de suspensão de células, agitando suavemente. Os tubos são incubados a 37° C durante 40 minutos. Posteriormente adicionam-se 100 µl de solução tampão (HEPES, NaCl, KCl, EDTA, pH 7,3) e centrifugam-se os tubos a 4° C, durante 5 minutos a 2250 rpm.

5. Determinação de células marcadas

Retiram-se 120 µl de sobrenadante e adicionam-se 20 µl de solução monoclonal. Esta solução contém anti-IgE marcada com *FITC e anti-CD63 marcado com *PE. Os tubos são incubados na obscuridade a 4° C, durante 30 minutos. Adicionam-se posteriormente 4 ml de solu-

ção de lise, que deverá actuar durante 5 minutos. Bloqueia-se a reacção com 1 ml de solução tampão HEPES. Após centrifugação, durante 5 minutos, a 2250 rpm, decantam-se os tubos e adicionam-se 500 µl de solução tampão HEPES.

Finalmente, após agitação suave de cada tubo, procede-se à leitura dos resultados num citómetro de fluxo (Becton Dickinson™), utilizando o *software* CellQuest.

Em suma, trata-se de uma técnica de diagnóstico *in vitro*, não invasiva, segura, útil, reprodutível e rápida, que pode ser realizada 24 a 48 horas após a colheita sanguínea, permitindo testar qualquer alergénio ou fármaco^{2,10}. Sempre que possível, a técnica deverá ser efectuada nas primeiras 24 horas. De Weck *et al* demonstraram que a percentagem de activação dos basófilos decresce a partir das 24 horas, podendo conduzir a resultados falsamente negativos às 48 horas, particularmente quando são testados fármacos².

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

O número absoluto de basófilos e a percentagem de basófilos activados são os parâmetros a considerar na avaliação dos resultados do TAB. Idealmente, o número absoluto de basófilos contabilizados no citómetro deverá aproximar-se de 500, não devendo nunca ser inferior a 150².

No Quadro I indicam-se os critérios de positividade e valores de *cut-off* estabelecidos por Sanz *et al*, com base nos trabalhos dos diversos grupos com reconhecida experiência na aplicação desta técnica². Os *cut-off* são estabelecidos para valores de sensibilidade e especificidade óptimos, mediante a análise de curvas ROC. A necessidade de definição de *cut-off* resulta de uma grande variabilidade nas percentagens de activação, consoante o tipo de alergénio utilizado. Assim, para os alimentos, podem encontrar-se percentagens de activação relativa-

Quadro I. Interpretação dos resultados do teste de activação dos basófilos (TAB)

CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE NA INTERPRETAÇÃO DO TAB			
Critério A (percentagem de basófilos activados - %BA)	Inalantes, alimentos e <i>Anisakis</i> : %BA >15%	Critério B (índice de estimulação - SI)	SI > 2 (SI = %BA após estimulação alergénica/ %BA no controlo negativo)
	Látex: %BA > 10%		
	Fármacos: %BA > 5%		
O TAB é considerado positivo sempre que os critérios A e B se verificam simultaneamente			

mente elevadas, para as quais contribuem, muitas vezes, processos de estimulação inespecífica *in vitro*. Por outro lado, no estudo dos fármacos encontram-se, com frequência, percentagens de activação relativamente mais baixas, o que conduz, necessariamente, à utilização de *cut-off* inferiores.

Os indivíduos atópicos, com elevados níveis de IgE, apresentam frequentemente percentagens de activação no controlo positivo superiores às encontradas em controlos saudáveis não atópicos².

Particularidades

Nos critérios de positividade, é importante considerar, para além da percentagem de activação, o número absoluto de células. Nos casos em que se obtém um número absoluto de células baixo, a utilização de 2 controlos negativos permite seleccionar o que apresenta, contudo, um maior número de células. Nestes casos, dever-se-á valorizar, simultaneamente, a percentagem de activação e o número absoluto de células. O controlo negativo que apresenta uma menor percentagem de activação poderá ser o seleccionado, se apresentar um número absoluto de células consideravelmente superior.

Controlo negativo positivo

Se o controlo negativo for positivo podemos considerar que esta situação indicia uma anormal estimu-

lação basal (ex: inflamação, infecção, contacto recente com o alergénio) e devemos aconselhar a repetição da análise, posteriormente².

Controlo positivo negativo

Em algumas situações o controlo positivo (anti-IgE) é negativo, o que poderá, eventualmente, resultar da ausência de receptores para IgE, sendo este fenómeno mais frequente em doentes não atópicos. Valores de activação dos basófilos pelo controlo positivo entre 12% e 30% são considerados baixos, sendo considerados negativos quando inferiores a 12%. Na casuística de De Weck e Sanz a percentagem de doentes em que a anti-IgE para receptores de alta afinidade não provoca activação de basófilos não parece exceder os 4%², embora alguns autores apontem para valores de 5-25%^{5,6,8}. Nestes casos, como o resultado do TAB não é valorizável, resultando inconclusivo, não se recomenda a sua repetição.

APLICAÇÃO DO TAB NO ESTUDO DE REACÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A ALIMENTOS

O aumento da frequência das reacções a alimentos constitui um desafio permanente ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, já que, actualmente, a

evicção do alimento causal continua a ser a medida mais eficaz no controlo desta alergia. Os testes cutâneos, apesar de representarem um exame com elevada reprodutibilidade, têm um valor preditivo positivo inferior a 50%. Os testes cutâneos negativos a alimentos conduzem a uma maior informação na exclusão de alergia alimentar mediada pela IgE, apresentando um valor preditivo negativo superior a 95%^{30,31}. O doseamento de IgE específica a alimentos, apesar de apresentar uma especificidade e valor preditivo negativo habitualmente elevados, tem frequentemente uma sensibilidade inferior à dos testes cutâneos por picada³⁰.

No estudo da alergia alimentar mediada pela IgE, o exame laboratorial de rotina continua a ser a determinação de IgE específica ao(s) alergénio(s) suspeito(s). Os testes de activação celular não são habitualmente efectuados como exames de rotina, continuando a ser encarados, pela grande maioria dos clínicos, como exames de segunda linha³². Contudo, poderão apresentar algumas vantagens, pelo menos no plano teórico, quando comparados com a simples detecção de anticorpos específicos circulantes. Hipoteticamente, ao permitirem o estudo *in vitro* da reactividade celular do doente ao alergénio específico, avaliam não apenas a existência de sensibilidade, mas possibilitam também uma aproximação mais real ao mecanismo fisiopatológico subjacente⁸. Sob um ponto de vista conceptual, poder-se-ão, assim, encarar como estudos dinâmicos *in vitro*.

Na alergia alimentar, a evolução para a tolerância coexiste frequentemente com a manutenção de sensibilização. Os testes cutâneos e a determinação de IgE específica permanecem positivos, na ausência de reactividade clínica. Nestes casos, a realização do TAB poderá fornecer informação adicional sobre uma provável tolerância.

Nos indivíduos com alergia alimentar, observa-se frequentemente uma elevada libertação espontânea de histamina³³⁻³⁵. Este facto poderá reduzir a utilidade do teste de libertação de histamina no diagnóstico desta alergia.

Moneret-Vautrin *et al* aplicaram o CAST e o TAB no

diagnóstico de alergia alimentar⁸. Concluíram que a libertação de LTC₄ induzida pelo alergénio e o estudo de activação de basófilos por determinação da expressão do CD63, através de citometria de fluxo, são testes com boa sensibilidade e especificidade. Neste estudo, demonstraram que, em doentes com alergia alimentar, a libertação espontânea de histamina ocorria na ausência de expressão de CD63 e de libertação de LTC₄. Este achado apoia o conceito de que esta libertação não depende da desgranulação dos basófilos nem reflecte um processo de activação celular. O TAB e o CAST apresentam assim maior utilidade relativamente ao teste de libertação de histamina, no diagnóstico de alergia alimentar, em doentes com elevada libertação espontânea de histamina.

Garcia-Avilés *et al* determinaram por citometria de fluxo a percentagem de basófilos activados expressando o CD63 após estimulação *in vitro* por alergénios alimentares¹⁸. Os 74 doentes estudados apresentavam clínica de urticária, asma e/ou rinite alérgica após ingestão alimentar, encontrando-se sensibilizados aos alergénios alimentares suspeitos (teste cutâneos por picada e doseamento de IgE específica positivos). Nestes doentes efectuaram, ainda, o teste de libertação de histamina e o CAST para os alergénios estudados. Encontraram uma correlação positiva com significado estatístico entre os resultados do TAB e os dos testes cutâneos, do teste de libertação de histamina, da determinação da IgE específica e do CAST. Neste estudo, o TAB demonstrou uma sensibilidade de 82,3% e uma especificidade de 62,5%, para um *cut-off* de 11%.

De Weck *et al* sublinharam que a utilização de alergénios alimentares standardizados deverá merecer particular atenção na obtenção de especificidades adequadas². Quando se utilizam alergénios alimentares no TAB é frequente a obtenção de percentagens de activação muito elevadas para os controlos negativos, comparativamente aos valores obtidos para alergénios inalantes e fármacos. Provavelmente esta observação resultará do facto de os extractos alimentares se encon-

trarem frequentemente contaminados por compostos, tais como lectinas, com capacidade de activar os basófilos.

Não existem, ainda, estudos publicados que comparem as sensibilidades, especificidades e valores preditivos positivo e negativo do TAB com os da prova de provocação oral, no diagnóstico de alergia alimentar.

Diversos estudos sugerem que concentrações elevadas de IgE específica a alimentos são preditivas de reactividade clínica a esses alimentos. Níveis elevados de IgE específica para determinados alimentos, como o ovo (>6KU/l), o amendoim (>15KU/l), o peixe (>20KU/l) e o leite (>32KU/l), permitiram cálculos de valores preditivos positivos superiores ou iguais a 95%, tornando desnecessário, nestes casos, a realização da prova de provocação oral^{32,36}.

Vila L *et al* demonstraram uma elevada sensibilidade do CAST comparativamente aos testes cutâneos por picada, determinação de IgE específica e prova de provocação oral, num grupo de 40 doentes com história de reacção adversa após ingestão alimentar³⁷. Estes doentes apresentaram uma libertação de sulfidoleucotrienos após estimulação por alérgénio significativamente superior à dos dois grupos-controlo, constituídos por 20 indivíduos saudáveis e 15 atópicos sensibilizados a aeroalérgénios. Relataram, ainda, que os doentes com história de anafilaxia apresentaram uma libertação de sulfidoleucotrienos superior à dos doentes com manifestações clínicas menos graves.

A realização de estudos multicêntricos e em larga escala, comparando as sensibilidades e especificidades do TAB com a de outros exames utilizados como rotina no diagnóstico de alergia alimentar, é, neste momento, fundamental. A determinação dos valores preditivos positivos para os diferentes alérgénios poderá, nalguns casos, tornar desnecessária a realização da prova de provocação oral. Ao testar a reactividade celular do basófilo em presença do alérgénio específico, poderemos admitir a realização de uma prova de provocação *in vitro*. Será por isso importante correlacionar os resultados do TAB com os da prova de provocação oral e com as

determinações de IgE específica, para a validação do seu uso corrente como método de diagnóstico *in vitro*.

O sucessivo aperfeiçoamento das técnicas laboratoriais aplicadas aos estudos funcionais conduzirá certamente à melhoria da eficácia diagnóstica. No caso particular da alergia alimentar, a melhoria da qualidade dos extractos disponíveis para diagnóstico poderá incluir a utilização de alérgénios recombinantes no TAB^{38,39}.

APLICAÇÃO DO TAB NO ESTUDO DE REACÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE A FÁRMACOS/ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

A hipersensibilidade a fármacos permanece uma das áreas mais complexas na prática clínica da imunoalergologia. A heterogeneidade do quadro clínico, da limitação do conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e dos factores predisponentes, escassez e a falta de standardização dos métodos de diagnóstico disponíveis dificultam o seu diagnóstico e, certamente, contribuem para a subvalorização das reacções⁴⁰.

Presentemente, o diagnóstico das reacções de hipersensibilidade a fármacos baseia-se numa história clínica detalhada, testes cutâneos, disponíveis para apenas alguns fármacos, e provas de provocação, indubitavelmente as que apresentam maior sensibilidade, embora acarretem riscos consideráveis⁴¹.

A utilização do teste de activação dos basófilos como método de diagnóstico no âmbito da alergia a fármacos é muito recente. No que respeita aos fármacos que podem induzir reacções alérgicas mediadas pela IgE, de que são exemplo os beta-lactâmicos²⁴⁻²⁶ e o metamizol²⁷, vários ensaios clínicos controlados comprovam a utilidade do TAB no esclarecimento do diagnóstico.

As reacções de hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), e em particular ao ácido acetilsalicílico (AAS), manifestam-se por sintomas respiratórios (rinosinusite crónica, polipose nasal e asma)

e/ou cutâneos (urticária e angioedema), que podem ser graves e inclusivamente fatais⁴², representando cerca de 20 a 25% de todas as reacções de hipersensibilidade a fármacos⁴³.

Com a provável excepção dos raros casos de choque anafiláctico⁴², é globalmente aceite que as reacções de hipersensibilidade ao AAS e AINEs não dependem da produção de IgE específica, mas assentam em outros mecanismos, em particular na inibição da ciclooxigenase (COX). A inibição da COX-1 resulta na diminuição da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que regula a produção de sulfidoleucotrienos e a libertação de outros mediadores pelos mastócitos. Os sulfidoleucotrienos, produzidos em maior quantidade pelos doentes com hipersensibilidade ao AAS/AINEs são considerados os principais mediadores neste tipo de reacções^{44,45}.

Apesar da incontestável produção de sulfidoleucotrienos por doentes com hipersensibilidade ao AAS/AINEs quando submetidos a provocação com o fármaco suspeito, estudos publicados utilizando a técnica de CAST neste diagnóstico revelam resultados algo contraditórios, alguns apontando para uma baixa sensibilidade, apesar de uma elevada especificidade^{41,46}.

Recentemente, o desenvolvimento do TAB e a sua combinação com o CAST reacenderam a polémica envolvendo a aplicação dos testes *in vitro* no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade ao AAS/AINEs, com a apresentação de resultados mais animadores^{28,29,42}.

Sainte-Laudy e Vallon investigaram 9 doentes com suspeita de anafilaxia induzida por aspirina e mediada pela IgE, com base na história clínica, testes cutâneos por picada e intradérmicos, determinação de IgE específica e TAB. Verificaram positividade do TAB nos 7 doentes em que foi aplicado e uma forte associação entre este método e uma história clínica sugestiva, testes cutâneos positivos, em particular intradérmicos, e presença de IgE específica. Os diferentes métodos aplicados em controlos saudáveis foram consistentemente negativos⁴².

Gamboa *et al* utilizaram também esta técnica no estudo de 60 doentes com hipersensibilidade ao

AAS/AINEs (38 com sintomas cutâneos, 20 com sintomas respiratórios e 2 com ambos), documentada pela história clínica ou por prova de provocação oral, e 30 controlos (15 asmáticos) com tolerância demonstrada a estes fármacos. Verificaram uma sensibilidade do teste de 43,3%, uma especificidade de 100%, um valor preditivo positivo de 100% e um valor preditivo negativo de 99,4%, após estimulação isolada com duas diferentes concentrações de AAS (1,25 mg/ml; 0,3 mg/ml). Quando utilizados quatro fármacos (AAS, paracetamol, metamizol e diclofenac), a sensibilidade global aumentou para 63,3% e a especificidade decresceu, mantendo-se, no entanto, superior a 90%, pelo que concluíram tratar-se de uma alternativa válida às provas de provocação oral. O naproxeno foi considerado um caso especial porque, quando testado na concentração mais elevada (5 mg/ml), induz a activação de basófilos, não só em doentes com hipersensibilidade a AINEs, também em quase todos os controlos²⁸. Esta situação parece relacionar-se com uma potente inibição *in vitro* da PGE₂, não se tratando, portanto, de uma expressão de citotoxicidade²⁹.

Sanz *et al* avaliaram posteriormente, no mesmo grupo de doentes e controlos, a importância de uma utilização conjunta do TAB e do CAST no diagnóstico *in vitro* de reacções de hipersensibilidade ao AAS/AINEs. Ao contrário do que sucede nas reacções alérgicas mediadas pela IgE, em que a correlação entre os dois testes é elevada, a associação do CAST aumentou a sensibilidade em 5-10%, à custa de uma marcada redução da especificidade para valores de cerca de 70%²⁹.

De acordo com estes autores, a elevada sensibilidade do TAB faz com que um resultado positivo seja considerado significativo, praticamente confirmando o diagnóstico quando a história clínica é compatível. Para uma maior eficácia, o teste deve ser realizado nos primeiros 6-12 meses após exposição ao fármaco e consequente reacção clínica. Quando, por questões económicas ou outras, não for possível testar os quatro AINEs (AAS, paracetamol, metamizol e diclofenac), os autores sugerem a escolha do AAS e diclofenac nas 2

concentrações inferiores (1,25 mg/ml e 0,3 mg/ml para o AAS; 0,3 mg/ml e 0,06 mg/ml para o diclofenac).

Embora o mecanismo celular subjacente à activação dos basófilos pelos AINEs permaneça desconhecido, estes autores reiteram que não se trata de uma reacção mediada pela IgE. Baseiam esta afirmação em três pressupostos: alguns doentes que praticamente não exprimem receptor de alta afinidade para a IgE continuam a ser estimulados por AINEs; não existe qualquer correlação entre a activação desencadeada pela anti-IgE e a reacção *in vitro* aos AINEs; em contraste com o que sucede nas reacções mediadas pela IgE, não existe uma boa correlação entre a expressão de CD63 e a libertação de sulfidoleucotrienos.

Em suma, Sanz *et al* consideram o TAB um método de diagnóstico *in vitro* reprodutível, com elevada especificidade (>90%) e sensibilidade (60-70%) e que apresenta uma boa correlação com as provas de provocação positivas. Embora resultados negativos no TAB não permitam excluir o diagnóstico, não dispensando a realização de prova de provocação para esclarecimento da situação clínica, resultados positivos associados a uma história compatível praticamente confirmam o diagnóstico. Deste modo, concluem que a utilização do TAB no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade a AINEs pode tratar-se de uma alternativa válida às provas de provocação, muitas vezes incómodas e perigosas, embora seja mandatária a realização de estudos multicêntricos, que já se encontram em curso.

COMENTÁRIOS

O aumento da frequência das reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos constitui um desafio permanente ao desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. Os diversos métodos actualmente disponíveis obrigam a um conhecimento profundo das suas aplicações, vantagens e limitações. O rigor da metodologia utilizada pelo imunoalergologista na planificação

dos diversos exames a solicitar ao laboratório condiciona a eficiência, sendo essencial ao estabelecimento do diagnóstico definitivo nas reacções de hipersensibilidade.

Ensaio clínico controlado demonstraram que o TAB permite a obtenção de sensibilidades e especificidades elevadas no diagnóstico de reacções alérgicas a alimentos e fármacos, representando uma técnica reprodutível e de fácil execução. O TAB revela-se ainda uma alternativa no diagnóstico de reacções de hipersensibilidade, particularmente a fármacos, em que não é possível a determinação de IgE específica.

Estão descritas correlações positivas e com significado estatístico entre os resultados do TAB e os de outros métodos de diagnóstico de uso corrente, como testes cutâneos, doseamentos de IgE específica e prova de provocação oral controlada.

Actualmente, encontram-se em curso ensaios multicêntricos e em larga escala que pretendem, sobretudo, a sua comparação com a prova de provocação oral. A possibilidade de recorrer a um método *in vitro*, sem os riscos inerentes a uma exposição *in vivo* ao alérgeno, parece-nos aliciante.

AGRADECIMENTOS

Com gratidão reconhecemos o elevado apoio técnico e humano de Sonia Ariz, Noelia Cacho e Helena Hermoso, durante a realização do estágio.

BIBLIOGRAFIA

1. Johansson SGO, Hourihane JO'B, Bousquet J et al. Position paper: A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813-24.
2. De Weck AL, Sanz ML. Flow cytometric cellular allergen stimulation test (FAST/Flow CAST). Technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy. *ACI International* 2002;14:204-15.
3. Sanz ML, Sánchez G, Gamboa PM et al. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in

- patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1007-13.
- Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:328-38.
 - Sainte-Laudy J, Vallon C, Guerin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergological diagnosis. *Allerg Immunol (Paris)* 1994;26:211-4.
 - Sabbah A, Sainte-Laudy J. Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *ACI International* 1996;8/4:116-20.
 - Sainte-Laudy J. Application of flow cytometry to the analysis of activation of human basophils. Immunological validation of the method. *Allerg Immunol (Paris)* 1998;30:41-3.
 - Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S. Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:33-40.
 - Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106: S292-302.
 - Crockard AD, Ennis M. Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow? Editorial. *Clin Exp Allergy* 2001;31:975-77.
 - Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;48:48-82.
 - Homburger H: *Methodos in Laboratory Immunology*. In: Middleton E, Reed C et al. eds. *Allergy: Principles and Practice I*, 5^a ed. St Louis: CV Mosby; 1998:417-29.
 - Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004;34:332-9.
 - Crockard AD, Ennis M. Basophil histamine release tests in the diagnosis of allergy and asthma. Editorial *Clin Exp Allergy* 2001;31:345-50.
 - Benvenist J. The human basophil degranulation test as an in vitro method for diagnosis of allergies. *Clin Allergy* 1981;11:1-11.
 - Pâris-Kohler, Demoly P, Persi L, Lebel B, Bousquet J, Arnoux B. In vitro diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest). *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:339-45.
 - Saporta M, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B. Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* 2001;56:442-5.
 - Garcia-Aviles C, Sanchez-Lopez G, Sanz ML et al. Flow-cytometric Cellular Allergen Stimulation Test (FAST) in the in vitro diagnosis of food allergy. *Allergy* 2000;55 (Suppl 63):128.
 - Ebo DG, Lechkar B, Schuerwegh AJ, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Validation of a two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. *Allergy* 2002;57:706-12.
 - Sanz ML, Gamboa PM, Garcia-Aviles C et al. Flow-cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:33-9.
 - Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1166-71.
 - Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E et al. Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:411-8.
 - Monneret G, Benoit Y, Debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenue J. Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. *Clin Immunol* 2002;102:192-9.
 - Sanz ML, DeWeck AL, Uasuf C, Gamboa PM, Chazot M. Use of flow cytometry to assess basophil activation in patients allergic to betalactam antibiotics: correlation between flow-cytometric allergen stimulation test and other in vivo and in vitro tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:307-8.
 - Sanz ML, Gamboa PM, Uasuf C et al. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002;32:277-86.
 - Sanz ML, Gamboa PM, de Weck AL. Clinical evaluation of in vitro tests in diagnosis of immediate allergic reactions to β -lactam antibiotics. *ACI International* 2002;14:185-93.
 - Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003;58:312-7.
 - Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1448-57.
 - Sanz ML, Gamboa P, de Weck AL. A new combined test with flow cytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotrienes is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136:58-72.
 - Hugh A. Sampson. Improving in-vitro tests for the diagnosis of food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2002;2:257-61.
 - Hugh A. Sampson. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805-19.
 - Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Fremont S. Laboratory tests for diagnosis of food allergy: advantages, disadvantages and future perspectives. *Allerg Immunol (Paris)* 2003;35:113-9.

33. Sampson HA, Broadbent KR, Berhise-Broadbent J. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N Engl J Med* 1989;321:228-32.
34. May CD. High spontaneous release of histamine in vitro from leukocytes of persons hypersensitive to food. *J Allergy Clin Immunol* 1976;58:432-37.
35. Boner AL, Folchi Vici E, Carcereri L et al. Spontaneous release of histamine from basophils in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;4:165-69.
36. Hugh A. Sampson, Deborah G Ho. Clinical aspects of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:444-51.
37. Vila L, Sanz ML, Sanchez G, Uasuf CG, Ferrer M, Barrio M, Dieguez I. Study of the in vitro sulphidoleukotriene production in food-allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001; 11:247-54.
38. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy* 1999;29:896-904.
39. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:27-36.
40. Demoly P, Kropf R, Bircher A, Pichler WJ. Drug hypersensitivity questionnaire. *Allergy* 1999;54:999-1003.
41. Lebel B, Messaad D, Kvedariene V, Rongier M, Bousquet J, Demoly P. Cysteinyl-leukotriene release test (CAST) in the diagnosis of immediate drug reactions. *Allergy* 2001;56:688-92.
42. Sainte-Laudy J, Vallon C. Nine cases of suspected IgE-mediated anaphylaxis induced by aspirin. *ACI International* 2002;14:220-2.
43. Faich GA. Adverse drug reaction monitoring. *N Engl J Med* 1986; 314:1589-92.
44. Szczeklik A, Stevenson D. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111;913-21.
45. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:290-6.
46. Pierzchalska M, Mastalerz L, Sanak M, Zazula M, Szczeklik A. A moderate and unspecific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leucocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1785-91.

Utilização de sulfassalazina no tratamento de doentes com urticária crónica idiopática – Experiência de um Serviço de Imunoalergologia

Sulfasalazine use in treatment of chronic idiopathic urticaria – Experience of an outpatient immunoallergy clinic

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 165-170

Pedro Martins¹, Luís Miguel Borrego², Sara Prates², Graça Pires²,
Cristina Santa Marta², Paula Leiria Pinto², José Rosado Pinto³

¹ Interno do Internato Complementar de Imunoalergologia

² Assistente Hospitalar de Imunoalergologia

³ Director do Serviço de Imunoalergologia

Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia. Lisboa

RESUMO

Os autores apresentam seis casos clínicos de doentes com urticária crónica idiopática (UCI) que não respondiam à terapêutica anti-histamínica convencional, necessitando de corticoterapia sistémica frequente para controlar as queixas. Após várias tentativas com outras terapêuticas, foram medicados com sulfassalazina. Efectuou-se uma análise deste grupo de doentes, procurando estabelecer uma avaliação do risco-benefício para a utilização da sulfassalazina na UCI, concluindo-se favoravelmente da sua utilização. Apresenta-se uma breve revisão dos mecanismos de acção, efeitos adversos e cuidados na utilização da sulfassalazina.

Palavras-chave: urticária crónica, sulfassalazina, tratamento.

ABSTRACT

The authors studied six patients with chronic idiopathic urticaria (CIU) that didn't respond to conventional therapy. All had systemic corticosteroid therapy to control symptoms, having being decided to initiate sulfasalazine. The patients were characterized and was concluded that in this group of patients, sulfasalazine seems to be an efficient and safe alternative therapeutic without serious adverse effects. The authors also present a short revision about sulphasalazine utilization.

Key-words: chronic urticaria, sulfasalazine, treatment.

INTRODUÇÃO

Todos os médicos que lidam com doentes que sofrem de urticária crónica (UC) sabem que o tratamento desta patologia é por vezes difícil, e até mesmo frustrante, não só para o doente como também para o próprio profissional de saúde¹.

Apesar de a urticária ser uma patologia conhecida desde a Antiguidade e de existirem descrições do tempo da China antiga, somente no século passado se começaram a descrever diferentes subtipos (de acordo com o agente etiológico) e a classificar as urticárias em agudas e crónicas, entendendo-se estas últimas como as que persistem mais de 6 semanas².

Na abordagem dos doentes com urticária crónica, doença com uma prevalência desconhecida, deparamo-nos com dois grandes problemas:

O primeiro, o de tentar identificar uma causa que, como é sabido, apenas se consegue encontrar numa minoria dos casos, mesmo após investigação exaustiva³. Por este motivo, grande parte das urticárias crónicas são rotuladas de idiopáticas. Este termo "idiopático", pouco satisfaz o doente que procura uma justificação para o seu problema cutâneo, pelo que não raras vezes consulta vários médicos na ânsia de encontrar uma explicação. Os exames a solicitar na abordagem do doente com urticária crónica são, aliás, um tema que não é ainda consensual⁴.

O segundo grande problema prende-se com o tratamento. Se felizmente em muitos casos se consegue controlar a sintomatologia com a utilização de anti-histamínicos-H1, noutras as lesões persistem, o que motiva frequentemente a utilização de ciclos de corticoterapia sistémica prolongados com os efeitos adversos daí decorrentes e sobejamente conhecidos. É exactamente por isto que, ao longo dos anos, têm surgido diversas propostas de fármacos considerados como "alternativos", com uma eficácia discutível em grande parte dos casos.

Entre os fármacos "alternativos", assim designados por constituírem uma terapêutica alternativa à corticoterapia, temos vários medicamentos habitualmente utilizados no tratamento de outras patologias: anti-histamínicos-H2, antidepressivos, antagonistas dos leucotrienos, colchicina, dapsona, imunossuppressores, varfarina, nifedipina....⁵.

Um dos fármacos que surge dentro deste grupo é a sulfasalazina, medicamento utilizado durante anos no tratamento das doenças intestinais inflamatórias crónicas e da artrite reumatóide. Apesar de não existirem muitos relatos da utilização de sulfasalazina no tratamento da UC, encontram-se descritos casos de sucesso na UCI, bem como na urticária retardada de pressão^{6, 7, 8}.

Neste artigo, os autores apresentam a experiência da utilização de sulfasalazina no tratamento de doentes

com UCI, no serviço de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia.

MATERIAL E MÉTODOS

Através da análise dos dados que constavam nos processos clínicos, estudaram-se retrospectivamente seis doentes com UCI medicados com sulfassalazina. Todos necessitavam de corticoterapia frequente para controlar as lesões mucocutâneas, dado não responderem ao tratamento com anti-histamínicos-H1/outras terapêuticas. Caracterizou-se este grupo de doentes analisando-se diversos parâmetros, nomeadamente: sexo, idade, duração de sintomas, tempo de seguimento na consulta, resultado de exames analíticos, resultado de biópsia cutânea, terapêutica prévia, eficácia da terapêutica, número / tipo de reacções adversas e duração do tratamento.

RESULTADOS

Todos os doentes estudados eram do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 40 e os 66 anos (média etária de 53 anos). O tempo médio de duração de sintomas foi de 3,5 anos (mínimo e máximo de 1 e 8 anos, respectivamente), apesar de o tempo médio de seguimento na consulta ser de 1,5 anos.

Todos os doentes tinham por altura da primeira consulta recorrido a médicos de outras especialidades e efectuado diversas análises sanguíneas, nomeadamente: hemograma, bioquímica sanguínea, velocidade de sedimentação, pesquisa de anticorpos antinucleares (ANAs) e de anticorpos anti-tiroideus, estudo da função tiroideia e do complemento, não tendo sido encontrada qualquer alteração analítica.

Realizou-se biópsia cutânea em três doentes, que foi compatível com urticária. Numa das biópsias observou-se um infiltrado inflamatório misto, rico em polimorfonu-

cleares e eosinófilos perivascular e intersticial. Noutra biópsia visualizou-se um infiltrado com predomínio de polimorfonucleares, e na terceira uma infiltração inflamatória perivascular difusa, na derme e pânículo, constituído por mononucleados e eosinófilos.

Da revisão da terapêutica efectuada, constatou-se que os seis doentes tinham sido medicados com doses elevadas de anti-histamínicos-H1 (cetirizina, fexofenadina), sem sucesso. Quatro, foram medicados com anti-histamínicos-H2 (ranitidina) sem qualquer melhoria. Relativamente à utilização de antagonistas dos receptores dos leucotrienos, foram prescritos a quatro doentes, e a colchicina prescrita a dois, também sem qualquer resultado.

A dapsona, antimalárico com conhecidas propriedades imunomoduladoras utilizado no tratamento de doenças auto-imunes, foi prescrita em quatro doentes, registando-se uma melhoria franca em todos eles. No entanto, teve que ser interrompida em todos, devido ao aparecimento de anemia sintomática (valores de 9-10 g/dl de hemoglobina).

Quanto à utilização de sulfassalazina, a dose inicial foi de 500mg/dia, com aumentos semanais de 500mg/dia até se alcançar 2000 mg/dia divididos em duas tomas. Esta terapêutica foi suplementada com ácido fólico 1 mg/dia, de modo a compensar os efeitos da malabsorção motivados pela sulfassalazina, que inibe a folato conjugase ao nível da mucosa intestinal. Foi efectuado doseamento da glicose-6-fosfato desidrogenase antes do início do tratamento.

Durante o tratamento, os doentes foram avaliados em consultas regulares para investigação dos potenciais efeitos adversos. Foram realizadas análises sanguíneas mensais, nomeadamente hemograma, estudo da função hepática e renal.

Num dos doentes a sulfassalazina foi interrompida após um mês de tratamento devido ao aparecimento de cefaleias. Nos restantes foi continuada, verificando-se uma melhoria progressiva em todos, deixando de ser necessária corticoterapia sistémica. O tempo médio até

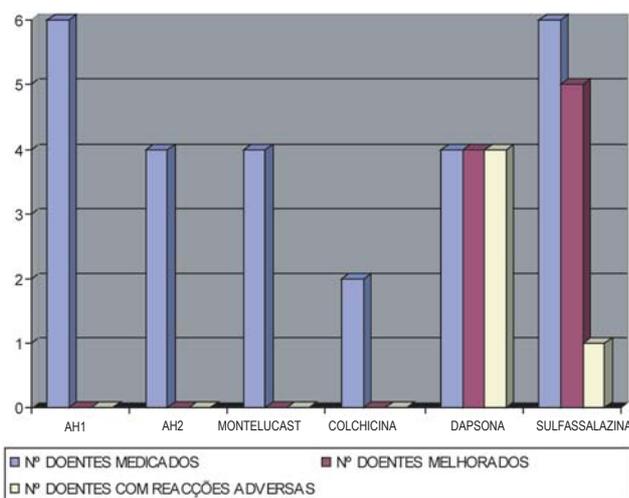


Fig. 1. Abordagem farmacológica nos 6 doentes estudados. Encontram-se assinalados para cada substância o número de doentes medicado, o número de doentes melhorado e o número de doentes com reacções adversas (AH1: anti-histamínicos-H1; AH2: anti-histamínicos-H2).

ocorrer melhoria foi de um mês e dez dias (mínimo de 2 semanas e máximo de 3 meses). O tempo de tratamento nos doentes em que se registou melhoria variou entre 2 e 12 meses. O número de doentes medicados com os vários fármacos, o número de doentes com melhoria clínica e o respectivo número de reacções adversas encontram-se discriminados na Fig. 1. O tempo de tratamento até se alcançar melhoria clínica, para cada doente, consta na Fig. 2.

DISCUSSÃO

A sulfassalazina é um fármaco que resulta da associação do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) e da sulfapiridina, antibiótico da família das sulfamidas. A sua utilização, ao longo de mais de 50 anos, tem sido essencialmente dirigida ao tratamento da doença crónica intestinal inflamatória e de diversas doenças reumatológicas, nomeadamente artrite reumatóide e esclerodermia^{6,7}.

Foram propostos vários mecanismos de acção para

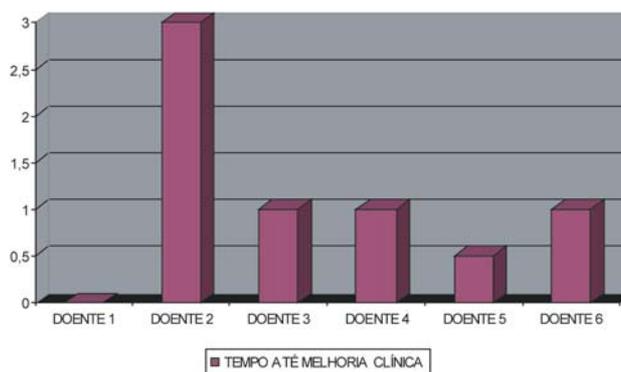


Fig. 2. Tempo de tratamento com sulfassalazina decorrido até melhoria clínica (em meses).

este fármaco, não estando no entanto ainda convenientemente esclarecidos. O 5-ASA é considerado o componente activo na doença intestinal inflamatória, ao invés da sulfapiridina, que parece assumir grande importância na artrite reumatóide^{7,9}.

Tem sido descrito como um medicamento com efeitos antibacterianos, anti-inflamatórios e imunomoduladores. Quanto ao efeito antibacteriano decorrente da sulfapiridina, antibiótico de baixo espectro, é especulativo que o mecanismo de acção da sulfassalazina possa resultar da erradicação de um eventual agente infeccioso sensível às sulfamidas. O seu poder anti-inflamatório advém do ácido 5-aminosalicílico, que contribui para a clearance de radicais livres, para além de inibir a lipó e ciclooxigenase. À semelhança de outros antifolatos, o seu poder imunomodulador poderá resultar duma diminuição da síntese de purinas, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios, que necessitam destas moléculas para serem sintetizados^{7,8,9,10}. Foi também demonstrado que a sulfassalazina inibe a libertação da histamina ao nível dos mastócitos. Ao nível do linfócito B, há uma redução da produção de imunoglobulinas¹¹ e, no que concerne ao linfócito T, parece ocorrer uma diminuição da síntese de citocinas^{8,10}. Mais recentemente foi demonstrado que a sulfassalazina inibe a activação dos macrófagos e suprime a expressão do complexo *major*

de histocompatibilidade de classe II, induzida pelo INF- γ ¹².

A confirmar-se a sua actuação na urticária crónica, resultará provavelmente da conjugação de todos estes mecanismos. Os primeiros relatos da utilização de sulfassalazina no tratamento da UCI datam de 1991⁶. Desde então foram publicados outros artigos sobre a prescrição de sulfassalazina neste tipo de doentes, e também em doentes com urticária retardada de pressão, sob a forma de casos clínicos. Celso Pereira *et al*, num estudo efectuado em doentes com vasculite urticariana normocomplementémica, demonstraram a tolerabilidade e eficácia da sulfassalazina, que persistiu após a suspensão terapêutica¹⁰.

O perfil de efeitos adversos da sulfassalazina é bem conhecido, parecendo ser dose-dependente e surgindo na sua maioria nos primeiros 3 meses de tratamento. A sulfapiridina será provavelmente a responsável pela maioria das reacções adversas, e os indivíduos acetiladores lentos poderão necessitar de doses menores. Dentro dos efeitos mais frequentes encontram-se os gastrintestinais, as cefaleias e a deficiência de ácido fólico.

Estes efeitos, apesar de não serem graves, podem constituir causa de baixa adesão à terapêutica, utilização incorrecta e abandono da medicação por parte do doente. Por se tratar de um antifolato, existe risco de desenvolvimento de alterações hematológicas. Relativamente à sua eventual nefrotoxicidade, a incidência de insuficiência renal nos doentes tratados não parece exceder a da população geral. São aconselhadas precauções nos doentes com história de doença hepática ou renal e nos que apresentam deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase. Por estes motivos, aconselha-se a realização de hemograma e estudo da função hepática mensais nos primeiros 3 meses de tratamento. Um dos efeitos que deverá ser tido em atenção, perante um indivíduo do sexo masculino, é o facto de poder provocar oligospermia reversível. Podem surgir reacções cutâneas, mas, excepto se graves, não são uma indicação absoluta para interrupção do tratamento^{7,13}. Encontram-se descritos casos de indução de tolerância^{14,15}.

Nos seis doentes apresentados, medicados com sulfassalazina, apenas um apresentou efeitos secundários (cefaleias). Tratou-se de um efeito descrito, sem gravidade e que respondeu de imediato à interrupção do medicamento, ao contrário dos efeitos verificados com a dapsona que, apesar de igualmente eficaz, provocou em todos os doentes anemia clinicamente significativa que persistiu vários dias após a sua suspensão.

É sabido que a urticária crónica idiopática é uma doença imprevisível em termos de evolução, ficando por responder se no futuro algum destes doentes voltará a ter lesões cutâneas. No entanto, em quatro dos doentes melhorados passaram-se já mais de oito meses desde a interrupção da sulfassalazina e, até ao momento, ainda não se registou reaparecimento da urticária em qualquer deles. Somente um doente se encontra sob medicação anti-histamínica-H1 (hidroxizina 25mg, duas vezes ao dia).

Poderemos interrogar-nos, também, sobre se a melhoria terá resultado não do efeito do medicamento mas da história natural da doença. Para responder convenientemente a esta questão seria necessário efectuar um estudo contra placebo, em dupla ocultação, onde fosse utilizado um grupo-controlo.

CONCLUSÃO

A nossa experiência com estes seis doentes sugere-nos que a sulfassalazina deve constar na lista dos medicamentos utilizados no tratamento da urticária crónica, nomeadamente naqueles que não respondam ao tratamento convencional com anti-histamínicos e que necessitem de corticoterapia sistémica frequente para controlar as queixas. Para além de eficaz, a sulfassalazina constituiu um tratamento seguro comparativamente à dapsona. Os efeitos secundários observados não foram graves e regrediram após a suspensão da terapêutica. Não obstante, deverá manter-se um seguimento clínico e laboratorial regular destes doentes para detectar pre-

cocemente quaisquer eventos adversos e para avaliar a resposta terapêutica.

Pensamos que a avaliação risco-benefício do medicamento é extremamente favorável, dado criar a possibilidade de os doentes ficarem assintomáticos, não necessitando posteriormente de qualquer medicação.

BIBLIOGRAFIA

1. Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 363-8.
2. Zuberbier T. Urticaria. *Allergy* 2003; 58: 1224-34.
3. Kaplan A. Urticaria and angioedema. In: *Allergy Principles & Practice*. Adkinson N et al. Eds. Philadelphia, Mosby, 6ª edição, 2003: 1537-58.
4. Kozel M, Bossuyt P, Mekkes J, Bos J. Laboratory tests and identified diagnoses in patients with physical urticarias: a systematic review. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 409-16.
5. Mateus C. Treatment of chronic idiopathic urticaria unresponsive to type I antihistamines in monotherapy. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130 (S1): 129-44.
6. Jaffer A. Sulfasalazine in the treatment of corticosteroid-dependent chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 964-5.
7. Engler R, Squire E, Benson P. Chronic sulfasalazine therapy in the treatment of delayed pressure urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 74: 155-9.
8. Hartmann K, Hani N, Hinrichs R, Hunzelmann N, Scharffetter-Kochanek K. Successful sulfasalazine treatment of severe chronic idiopathic urticaria associated with pressure urticaria and angioedema. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 71.
9. Smedegard G, Bjork J. Sulphasalazine: mechanism of action in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34 (S2): 7-15.
10. Pereira C, Julião M, Loureiro C, et al. Avanços terapêuticos na vasculite urticariana linfocitária normocomplementémica. *Rev Port Imunoalergol* 1997; 4: 183-98.
11. Hirohata S, Ohshima N, Yanagida T, Aramaki K. Regulation of human B cell function by sulfasalazine and its metabolites. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 631-40.
12. Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Deitch EA. Sulphasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide synthetase expression, IL-12 production and major histocompatibility complex expression. *Immunology* 2001; 103: 473-8.
13. Ransford R, Langman M. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on safety of Medicines. *Gut* 2002; 51: 536-9.
14. Akahoshi K, Chijiwa Y, Kebemura T, Okabe H, Akamine Y, Nawata H. Desensitization for sulfasalazine induced skin rash in a patient with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1994; 29: 772-5.
15. Tolia V. Sulfasalazine desensitization in children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1029-32.

Asma – factor de risco para hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não esteróides?

Asthma – Risk factor for hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs?

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 171-175

Carlos Neto Braga¹, Luís Miguel Borrego¹, Paula Leiria Pinto¹, Susana Marinho², José Rosado Pinto³

¹ Assistente Hospitalar de Imunoalergologia

² Interno do Internato Complementar de Imunoalergologia

³ Director do Serviço de Imunoalergologia

Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia, Lisboa

RESUMO

A caracterização dos doentes com reacções adversas a anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) e a identificação de eventuais factores de risco são importantes, uma vez que estas reacções são relativamente frequentes na prática clínica, são imprevisíveis e, por vezes, potencialmente fatais. Foi nosso objectivo caracterizar a população de doentes observados na nossa consulta com reacção adversa aos AINEs, nos últimos 2 anos, e avaliar a relação entre asma e hipersensibilidade aos AINEs. Incluíram-se 48 doentes com intolerância aos AINEs confirmada através da história clínica e/ou prova de provocação, seguidos na nossa consulta nos últimos 2 anos (grupo A). Esta população de doentes foi comparada com 61 doentes referenciados à nossa consulta por suspeita de hipersensibilidade a fármacos, a qual não se confirmou (grupo B). Os doentes foram caracterizados quanto a: idade, sexo, manifestações clínicas das reacções adversas, antecedentes pessoais e familiares de atopia e quanto à presença de sensibilização alérgica. Efectuaram-se testes cutâneos em picada com os aeroalergénios mais comuns. Realizaram-se provas de provocação com o fármaco

suspeito para confirmação do diagnóstico e/ou com outro AINE para encontrar uma alternativa terapêutica. Nas situações em que havia reexposição ao medicamento e a sintomatologia era reprodutível, as provas de provocação foram dispensadas. Utilizámos o teste C2 para comparação dos resultados obtidos nos dois grupos de doentes.

Encontrou-se uma elevada prevalência de asma e sensibilização a aeroalergénios nos doentes com hipersensibilidade aos AINEs, o que sugere a existência de uma associação entre estas entidades clínicas.

ABSTRACT

The characterisation of patients with adverse reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and the identification of possible risk factors are important since these reactions are relatively frequent, unpredictable and potentially fatal. The aim of our study was to characterise a population of patients with a history of adverse reactions to NSAIDs followed-up at our outpatient clinic during the last two years, and to evaluate the relationship between asthma and NSAID hypersensitivity. We included 48 patients with NSAID intolerance, confirmed by the clinical history and/or oral challenge (Group A). This group was compared with 61 patients referred to our outpatient clinic due to a suspicion of NSAID hypersensitivity that wasn't confirmed (Group B). The patients were characterised regarding age, gender, clinical manifestations of the adverse reactions, personal and family history of atopy and allergen sensitisation (for which we performed skin prick tests with a battery of common inhalant allergens). We performed oral challenges with the culprit drugs to confirm the diagnosis and/or with another NSAID in order to find a therapeutic alternative. In those patients who reported a history of re-exposure to the culprit drug and the clinical manifestations were reproducible, the challenges were not performed. We used C2 test to compare the results obtained in the two groups of patients. We found a high prevalence of asthma and of sensitisation to inhalant allergens in the group of patients with NSAID hypersensitivity, which suggests an association between these two disorders.

Key-words: non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), NSAID hypersensitivity, atopy, asthma.

INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são medicamentos muito utilizados na prática clínica, em virtude das suas potencialidades farmacológicas (efeito anti-inflamatório, analgésico e anti-agregante plaquetário), sendo apontados como uma das principais causas de reacções adversas a fármacos^{1,2,3,4}. Geralmente, estas reacções são imprevisíveis e podem, inclusive, ser potencialmente fatais.

Na população geral, a prevalência de hipersensibilidade aos AINEs é de 0,3 a 0,5%^{1,2,3,5}. Em doentes asmáticos adultos, esta prevalência é de 10%, atingindo 30 a 40% dos doentes com asma e polipose nasal (triade do ácido acetilsalicílico ou síndrome de Fernand-Widal)^{1,2,4,6,7,8,9,10}. Em doentes com urticária crónica, a prevalência varia entre 21 e 30%^{1,2,4,6,7}. Os sintomas respiratórios predominam nos adultos, a partir da terceira década de vida e em doentes do sexo feminino^{1,2,3,6,7,8,9,10}. Nas crian-

ças, os sintomas respiratórios são raros, sendo as manifestações clínicas essencialmente cutâneas.

A asma tem sido associada à hipersensibilidade aos AINEs, especialmente em adultos com manifestações respiratórias. Por outro lado, alguns autores têm encontrado uma elevada prevalência de sensibilização a aeroalergénios em doentes com hipersensibilidade aos AINEs³. No entanto, a sensibilização a aeroalergénios não é considerada factor de risco para esta entidade clínica. No que respeita às crianças, os dados epidemiológicos referentes a este grupo etário são escassos.

A abordagem diagnóstica destes doentes continua a basear-se em provas de provocação, com todos os riscos que lhes são inerentes. Neste contexto, é importante a caracterização dos doentes com reacções adversas a AINEs, bem como a identificação de eventuais factores de risco e o desenvolvimento de meios de diagnóstico mais sensíveis e seguros.

OBJECTIVO

Foi nosso objectivo caracterizar a população de doentes observados na nossa consulta com reacção adversa aos AINEs, nos últimos 2 anos, e avaliar a relação entre asma e hipersensibilidade aos AINEs.

METODOLOGIA

Incluíram-se 48 doentes com intolerância aos AINEs confirmada através da história clínica e/ou prova de provocação, seguidos na nossa consulta nos últimos 2 anos (grupo A). Esta população de doentes foi comparada com 61 doentes referenciados à nossa consulta por suspeita de hipersensibilidade a fármacos que não se confirmou (grupo B).

Os doentes foram caracterizados quanto a: idade, sexo, manifestações clínicas das reacções adversas, antecedentes pessoais e familiares de atopia e quanto à

presença de sensibilização alérgica. Efectuaram-se testes cutâneos em picada utilizando uma bateria com os aeroalergénios mais comuns. Realizaram-se provas de provocação com o fármaco suspeito para confirmação do diagnóstico e/ou outro fármaco para encontrar uma alternativa terapêutica, após consentimento informado. Nas situações em que havia reexposição ao medicamento e a sintomatologia era reprodutível, as provas de provocação foram dispensadas. Utilizámos o teste C2 para comparar os resultados obtidos nos dois grupos de doentes.

RESULTADOS

Os doentes do grupo A tinham média de idades de 24,8 anos (desvio-padrão ± 19), sendo a relação sexo masculino/ sexo feminino de 1:1,5. No grupo B, a média de idades foi de 23,3 anos (± 18) e a relação sexo masculino/ sexo feminino de 1:1,3.

Existiam antecedentes familiares de doença alérgica em 58,3% e 68% dos doentes, respectivamente, no grupo A e no grupo B (Fig. 1). No grupo A, a prevalência de antecedentes pessoais de doença alérgica foi de 77%, enquanto no grupo B foi de 49%, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Fig. 2). No caso particular da asma, esta ocorreu em 56,3% dos doentes do grupo A e em 25% dos doentes do grupo B, tratando-se também de resultados com significado estatístico (Fig. 3).

Encontrou-se sensibilização para aeroalergénios em 60% dos doentes no grupo A e em 26% no grupo B, sendo a diferença estatisticamente significativa (Fig. 4). No grupo A não houve diferença significativa na percentagem de doentes sensibilizados a aeroalergénios, com e sem choque anafiláctico (Fig. 5).

No grupo A, 60,4% dos doentes apresentavam manifestações cutâneas, 22,9% anafilaxia, 10,4% choque anafiláctico e 6,3% manifestações respiratórias (Fig 6).

Os AINEs implicados nas reacções adversas foram: ácido acetilsalicílico (AAS) (45,7%), ibuprofeno (30,4%),

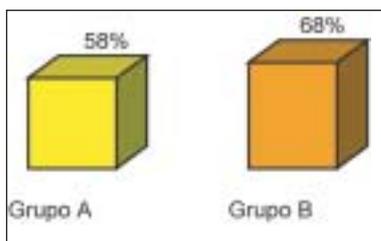


Fig. 1. História familiar de doença alérgica.

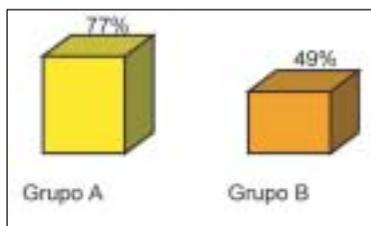


Fig. 2. Antecedentes pessoais de doença alérgica.

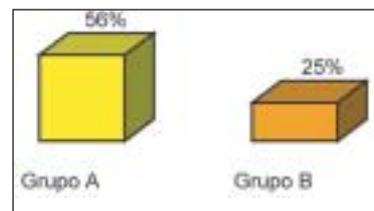


Fig. 3. História pessoal de asma.

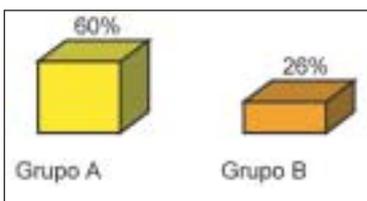


Fig. 4. Sensibilização a aeroalergénios.

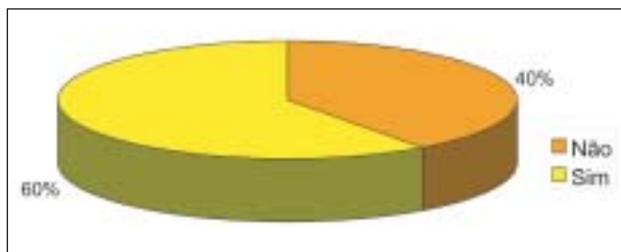


Fig. 5. Sensibilização alérgica – choque anafilático.

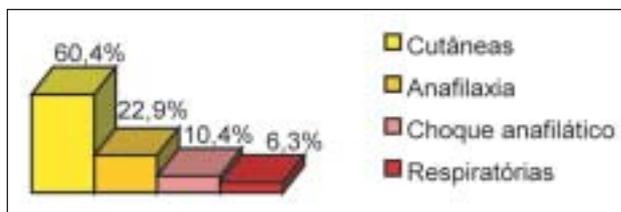


Fig. 6. Manifestações clínicas.

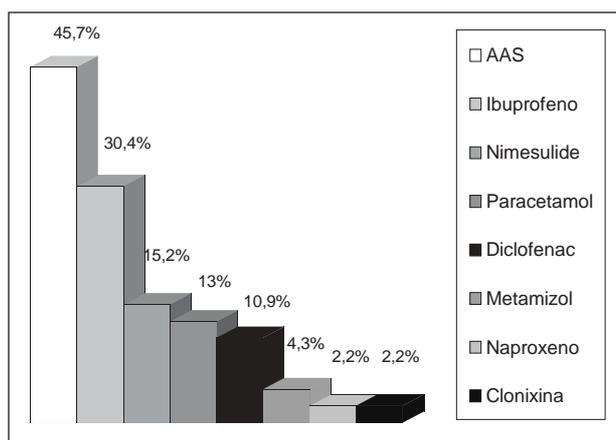


Fig. 7. AINEs implicados.

nimesulide (15,2%), paracetamol (13%), diclofenac (10,9%), metamizol (4,3%), naproxeno (2,2%) e clonixina (2,2%) (Fig. 7).

DISCUSSÃO

Vários estudos existentes na literatura apontam para uma associação entre a asma a a hipersensibilidade aos AINEs^{1, 2, 3, 4, 6, 7}. Por outro lado, alguns autores têm encontrado uma elevada prevalência de sensibilização a aeroalergénios em doentes com hipersensibilidade aos AINEs³.

Na nossa amostra de doentes com hipersensibilidade aos AINEs (grupo A), apesar de a maioria dos doentes

terem antecedentes pessoais de asma (56%), as manifestações clínicas predominantes foram cutâneas (urticária e angioedema). Os doentes com manifestações exclusivamente respiratórias – dificuldade respiratória baixa – (n=3) eram todos asmáticos. Os AINEs mais frequentemente implicados foram o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno, reflectindo a sua ampla utilização.

Tendo em conta os resultados obtidos na nossa população, as prevalências de sensibilização a aeroalergénios e asma parecem estar aumentadas nos doentes com hipersensibilidade aos AINEs, independentemente do tipo de manifestações clínicas, quando comparado com um grupo-controlo (grupo B). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por vários autores. Assim, a asma parece ser um factor de risco para a hipersensibilidade a AINEs. Por outro lado, no nosso estudo, a sensibilização a aeroalergénios não foi factor de risco para a ocorrência do choque anafiláctico.

De referir ainda que em vários doentes se verificou uma subvalorização da intolerância aos AINEs (14,9% dos doentes do grupo A foram referenciados por "alergia à penicilina").

Existe uma necessidade de desenvolver métodos de diagnóstico que facilitem o estudo destes doentes, nomeadamente testes de provocação *in vitro*, tais como o *Cellular Antigen Stimulation Test* (CAST) e o *Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test* (FAST).

Saliente-se que na idade pediátrica as alternativas terapêuticas disponíveis também são limitadas.

Contacto:

Carlos Neto Braga
Serviço de Imunoalergologia
Hospital de Dona Estefânia
Rua Jacinta Marto
1169-045 Lisboa
E-mail: hde.imunoalergo@mail.telepac.pt

BIBLIOGRAFIA

1. Morais de Almeida M, Gaspar A, Carvalho F, Abreu Nogueira J, Rosado Pinto J. Hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não-esteróides - novas e velhas estratégias. *Rev Port Imunoalergol* 1998;5 (4): 335-43.
2. Morais de Almeida MA, Gaspar AP, Carvalho FS, Abreu Nogueira JM, Rosado Pinto JE. Adverse Reactions to Acetaminophen, ASA and NSAIDs in children: what alternatives? *Allergy Asthma Proc* 1997;18:313-8.
3. Sánchez-Borges M, Capriles-Hulett A. Atopy is a risk factor for anti-inflammatory drug sensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:101-6.
4. Stevenson DD. Approach to the patient with a history of adverse reactions to aspirin or NSAIDs: diagnosis and treatment. *Allergy Asthma Proc* 2000; 21:25-31.
5. Jenkins C. Recommending analgesics for people with asthma. *Am J Ther* 2000;7:55-61.
6. Stevenson DD. Adverse reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 1998; 18:773-96.
7. Schapowal AG, Simon H-U, Schimitz-Schuman M. Phenomenology, pathogenesis, diagnosis and treatment of aspirin-sensitive rhinosinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Belg*1995;49:235-50.
8. Suresh BK, Sundeep SS. Aspirin and asthma. *Chest* 2000;118:1470-6.
9. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104: 5-13.
10. Sarah L, Glyn V. The use of analgesics in patients with asthma. *Drug Saf* 2001;24:829-41.

Hipersensibilidade à Vitamina B12 – A possibilidade de dessensibilização

Vitamin B12 hypersensitivity – The possibility of desensitization

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 177-185

Ana Célia Costa¹, Manuel Branco Ferreira², Amélia Spínola Santos³, Elisa Pedro⁴,
Antero Palma-Carlos⁵, Manuel Pereira Barbosa⁶

¹ Interna de Imunoalergologia, Unidade de Imunoalergologia, Hospital de Santa Maria

² Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina de Lisboa, Assistente Hospitalar, Unidade de Imunoalergologia, Hospital de Santa Maria

³ Assistente Hospitalar, Unidade de Imunoalergologia, Hospital de Santa Maria

⁴ Assistente Hospitalar Graduada, Unidade de Imunoalergologia, Hospital de Santa Maria

⁵ Professor Catedrático Jubilado da Faculdade de Medicina de Lisboa

⁶ Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina de Lisboa, Chefe de Serviço, Unidade de Imunoalergologia, Hospital de Santa Maria

RESUMO

Introdução: Na prática clínica, a vitamina B12 é frequentemente prescrita mas nem sempre necessária. Quando absolutamente indispensável, significa que, na maioria dos doentes, tem de ser administrada durante toda a vida. Embora raras, podem ocorrer reacções de hipersensibilidade à vitamina B12, mesmo após várias administrações. Em situação de hipersensibilidade a todas as alternativas comerciais eficazes, deve-se ponderar a possibilidade de dessensibilização em doentes que necessitem desta terapêutica. Os autores descrevem a marcha diagnóstica e o protocolo de dessensibilização intramuscular à vitamina B12 realizados em dois doentes. **Material e métodos:** Foram incluídos em protocolo de dessensibilização intramuscular dois doentes com deficiência de vitamina B12 e história de reacções de hipersensibilidade durante tratamento com as preparações comerciais de vitamina B12. O primeiro doente desencadeou reacção anafiláctica após administração intramuscular de hidroxicoBALAMINA e o segundo desenvolveu manifes-

tações de urticária generalizada e angioedema da face após administração de cianocobalamina intramuscular e cobamamida oral. Realizaram-se testes cutâneos em picada e intradérmicos com as várias preparações comerciais de vitamina B12 disponíveis em Portugal, que foram positivos. Em ambos os doentes, iniciou-se dessensibilização com cianocobalamina em regime de Hospital de Dia. **Resultados:** A dessensibilização decorreu sem intercorrências nos dois doentes. Actualmente, estão medicados com cianocobalamina intramuscular: o primeiro na dose de 500µg quinzenalmente e o segundo 1mg mensalmente, com boa tolerância, atingindo-se níveis séricos de vitamina B12 e parâmetros hematológicos normais. **Conclusão:** Nos doentes alérgicos às preparações comerciais de vitamina B12, deve-se escolher a forma (hidroxicobalamina ou cianocobalamina) com menor reactividade observada nos testes cutâneos, para efectuar a dessensibilização, possibilitando a manutenção de forma eficaz e com boa tolerância de um tratamento indispensável à vida.

Palavras-chave: alergia à vitamina B12, dessensibilização à vitamina B12

ABSTRACT

Background: In clinical practice, vitamin B12 is often prescribed but not always needed. If there is real need, it is frequently for lifelong therapy. Although rare, allergic reactions associated to vitamin B12 could happen, even after several administrations. When patients are sensitized to all vitamin B12 commercial formulations, the possibility of desensitization should be considered. The authors describe the diagnostic procedures and the desensitization protocol performed in two patients. **Material and Methods:** Two patients with vitamin B12 deficit and history of allergic reactions occurring during treatment with different commercial preparations of vitamin B12, were included. The first patient developed anaphylactic reaction after intramuscular administration of hydroxycobalamin and the second patient had a generalized urticaria and angioedema after intramuscular cyanocobalamin and oral cobamamid administration. Skin prick tests and intradermal tests were performed with vitamin B12 commercial preparations available in Portugal. Both patients were submitted to an intramuscular desensitization protocol with cyanocobalamin in our hospital setting. **Results:** The desensitization protocol occurred without adverse reactions. At present, both patients are treated with intramuscular cyanocobalamin: 500µg every 2 weeks in the first patient and 1mg every month in the second, with good tolerance, normal hematologic counts and normal serum vitamin B12 levels. **Conclusions:** In patients sensitized to all vitamin B12 commercial formulations available, the less reactive form of vitamin B12 (hydroxycobalamin or cyanocobalamin) in skin tests, should be selected to a desensitization protocol, allowing maintenance of an indispensable treatment with good efficacy and tolerance.

Key-words: vitamin B12 allergy, vitamin B12 desensitization

INTRODUÇÃO

A vitamina B12 ou cobalamina resulta da união assimétrica de quatro grupos pirrólicos em torno de um átomo de cobalto. A cobalamina pode ser convertida em duas formas metabolicamente activas: a metilcobalamina e a adenosilcobalamina^{1,2}.

A cobalamina constitui um cofactor essencial para duas enzimas, a metionina sintetase e a L-metilmalonil-CoA mutase, intervindo em dois processos metabólicos fundamentais.

A metionina sintetase requer a metilcobalamina como cofactor para a transferência do grupo metil do metil-tetra-hidrofolato para a homocisteína, formando metionina e tetra-hidrofolato, reacção necessária à síntese do heme. Por outro lado, a ausência de conversão da homocisteína em metionina pode ser, em parte, responsável pelas alterações neurológicas, já que a metionina sintetizada nesta reacção é necessária para a produção de colina e fosfolípidos contendo colina, cuja deficiência desencadeia lesão do sistema nervoso^{1,2}.

A L-metilmalonil-CoA mutase requer a adenosilcobalamina para converter metilmalonil-CoA a succinil-CoA, numa reacção de isomerização. A ausência deste cofactor promove elevação dos níveis teciduais de metilmalonil CoA e seu precursor, propionil CoA. Como consequência, ácidos gordos não fisiológicos contendo um número ímpar de átomos de carbono são sintetizados e incorporados nos lípidos neuronais, efeitos que podem originar uma mielina instável e consequente desmielinização^{1,2}.

A vitamina B12 ingerida nos alimentos requer, para a sua absorção, uma glicoproteína secretada pela célula parietal da mucosa gástrica, denominada factor intrínseco. Esta glicoproteína combina-se com a vitamina B12, formando um complexo que é captado por receptores específicos nas células mucosas do íleo terminal. Uma vez no citoplasma das referidas células, o factor intrínseco é destruído e a vitamina B12 transferida para outra proteína de transporte, a transcobalamina II (TC II). O complexo vitamina B12-TC II é secretado para a cor-

rente sanguínea, a partir da qual é rapidamente captado pelo fígado, medula óssea e outras células. Normalmente, cerca de 2 mg de vitamina B12 estão depositados no fígado e outros 2 mg armazenados no organismo em geral. De acordo com as necessidades mínimas diárias, seriam necessários 3 a 6 anos para um indivíduo se tornar deficiente em vitamina B12 se a sua absorção fosse interrompida abruptamente^{1,2}.

Dependendo da gravidade, a deficiência de vitamina B12 desencadeia, para além dos sintomas característicos de anemia, manifestações gastrointestinais e neurológicas que podem ser graves. As primeiras resultam do efeito da deficiência da cobalamina na rápida proliferação do epitélio gastrointestinal e da megaloblastose no epitélio do intestino delgado, que provoca síndrome de malabsorção. As alterações neurológicas são as mais preocupantes, iniciando-se com desmielinização, seguindo-se a degeneração axonal e eventual morte neuronal, tornando-se irreversíveis mesmo após tratamento adequado. Situações clínicas que condicionem diminuição marcada ou ausência de produção do factor intrínseco desencadeiam défice de vitamina B12, sendo indispensável a sua reposição durante toda a vida, habitualmente por via parentérica devido à deficiente absorção acompanhante^{1,2}.

Embora raramente, têm sido descritas reacções alérgicas imediatas (cutâneas, respiratórias e/ou anafilácticas) após a administração parentérica de vitamina B12^{3-11, 15-17}, mesmo depois de vários anos de terapêutica^{4,7,17}. Em Portugal, a vitamina B12 é sintetizada para uso terapêutico sob três formas, cianocobalamina (CC), hidroxicobalamina (HC) e cobamamida (C), para administração intramuscular, sendo a cobamamida e a cianocobalamina utilizáveis também por via oral. Na literatura, existem referências de doentes com reacções a uma forma de cobalamina que são capazes de tolerar outra formulação alternativa^{16,17}. No entanto, poderá ocorrer sensibilização a todas as preparações comerciais parentéricas de vitamina B12. Nestes casos, a via oral pode ser uma alternativa, embora esteja também associada à ocorrência de reacções ou possa ser ineficaz para compensar a defi-

ciência de vitamina B12. Deste modo, a possibilidade de indução de tolerância constitui uma alternativa viável para estes doentes. O primeiro e único protocolo com sucesso, descrito na literatura em 1997, foi efectuado na Unidade de Imunoalergologia do Hospital de Santa Maria por alguns dos autores do presente trabalho¹¹. Posteriormente, em 1998¹⁵, há referência a uma tentativa de dessensibilização com HC em doente com reacção imediata de urticária e angioedema (incluindo envolvimento laríngeo), apresentando testes cutâneos em picada e intradérmicos negativos. Nesse protocolo administraram-se doses crescentes de HC, a intervalos de 15 minutos, a partir da concentração de 0.05 µg. Cerca de 10 minutos após a dose de 125 µg, o doente desenvolveu uma reacção semelhante à anterior. A medicação prévia com anti-histamínicos não preveniu o aparecimento das manifestações clínicas descritas.

A referenciação à nossa Unidade de um segundo doente com história de hipersensibilidade à vitamina B12, por via intramuscular e oral, confirmada nos testes cutâneos para todas as preparações comerciais disponíveis, levou-nos à realização de um segundo esquema de dessensibilização.

Assim, no presente trabalho, os autores descrevem a marcha diagnóstica e o protocolo de dessensibilização intramuscular à vitamina B12 realizados nos dois doentes, adaptado às particularidades clínicas de cada um (gravidade da reacção e intensidade de reactividade cutânea).

MATERIAL E MÉTODOS

Caso 1

O primeiro caso clínico refere-se a um doente com 54 anos, com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia perniciosa, medicado com hidroxocobalamina 5000 µg intramuscular trimestral. Cerca de 20 minutos após a sexta injeção iniciou urticária e angioedema generalizados, vômitos, taquicardia e hipotensão, negando toma de outros fármacos na semana precedente. A anafilaxia

resolveu após medicação com epinefrina subcutânea, hidroxizina intramuscular e prednisolona endovenosa no serviço de urgência.

Caso 2

O segundo caso clínico refere-se a um doente de 60 anos, com antecedentes de gastrectomia total Bilroth I por carcinoma gástrico e consequente impossibilidade de absorção de vitamina B12. Medicado com cianocobalamina 1mg intramuscular mensalmente durante 18 meses. Sem outras terapêuticas associadas durante o tratamento. Cerca de 15 minutos após a décima-oitava administração, iniciou urticária generalizada e angioedema da face, que cedeu à terapêutica com hidroxizina intramuscular e prednisolona endovenosa no serviço de urgência. Suspendeu a terapêutica durante 6 anos. Por agravamento progressivo da anemia, reiniciou terapêutica com vitamina B12 por via oral (cobamamida 1mg) que suspendeu após um mês de tratamento por desenvolvimento de idêntica sintomatologia cutânea.

Nos antecedentes pessoais e familiares de ambos os doentes não havia história de atopia ou reacções alérgicas.

Para confirmar a hipersensibilidade à vitamina B12, os doentes foram submetidos a testes cutâneos em picada e intradérmicos com preparações comerciais injectáveis de HC, CC e C, com diluições em água destilada, inicialmente de 1:10 000 e com uma progressão logarítmica. Adicionalmente, efectuaram-se os controlos positivo (hidrocloridrato de histamina 10 mg/ml) e negativo (solução salina) em picada. No primeiro doente, os testes cutâneos em picada revelaram pápula com diâmetro médio de 8 mm com a histamina e de 4 mm com a HC, tendo sido negativos com CC. Os testes intradérmicos foram positivos com HC (9 mm) e CC (5 mm) na concentração de 1:10, documentando-se negatividade com o controlo negativo. No segundo caso, os testes cutâneos em picada com HC, CC e C foram negativos e os intradérmicos positivos a partir da concentração de 1/100 (HC com 9 mm, CC com 7 mm e C com 8 mm) para as três

Quadro 1. Resultados dos testes cutâneos com as várias preparações de vitamina B12

		Caso 1		Caso 2	
		Testes cutâneos (diâmetro médio da pápula / mm)			
		Em picada*	Intradérmicos	Em picada**	Intradérmicos
Hidroxibalamina (5000 µg/ml)	1/10000	-	-	-	-
	1/1000	-	-	-	-
	1/100	-	-	-	9
	1/10	-	9	-	10
	1/1	4	10	-	11
Cianocobalamina (1 µg/ml)	1/10000	-	-	-	-
	1/1000	-	-	-	-
	1/100	-	-	-	7
	1/10	-	5	-	8
	1/1	-	6	-	9
Cobamamida (5000 µg/ml)	1/10000	NR	NR	-	-
	1/1000	NR	NR	-	-
	1/100	NR	NR	-	8
	1/10	NR	NR	-	9
	1/1	NR	NR	-	10

Histamina = 8* e 7** mm
NR - não realizado

preparações de vitamina B12 (Quadro 1).

Adicionalmente, realizaram-se testes cutâneos em picada com uma bateria alargada de aeroalergénios e alergénios alimentares, assim como com os solventes da vitamina B12 que foram negativos em ambos os doentes. Dado o facto da preparação de CC incluir óleo de sésamo, realizou-se teste cutâneo em picada com semente de sésamo que foi negativo.

Os testes cutâneos em picada e intradérmicos com as mesmas preparações e nas mesmas diluições foram efectuados em cinco voluntários saudáveis com resultados negativos.

RESULTADOS

Dessensibilização

Após discussão dos casos clínicos com os respectivos hematologistas e com o consentimento informado escrito

dos doentes, decidiu-se realizar um protocolo de dessensibilização adaptado a cada doente e eventualmente ajustado de acordo com os valores hematológicos, até alcançar a dose terapêutica de vitamina B12. A dessensibilização foi efectuada em Hospital de Dia, sob supervisão médica, com acesso venoso mantido até 6 horas após a última administração de cada dia. Utilizou-se uma preparação comercial de cianocobalamina (1000 µg/ml) intramuscular que foi diluída a 1:100 no primeiro caso e a 1:500 no segundo caso, dada a maior reactividade observada nos testes cutâneos deste doente.

Nos Quadros 2 e 3 estão indicadas as doses efectuadas em cada um dos doentes do protocolo (três dias no doente 1 e cinco dias no doente 2). Não foram observadas quaisquer reacções adversas em nenhum dos doentes.

Quadro 2. Protocolo de dessensibilização à cianocobalamina utilizado no Caso 1
(10 injeções i.m. a intervalos de 30 minutos / 3 dias)

Dia	Diluições / concentrações	Quantidade administrada (ml)	Dose cumulativa / dia
1º	1ª Diluição 1:100 (10µg/ml)	0.10ml → 0.20ml → 0.50ml	8µg
2º	2ª Diluição 1:10 (100µg/ml)	0.10ml → 0.20ml → 0.40ml → 0.80ml	150µg
3º	3ª Diluição 1:1 (1000µg/ml)	0.15ml → 0.25ml → 0.50ml	900µg

Quadro 3. Protocolo de dessensibilização à cianocobalamina utilizado no Caso 2
(11 injeções i.m. a intervalos de 30 minutos / 5 dias)

Dia	Diluições / Concentrações	Quantidade administrada (ml)	Dose cumulativa / dia
1º	1ª Diluição 1:500 (2µg/ml)	0.5ml → 1.0ml → 2.0ml	7 µg
2º	2ª Diluição 1:50 (20µg/ml)	0.5ml → 1.0ml	30 µg
3º	3ª Diluição 1:10 (100µg/ml)	0.4ml → 1.0ml	140 µg
4º	4ª Diluição 1:5 (200µg/ml)	1.0ml → 1.5ml	500 µg
5º	5ª Diluição 1:1 (1000µg/ml)	0.5ml → 0.5ml	1000 µg

Seguimento

Os dois doentes estão medicados com cianocobalamina intramuscular, no primeiro caso na dose de 500 µg 15/15 dias desde há cerca de 8 anos e no segundo caso com 1mg mensal desde há 4 anos, atingindo-se níveis séricos de vitamina B12 e parâmetros hematológicos normais, sem quaisquer intercorrências, nomeadamente reacções alérgicas.

DISCUSSÃO

O organismo humano não sintetiza cobalamina, sendo necessário uma ingestão mínima de 2.5 µg na dieta, exclusivamente através de produtos animais.

Em doentes com anemia perniciosa ou com ressecção gástrica extensa, a absorção de vitamina B12 é inadequada e a sua imprescindível suplementação deve ser efectuada por via parentérica. As preparações comerciais disponíveis no nosso País são a cianocobalami-

na, a hidroxicobalamina e a cobamamida, administradas por via intramuscular.

As reacções alérgicas à vitamina B12 são raras mas podem ser graves³ e ocorrerem mesmo após vários anos de terapêutica^{4,7,17}. Nos doentes apresentados, a história clínica e a positividade dos testes cutâneos na leitura imediata sugerem um mecanismo mediado pela IgE. Alguns autores demonstraram, também, positividade dos testes de libertação de histamina pelos basófilos *in vitro*⁵. A maioria das manifestações clínicas descritas são do tipo imediato, nomeadamente cutâneas (prurido, urticária e angioedema), respiratórias (dispneia e broncospasmo), choque anafiláctico e morte^{3-11, 15-17}. Raramente, podem ocorrer reacções de hipersensibilidade tardia traduzidas por dermatite de contacto devido ao anel de cobalto contido nesta vitamina, mas a dermatite pode aparecer sem sensibilidade ao cobalto demonstrável, ou seja, com testes epicutâneos (*patch tests*) negativos para o cobalto. A dermatite pode também ser desencadeada num contexto ocupacional ou durante te-

rapêutica prolongada com este fármaco¹²⁻¹⁴.

As reacções de hipersensibilidade podem ser provocadas por cianocobalamina^{9,17}, hidroxicoalamina^{5,6,8,9,11,15-17} ou ambas^{7,10}. Na literatura, existem descrições de doentes com anemia perniciosa e boa tolerância à cianocobalamina que sofreram reacção anafiláctica quando tratados com hidroxicoalamina^{5,15,16}. Em dois desses casos, os testes cutâneos eram positivos para a hidroxicoalamina e negativos para a cianocobalamina, pelo que se optou por terapêutica com cianocobalamina intramuscular em doses crescentes (0.1 mg; 0.5 mg; 1 mg) até à dose terapêutica (1 mg) de manutenção mensal^{5,15}. Nos doentes apresentados no nosso trabalho, obtiveram-se resultados positivos nos testes cutâneos intradérmicos para as duas preparações intramusculares (1:10 no caso 1 e 1:100 no caso 2), embora com uma reactividade cutânea inferior para a cianocobalamina nos dois doentes. Alguns autores referem que a via oral pode ser uma alternativa para estes doentes^{4, 10}, mas reacções alérgicas também podem ocorrer⁷, como verificámos no segundo doente. Por outro lado, a eficácia terapêutica é significativamente menor devido à deficiente absorção nestas situações clínicas e existe, paralelamente, uma menor adesão do doente à terapêutica oral para toda a vida.

Alguns autores conseguiram tratar doentes com reacções imediatas associadas à terapêutica com vitamina B12, mediante medicação com corticóides (dexametasona) ou anti-histamínicos (terfenadina) antes de cada administração de vitamina B12¹⁷. Mas esta profilaxia, por vezes, não é eficaz, como descreve Vidal, em que a medicação prévia com anti-histamínicos não preveniu a ocorrência de urticária e angioedema, com envolvimento laringeo, após administração de HC em doente alérgico⁵. Por outro lado, essas descrições referem-se a doentes com clínica compatível com reacção alérgica (urticária/angioedema e choque anafiláctico) imediatamente após terapêutica com vitamina B12, mas com testes cutâneos em picada e intradérmicos e testes de libertação de histamina para HC e CC negativos. Estes resultados, provavelmente, reflectem o facto de a anafi-

laxia poder ser consequência de impurezas retidas durante a biossíntese das preparações de vitamina B12 ou de substâncias adicionadas às soluções, como solventes ou conservantes^{3,17-19}. Nas preparações intramusculares disponíveis em Portugal, o solvente utilizado é álcool benzil, devendo ser excluída a presença de sensibilização através dos testes cutâneos. Os dois doentes descritos não apresentavam reactividade cutânea com o solvente.

Nestes dois casos apresentados procedemos à realização de um protocolo de dessensibilização com a cianocobalamina, por parecer a forma menos alergizante em ambos os doentes, traduzida por uma menor reactividade cutânea¹¹. No caso 2 optou-se por um protocolo mais lento, em 5 dias, iniciado por uma dose com menor concentração, em virtude de o doente apresentar positividade nos testes cutâneos para uma diluição maior, o que fazia supor uma maior reactividade ao fármaco. Por outro lado, a periodicidade e a dose de manutenção para cada doente foram adaptadas individualmente em conformidade com o hematologista; no primeiro doente uma dose quinzenal de 500 µg e no segundo 1mg mensal, de modo a manterem níveis séricos normais e constantes de vitamina B12. Deste modo, foi administrado no último dia a dose total de manutenção, embora no primeiro doente se obtivesse uma dose cumulativa no último dia (900 µg) superior à pretendida (500 µg), de modo a permitir uma maior segurança nas administrações futuras, dada a maior gravidade da reacção alérgica. O protocolo de dessensibilização decorreu sem intercorrências, terminando com sucesso e permitindo a instauração de uma terapêutica indispensável para a vida destes doentes.

No entanto, há a referir o facto de as preparações parentéricas terem alguns inconvenientes, nomeadamente a dor associada à sua aplicação e a necessidade de pessoal médico ou de enfermagem para a sua administração. Por outro lado, a via parentérica por si só constitui um risco acrescido para a ocorrência de reacções, inclusive anafilaxia, durante a dessensibilização¹⁵. Deste

modo, vários autores têm vindo a utilizar a vitamina B12, de forma experimental, por via nasal, com bons resultados. Slot *et al* estudaram seis doentes com ressecções do estômago e íleo terminal, apresentando níveis de vitamina B12 inferiores a 200 ng/l. Uma dose de 1500 µg de hidroxicoBALAMINA foi aplicada intranasalmente nos dias 0, 14 e 21. Todos os doentes apresentaram um aumento da concentração de vitamina B12 cerca de 1 hora após a aplicação nasal, atingindo um aumento de oito vezes em relação aos níveis basais, que se manteve durante 1 semana após a administração, sem efeitos adversos²⁰.

Recentemente, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou uma preparação de vitamina B12 (cianocobalamina) para aplicação intranasal (Nascobal®) semanalmente. Está comercializada nos EUA²¹ mas ainda não disponível no nosso País.

Por outro lado, a forma intranasal de vitamina B12 não tem o solvente álcool benzil na sua constituição. Dado não existirem preparações parentéricas sem este conservante, esta nova preparação permite o tratamento de doentes com deficiência de vitamina B12 que estão sensibilizados ao álcool benzil²². Assim, a via intranasal parece ser uma boa alternativa, minimizando a possibilidade de reacções alérgicas, embora não esteja disponível na maioria dos países, incluindo Portugal.

CONCLUSÃO

Embora o risco seja diminuto, a administração parentérica de vitamina B12 pode originar reacções alérgicas graves, e esta possibilidade deve ser conhecida de todos os médicos.

Perante uma suspeita de alergia à vitamina B12, deverão ser efectuados testes cutâneos para as três preparações comerciais disponíveis. Em situação em que a administração intramuscular é a única via eficaz disponível, deve-se ponderar a realização de um protocolo de dessensibilização, efectuado sempre em meio hospitalar sob vigilância clínica apertada pelo imunoalergologista.

Para a dessensibilização, deve-se escolher a forma de vitamina B12 menos alergizante, baseada nos testes cutâneos, e efectuar um protocolo adaptado às necessidades de cada doente.

Nos dois casos descritos, o protocolo de dessensibilização decorreu com segurança e eficácia, permitindo a instituição de uma terapêutica indispensável à vida do doente.

Embora nos EUA se tenha iniciado, recentemente, a comercialização de vitamina B12 por via nasal, na maioria dos países não existe esta alternativa, pelo que a possibilidade de dessensibilização por via intramuscular em doentes com sensibilização a todas as preparações comerciais oferece uma alternativa para estes doentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Babior BM, Bunn HF. Megaloblastic anemias. In: Kurt J. Isselbacher, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. vol 2. McGraw-Hill; 2004: 1726-31.
2. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate and homocysteine. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2003: 62-81.
3. Bedfordt PD. Side-effects of preparation of vitamin B12. *Br Med J* 1962; 1: 690.
4. Ugwu CN, Gibbins FJ. Anaphylactic reaction to vitamin B12 appearing after several years of treatment. *Age Ageing* 1981; 10: 196-97.
5. De Blay F, Sager MF, Hirth C, Alt M, Chamouard P, Baumann R, Pauli G. IgE - mediated reaction to hydroxycobalamin injection in patient with pernicious anaemia. *Lancet* 1992; 339: 1535-36.
6. Hodving G. Anaphylactic reaction after injection of vitamin B12. *Br Med J* 1968; 3: 102.
7. James J, Warin RP. Sensitivity to cyanocobalamin and hydroxycobalamin. *Br Med J* 1971; 2: 262.
8. Auzepy P, Veissieres JF, Deparis M. Letter: Anaphylactic shock caused due to hydroxycobalamin. *Nouv Presse Med* 1974; 3: 152.
9. Dally S, Gaultier M. Anaphylactic shock caused by hydroxycobalamin. *Nouv Presse Med* 1976; 5: 1917.
10. Woodliff HJ. Allergic reaction to cyanocobalamin injection. *Med J Aug* 1986; 144: 223.
11. Branco-Ferreira M, Clode MH, Pereira-Barbosa MA, Palma-Carlos AG. Anaphylactic reaction to hydroxycobalamin. *Allergy* 1997; 52: 118-19.
12. Fisher AA. Cobalt dermatitis. In: *Contact dermatitis*. 2nd ed.

- Philadelphia: Lea & Febiger, 1973: 112-15.
13. Price ML, MacDonald DM. Cheilitis and cobalt allergy related to ingestion of vitamin B12. *Contact Dermatitis* 1981; 7: 352.
 14. Rodriges A, Echechia S, Alvarez M, Muro M. Occupational contact dermatitis from vitamin B12. *Contact Dermatitis* 1994; 31: 271.
 15. Vidal C, Lorenzo A. Anaphylactoid reaction to hydroxycobalamin with tolerance of cyanocobalamin. *Postgrad Med J* 1998; 74: 702.
 16. Heyworth-Smith D, Hogan PG. Allergy to hidroxicobalamin, with tolerance of cianocobalamin. *Med J Aust* 2002; 177: 162-63.
 17. Tordjman R, Genereau T, Guinépain MT, Weyer A, Lortholary O, Royer I, Casassus P, Guillevin L. Reintroduction of vitamin B12 in 2 patients with prior B12-induced anaphylaxis. *Eur J Haematol* 1998; 60: 269-70.
 18. Wilson JP, Solimando DA Jr, Edwards MS. Parenteral benzyl alcohol-induced hypersensitivity reaction. *Drug Intell Clin Pharm* 1986; 20: 689-91.
 19. Grant JA, Bilodeau PA, Guernsey BG, Gardner FH. Unsuspected benzyl alcohol hypersensitivity. *N Engl J Med* 1982; 306: 108.
 20. Slot WB, Merkus FW, Van Deventer SJ, Tytgat GN. Normalization of plasma vitamin B12 concentration by intranasal hydroxycobalamin in vitamin B12-deficient patients. *Gastroenterology* 1997; 113: 430-33.
 21. Vasquez E. New vitamin B12 gel, instead of injection. *Posit Aware* 1998; 9: 17.
 22. Turvey SE, Cronin B, Arnold AD, Twarog FJ, Dioun AF. Adverse reactions to vitamin B12 injections due to benzyl alcohol sensitivity: successful treatment with intranasal cyanocobalamin. *Allergy* 2004; 59: 1023-24.

Alergia a perceves no contexto da síndrome ácaros-crustáceos-moluscos-baratas

Barnacle allergy in the context of the mites-crustaceans-molluscs-cockroaches syndrome

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 187-193

Susana Marinho¹, Ângela Gaspar¹, Mário Morais Almeida¹, Idoia Postigo², Jorge Guisantes², Jorge Martínez^{2,3}, José Rosado Pinto¹

¹ Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia, Lisboa, Portugal

² Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do País Basco, Vitoria, Espanha

³ Sweden Diagnostics Espanha SL, Laboratorio de Aplicaciones, Barcelona, Espanha

RESUMO

Introdução: A tropomiosina dos invertebrados é o pan-alergénio que une crustáceos, moluscos, aracnídeos, insectos e parasitas, encontrando-se significativa homologia de sequência entre as proteínas dos vários grupos. Os perceves são um tipo de crustáceo particularmente apreciado e consumido no nosso país; no entanto, a alergia a este crustáceo é uma situação bastante rara da qual só existe um trabalho publicado na literatura. **Caso clínico:** Apresentamos o caso de uma criança do sexo masculino, de 9 anos de idade, com asma brônquica, rinoconjuntivite alérgica e eczema atópico, sensibilizada a ácaros e baratas. Aos 7 anos, 10 minutos após a primeira ingestão de perceves, refere síndrome de alergia oral, angioedema periorbitário e rinoconjuntivite. Aos 8 anos, ocorreram 4 episódios semelhantes após ingestão de caracol, camarão, lula e choco (referindo ingestão prévia destes alimentos sem queixas). Aos 9 anos, refere episódio de urticária da face e angioedema periorbitário com inalação de vapores de cozedura de

camarão. Foram realizados testes cutâneos por *prick* que se revelaram positivos para perceves, camarão, caracol, lula, choco, polvo e amêijoia em natureza, e para gamba, caranguejo e mexilhão com extractos comerciais. Os doseamentos de IgE específica sérica revelaram-se positivos para camarão, caracol, lula, polvo e amêijoia, bem como para perceves e tropomiosina recombinante. Foi efectuado *SDS-PAGE immunoblotting* com extracto de perceves que revelou várias fracções alergénicas com grande variação de pesos moleculares (19-88 kDa); foi ainda efectuado estudo de inibição com *D. pteronyssinus*, que inibiu várias fracções fixadoras de IgE no extracto de perceves. **Discussão:** Apresenta-se um caso raro de uma criança, com quadro de alergia respiratória associada a sensibilização a ácaros e baratas, com alergia alimentar a crustáceos – incluindo a perceves – e moluscos gastrópodes, bivalves e cefalópodes. Foram caracterizados os alergénios implicados na alergia a perceves e demonstrada a presença da tropomiosina como alergénio implicado, bem como a reactividade cruzada entre estes crustáceos e os ácaros.

Palavras-chave: alergia alimentar, reactividade cruzada, crustáceos, perceves, moluscos, ácaros.

ABSTRACT

Background: *Invertebrate tropomyosin is the pan-allergen uniting crustaceans, molluscs, arachnids, insects and parasites, and there is a significant sequence homology among the proteins of each of these groups of invertebrates. Barnacles are seafood particularly appreciated and consumed in Portugal, but barnacle allergy is a rare condition of which there is only one reference in the indexed literature.* **Clinical Case:** *We present the case of a 9-year-old male, with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema, sensitised to mites and cockroaches. At 7 years of age, he has an episode of oral allergy syndrome, periorbital angioedema and rhinoconjunctivitis, 10 minutes after his first ingestion of barnacles; he had 4 similar subsequent episodes after the ingestion of snail, shrimp, squid and cuttlefish when he was 8 years old (prior ingestion without any symptoms), and at age 9 years he had an episode of facial urticaria and periorbital angioedema related to the inhalation of shrimp cooking vapours. The skin prick tests performed were positive to barnacle, shrimp, snail, squid, cuttlefish, octopus, and clam (prick to prick skin test) and prawn, crab and mussel (commercial extracts). Specific serum IgE quantification was positive to shrimp, snail, squid, octopus and clam, as well as to barnacle and recombinant tropomyosin. SDS-PAGE immunoblotting to barnacle revealed several allergenic fractions with a wide variation in molecular masses (19-88 kDa); the inhibition-immunoblotting assay with *D. pteronyssinus* inhibited several IgE-binding fractions in the barnacle extract.* **Discussion:** *We present an unusual case of a child with respiratory allergy associated to the sensitisation to mites and cockroaches, with food allergy to crustaceans - including barnacles - and molluscs (gastropods, bivalves and cephalopods). The allergens implicated in the allergy to barnacles were characterized and we also demonstrated the presence of tropomyosin as an important implicated allergen, as well as the cross-reactivity between these crustaceans and mites.*

Key-words: *food allergy, cross-reactivity, crustaceans, barnacles, molluscs, mites.*

INTRODUÇÃO

Os crustáceos são reconhecidos como uma causa comum de alergia alimentar, particularmente em idade adulta, sendo esta uma situação de frequência crescente e um importante problema de saúde (também relacionado com a popularidade e consumo crescentes deste tipo de mariscos).^{1,2} Os perceves são um tipo de crustáceo particularmente apreciado e consumido no nosso país, bem como em Espanha, França e na América do Sul; no entanto, a alergia a este crustáceo é uma situação bastante rara, da qual só existe uma referência publicada na literatura indexada.³ Os alergénios moleculares implicados e possíveis fenómenos de reactividade cruzada, nomeadamente com ácaros, não foram ainda identificados.

A tropomiosina dos invertebrados é o pan-alergénio que une crustáceos, moluscos, aracnídeos, insectos e parasitas, encontrando-se significativa homologia de sequência entre as proteínas dos vários grupos.⁴⁻⁹ A existência de fenómenos de reactividade cruzada entre ácaros e crustáceos tem sido documentada por diversos autores, bem como entre ácaros e moluscos gastrópodes, particularmente caracol, com claras implicações clínicas.¹⁰ No que diz respeito às interacções entre ácaros e moluscos bivalves, e particularmente entre ácaros e moluscos cefalópodes, embora haja alguns casos descritos, não estão tão bem definidas.

O crescente consumo de marisco e o subsequente risco aumentado de alergia tornam importante a elucidação das bases moleculares da alergia ao marisco através da identificação dos alergénios implicados ao nível molecular.

Os autores apresentam um caso raro de alergia alimentar IgE-mediada a crustáceos (incluindo perceves) e a moluscos (incluindo as três classes: gastrópodes, bivalves e cefalópodes) numa criança sensibilizada a ácaros e baratas.

CASO CLÍNICO

Criança do sexo masculino, com 9 anos de idade e de raça caucasiana, com antecedentes familiares alérgicos (mãe com asma e alergia ao látex; irmão com asma e alergia à penicilina), com história de asma brônquica, rinoconjuntivite alérgica e eczema atópico, sensibilizada a ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*) e baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*).

Aos 7 anos de idade, 10 minutos após a primeira ingestão de perceves, refere quadro de prurido orofaríngeo, angioedema periorbitário e rinoconjuntivite. Posteriormente, ocorreram 4 episódios de características semelhantes após ingestão de caracol, camarão, lula e choco, aos 8 anos de idade, referindo ingestão prévia destes alimentos sem queixas. Aos 9 anos de idade refere episódio de urticária da face e angioedema periorbitário na sequência da inalação de vapores de cozedura de camarão. Nega queixas relacionadas com a ingestão de outros crustáceos ou bivalves; nunca ingeriu polvo.

Encontra-se em evicção de crustáceos e moluscos (gastrópodes, bivalves e cefalópodes) desde os 8 anos de idade. Nunca fez imunoterapia específica para nenhum dos aeroalergénios a que se encontra sensibilizado.

Na consulta de Imunoalergologia foram efectuados testes cutâneos por *prick* que foram positivos para perceves, camarão, caracol, lula, choco, polvo e amêijoas em natureza; e para gamba, caranguejo e mexilhão com extractos comerciais (Quadro 1).

Uma vez que nunca houve referência a queixas associadas a bivalves (que ingeria previamente sem problemas), tendo-se mantido em evicção dos mesmos após os episódios associados à ingestão de outros moluscos, foi proposta prova de provocação com amêijoas, que foi recusada (também com base no facto de se tratar de um alimento não indispensável na dieta).

Foram preparados extractos de perceves cru e cozinhado para a realização dos estudos *in vitro*: determinação de IgE específica através do método UniCAP®

System, *immunoblotting* e estudo de inibição com *D. pteronyssinus*.

Os doseamentos de IgE específica sérica revelaram-se positivos para perceves (extracto de perceves cru e cozinhado) e tropomiosina recombinante (Quadro 1), bem como para ácaros do pó (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*), baratas (*B. germanica*, *P. americana*), camarão, caracol, lula, polvo e amêijoia.

Foi efectuado estudo de *immunoblotting* para perceves (fase sólida) para analisar os componentes alergénicos

implicados na sensibilização a este crustáceo (Fig. 1 e Quadro 2). Este estudo revelou várias fracções alergénicas com grande variação de pesos moleculares (19 a 88 kDa), sendo os resultados muito similares comparando o extracto de perceves cru com o cozinhado. Salienta-se uma banda de 37 kDa, identificada em ambos os extractos, que poderá corresponder à tropomiosina.

Com vista ao estudo de possível reactividade cruzada entre perceves e ácaros, foi também efectuado um estudo de *immunoblotting*-inibição com extracto de

Quadro 1. Resultados dos testes cutâneos (TC) por *prick* e dos doseamentos de IgE específica sérica

Alergénios	TC por <i>prick</i> (diâmetro médio da pápula em mm)	IgE específica sérica (kU/l)
<i>D. pteronyssinus</i>	5	>100
<i>D. farinae</i>	3,5	>100
<i>B. tropicalis</i>	6,5	nd
<i>B. germanica</i>	4	37,3
<i>P. americana</i>	3,5	11,2
Perceves cru/	9,5	0,82
Perceves cozinhado	9,5	3,65
(PP/ extracto preparado para slgE)		
Tropomiosina recombinante	nd	86,0
Camarão (PP)	7	-
(EC)	nd	85,2
Caracol (PP)	8,5	-
(EC)	nd	20,0
Amêijoia (PP)	7	-
(EC)	1,5	>100
Lula (PP)	9	-
(EC)	nd	6,41
Polvo (PP)	9	-
(EC)	nd	38,6
Choco (PP)	6	-

EC = extracto comercial; PP = teste cutâneo *prick to prick*; nd = não determinado.

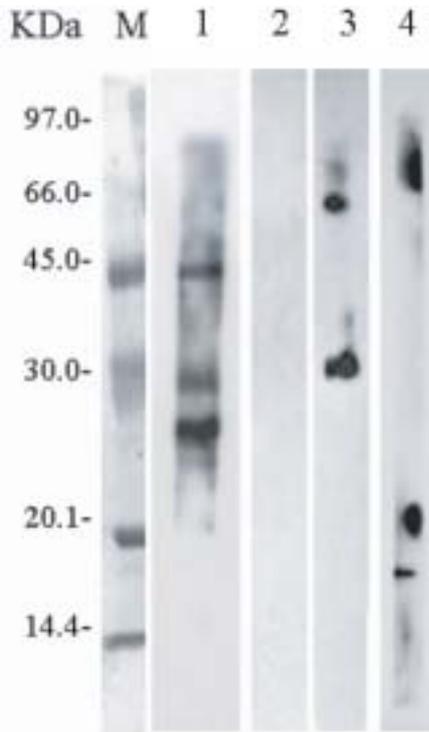


Figura 1. IgE *immunoblotting* para perceves e IgE-*immunoblotting*-inibição usando extracto de perceves cru na fase sólida e extracto de *D. pteronyssinus* como inibidor. M: Marcador de peso molecular. Linha 1: *immunoblotting* para perceves (extracto cru); Linha 2: controlo de *immunoblotting*-inibição - soro pré-incubado com extracto de perceves; Linha 3: *immunoblotting*-inibição - soro pré-incubado com extracto de *D. pteronyssinus*; Linha 4: *immunoblotting* para *D. pteronyssinus* (fase sólida).

perceves, no qual o soro do doente foi pré-incubado com extracto de *D. pteronyssinus*, procedendo-se posteriormente ao *immunoblotting* com extracto de perceves na fase sólida. Foram inibidas várias fracções fixadoras de IgE no extracto de perceves, entre 19 e 74 kDa, incluindo a banda de 37 kDa, permanecendo duas bandas, de 30 e 60 kDa, que não foram inibidas (Quadro 2 e Fig. 1).

Quadro 2. Pesos moleculares (kDa) das fracções antigénicas reconhecidas nos estudos de *immunoblotting* e *immunoblotting*-inibição

<i>Immunoblotting</i> para perceves		<i>Immunoblotting</i> -inibição (com <i>Der pteronyssinus</i>)
Perceves crus	Perceves cozinhados	Perceves crus
	87,9	
74	63,4	
59	60	60
56		
49	50,2	
44	45,3	
40,3		
36,8	37	
	34,3	
	32,5	
30	30,5	30
	27,6	
25	25,6	
23,5	24	
22	23	
19	20	

DISCUSSÃO

Embora as reacções alérgicas IgE-mediadas a crustáceos sejam frequentes, quadros associados de alergia a moluscos gastrópodes, bivalves e cefalópodes são situações pouco comuns, particularmente em idade pediátrica.

No caso particular dos perceves, apesar de muito apreciados em Portugal, bem como noutros países da Europa mediterrânea, apenas um trabalho os aponta como agentes implicados em quadros de alergia³, o que está provavel-

mente relacionado com o seu consumo limitado.

No caso clínico apresentado, foi confirmada a existência de alergia IgE-mediada a perceves, quer por testes *in vivo* – testes cutâneos positivos para perceves em natureza, quer por testes *in vitro* – presença de IgE específica para perceves identificada por UniCAP®[®] e *immunoblotting*.

É de salientar a sensibilização a ácaros observada nesta criança, tal como descrito na maioria dos casos de alergia a crustáceos reportados na literatura, o que nos levou a investigar a presença de fenómenos de reactividade cruzada entre perceves e *D. pteronyssinus*, tendo demonstrado a presença de epitopos fixadores de IgE comuns e confirmando a existência de reactividade cruzada entre estes invertebrados.

Verificámos tratar-se de um caso em que há inibição do extracto de perceves pelo extracto de *D. pteronyssinus*, salientando-se a inibição de uma banda de 37 kDa, que poderá corresponder à tropomiosina. Confirmou-se ainda a existência de IgE específica para tropomiosina recombinante (86 kU/l).

A alergia a crustáceos tem sido estudada exaustivamente e existem inúmeros trabalhos apontando a tropomiosina como o alérgeno *major* envolvido na reactividade a várias espécies desta classe. Esta molécula, com um peso molecular de 36-37 kDa, pertence a uma família de proteínas com estrutura altamente conservada e com múltiplas isoformas, encontrada em células musculares e não musculares, sendo ubiqüitária no reino animal. Devido ao seu alto grau de conservação e significativa homologia de sequência entre os invertebrados, a tropomiosina é apontada como o pan-alérgeno homólogo implicado nas reacções de reactividade cruzada IgE-mediada clinicamente importantes entre várias espécies de invertebrados, desde os crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo) a moluscos (caracol, lula, amêijoia), aracnídeos (ácaros), insectos (baratas) e mesmo nemátodos.⁴⁻⁹

Recentemente, um novo alérgeno de 39,9 kDa, do camarão *Penaeus monodon* (Pen m 2), foi identificado uti-

lizando soros de doentes com alergia a este crustáceo. Esta proteína revelou grande semelhança com a argininaquinase dos crustáceos e foi identificada como um novo alérgeno implicado na reactividade cruzada entre esta classe de invertebrados.¹¹ No doente apresentado, não se observou nenhuma banda no estudo de *immunoblotting* com extracto de perceves com peso molecular similar.

Nos estudos *in vitro* efectuados neste caso, verificou-se a presença de duas bandas proteicas de 30 e 60 kDa no estudo de *immunoblotting* com extracto de perceves, que não foram inibidas pelo extracto de *D. pteronyssinus*, e que poderão corresponder a alérgenos específicos de perceves. Uma proteína de peso molecular rondando os 60 kDa foi também identificada no estudo de Moreno Escobosa *et al.*³

Embora uma ligação entre imunoterapia específica para ácaros e o aparecimento de alergia alimentar a crustáceos e moluscos tenha sido reportada,¹² é de salientar que a criança em causa nunca foi submetida a esta terapêutica.

Analisando o caso apresentado, parece-nos plausível assumir que fenómenos de reactividade cruzada com ácaros estejam implicados no que diz respeito à alergia a perceves, dado que os sintomas ocorreram aquando da primeira ingestão e foi confirmada a inibição *in vitro* de múltiplas fracções alérgicas pelo extracto de *D. pteronyssinus*.

No que se refere à alergia a moluscos, é lícito colocar a mesma hipótese, embora possamos também estar em presença de co-sensibilização. Mais estudos, utilizando uma maior variedade de extractos de crustáceos e moluscos, serão necessários para esclarecer esta situação.

Contacto:

Susana Marinho
Serviço de Imunoalergologia
Hospital de Dona Estefânia
Rua Jacinta Marto
1169-045 Lisboa
E-mail: hde.imunoalergo@mail.telepac.pt

BIBLIOGRAFIA

1. Musmand JJ, Daul CB, Lehrer SB. Crustacea allergy. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:722-32.
2. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:159-65.
3. Moreno Escobosa MC, Alonso LE, Sanchez AA, et al. Barnacle hypersensitivity. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2002; 30:100-3.
4. Reese G, Ayuso R, Carle T, Lehrer SB. IgE-binding epitopes of shrimp tropomyosin, the major allergen Pen a 1. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118:300-1.
5. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:247-58.
6. Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129:38-48.
7. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:956-61.
8. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar Biotechnol (NY)* 2003; 5:339-48.
9. Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59:243-67.
10. van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, et al. Asthma after consumption of snails in house-dust-mite-allergic patients: a case of IgE cross-reactivity. *Allergy* 1996; 51:387-93.
11. Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003; 170:445-53.
12. van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996; 51:108-13.