

Fenotipagem Linfocitária na Vasculite Urticariana

PEREIRA AC¹, TODO-BOM A², JULIÃO MJ³, SILVA MR⁴, LOUREIRO AC², FARIA E¹, PINTO-MENDES J⁵, CHIEIRA C⁶, ROBALO CORDEIRO AJA⁷

RESUMO

Na casuística dos doentes portadores de Urticária Crónica Idiopática da nossa consulta de Imuno-Alergologia, a Vasculite Urticariana, normocomplementémica e com necrose e infiltrado da parede do vaso por mononucleares linfócitos, apresenta uma prevalência de 20,9%. Considerou-se importante a caracterização laboratorial e histológica nestes doentes, de modo a contribuir para o esclarecimento fisiopatológico desta situação.

Estudaram-se 14 doentes com Urticária Crónica Idiopática, com diagnóstico histológico de vasculite Linfocitária, tendo sido submetidos a exame analítico sanguíneo (Leucograma, imunoglobulinas séricas com IgE total, fracções do complemento e CH100, marcadores reumatismiais, ANA e estudo tiroideu), testes cutâneos de alergia por "prick" teste para alérgenos comuns e capilaroscopia peri-ungueal. A partir de fragmento cutâneo de reserva, em parafina procedeu-se a fenotipagem linfocitária pelo método de Avidina Biotina/HRP (DAKO) para CD3, CD45RO e CD20. Os resultados foram expressos em número médio e percentual por lâmina e por doente. O grupo controlo foi constituído por 5 doentes com o diagnóstico de Urticária Crónica Idiopática sem Vasculite.

Os resultados apresentam valores normais das fracções de Complemento, determinações muito

elevadas de IgE total ($229 \pm 309,4$ KU/L), em doentes não atópicos. O valor médio absoluto de linfócitos por lâmina foi significativamente superior ao grupo controlo ($43,3 \pm 25,2$ e $15,3 \pm 6,2$) respectivamente, $p=0,045$). Na Vasculite Urticariana o valor percentual médio de linfócitos CD3 ($53,3 \pm 17,0\%$) e CD45RO ($53,1 \pm 19,4\%$) foi coincidente e a presença de Linfócitos B ativado de reduzida expressão ($6,8 \pm 4,3\%$). Em relação ao grupo controlo verificou-se que a valor percentual de CD3 é significativamente menor ($25,6 \pm 2,9$; $p=0,0072$), mas que são maioritariamente Linfócitos "primed", CD45RO ($91,2 \pm 12,9$; $p=0,0038$), não tendo sido observados CD20+.

Considera-se que existem diferenças significativas entre ambos os grupos, porém, não parece possível, nesta fase, concluir pela existência de entidades nosológicas distintas ou processos evolutivos de uma mesma patologia.

PALAVRAS-CHAVE: Urticária, Vasculite urticariana, Linfócitos

SUMMARY

LYMPHOCYTIC PHENOTYPING IN URTICARIAL VASCULITES

Statistics concerning patients with Chronic Idiopathic Urticaria in our Immuno-Allergy outpatient department show that urticarial vasculitis with normal complement, necrosis and mononuclear infiltrate of the vascular wall has a prevalence of 20%. We considered the analytical and histological characterization of these patients to be a valuable contribution to the understanding of the pathophysiology of this disorder.

The study group consisted of 14 patients with Chronic Idiopathic Urticaria, diagnosed histologically as lymphocytic vasculitis. They were submitted to blood tests (white blood count, serum immunoglobulins, serum complement, CH100, Rheumatoid markers, ANA and thyroid studies), skin prick tests and peri-ungueal capillaroscopy.

Unidade de Imuno-Alergologia
Serviço de Pneumologia
Hospitais da Universidade de Coimbra

- 1 - Interno do Internato Complementar de Imuno-Alergologia. HUC
- 2 - Assistente Hospitalar de Imuno-Alergologia. HUC
- 3 - Assistente Hospitalar de Anatomia Patológica. HUC
(Director de Serviço: Dr.ª Maria Irene Martins)
- 4 - Assistente Hospitalar eventual de Anatomia Patológica. HUC
- 5 - Assistente Hospitalar Graduado de Imuno-Alergologia. HUC
- 6 - Chefe de Serviço de Imuno-Alergologia. HUC
- 7 - Director de Serviço de Pneumologia. HUC. Prof. Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Entregue para publicação - 5/7/1994
Aceite para publicação - 2/12/1994

Lymphocytic phenotyping, using parafin embedded skin fragments, was done by Avidin-Biotin-HRP method for CD3, CD45RO and CD20 (DAKO)

Results were expressed in mean number and mean percentual values for each slide and patient. The control group was made up of 5 patients with chronic urticaria without vasculitis. Results show normal values for serum complement and increase IgE, without clinical or prick correlation. The mean number of lymphocytes per slide was significantly higher than the control group (43.3 ± 25.2 and 15.3 ± 6.2 respectively, $p=0.045$). In Urticarial vasculitis, patients, the mean percentual of CD3 ($53.3 \pm 16.95\%$) and CD45RO ($53.7 \pm 19.42\%$) coincided, while activated B lymphocytes were decreased ($6.8 \pm 4.29\%$). Control group results revealed CD3 lymphocytes to be lower ($25.57 \pm 2.91\%$, $p=0.0072$) while priming lymphocytes predominated (91.17 ± 12.85 , $p=0.0038$) and no CD20+ were observed.

Although significant differences between the two groups were found, it does not seem possible to conclude, at this point, if we are in the presence of two distinct disorders or different stages of the same disease.

KEY WORDS: *Urticaria, Urticarial vasculitis, Lymphocytes*

INTRODUÇÃO

A urticária é uma situação clínica caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular cutânea^{1,2,3,4}. A exuberância clínica não encontra correlação com as diferentes formas histopatológicas que podem ser observadas¹: edema da derme superficial, perivasculite, vasculite necrosante, e uma variedade de diferentes formas de inflamação cutânea.

A Urticária Crónica, segundo Kaplan¹, caracteriza-se por fenómenos de perivasculite não necrosante, com infiltrado de linfócitos⁵ e acumulação de mastócitos^{1,2,6}. Estudos recentes destacam o predomínio de linfócitos T helper neste infiltrado. Aceitando a existência em humanos dos sub-tipos de células T helper (Th1 e Th2) observados em rato^{7,8}, compreende-se a impregnação de mastócitos dependentes de IL-4, produzida e sintetizada por Linfócitos T Helper, predominantes no tegumento destes doentes¹. O linfócito cutâneo parece, pois, pela capacidade de síntese de citocinas de activação, inibição ou modulação de outras células implicadas no processo inflamatório e pela capacidade de integração e comunicação celular, deter uma importância decisiva, que não a de simples espectador passivo, de todo o processo evolutivo da Urticária Crónica².

A prevalência de Vasculite Urticariana nos doentes observados na nossa consulta de Imuno-Alergologia dos HUC é de 21,19% do total de doentes com esta

patologia⁹. Ao contrário do descrito na literatura², todos estes doentes apresentaram infiltrado necrosante da parede do vaso, com predomínio absoluto de mononucleares linfócitos e, em todos eles, verificaram-se valores normais de Complemento sérico.

Considerou-se pertinente a reflexão destes resultados, procurando caracterizar sumariamente, a população celular linfocitária nestes doentes e contribuir de algum modo, para o esclarecimento da fisiopatologia desta entidade. O melhor conhecimento de todos os intervenientes celulares e biológicos interessados neste processo, terá obviamente implicações terapêuticas futuras (com utilização de fármacos mais adequados ao controlo clínico) que a fase inicial dos nossos estudos não permite neste momento.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes

Seleccionaram-se aleatoriamente 14:14 doentes, ambos os sexos, com média de idades de $35,6 \pm 12,1$ anos, com diagnósticos histológico de Vasculite Urticariana, de uma série de 105 submetidos a estudo clínico, histológico e laboratorial de Urticária Crónica, da Consulta de Imuno-Alergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Em todos eles não foram identificados factores desencadeadores ou etiológicos, as manifestações clínicas foram sobreponíveis aos restantes doentes sem diagnóstico histológico de Vasculite e a duração média da doença foi 23 ± 26 meses.

Para grupo controlo, foram seleccionados aleatoriamente 5 doentes com diagnóstico histológico de Urticária Crónica Idiopática sem lesões de vasculite cutânea no fragmento de biópsia.

Metodologia

Todos os doentes em estudo, foram submetidos ao seguinte estudo:

1- Exames sanguíneos

Procedeu-se a exames analíticos de sangue venoso periférico, em simultâneo à realização da biópsia cutânea, para os seguintes parâmetros:

- Hemograma e leucograma
- Imunoglobulinas séricas
- Fracções do complemento: CE e C4 e determinação de CH100
- Marcadores reumáticos: PCR, Factor Reumatoide e Waller Rose
- Anticorpos antinucleares (ANA)
- Estudo tiroideo: T3, T4 e TSH e AC antitiroideos (anti-TMS e anti-HTG)

2 - Testes cutâneos de alergia por "prick" teste para ácaros do pó doméstico, faneras de animais domésticos e pólenes de gramíneas e parietária.

3- *Capilaroscopia peri-ungueal sob microscopia óptica (Zeiss) com fonte de luz oblíqua em ampliação de 300 vezes.*

4- *Fenotipagem linfocitária em fragmento cutâneo de biópsia.*

Todos os doentes foram submetidos a biópsia cutânea no mesmo local (superfície volar do braço esquerdo), segundo a técnica habitual (desinfecção local, anestesia com Xilocaína (2,5cc) a 2%, corte com Punch Skin Biopsy-8-mm-). Uma porção do material de biópsia foi submetida a ultracongelamento a -70° e a restante submetida a fixação em formal a 5%, seguida de manipulação em parafina, coloração com hematoxilina-eosina e finalmente observação sob microscopia óptica (Zeiss, ampliação de 300 vezes).

O fragmento de reserva parafinado, foi submetido a cortes finos com marcação linfocitária com anticorpos monoclonais (CD20 e CD45RO) e policlonais (CD3) do Laboratório DAKO (A-452; M-742; M-755), pelo método de Avidina-Biotina-HRP ²³:

- 1 - Desaparafinação e hidratação
- 2 - Digestão enzimática (só para CD3) com protese a 0,1%: 10 minutos
- 3 - Lavagem em PBS
- 4 - Incubação em H202 a 3% em água destilada: 15 minutos
- 5 - Lavagem em PBS
- 6 - Bloqueio das ligações não específicas com soro de porco normal: 20 minutos
- 7 - Aplicação do anticorpo: 30 minutos
CD3 (DAKO A-452) 1/100 em PBS
CD45RO (DAKO M742) 1/70 em PBS
CD20 (DAKO M755) 1/70 em PBS
- 8 - Lavagem em PBS
- 9 - Incubação em soro de porco anti-cabra, coelho, ratinho, biotilado (DAKO E453) 1/120 em PBS: 30 minutos
- 10 - Lavagem em PBS
- 11 - Incubação com Avidina/HRP (DAKO P 364) 1/400: 30 minutos
- 12 - Lavagem em PBS
- 13 - Incubação com solução de substrato cromogénico DAB-3mg/5ml de PBS+100ul de H202: 10 minutos
- 14 - Lavagem com água destilada
- 15 - Contrastação com Hematoxilina de Meyer: 10 minutos
- 16 - Lavagem em água corrente, deixando azular
- 17 - Desidratação e montagem em meio sintético
- 18 - Marcação a castanho das ligações específicas.

O controlo de qualidade, da marcação linfocitária, foi efectuado em cortes de amígdala para os mesmos anticorpos.

5 - Leitura e resultados

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

RESULTADOS

O leucograma apresentou valores dentro dos parâmetros de referência (leucócitos $6,5 \pm 1,3 \text{G/L}$ e linfócitos $35,4 \pm 7,7\%$).

As imunoglobulinas séricas: IgG, IgA e IgM apresentaram-se dentro dos valores normais (Fig. 1).

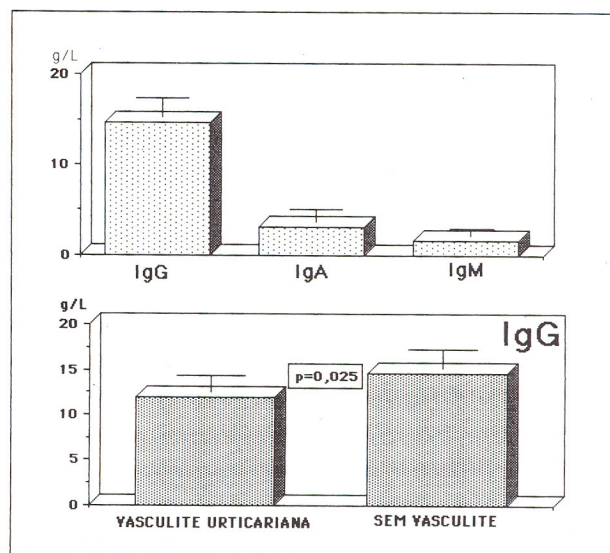


Fig. 1 - Imunoglobulinas séricas

A IgE sérica total apresentou-se elevada ($229,0 \pm 309,4 \text{ KU/L}$) em relação ao grupo controlo ($73,5 \pm 30,8 \text{ KU/L}$) (Fig. 2).

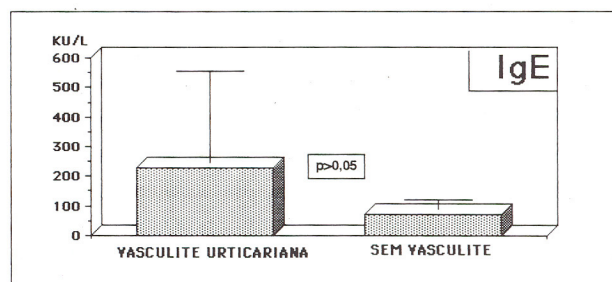


Fig. 2 - Imunoglobulina E, sérica, (CAP-System)

As fracções de complemento (Fig. 3) sérico C4 (1,07±0,19g/dl) e C4 (0,24±0,02g/dl) apresentaram

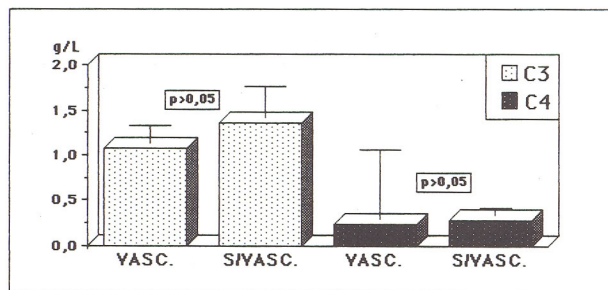


Fig. 3 - Complemento sérico

valores médios dentro dos valores de referência, apresentando dois indivíduos valores no limite inferior do normal (C3=0,7g/dl e C4=0,13g/dl). Todas as determinações de Ch100 apresentaram valores normais.

Os testes cutâneos de alergia foram positivos somente em 1 doente para gramíneas, sem correlação clínica. O estudo tireoideu, marcadores reumáticos revelou-se normal. A capilaroscopia peri-ungueal foi condordante com o estudo histológico em um doente.

Quanto ao valor total médio de linfócitos por Lâmina (Fig. 4) verificou-se, como seria esperado, aumento marcado (43,3±25,2) e com significado estatístico em relação ao grupo controlo (15,25±6,2).

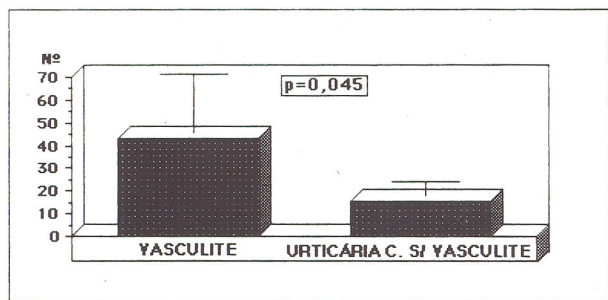


Fig. 4 - Número médio de linfócitos por lâmina

Quando comparados ambos os grupos: Vasculite e histologia normal (Fig. 5), o número médio de linfócitos marcados não apresentou diferença estatística (T student) após marcação delular específica para CD3 (33,0±33,5 e 4,3±2,6) e CD45RO (21,1±19,2 e 13,5±4,2) (Fig. 5); porém obtém-se diferença significativa quando analisados os valores percentuais dos linfócitos marcados positivamente (respectivamente: 53,31±16,95% e 25,57±2,91% para CD3; e 53,07±19,42% e 91,17±12,88% para CD45RO (Fig. 6).

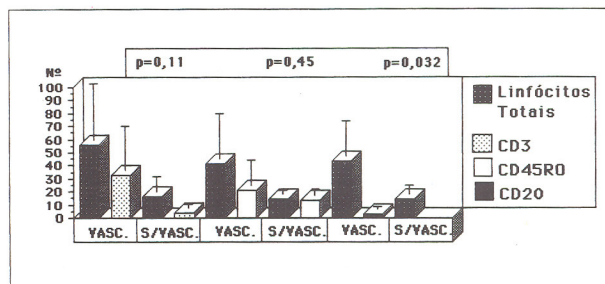


Fig. 5 - Fenotipagem linfocitária: Número médio de linfócitos marcados

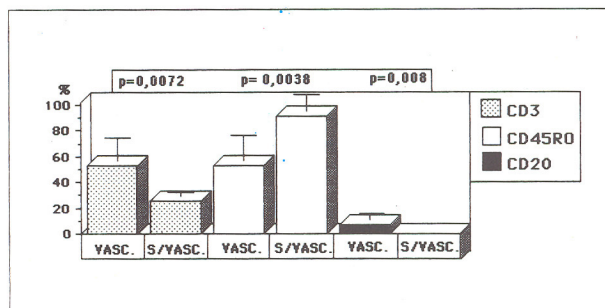


Fig. 6 - Fenotipagem linfocitária: Valor percentual de linfócitos marcados

Dos 14 doentes com Vasculite Urticariana, 5 foram estudados em fase activa de lesões de Urticária, mas não se observaram diferenças na tipagem linfocitária cutânea em relação aos doentes em período de aparente remissão clínica (Fig. 7).

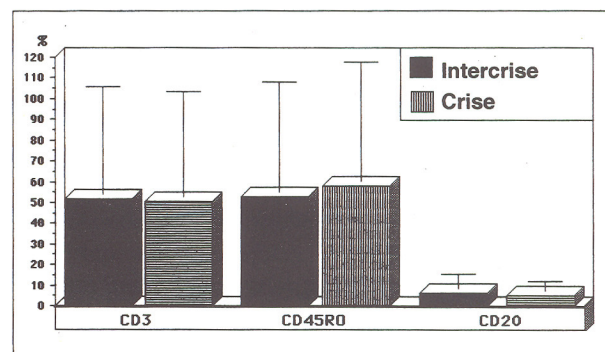


Fig. 7 - Fenotipagem linfocitária na vasculite linfocitária em doentes em período de remissão e lesões activas de urticária.

DISCUSSÃO

Nestes doentes, não foram encontrados valores reduzidos das fracções do complemento sérico, tal como as descrições clássicas dos fenómenos de Vasculite associados a Urticária Crónica^{1,10-16}, mas, é actualmente aceite, ainda por vezes em descrições clínicas isoladas²⁰⁻²², mas em número progressivamente crescente, quadros de Vasculite Urticariana

normocomplementémicos. O não consumo de frações de complemento sérico doentes poderia significar que a Vasculite observada nestes doentes, seria resultado de fenómenos locais, mas a associação frequente de Urticária a fenómenos e patologia sistémica auto-imune¹⁸, contrária de algum modo esta interpretação.

Observaram-se determinações de IgE sérica em concentração elevada, com significado estatístico em relação ao grupo controlo; ainda que o valor médio neste grupo seja ele próprio elevado. Este valor não encontra correlação com a existência de parasitose intestinal ou atopia. Estes resultados parecem confirmar a importância da IgE como imunoglobulina de inflamação²⁴; ou hipoteticamente realçar, o fenómeno de síntese em resposta e inógenos mal caracterizados, eventualmente autólogos, sob condições particulares.

Atendendo a um conjunto vasto de estudos^{1,2,26,27}, o mecanismo etiopatogénico na Urticária Crónica, não parece de modo algum na maioria dos doentes, associado a um fenómeno alérgico clássico, na dependência dos principais agentes alérgicos comuns. Se a importância terapêutica dos anti-histamínicos H1 é indelével, antagonizando a libertação de Histamina Mastocitária, validando o contributo, fundamental desta célula neste processo^{6,27,28}, o mecanismo pelo qual essa desgranulação é processada sugere alguma controvérsia. Aceita-se a desgranulação^{28,29} dependente de estímulos físicos, químicos ou farmacológicos e, fenómenos alérgicos clássicos dependentes de IgE. Embora a presença de IgE específicas, para um conjunto vasto de alérgenos (ácaros, faneras, pólenes e alimentos) tenha sido pesquisada nestes doentes², a produtividade deste screening foi na maioria dos casos insuficiente no esclarecimento etiológico; mas do mesmo modo a concentração sérica da IgE total apresenta-se em valores elevados permitindo a conceptualização descrita anteriormente.

A associação de Urticária Crónica com patologia reumatisal auto-imune, confirmada em vários trabalhos^{1,2,17-19}, poderia sumariamente relacionar-se com as formas histológicas mais graves nestes doentes. Seria assim de esperar uma maior prevalência desta patologia nos doentes com Vasculite Urticariana, mas a análise dos dados clínicos e serológicos (RA Test, PCR e Waller Rose) revelaram-se negativos nesta série. A ocorrência desta patologia foi por nós já observada⁹ mas foi independente da histologia cutânea, nomeadamente de fenómenos de Vasculite.

Do mesmo modo, a associação ou a maior prevalência de Tiroidite auto-imune sub-clínica em doentes com Urticária³⁰ não apresentou relação com a observação histológica.

A capilaroscopia apresentou produtividade diagnóstica muito modesta só descrevendo fenómenos de Vasculite em um doente, pelo que a sensibilidade

diagnóstica é muito modesta, não devendo constituir um exame de abordagem ou de controlo clínico nestes doentes.

Neste estudo pretendeu-se caracterizar sumariamente as populações linfocitárias dependentes neste processo. A escolha dos marcadores baseou-se na destrinça de duas populações linfocitárias T e B. O linfócito B³¹ quer pela capacidade de apresentação antigénica quer pela capacidade de síntese de imunoglobulinas e mediadores celulares, poderia ser de facto uma célula fundamental neste processo, optando-se deste modo pela marcação de células B activadas, atendendo às concentrações séricas elevadas de IgE.

A caracterização T foi decidida, nesta primeira fase, pela marcação do receptor de superfície CD3, comum a todas as expressões fenotípicas, e dentro deste grupo a marcação CD45RO, para discriminar as células T de memória^{8,32}. Considerou-se no decurso desta fase não alargar a marcação celular, de modo a permitir, subsequentemente, uma maior ponderação e fenotipagem mais criteriosa.

Analisando o número médio de linfócitos por lâmina em ambos os grupos verificou-se, como seria esperado um aumento significativo de linfócitos nos fragmentos de biópsia. Porém, a observação em número médio absoluto por lâmina em relação a cada um dos fenótipos linfocitários em estudo, não foi encontrado significado estatístico entre ambos os grupos. A dispersão de resultados, com desvios padrão necessariamente elevados impede a validação estatística.

Quando se procedeu à análise dos resultados em função do seu valor percentual em função do número absoluto em cada lâmina e para cada marcador, obtivemos significado estatístico entre os dois grupos em análise. Na Vasculite Urticariana observou-se um valor percentual mais elevado de CD3 positivos, mas inferior de Linfócitos T (CD45RO) já sujeitos a priming em relação ao grupo sem Vasculite. A presença de Linfócitos B activados foi observado em valor muito reduzido não estando presentes nos doentes do grupo controlo (tal como o descrito na literatura¹).

A análise dos resultados, na Vasculite Urticariana, revela que aproximadamente 53% do número total de Linfócitos presente no fragmento são células CD3+, sendo de igual modo esse valor de células T de memória. Estes valores permitem suspeitar do envolvimento no infiltrado de células naïff, ainda não sensibilizadas a antigénios dérmicos, endoteliais ou do suporte conjuntivo do tegumento cutâneo. Considera-se ainda possível o contributo patogénico de células NK e LAK quer pela capacidade intrínseca de lesão vascular³² quer pelo diferencial absoluto de mononucleares linfócitos não marcados positivamente por CD3 e CD20.

Em doentes sem Vasculite a maioria de Linfócitos T são células de memória CD45R0 (91,2±12,9%). A diferença percentual de Linfócitos CD3+ no infiltrado peri-vascular é indiscutível em relação ao grupo em estudo, permitindo uma vez mais inferir da responsabilidade de outras células na patogénese da Urticária. No início deste trabalho, e em ambos os grupos, era esperado um valor mais significativo de Linfócitos CD3 positivos; o resultado encontrado poderá justificar-se pelo emprego de um anticorpo policlonal, devendo por isso submeter-se a confirmação, em marcações subsequentes.

O sistema imune cutâneo representa um local preferencial ao estabelecimento da população linfocitária priming, resultante da recirculação de linfócitos, em condições fisiológicas e de homeostasia³³, tendo-se observado esse predomínio em doentes do grupo controlo.

No conjunto estes resultados sugerem a contribuição indiscutível do Linfócito T na fisiopatogenia da Urticária Crónica com ou sem fenómenos de Vasculite cutânea^{34,35}. Considera-se deste modo que a lesão vascular será provavelmente resultante de citotoxicidade celular, na dependência de Linfócitos (T e eventualmente NK e LAK), dado o indiscutível predomínio em áreas lesadas e a capacidade de desencadear e perpetuar este tipo de fenómenos.

Refere-se ainda que, num doente observamos Linfócitos T, CD3 positivos entre os queratinócitos dos extractos basais da epiderme. Esta observação ainda que necessitando de confirmação posterior, poderá realçar o contributo do queratinócito³⁶ na fisiopatologia da Urticária, sabendo que se trata do maior pool fisiológico de IL1, de importância fundamental na amplificação do fenómeno inflamatório e recrutamento de outras células elas próprias também implicadas na inflamação.

Este estudo confirma a importância da realização do estudo histológico em doentes portadores de Urticária Crónica, pois que as alterações neles encontradas, são efectivamente em número e expressão significativa, nomeadamente a Vasculite Urticariana, com repercussão clínica sobreponível aos restantes doentes. Porém, mesmo no estudo histológico de doentes sem fenómenos de Vasculite (infiltrado e necrose da parede do vaso), os fenómenos de Peri-Vasculite foram uma observação quase constante, com predominância pelos pequenos vasos da derme superficial e em áreas peri-anexiais. Este facto, sugere de algum modo, que todo e qualquer processo clínico de Urticária Crónica Idiopática é de alguma forma um processo evolutivo de vasculite cutânea³⁴, mas que a própria evolução clínica e celular dinâmica cursará, eventualmente, com período de estabilização vascular dependente de mecanismos e factores não caracterizados e mal definidos. Porém, a

população celular nos dois grupos em estudo apresentam diferenças reais e estatisticamente significativas, pelo que fisiopatologicamente poderão constituir duas entidades distintas, ainda que com expressão clínica sobreponível.

Considera-se relevante a persecução de novos estudos, abordando a vertente celular na Urticária Crónica, de modo a uma melhor caracterização fisiopatológica que permitirá seguramente novas abordagens terapêuticas^{26,37,38}.

Agradecimento

Ao Sr. Pedro Pessa, do departamento de Imunocitoquímica, do Serviço de Anatomia Patológica dos HUC, pela colaboração e empenho na realização deste estudo.

BIBLIOGRAFIA

1. **Kaplan AP.** Urticaria and Angiodema. In Middleton E, Reed CE, Adkinson NF, et al (eds). *Allergy: Principles and Practise. St. Louis, CV Mosby*, 1988; 1377-401.
2. **Huston DP, Bressler RB.** Urticaria and Angiodema. *Med Clin North Am* 1992; 76(4): 805-40.
3. **Terr AL.** Anaphylaxis and Urticaria. In Stires DP, Terr Al (eds). *Basic and Clinical Immunology. London, Prentice Hall Int*, 1991; 400-9.
4. **Palma-Carlos AG, Jordão AL.** Immunopathology of urticaria. *Allergie Immunologie* 1991; 23(10): 443-6.
5. **Mekori YA, Giorno RAC, Anderson P, Koler PF.** Lymphocyte subpopulations in the skin of patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:681.
6. **Smith CH, Soh C, Lee TH.** Cutaneous histamine metabolism in chronic urticaria. *Allergy Clin Immunol* 1992; 89:944-50.
7. **Kapsenberg ML, Wierenga EA, Bos JD, Jansen HM.** Funcional subsets of allergen-reactive human CD4+T cells. *Immunology Today* 1991; 12:392-5.
8. **Akbar AN.** The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunology Today* 1991; 12:184-8.
9. **Pereira AC, Pinto-Mendes J, Tavares B, et al.** Immunologic changes in chronic urticaria. *Allergy* 1992; 47(12 sup): 187.
10. **Monroe EW, Schulz CL, Maize JC, Jordon RE.** Vasculitis in chronic urticaria: an immunopathologic study. *J Invest Dermatol* 1981; 76:103-5.
11. **Phanuphak P, Kohler PF, Stanford RE, et al.** Vasculitis in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 65:436-44.
12. **Gammon WR.** Urticarial Vasculitis. *Dermatologic Clinis* 1985; 3:97-105.
13. **Mehregan DR, Hall MJ, Gibson LE.** Urticarial Vasculitis: a hispotathologic and clinical review of 72 cases. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26:441-8.
14. **Cardoso PA, de Oliveira ZP, Alves VA, et al.** Urticarial vasculitis. *Allergol-Immunopathol-Madr* 1990; 18:191-5.
15. **Peteiro C, Torobio J.** Incidence of leucocytoclastic vasculitis in chronic idiopathic urticaria. Study of 100 cases. *Am J Dermatopathol* 1989; 11:528-33.
16. **Torrallba SM, Serrano MI, Barcelona JA, Puras TA.** Leucocytoclastic vasculitis or a superposition syndrome (letter). *An Med Interna* 1991; 9:205.

17. **Wisnieski JJ, Jones SM.** Comparison of autoantibodies to the collagen-like region of C1q in hypocomplementemia urticarial vasculitis-syndrom and systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1992; 148:1396-403.
18. **Asherson RA, Sontheimer R.** Urticarial vasculitis and syndromes in association with connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:743-4.
19. **Asherson RA, D'Cruz D, Stephens CJ, et al.** Urticarial vasculitis in connective tissue disease clinic: patterns, presentations, and treatment. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20:285-96.
20. **Sanchez NP, Winkleman RK, Schroeter AL, et al.** The clinical and histological spectrums of urticarial vasculitis. *J. Am Acad Dermatol* 1982; 7:599.
21. **Asherson RA, Buchanan N, Kenwright S, et al.** The normocomplementemic urticarial vasculitis syndrom: report of a case and response to colchicine. *Clin Exp Dermatol* 1991; 16:424-7.
22. **Hassan ML, Perez JA, del Pino EY, Schroh RG.** Vasculitis urticaria: study of 12 cases. *Med Cutan Ibero Lat Am* 1990; 18:179-84.
23. **Lathan GR, D'Ardene AJ.** Routine Laboratory methods. In AG Stansfeld, AJ d'Ardenne (eds). Lymph node biopsy interpretation. *Churchill Livingstone, Longman Group UK, London, 2.ª Ed.* 1992; 469-81.
24. **Mudde GC, Hansel TT, Reijen FC, et al.** IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture? *Immunol Today* 1990; 11:440-2.
25. **Soter NA.** Acute and chronic urticaria and angiodema. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25:146-54.
26. **Quaranta JH, Rohr AS, Rachelefsky GS, et al.** The natural history and response to therapy of chronic urticaria and angiodema. *Ann Allergy* 1989; 62:421-4.
27. **Waljgren CF.** Pathophysiology of itching in urticaria and atopic dermatitis. *Allergy* 1992; 47:65-75.
28. **Holgate ST.** The mast cell and its function in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:11-16.
29. **Church MK, ElLati S, Okayama Y.** Biological properties of human skin mast cells. *Clin Exp. Allergy* 1991; 21 (sup 3): 1-9.
30. **Leznoff A, Sussman GL.** Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angiodema with thyroid autoimmunity; a study of 90 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:66-71.
31. **Goodman JW.** The immune response. In Stites DP, Terr AI (eds). *Basic and Clinical Immunology. London, Prentice Hall Int, 1991; 34-44.*
32. **Lanier L.** Cells of the immune response: Lymphocytes and Mononuclear. Phagocytes. In Stites DP, Terr AI (eds). *Basic and Clinical Immunology. London, Prentice Hall Int, 1991; 61-72.*
33. **Bos JD, Kapsemberg ML.** The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today* 1993; 14:75-78.
34. **Kaplan AF.** Urticaria: the relationship of duration of lesion to pathogenesis. *Allergic Proc.* 1990; 11:15-78.
35. **Keahey TM.** The pathogenesis of Urticaria. *Dermatologic Clinics* 1985; 3:13-28.
36. **Mérot Y, Saurat JH.** Structure et immuno-pathologie de la peau. In Charpin J (ed). *Allergologie. Paris, Flammarion Medicine Sciences, 1986; 448-59.*
37. **Jaffer AM.** Sulfasalazine in the treatment of corticosteroid-dependent chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:964-5.
38. **Epstein MM, Watsky KL, Lanzi RA.** The role of diet in the treatment of a patient with urticaria and urticarial vasculitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:414-5.

Correspondência

Dr. Celso Pereira
 Unidade de Imunoalergologia
 Serviço de Pneumologia
 Hospitais da Universidade de Coimbra
 3000 COIMBRA