

Mediadores e inflamação alérgica

A. G. Palma-Carlos^{1,3} M.Laura Palma-Carlos^{2,3}

¹ Professor Catedrático F.M.L., ex-Director de Serviço HSM

² Investigadora-Coordenadora de Ciências Médicas da UL

³ Centro de Alergologia e Imunologia Clínica — CAIC. Centro de Hematologia e Imunologia - CHIUL

INTRODUÇÃO

O estudo dos mediadores e da sua determinação como marcadores de inflamação tem adquirido novas aplicações com a introdução de recentes tecnologias^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11, 12,13,14}.

Como marcadores gerais de inflamação são em geral utilizadas as moléculas de adesão, para os mastócitos a triptase, para os eosinófilos a proteína catiónica dos eosinófilos — ECP — para leucócitos circulantes incluindo os basófilos o doseamento *in vitro* após contacto com o antigénio dos leucotrienos (CAST), e como marcador específico de activação dos basófilos a citometria de fluxo (FAST), utilizando uma dupla marcação por anti-IgE (basófilos e anti CD63) marcador de activação^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15}.

Nesta revisão serão apresentados resultados obtidos nos últimos anos pelo nosso grupo de trabalho no estudo da triptase no lavado nasal, o ECP no lavado nasal, as moléculas de adesão solúveis, a libertação de leucotrienos por método imunoenzimático — ELISA, e a activação dos basófilos por

citometria de fluxo (FAST). Estes métodos podem ser utilizados tanto para diagnóstico etiológico como para demonstração de reactividade celular ou para controlo de terapêutica tanto farmacológica como imunoterapia específica.

1. LIBERTAÇÃO DE TRIPTASE

Como é sabido a triptase é um mediador específico mastocitário, uma vez que apenas os mastócitos libertam esta protease após estimulação, propriedade que não partilham os basófilos que libertam histamina como os mastócitos, mas não triptase nem PGD₂^{2, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27}.

Os ensaios de standardização de testes de provocação com extracto aquoso de *Parietaria* com objectivo de dosear triptase no lavado nasal segundo a técnica proposta por NACLERIO levemente modificada⁷ demonstraram que o pico máximo de libertação de mediadores se observava aos 10 min. que a dose mais eficaz de alérgeno aquoso nebulizado era de 1000 U. Obtidos resultados reprodutíveis

esta técnica foi utilizada de forma seriada para controlo de terapêutica.

O estudo da libertação de mediadores foi repetido após 2 anos de imunoterapia específica para a Parietaria por via sistémica; verificou-se que não só a quantidade de triptase libertada estava reduzida mas também que o pico de libertação do mediador mastocitário que antes da vacina se verificava aos 10 min. era depois observado aos 20 min. o que traduz uma diminuição da reactividade mastocitária — liberalidade ou *releaseability*^{21,22,23,24,26}.

A diminuição da quantidade de triptase libertada verificava-se para qualquer das concentrações utilizadas para a provocação nasal (10,100 ou 1000 U).

O estudo seriado da libertação de triptase após provas de provocação nasal como alergénio específico permite assim confirmar a nível celular mastocitário, de forma objectiva a eficácia das vacinas antialérgicas sobre a activação dos mastócitos (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

2. LIBERTAÇÃO DE ECP NASAL

A mesma metodologia de lavagem nasal estandardizada pode ser utilizada para avaliar a reactividade dos eosinófilos após teste de provocação nasal e o efeito das terapêuticas farmacológicas com anti-histaminicos sistémicos ou corticoides inalados ou imunoterapia específica na reactividade dos eosinófilos. Para a libertação de ECP verifica-se após provocação com ácaros do pó doméstico (*Dermaphagoides pteronyssinus* um duplo padrão, alguns doentes tem uma elevação de libertação de ECP já uma hora após provocação, outros reagem de forma mais marcada 4 horas após contacto com o alérgeno^{1, 2, 21, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41}.

Num ensaio controlado a médio prazo verificou-se que não havia diferenças iniciais significativas entre dois grupos de doentes tratados, uns com imunoterapia específica (SIT) outros com farmacoterapia.

Após 2 anos de tratamento os doentes tratados com fármacos mantinham o mesmo padrão de libertação de ECP sem alterações significativas. Pelo contrário, nos doentes tratados com imunoterapia observou-se uma diminuição altamente significativa do nível de ECP não só basal, antes da provocação mas também de libertação de ECP às 1 e 4 horas.^{1,2,3,17,27,28,38,39,40,41,42}.

Estes resultados demonstram que a imunoterapia específica administrada por via sistémica inibe a reactividade dos eosinófilos não só basal, antes do contacto com o alergénio mas também após estimulação pelo alergénio, contribuindo assim para diminuir o processo de inflamação crónica da alergia respiratória^{1,2,3,17,27,28,38,39,40}.

3. MOLÉCULAS DE ADESÃO E INFLAMAÇÃO ALÉRGICA

As formas solúveis das moléculas de adesão, facilmente acessíveis no soro, são marcadores sistémicos muito úteis da inflamação alérgica e podem ser utilizados como marcadores de inflamação permitindo avaliar o efeito das diversas terapêuticas farmacológicas ou outras.^{4, 7, 12, 14, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 4, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56}.

O tratamento prolongado com anti-histaminicos anti H1 como a Loratadina não diminui significativamente em relação ao grupo controlo, também de doentes riníticos, os níveis séricos de s-ICAM-1.

No entanto, o nível de s-VCAM-1 após o mesmo período de tratamento com Loratadina diminui significativamente.

Foi também estudado o efeito de imunoterapia específica sobre o nível sérico das duas moléculas de adesão s-ICAM-1 e s-VCAM-1. Após um ano de imunoterapia específica não se verificou diminuição significativa do nível de s-ICAM-1 mas sim do s-VCAM-1. Após 2 anos de imunoterapia específica tanto o s-ICAM-1 como o s-VCAM-1 tinham diminuído significativamente em relação ao

grupo controlo tratado apenas com meios farmacológicos confirmando assim uma acção anti-inflamatória sistémica ^{4, 46, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56}.

Estes resultados assim como os obtidos para a triptase e o ECP confirmam que a imunoterapia específica tem um efeito anti-inflamatório geral, demonstrado pela diminuição das moléculas de adesão e também uma acção directa sobre mastócitos e eosinófilos traduzido pela diminuição de libertação de triptase e ECP após provas de provocação seriadas com alérgenos específicos. A confirmação de marcadores específicos com indicadores gerais de inflamação, nomeadamente as moléculas de adesão permite avaliar a evolução das doenças alérgicas e o efeito das terapêuticas farmacológicas ou das vacinas e fornece dados objetivos de avaliação da alergia ^{4, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56}.

4. LIBERTAÇÃO DE LEUCOTRIENOS E ALERGIA

A activação celular após contacto com o alérgeno leva as células pró-inflamatórias à libertação de mediadores pré-formados e neoformados.

Estes mediadores podem ser estudados no sangue periférico após contacto das células do doentes com o antigénio no denominado teste de estimulação celular pelo antigénio (cellular antigen stimulation test-CAST) com determinação dos leucotrienos libertados. Esta técnica foi utilizada no estudo da alergia a fármacos de doentes e a veneno de himenopteros observando-se positividade em grande número. O facto de não haver para os venenos de himenopteros correlação entre o CAST, os testes cutâneos, a IgE específica e o western blot sugere que o CAST pode, ou identificar reacções não IgE mediadas ou estar onerado por falsos positivos uma vez que as outras 3 técnicas utilizadas tinham correlação entre si ^{7, 56, 57, 58, 59}.

O CAST pode também ser aplicado ao diagnóstico das reacções medicamentosas tendo sido já uti-

lizado para anti-inflamatórios não esteróides (AINES) e antibióticos. Verificou-se excelente correlação entre CAST e provas de provocação a antibióticos só com uma dissociação, (CAST negativo, provocação positiva para cefalosporina). Esta nova técnica pode assim contribuir para o diagnóstico das reacções medicamentosas e possivelmente identificar em certos casos reacções cujo mecanismo é independente da IgE ^{7, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62}.

5. ACTIVAÇÃO DE BASÓFILOS POR CITOMETRIA DE FLUXO (FAST)

Nos últimos anos a citometria de fluxo permitiu reactivar a técnica de estudo de desgranulação dos basófilos humanos muito divulgada há 20 anos mas agora pouco utilizada pela morosidade de leitura em microscópica óptica. A versão actual implica uma dupla marcação com anti-IgE que identifica praticamente só os basófilos de sangue periférico, únicas células circulantes que apresentam sempre receptores de alta afinidade para a IgE e anti CD63 (mais recentemente CD 203) que é um marcador de activação celular. ^{62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 83}. A dupla marcação permite a contagem do número de basófilos activados. A activação de basófilos é específica para os alérgenos em causa sejam gramíneas, ácaros ou outros e permite realizar um diagnóstico a nível humoral como se passa com a IgE específica. Acresce que a cronologia da activação celular não é simultânea com as variações da IgE específica e que nomeadamente durante a imunoterapia específica a diminuição da reactividade dos basófilos precede a baixa de IgE específica como demonstramos há alguns anos utilizando ainda a técnica de desgranulação dos basófilos ^{21, 81, 82}.

CONCLUSÕES

Os novos métodos de avaliação de libertação de mediadores permitem actualmente uma melhor

compreensão patogénica e um diagnóstico mais preciso das reacções e da inflamação alérgica. O seu estudo é forçosamente um trabalho de grupo e só a estreita coordenação entre os nossos colaboradores do CHIUL e da Unidade de Imunoalergologia permitiu obter estes resultados. Na prática o estudo dos mediadores permite confirmar diagnósticos etiológicos, afirmar a intervenção de células em causa, mastócitos, basófilos ou eosinófilos, avaliar a intensidade do componente inflamatório e estudar a reactividade perante alérgenos *ex vivo* tanto pela libertação de leucotrienos como pela aplicação da citometria de fluxo. É possível que certo número de reacções⁶¹ não mediadas por IgE possam ser abrangidas pelas novas metodologias nomeadamente, pelo estudo da libertação de leucotrienos⁵⁶.⁵⁷ É provável que algumas destas novas vias de estudo da reacção alérgica vejam as suas aplicações alargadas na prática Imunoalergologia nos próximos anos^{1, 2, 4, 5, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 62, 63, 78, 83}.

Os cheiros, os pós, as especiarias alteram os doentes e mesmo os países como escreveu Sá de Miranda no século XVI. Se Sá de Miranda hoje se dedicasse ao estudo de mediadores poderia afirmar de forma poética um concerto sobre inflamação.

BIBLIOGRAFIA

1. Branco Ferreira, M. Palma-Carlos, A.G.; Palma-Carlos, M.L. — Immediate and late phase mediators in allergic rhinitis. *Int. Rev. Allergy. Clin. Immunol.* 1999, 5,5-8.
2. Branco Ferreira, M. Palma-Carlos, A.G.; Palma-Carlos, M.L. — Mediators release and nasal allergy. *Int. J. Immunorehabil.* 1999, 12, 36-39.
3. Melo, A.C. — Citometria de fluxo em imunoalergologia. *Jornadas Científicas de Análise Clínicas, Ordem dos Farmacêuticos*, 1999,25.
4. Canónica, G.W., Ciprandi G., Passalacqua Q., Pesce G., Scordama A., A. Bagnasco M. — Molecular events in allergic inflammation. *Allergy* 1997, 52 (suppl. 34) 25-30.
5. Cauwenberge P., Wang D. — Role of cells and mediators in nasal allergic response. *Rev. Esp. Allergol. Immunol. Clin.* 1997, 12, 87-94.
6. Kay A.B. — Concepts of allergy and hypersensitivity in Allergy and Allergic diseases. Kay AB (eds) Blackwell Science, Oxford 1997, 23-25.
7. Palma-Carlos, M.L. ; Pereira Santos, M.C.; Melo, A.; Palma-Carlos, A.G. Basophil activation — current methods of evaluation. *Int. J. Immunorehabil.*, 2002, 4, 364-365.
8. Wang D. — Nasal allergic reactions Ph. D. thesis. Ghent, Belgium, 1995.
9. Kuna P.,Lazarovich M., Kaplan A.P.- Studies of MCAF, MCP-1, RANTES, MP-1, IL-8, Histamine, ECP and tryptase in allergic rhinitis sufferers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994, 93, 216.
10. Baraniuk J.N. — Mechanisms of allergic rhinitis. *Current Allergy Asthma Reports* 2001, 1, 207-217.
11. Miller S., Busse WW., Holgate S. — Cellular and mediator mechanisms of allergic inflammation.
12. Palma-Carlos A.G.,Palma-Carlos M.L. — Adhesion molecules in immunity and inflammation. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1993, 25, 4-9.
13. Van Cauwenberge P., Watelof B., Bachert C. — New insights in the pathogenesis of allergic rhinitis — in *Allergy Syndrome in the third millenium*, Wuthrich B (ed) Karger Basel 1999, 95-101.
14. Palma-Carlos A.G., Branco-Ferreira M., Pereira Santos M.C., Palma-Carlos M.L. — The nose and the bronchi : A functional unit. *Asthma* 2001, 2, supl. 1, 97-103.
15. Palma-Carlos A.G., Branco-Ferreira M., Pereira Santos M.C., Palma-Carlos M.L. — Rhinitis and asthma. More similarities than differences. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 2001, 33, 140-146.
16. Palma-Carlos, A.G.; Palma-Carlos, M.L.; Spínola Santos, A.; Pereira Santos, M.C.; Pregal. - A. Nasal reactivity and immunotherapy. *Pediatric Otorrhino An update — Passali, D., ed., Kluper, the Hague*, 1998, 171-180.
17. Palma-Carlos, A.G.; Palma-Carlos, M.L.; Branco Ferreira, M.; Spínola Santos, A.; Pereira Santos, M.C.; Pregal, A. — Nasal allergen challenge and immunotherapy control. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1998, 30, 153-156.
18. Branco-Ferreira M., Palma-Carlos AG. — Cytokines and asthma. *Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1998, 8, 141-148.
19. Bachert C., Wagenmann M., Holta Pells G. — Cytokine and adhesion molecules in allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol.* 1998, 12, 3-8.
20. Bousquet J., Lockey R., Malling H. — WHO position paper. Allergen immunopathology : therapeutical vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998, 53 supl. 4.
21. Palma-Carlos, A.G. Palma-Carlos, M.L.; Pereira Santos, M.C.; Melo, A.; Spínola Santos, A.; Pregal, A.; Pedro, E.; Branco Ferreira, M. — Immunoreactivity in allergic rhinitis. *Int.J.Immunorehabil.*, 1997, 7 25-31.
22. Naclerio R.M., Barood F.M., Kagey-Sobotka A., Liechtenstein I.M. — Basophils and eosinophils in allergic rhinitis. *J.Allergy Clin Immunol.* 1994, 94, 1303-1309.
23. Palma-Carlos, M.L. ; Pereira Santos, M.C.; Pedro, E.; Spínola Santos, A.; Ferreira, F.; Palma-Carlos, A.G. - Tryptase release after nasal provocation tests in Parietaria allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 97, 195.
24. Palma-Carlos M.L., Pereira Santos M.C., Pedro E., Spínola Santos A., Ferreira F., Palma-Carlos A.G. — Tryptase release after nasal provocation tests in Parietaria allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 87, 195.
25. Palma-Carlos, M.L. ; Pereira Santos, M.C.; Pedro, E.; Spínola Santos, A.; Palma-Carlos, A.G. — Tryptase release after nasal provocation test. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1999, 31, 159.
26. Proud D., Bailey G.S., Naclerio R.M. et al. — Tryptase and histamine as markers to evaluate mast cell activation during the response to nasal challenge in the allergens, cold dry and hyperosmolar solutions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992, 89, 1098-1110.
27. Palma-Carlos M.L., Pereira Santos M.C., Pedro E., Spínola Santos A., Palma-Carlos A.G. — Tryptase release after nasal provocation tests. — *ACI Int.* 1997, supl. 4, 227.
28. Rasp G., Hochstrasser K. — Tryptase in nasal lavage fluid is a useful marker of allergic rhinitis. *Allergy* 1993, 48, 72-74.
29. Palma-Carlos, M.L. ; Spínola Santos, A.; Branco Ferreira, M.; Pereira Santos, M.C.; Palma-Carlos, M.L. — Immunotherapy in allergic rhinitis. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 2001, 33, 323-326.

30. Palma-Carlos A.G., Branco Ferreira M., Pereira Santos M.C., Lopes Pregal A., Palma-Carlos M.L. — Kinetic of ECP release after nasal provocation tests. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1999, 31, 122.
31. Palma-Carlos, A.G. ; Branco Ferreira, M.; Pereira Santos, M.C.; Pedro, E.; Spínola Santos, A.; Pregal, A.; Palma-Carlos, M.L. — Nasal provocation and immunotherapy. *Invest. Allerg. Clin. Immunol.*, 1999, 9, 283-287.
32. Palma-Carlos A.G., Palma-Carlos M.L., Pereira Santos M.C., Pedro E., Spínola Santos A., Pregal A. — Immunotherapy and mast cell activation. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1998, 30, 257-259.
33. Palma-Carlos, A.G., Palma-Carlos, M.L.; Branco Ferreira, M.; Spínola Santos, A.; Pereira Santos, M.C.; Pedro, E. — Nasal allergen challenge and mediators release. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1997, 29, 269-271.
34. Palma-Carlos, A.G.; Palma-Carlos, M.L.; Spínola Santos, A.; Pregal, A. — Immunotherapy and mast cell activation. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 1998, 30, 257-258.
35. Palma-Carlos, A.G. — Local and systemic immunotherapy in nasal allergy. *Int. J. Ped. ORL.*, 1999, 49 suppl. 1, S207-S211.
36. Juliusson S., Holmberg K., Baumgarten C.K. — Tryptase in nasal lavage fluid after nasal allergen challenge. *Allergy* 1991, 46, 459-465.
37. Nakai Y., Sakamoto H., Omoshi Y et al. — Effect of immunotherapy on serum levels of eosinophil cationic protein in perennial allergic rhinitis. *Am Otol. Rhin. Laryngol.* 1997, 106, 848-853.
38. Nishioka H., Saito C., Nagano T., Okano ., Masuda Y., Kuriyana T. — Eosinophils cationic protein in nasal secretions of patients with mite allergic rhinitis laryngoscopic. 1993, 103, 189-197.
39. Furin M.J., Norman P.S., Creticos P.S. et al. - Immunotherapy decreases antigen induced eosinophil migration into the nasal cavity. *J. Allergy Clin Immunol.* 1996, 97, 680-688.
40. Palma-Carlos A.G., Branco-Ferreira M., Pereira-Santos M.C., Palma-Carlos M.L. — Specific immunotherapy reduces nasal ECP release. *J.Allergy Clin. Immunol.* 2000, 105, 5316.
41. Branco Ferreira, M. ; Silva, S.; Pereira dos Santos, M.C., Palma-Carlos, A.G. - Effect of specific immunotherapy in ECP release after specific nasal provocation. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2001, 1, 243-248.
42. Branco-Ferreira M., Palma-Carlos M.L., Santos M.C., Lopes Pregal A., Palma-Carlos A.G. — Kinetics of eosinophil cationic protein release in mite allergic rhinitis after specific nasal provocation. *Eur Annals Allergy Immunol.* 1998, 30, 104-111.
43. Adolphson C.R., Gleich G.J. — Eosinophils in Allergy. Holgate S, C.Musk MK (eds) Gower Medical Publishing, London 1993, 6-16-12.
44. Palma-Carlos A.G., Branco Ferreira M., Pereira Santos M.C., Lopes Pregal A., Palma-Carlos M.L. ECP release after nasal provocation tests. *ACI Int.* 1997, spl. 4, 226.
45. Iwamoto F. — The role of adhesion molecules in selective eosinophil recruitment. *ACI News* 1994, 6, 170-175.
46. Lee B.J., Naclerio R.M., Bochner B.S. et al. — Nasal challenge with allergen upregulates the local expression of vascular endothelial adhesion molecules. *J.Allergy Clin Immunol.* 1994, 94, 1006-1016.
47. Montefort S., Feather I.H., Wilson S.I. et al. — The expression of leukocyte endothelial adhesion molecules increased in perennial allergic rhinitis. *Am. J. Resp. All. Med. Ol.* 1992, 7, 393-398.
48. Branco Ferreira M., Silva S., Pereira dos Santos M.C., Palma-Carlos A.G. — Effect of specific immunotherapy in ECP release after specific nasal provocation. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* 2001, 1, 243-248.
49. Branco Ferreira M., Pereira Santos M.C., Palma-Carlos M.L., Palma-Carlos A.G. — Anti-histamine and serum adhesion molecules levels. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 2001, 33, 233-236.
50. Branco Ferreira M., Pereira Santos M.C., Lopes Pregal A., Michelena T, Alonso E., Palma-Carlos A.G. — Effect of specific immunotherapy versus loratadine on serum adhesion molecules. *Eur Annals Allergy Immunol.* 201, 33, 319-322.
51. Canónica G.W., Cprandi G., Buscaglia S., Bagnasco M. — Adhesion molecules on allergic inflammation. *Allergy* 1994, 49, 135-141.
52. Ciprandi G., Pranzati C., Ricca V., Passalacqua G., Bagnasco M. — Allergen specific challenge reduces the expression of ICAM-1 on epithelial cells of allergic subjects. *Amn. Resp. Out Care Med* 1994, 150, 1653-1659.
53. Ciprandi G., Passalacqua G. Azzarone B. et al. — Molecular events in allergic inflammation expression of adhesion molecules and modulation in asthma and allergic diseases. Marone G. (ed) Academic Press London 1998, 309-319.
54. Delisser H.M. — The role and contribution of adhesion molecules to asthma and pulmonary diseases in Asthma and Rhinitis. Busse W.W., Holgate ST. Eds. Blackwell Science, Oxford 2000, 691-701.
55. Pereira Santos M.C., Pregal A.L., Alonso E., Palma-Carlos M.L., Palma-Carlos A.G. — Dynamics of soluble adhesion molecules during ? for perennial allergic rhinitis. *Allergy* 2000, 55, suppl. 63, 177-178.
56. Palma-Carlos M.L., Melo A., Pereira Santos M.C., Palma-Carlos A.G. - Expression of PBC adhesion molecules in hay fever. *Allergy Clin. Immunol. Int.* 1997, 16, sup 4, 180.
57. Palma-Carlos M.L., Pereira Santos M.C., Pedro E., Spínola Santos A., Palma-Carlos A.G. — Soluble adhesion molecules: therapeutic target for allergen immunotherapy. *Allergy* 2002, 57, sup 73, 72-73.
58. Pereira Santos M.C., Lopes Pregal A., Spínola Santos A., Alonso E., Palma-Carlos M.L., Palma-Carlos A.G. — Effect of immunotherapy on soluble adhesion molecules. *Eur. Annals Allergy Immunol.* 2001, 33, 225-228.
59. Pereira Santos M.C., Murta R., Spínola Santos A., Alonso E., Vinhas de Sousa A., Palma-Carlos A.G., Palma-Carlos M.L. — Drug allergy diagnosis. Correlation between oral drugs challenges and CAST-ELISA. *Allergy*, 2001, 56, sup 68, 105.
60. Pereira Santos M.C., Spínola Santos A., Pregal A., Pedro E., Murta R., Palma-Carlos M.L, Palma-Carlos A.G. — The adverse drug reaction diagnosis by CAST-ELISA. Correlation with oral drug challenge. *Allergy*, 2002, 57, sup 73, 257.
61. Lebel., Messaad., Kveda Riene V. Rongierm., Bousquet., Demoly P. — Cystenol-leukotriene release tests (CAST) in the diagnosis of immediate drug reaction. *Allergy* 2001, 56, 688-692.
62. Deweck A.L., Sanz M.L. — Flow cytometric cellular allergen stimulation (est. FAST/Flowcast) technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy. *ACI Int.* 2002, 14, 2004-2015.
63. Pereira Santos M.C., Palma-Carlos M.L., Pedro E., Palma-Carlos A.G. — Laboratory diagnosis of hymenoptera venom allergy. Comparative study between specific IgE, Western blot and allergen leucocyte stimulation (CAST). *Eur. Annals Allergy Immunol.* 2002, 34, 10-12.
64. Pereira Santos M.C., Spínola Santos A., Palma-Carlos M.L. et al. — Adverse drug reactions diagnosis by cellular antigen stimulation test (CAST-ELISA). *J. Allergy Clin Immunol.* 202, 109, S154.
65. Sabbah A., Sainte-Laudy J. — Flow cytometry applied to the analysis of lymphocyte and basophil activation. *ACJ Int* 1996, 8, 116-119.
66. Sabbah A., Drouet M., Sainte-Laudy J., Lauret M.J., Loiry M. — Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic allergologique. *Allergie Immunol* 1995, 29, 15-21.
67. Sabbah A., Plassais R., Gremadin S., et al. — Le test d'activateurs des basophiles par cytométrie en flux dans le diagnostic de l'allergie aux venins d'hyménoptères. *Allergie Immunol.* 1998, 30, 444-51.
68. Monneret-Vautrin P., Sainte-Laudy J., Kanny G., Frémont S. — Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4-release IgE mediated food allergy. *Am. Allergy Asthma Immunol.* 1999, 82, 33-40.
69. Monneret G., Gutowski M.C., Bienvenu J. — Detection of aller-

- gen induced basophil activation by expression of CD63 antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 1999, 115, 393-396.
70. Nakagawa T., Stadler B.M., De Weck A.L. — Flow cytometric analysis of human basophil degranulation. *Allergy* 1981, 36, 39-47.
 71. ParisKohler A., Demoly P., Persi L., Lebel B., Lebel B., Bousquet J., Arnoux B. — "In vitro" diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorometric analysis of basophils. *J. Allergy Clin Immunol.* 2000, 105, 339-345.
 72. Sabbah A. — Étude préliminaire du test d'activation des basophiles à l'aide d'anticorps membranaire par cytométrie de flux. *Allergie Immuno.* 1995, 27, 274-276.
 73. Sainte-Laudy J., Le Provost A., Andre C., Vallon C. — Comparison of four methods for human basophil activation measurement. In *Proceedings 16th EAACI Congress 1995*, Basomba A., Hernandez MD (ed) 1995, pp 257-260.
 74. Sainte-Laudy J., Sabbah A., Drouet M., Lauret M.G., Loiry M.L. — Flow cytometric analysis of basophil activation. *Inflam. Res.* 1996, 45, suppl. 1, 535-36.
 75. Sainte-Laudy J. — Application of flow cytometry to the analysis of activation of human basophils. *Immunologie validation of method. Allergie Immunol.* 1998, 30, 41-43.
 76. Sainte-Laudy J., Sabbah A., Drouet M., Lauret M.G., Loiry M. — Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotrienes for release. *Am. Exp. Allergy* 2000, 30, 1166-1171
 77. Sanz M.L., De Weck A.L., Gamboa P. M., Sanchez G. et al. — Flow cytometric cellular allergen stimulation test in latex allergy. *Allergy* 2000, 55, suppl. 63, 22.
 78. Sanz M.L., De Weck A.L., Vasuf C., Gamboa P.M., Chazot M. — Determination by flow cytometry of activated basophils in patients allergic or pseudo-allergic to various allergens and drugs. A new diagnostic test (FAST). *Allergy* 2000, 63, suppl. 63, 25.
 79. Sanz M.L., Sanchez G., Gamboa P.M., et al. — Allergen induced basophil activation : CD63 cells expression detected by flow cytometry in patients allergic to Dpteronysium and Lolium perenne. *Clin Exp. Allergy* 2001, 31, 1007-1013.
 80. Boumiza R., Monneret G., Forssier et al. — Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203C instead of CD63. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33, 208-21.
 81. Palma-Carlos M.L., Palma-Carlos A.G. — Effect of grass pollen allergoid immunotherapy on specific IgE and basophil response. *Allergy* 1993, 48, 70.
 82. Palma-Carlos A.G., Palma-Carlos M.L. — Effect of immunotherapy on specific IgE and basophil response. *ACI Int.* 1997, suppl. 4, 200.
 83. De Weck A.L., Sainte-Laudy J. — Drug Allergy and ENDA. *ACI Int.* 2002, 14, 181-182.