

**IMUNOREATIVIDADE TARDIA NÃO MEDIADA POR IgE A ÁCAROS DA
POEIRA DOMÉSTICA DEMONSTRADA POR TESTE DE INIBIÇÃO DA
ADERÊNCIA DO LEUCÓCITO E POR PROVA DE PROVOCAÇÃO NASAL –
ESTUDO DE DOIS CASOS**

**NON-IGE-MEDIATED DELAYED IMMUNOREACTIVITY TO HOUSE DUST MITE
DEMONSTRATED BY LEUCOCYTE ADHERENCE INHIBITION TEST AND
NASAL CHALLENGE TEST – REPORT OF TWO CASES**

**Celso Eduardo Olivier¹; Regiane Patussi dos Santos Lima²; Raquel Acácia Pereira
Gonçalves dos Santos²; Daiana Guedes Pinto³; Conceição Aparecida Vilella⁴**

¹ Doutorando em Clínica Médica junto à Disciplina de Alergia e Imunologia do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

² Acadêmicas de Biomedicina da Faculdade Anhanguera de Santa Bárbara.

³ Biomédica do Instituto Alergoimuno para diagnóstico em Alergias de Americana.

⁴ Doutora em Ciências Médicas - Pesquisadora do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Autor responsável:

Celso Eduardo Olivier - email: celso@docsystems.med.br

Palavras-chave: rinite idiopática, teste da inibição da aderência do leucócito, ácaro da poeira doméstica, prova de provocação nasal, hipersensibilidade não-mediada por IgE

Keywords: idiopathic rhinitis, leukocyte adherence inhibition test, house dust mite, nasal challenge test, non-IgE-mediated hypersensitivity

RESUMO

A caracterização dos mecanismos inflamatórios em pacientes com diagnóstico de “Rinite Idiopática” é um desafio para os médicos que investigam a etiologia das doenças alérgicas. Duas pacientes com este diagnóstico, após investigação etiológica com testes cutâneos negativos e dosagens de IgE específica normais, foram submetidas à prova de provocação nasal com extrato de ácaros. Obteve-se reação nasal tardia após uma hora da aplicação do antígeno, com intensidade máxima dos sintomas após quatro horas da aplicação. O muco nasal foi colhido na primeira hora para contagem de eosinófilos. Foram colhidas amostras de sangue para o teste de inibição da aderência do leucócito realizados segunda a técnica descrita por Halliday. A citologia nasal demonstrou 34,4% de eosinófilos no primeiro caso e 54,8% no segundo caso. A taxa de aderência controle dos leucócitos foi de 75,1% para o primeiro caso e

de 96% para o segundo caso. A inibição da aderência induzida pelo enfrentamento antigênico no primeiro caso foi de 91,5% para *Dermatophagoides pteronyssinus* e de 93,4% para *Dermatophagoides farinae*. Para o segundo caso, obteve-se 100% de inibição de aderência para os três ácaros testados (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*). Não houve inibição da aderência para extratos de leite de vaca e carne de frango. O teste de inibição de aderência do leucócito mostrou-se um teste promissor para identificação de imunidade celular específica a antígenos respiratórios com potencial para preencher uma lacuna importante no diagnóstico de doenças de hipersensibilidade tardia.

ABSTRACT

The identification of the intrinsic mechanisms behind mucosal inflammatory processes on patients with idiopathic rhinitis is a challenge to doctors used to investigate the etiology of allergic diseases. Two patients with diagnosis of idiopathic rhinitis, after an extensive investigation with negative cutaneous tests and normal specific IgE dosages were submitted to nasal challenge test with house dust mite extracts. After absence of immediate reactions, it was observed a late reaction with nasal discharge, nasal blockage, repeated sneezes initializing one hour after challenge with peak of symptoms by four hours from challenge. Nasal mucus was collected after one hour to count eosinophils. Blood samples were collected and submitted to leukocyte adherence inhibition test as described by Haliday. Nasal cytology revealed a count of eosinophils of 34,4% on first case and 54,8% on second case. The leukocyte adherence rate was 75,1% in the first patient and 96% in second patient. Inhibition of leukocyte adherence was 91,5% for *Dermatophagoides pteronyssinus* and 93,4% for *Dermatophagoides farinae* in first patient. On the second patient, it was observed 100% of inhibition on leukocyte adherence for all three mites tested (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *Blomia tropicalis*). There was no inhibition on adherence for food allergens (milk and chicken meat). Leukocyte adherence inhibition test was able to demonstrate cellular immunoreactivity to respiratory allergens with potential to play a role on diagnosis of delayed hypersensitivity reactions.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A caracterização etiológica da hipersensibilidade imune está atualmente relativamente bem definida para as doenças originadas por hiperprodução de anticorpos. Os testes cutâneo-alérgicos e as técnicas sorológicas para a quantificação das imunoglobulinas específicas (não só da classe IgE, como também das subclasses de IgG e IgA), vêm sendo amplamente utilizados na prática clínica para fundamentar o diagnóstico clínico-laboratorial das doenças imunes humorais. No entanto, a caracterização das doenças de hipersensibilidade de natureza celular ainda encontra-se bastante deficiente pela escassez de exames complementares disponíveis e de centros diagnósticos que os executem de rotina. Desta maneira, a prevalência

das doenças desta natureza ainda é uma incógnita para a sociedade científica, assim como a caracterização individual dos mecanismos envolvidos, principalmente em decorrência da diversidade e da inespecificidade dos sintomas associados. Deste a publicação clássica de Gell e Coombs (Gell e Coombs, 1968), houve poucas mudanças em relação à classificação das doenças de hipersensibilidade. As reações do tipo I de Gell e Coombs são as mediadas por IgE que degranulam diretamente as células efectoras (mastócitos e basófilos) com liberação dos autacóides pré e pós-formados. As reações do tipo II são caracterizadas por interações antígeno-anticorpo que ativam complemento e estimulam a produção local de anafilatoxinas (C3a e C5a) que recrutam leucócitos polimorfonucleares. Estes liberam enzimas hidrolíticas que promovem as lesões subseqüentes. As reações do tipo III são desencadeadas por imunocomplexos circulantes, mas também dependem de células citotóxicas efectoras, assim como do sistema de complemento. As reações do tipo IV são mediadas por células e independem de anticorpos séricos específicos. Já se propôs incluir nesta classificação as reações de hipersensibilidade do tipo V que envolveriam as reações granulomatosas (Rajan, 2003).

A investigação etiológica dos processos alérgicos envolve basicamente a pesquisa de anticorpos específicos para os alérgenos suspeitos, os testes cutâneo-alérgicos e as provas de provocação ou enfrentamento antigênico (Bernstein et al, 2008). A prova de provocação nasal é um teste simples, capaz de evidenciar dois grupos de respostas: as reações imediatas e as reações tardias. As reações imediatas estão associadas à estimulação inespecífica, enquanto que as reações tardias estão classicamente associadas às reações antígeno-específicas (Miyahara et al, 2008).

A avaliação *in vitro* da imunorreatividade celular frente a antígenos específicos tem sido realizada de maneira bastante tímida, principalmente no estudo das doenças de hipersensibilidade (Nordqvist e Rorsman, 1967; Goring et al, 1983). Os dois únicos testes diagnósticos listados pelas tabelas da Associação Médica Brasileira (teste de inibição da aderência do leucócito e o teste de inibição da migração do leucócito) são procedimentos raramente realizados pelos laboratórios clínicos. O teste de inibição da aderência do leucócito é um procedimento artesanal descrito em 1972 por Halliday para detecção de antígenos tumorais envolvidos na imunidade mediada por células (Halliday e Miller, 1972). Tem similaridade com o correlato teste de inibição da migração do leucócito (Bullen e Losowsky, 1978). São testes descritos para a detecção de imunorreatividade celular a antígenos tumorais (Dgani et al, 1993), com relatos na literatura para a demonstração de imunorreatividade a alérgenos exógenos, como por exemplo, a poeira doméstica, a candidina, o PPD (Kuratsuji,

1981), a beta-lactoglobulina bovina (Ashkenazi et al, 1980) e o glúten (Ashkenazi et al, 1978). A conferência da propriedade de não-aderência do leucócito ao vidro induzida pelo enfrentamento com antígenos específicos depende basicamente de mecanismos celulares (Kuratsuji, 1981) nos quais estariam envolvidos diversos tipos de células (Tong et al, 1979). Aventa-se que estes testes avaliem indiretamente a liberação de citocinas pelos linfócitos T. Quando ativados pela presença do antígeno específico, os linfócitos liberariam um fator solúvel (teorizado como o Fator de Inibição da Aderência do Leucócito ou LAIF de “Leukocyte Adherence Inhibition Factor”) que atuaria sobre os leucócitos conferindo a propriedade de não-aderência ao vidro (Halliday, 1979). O envolvimento dos linfócitos T foi sugerido pela observação de que a administração de anticorpos murinos anti- θ (anti-theta) cancela a inibição da aderência (Holt et al, 1975). Os anticorpos murinos anti- θ são dirigidos especificamente contra o antígeno CH3 associados ao linfócito T (Greaves e Raff, 1971). Como os linfócitos T não são capazes de ligar-se diretamente ao antígeno (sendo dependentes da apresentação antigênica dentro do contexto TCR-MHC II), fica evidente que outras células ou outros componentes estão envolvidos. Ainda não foi desvendado de maneira satisfatória todos os mecanismos celulares e as citocinas envolvidas neste processo, porém demonstrou-se que os leucotrienos, e em especial o LTC₄, são fatores importantes no processo (Fink et al, 1985 - a) modulados pela secreção de interferon (Fink, et al, 1985 - b). O objetivo do presente trabalho é rever a utilidade do teste de inibição da aderência do leucócito como uma prova *in vitro* para demonstração de imunorreatividade celular antígeno-específica a alérgenos ambientais, na perspectiva de resgatar uma ferramenta potencial na investigação etiológica das doenças de hipersensibilidade tardia a antígenos protéicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Duas pacientes do sexo feminino (OM de 49 anos e RPSL de 24 anos) com sintomas semelhantes (prurido nasal, espirros em salva, rinorréia hialina, tamponamento nasal e lacrimejamento associados à exposição à poeira doméstica) foram clinicamente diagnosticadas como rinite persistente moderada/grave segundo os critérios do grupo ARIA (Bousquet et al, 2001). Após investigação habitual inconclusiva através de testes cutâneo-alérgicos pelo método de puntura (skin prick test), dosagem de IgE específica (Immunocap) e prova de provocação nasal (com mistura de ácaros) não reagente em um momento inicial, observou-se uma reação tardia à prova de provocação nasal (Lebel et al, 1988) que resultou em intenso prurido nasal, rinorréia hialina e espirros em salva. Procedeu-se à coleta de muco nasal uma hora após o enfrentamento e coletou-se amostra de sangue para o teste de inibição

da aderência do leucócito, realizado com sangue fresco anticoagulado em EDTA, sedimentado a 37°C por uma hora para separar as hemáceas dos leucócitos. A seguir a amostra de plasma é dividida em pelo menos duas partes, sendo que uma serve como controle e a(s) outra(s) é(são) enfrentada(s) com o(s) antígeno(s) em estudo por meia hora em agitação orbital a 200 rpm a 37°C. Para se obter uma quantidade suficiente de leucócitos separa-se 1mL de plasma em um tubo de Eppendorf para cada antígeno testado. Para cada tubo adiciona-se 100 µL de solução de extrato comercial do antígeno a 20% (adquirido de FDA Allergenic – Rio de Janeiro – RJ – Brasil). Após enfrentamento com antígeno por 60 minutos a 37°C em agitação suave, as amostras de plasma são alocadas em câmaras hemocitométricas não espelhadas (Neubauer) e deixadas por duas horas em câmara úmida a 37°C para permitir a aderência dos leucócitos ao vidro da lâmina. A seguir os leucócitos são contados, lava-se a câmara hemocitométrica gentilmente com movimento vertical único em um Becker com PBS a 37°C. A seguir coloca-se outra lamínula, completa-se a câmara com PBS a 37°C e contam-se novamente os leucócitos restantes (aderidos). Realiza-se o mesmo procedimento no plasma controle e observa-se a diferença na aderência entre as duas leituras. Quando existe uma completa inibição da aderência pelo contato do antígeno, após a lavagem da câmara enfrentada não se observam mais leucócitos, enquanto que na câmara do controle, os leucócitos permanecem aderidos ao vidro. Antes da lavagem pode-se estimar a aderência do leucócito com leves movimentos da lamínula durante a microscopia, quando se observa a aderência ou a movimentação livre das células sobre a lâmina. Após as contagens nas câmaras realiza-se então o cálculo da porcentagem de aderência da solução controle e da(s) solução(ões) de antígeno(s) que corresponde à contagem pós-lavagem dividida pela contagem pré-lavagem multiplicada por 100. A taxa de inibição da aderência (TIA) é calculada segundo a fórmula $TIA = [1 - (\% \text{ células aderentes da amostra enfrentada} / \% \text{ células aderentes da amostra controle})] \times 100$ (Holt et al, 1975).

RESULTADOS

Os resultados analíticos de cada paciente encontram-se nas tabelas 1 e 2. A citologia nasal demonstrou 34,4% de eosinófilos no primeiro caso e 54,8% no segundo caso. A taxa de aderência do controle foi de 75,1% para o primeiro caso e de 96% para o segundo caso. O aspecto da câmara hemocitométrica antes e após lavagem do controle para o primeiro paciente é mostrado na Figura 1. A taxa de inibição da aderência para o primeiro paciente foi para *Dermatophagoides pteronyssinus* de 91,5% e para *Dermatophagoides farinae* de 93,4%. Para o segundo paciente, obteve-se 100% de inibição de aderência para os três ácaros testados (*D.*

pteronyssinus, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*). O aspecto da câmara hemocitométrica enfrentada com *D. pteronyssinus* antes e após lavagem é mostrado na Figura 2. O extrato de mistura de polens demonstrou 39,1% de inibição da aderência no primeiro paciente. O extrato de leite de vaca demonstrou 19% de inibição da aderência para o segundo paciente. O extrato de carne de frango demonstrou 2% de inibição da aderência para o segundo paciente.

Tabela 1 - Resultados dos testes da primeira paciente.

| <i>Paciente 1 (OM)</i> | <i>Resultados</i> |
|--|-------------------|
| Eosinófilos do Muco nasal após provocação com ácaros-mix | 34,4% |
| IgE Total | 28,8 UI/ml |
| IgE específico para <i>D. pteronyssinus</i> | < 0,35 KU/mL |
| IgE específico para <i>D. farinae</i> | < 0,35 KU/mL |
| Teste de puntura para <i>D. pteronyssinus</i> | 0 |
| Teste de puntura para <i>D. farinae</i> | 0 |
| Teste de puntura para fungos-mix | 0 |
| Teste de puntura para polens-mix | 0 |
| Teste de puntura controle Positivo | 4 mm |
| Teste de puntura controle Negativo | 0 |
| Taxa de Aderência do Controle | 75,1% |
| Taxa de Inibição da Aderência para <i>D. pteronyssinus</i> | 93,4% |
| Taxa de Inibição da Aderência para <i>D. farinae</i> | 91,5% |
| Taxa de Inibição da Aderência para fungos-mix | 75,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para polens-mix | 39,1% |

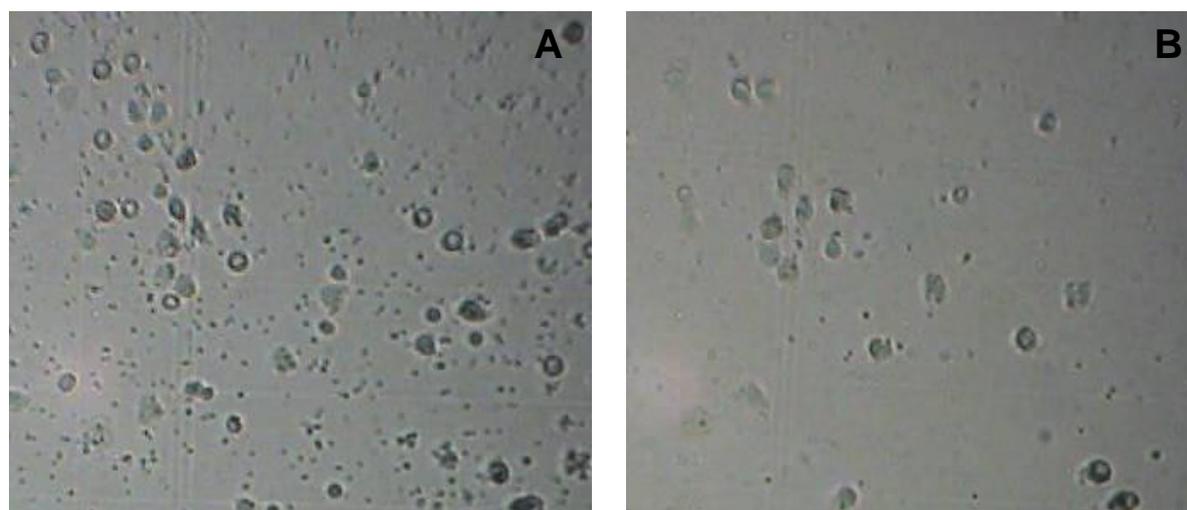


Figura 1 - Aspecto da câmara hemocitométrica antes (A) e após (B) a lavagem em PBS no controle com taxa de aderência do leucócito = 75,1% (paciente 1).

Tabela 2 - Resultados dos testes da segunda paciente.

| <i>Paciente 2 (RPSL)</i> | <i>Resultados</i> |
|--|-------------------|
| Eosinófilos do Muco nasal após provocação com ácaros-mix | 54,8% |
| IgE Total | 5,5UI/ml |
| IgE específico para <i>D. pteronyssinus</i> | < 0,35 KU/mL |
| IgE específico para <i>D. farinae</i> | < 0,35 KU/mL |
| IgE específico para <i>B. tropicalis</i> | < 0,35 KU/mL |
| IgE específico para fungos-mix | < 0,35 KU/mL |
| Teste de puntura para <i>D. pteronyssinus</i> | 0 |
| Teste de puntura para <i>D. farinae</i> | 0 |
| Teste de puntura para fungos-mix | 0 |
| Teste de puntura para polens-mix | 0 |
| Teste de puntura para leite de vaca | 0 |
| Teste de puntura controle Positivo | 5 mm |
| Teste de puntura controle Negativo | 0 |
| Taxa de Aderência do controle | 96,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para <i>D. pteronyssinus</i> | 100,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para <i>D. farinae</i> | 100,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para <i>B. tropicalis</i> | 100,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para fungos-mix | 100,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para carne de frango | 2,0% |
| Taxa de Inibição da Aderência para leite de vaca | 19,0% |

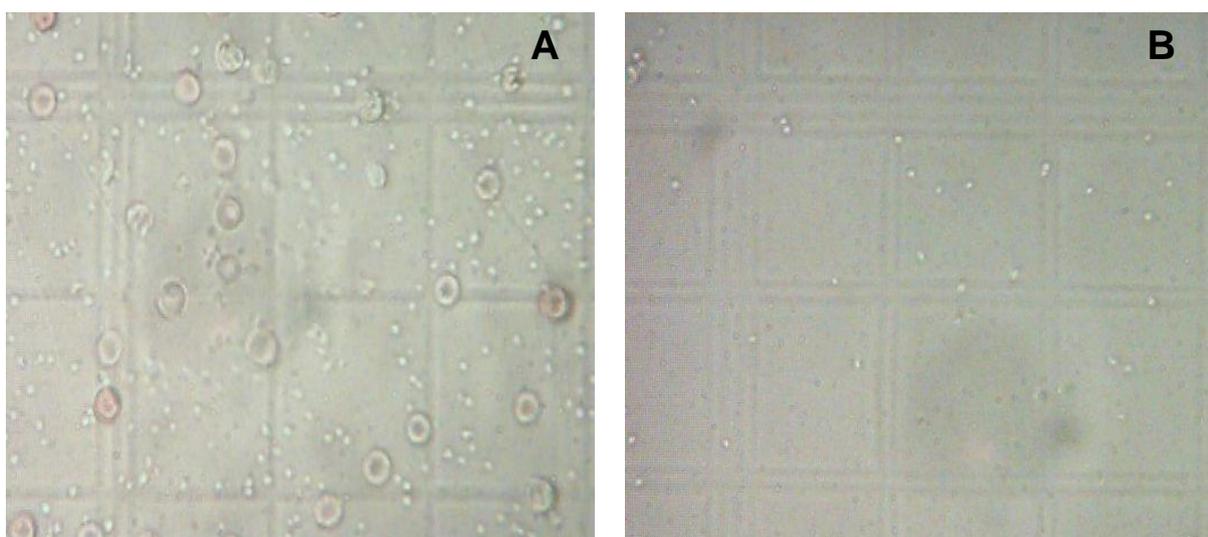


Figura 2 - Aspecto da câmara hemocitométrica antes (A) e após (B) a lavagem em PBS com 100% de inibição da taxa de aderência do leucócito após enfrentamento antigênico com *Dermatophagoides pteronyssinus* (paciente 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, apresentamos dois pacientes com quadro de rinite persistente investigados à exaustão pelos meios diagnósticos usuais (dosagem de IgE específica, testes cutâneo-alérgicos e prova de provocação nasal) que resultaram negativos em um momento inicial. Chamou a atenção o fato de que estes pacientes apresentaram reações tardias à prova de provocação nasal (início após uma hora da administração do antígeno e intensidade máxima dos sintomas após quatro horas), que sugeriram um mecanismo de imunorreatividade celular ou humoral-celular. Com a oportunidade de coletar o muco nasal após uma hora do enfrentamento observou-se a migração de eosinófilos para o muco nasal, inexistente na coleta inicial realizada logo em seguida à administração nasal do antígeno. Realizou-se o enfrentamento “*in vitro*” com os antígenos suspeitos pela história e pela prova de provocação na perspectiva de evidenciar algum tipo de imunorreatividade específica a estes agentes. Como controle para o teste, utilizou-se o próprio plasma dos pacientes, sem o enfrentamento antigênico e adicionalmente com o enfrentamento feito com antígenos alimentares irrelevantes. Apesar de não existirem referências para valores normais na literatura para este teste, a inibição da aderência com os antígenos suspeitos foi marcadamente diferente do que aconteceu nos controles. O teste de inibição da aderência do leucócito é uma prova de enfrentamento realizada “*in vitro*” para detecção de imunorreatividade celular específica a antígenos suspeitos de serem responsáveis por doenças de hipersensibilidade. Da mesma maneira que os testes cutâneos ou a dosagem de IgE específica, o teste de inibição da aderência do leucócito não confirma o envolvimento do antígeno na fisiopatologia da doença, mas demonstra imunorreatividade ao antígeno testado e portanto a possibilidade de que esteja envolvido. O diagnóstico do envolvimento do agente etiológico no processo fisiopatológico é realizado com o conjunto de informações proporcionadas pela cuidadosa anamnese, exame físico, os testes de sensibilidade e as provas de provocação envolvendo o órgão afetado. Por requerer um profissional especificamente treinado, o teste de inibição da aderência do leucócito é um exame pouco executado nos laboratórios clínicos, porém é um dos exames mais factíveis para evidenciar mecanismos de imunorreatividade celular a antígenos específicos no diagnóstico de hipersensibilidade imune não mediada por IgE. Apesar de, neste relato de casos, não existir suficiência estatística para generalizar conclusões a nível populacional, o teste de inibição da aderência do leucócito mostrou-se uma prova de enfrentamento “*in vitro*” promissora para detectar imunorreatividade celular a antígenos ambientais. Sugere-se a realização de estudos mais amplos para abalizar a utilidade analítica deste teste como ferramenta na prática clínica do imunologista.

REFERÊNCIAS

- Ashkenazi A, Idar D, Handzel ZT et al. An in-vitro immunological assay for diagnosis of coeliac disease. *Lancet*. 1(8065): 627-629, 1978.
- Ashkenazi A, Levin S, Idar D et al. In Vitro Cell-Mediated Immunologic Assay for Cow's Milk Allergy. *Pediatrics*. 66(3): 399-402, 1980.
- Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 100(3 Suppl 3): S1-148, 2008.
- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin. Immunol*. 108(5 Suppl): S147-334, 2001.
- Bullen AW, Losowsky MS. Comparison of a leucocyte adherence test with the leucocyte migration inhibition test and skin reactivity to PPD. *Clin. Exp. Immunol*. 31(3): 408-413, 1978.
- Dgani R, Shani A, Elchalal U et al. The leukocyte adherence inhibition test (LAI) in preoperative diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. 49(3): 349-353, 1993.
- Fink A, Bibi H, Eliraz A et al. Leukotrienes (LTC₄, LTD₄) confer glass non-adherence on leukocytes of asthmatic individuals. Dependency on cyclooxygenase products and calcium ion. *Immunol. Lett*. 10(6): 319-323, 1985.
- Fink A, Shahin R, Eliraz A et al. Interferon modulates the leukotriene C₄-induced non-adherence properties of leukocytes: acquisition of an asthmatic phenotype. *Immunol. Lett*. 10(3-4): 159-163, 1985.
- Gell PGH, Coombs RRA Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease. In: Gell PGH and Coombs RRA: *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford: Ed. Blackwell Scientific Publications, 1968. p.575-596.
- Goring HD, Gey M, Schubert H. Leukocyte adherence inhibition test (LAIT) as an allergy test in the diagnosis of drug exanthema and allergic contact eczema. *Dermatol. Monatsschr*. 169(6): 380-384, 1983.
- Greaves MF, Raff MC. Specificity of anti-theta sera in cytotoxicity and functional tests on T lymphocytes. *Nat. New Biol*. 233(42): 239-241, 1971.
- Halliday WJ. Historical Background and Aspects of the Mechanism of Leukocyte Adherence Inhibition. *Cancer Res*. 39(2): 558-563, 1979.
- Halliday WJ, Miller S. Leukocyte adherence inhibition: a simple test for cell-mediated tumour immunity and serum blocking factors. *Int. J. Cancer*. 9(3): 477-483, 1972.
- Holt PG, Roberts LM, Fimmel PJ et al. The L.A.I. microtest: a rapid and sensitive procedure for the demonstration of cell-mediated immunity in vitro. *J. Immunol. Methods*. 8(3): 277-288, 1975.
- Kuratsuji T. Studies on leukocyte adherence inhibition test. Part I. Studies on mechanisms of leukocyte adherence inhibition. *Keio J. Med*. 30(2): 53-63, 1981.
- Kuratsuji T. Studies on leukocyte adherence inhibition test. Part II. Clinical applications of LAI test to detect delayed type hypersensitivity in infants and children. *Keio J. Med*. 30(2): 65-69, 1981.
- Lebel B, Bousquet J, Morel A et al. Correlation between symptoms and the threshold for release of mediators in nasal secretions during nasal challenge with grass-pollen grains. *J. Allergy Clin. Immunol*. 82(5): 869-77, 1988.

- Miyahara S, Miyahara N, Lucas JJ et al. Contribution of allergen-specific and nonspecific nasal responses to early-phase and late-phase nasal responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121(3): 718-724, 2008.
- Nordqvist B, Rorsman H. Leucocytic migration in vitro as an indicator of allergy in eczematous contact dermatitis. *Trans. St. Johns Hosp. Dermatol. Soc.* 53(2): 154-9, 1967.
- Rajan TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* 24(7): 376-379, 2003.
- Tong AW, Burger DR, Finke P et al. Assessment of the mechanism of the leukocyte adherence inhibition test. *Cancer Res.* 39(2): 597-603, 1979.