Paulo Ricardo Criado

**A resposta inflamatória na urticária aguda
associada a medicamentos : avaliação
imunoistoquímica e imunoeletrônica da
unidade microvascular da derme**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Cidia Vasconcellos

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Criado, Paulo Ricardo

A resposta inflamatória na urticária aguda associada a medicamentos : avaliação imunoistoquímica e imunoelétrica da unidade microvascular da derme / Paulo Ricardo Criado. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Cidia Vasconcellos.

Descritores: 1.Urticária 2.Erupção por droga 3.Imunoistoquímica 4.Microscopia imunoelétrica 5.Mastócitos 6.Inflamação 7.Triptases 8.Fator XIIIa 9.Macrófagos 10.Células endoteliais 11.Fagocitose 12.Terminações nervosas/ultraestrutura 13.Exocitose

USP/FM/SBD-251/07

DEDICATÓRIA

*À minha filha Giulia que me ensinou o verdadeiro sentido da
vida: nada é maior que o verdadeiro amor.*

*À Roberta minha esposa, brilhante médica, que me inspira e cujo
amor nos deu nossa filha, o propósito maior das nossas vidas.*

*Ao meu pai Mariano e minha mãe Margarida cujo sonho e esforço
me conduziram até aqui.*

*Aos doentes que sofrem de urticária, que nossa missão como
médicos possa aliviar seu sofrimento físico e moral.*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Cidia Vasconcellos, Dermatologista, Vice-Chefe do Laboratório de Investigação Médica (LIM) 53, Micologia Médica, da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) minha orientadora no mestrado e no doutorado, cuja capacidade profissional, paciência, estímulo e amizade verdadeira, tornaram possível a execução deste projeto, além de ser responsável em grande parte pelo meu crescimento pessoal e profissional, minha eterna amizade e meu agradecimento sincero.

A Dra. Roberta Fachini Jardim Criado, Alergologista da Disciplina de Dermatologia e Pneumologia da Faculdade de Medicina do ABC, entusiasta no estudo da urticária, pelas observações relevantes neste projeto e, como esposa, minha gratidão pela paciência pelas horas roubadas do convívio familiar.

Ao Prof. Dr. Jose Eduardo Costa Martins, Professor Titular do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a quem admiro pelo entusiasmo pela dermatologia, desde o início de minha formação dermatológica, minha eterna gratidão por acreditar em mim, me permitir à rica experiência profissional de trabalhar na honrada Casa de Arnaldo, e oferecer sua preciosa amizade.

Ao Prof. Dr. Evandro Arigbóia Rivitti, Professor Titular do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a quem sempre admirei desde o meu início na dermatologia, por me receber de forma cordial no Departamento de Dermatologia, permitindo concretizar um sonho profissional, o de poder partilhar do seu convívio e sabedoria, meu eterno agradecimento.

À Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte, Professora Titular do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo e Responsável pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, por me receber tão gentilmente no seu Laboratório e permitir nele a execução deste projeto de Doutorado.

À Profa Dra. Mirian Nacagami Sotto, Professora associada e médica supervisora da Universidade de São Paulo, Departamento de Dermatologia, a qual desde o início do meu exercício profissional tem nos estimulado na pesquisa na Dermatologia, fazendo sugestões preciosas ao mestrado e ao doutorado, nosso agradecimento pelo Curso de Pós-graduação e pela amizade.

À Dra. Cleusa Fumica Hirata Takakura, Bióloga do Departamento de Patologia da FMUSP, pela dedicação a esta tese, paciência na sua execução, estímulo ao projeto, os quais se expressaram pelas inúmeras horas aplicadas a este estudo, nosso profundo e eterno agradecimento, além de nossa grande admiração pela competência profissional.

À Profa. Dra. Carla Pagliari, Bióloga especialista de laboratório (superior III) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pesquisadora do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP, sem cujo conhecimento e capacidades profissionais não teríamos como executar este projeto.

Ao Sr. Cleiton Alves, Biólogo responsável pelo Laboratório de Dermatologia Tropical, do Departamento de Dermatologia da FMUSP, pelo auxílio prestimoso no estudo imunoistoquímico do nosso projeto, agradecemos sua competência profissional e sua inestimável colaboração.

À Profa Dra. Neusa Yuriko Sakai Valente, Dermatologista do Departamento de Dermatologia da FMUSP, responsável pelo setor de Dermatopatologia do Serviço de Dermatologia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, nossa eterna gratidão pelos primeiros passos no aprendizado da Dermatologia, nossa profunda admiração pela competência profissional, nosso apreço pelo espírito crítico nas decisões médicas, nossa admiração pelo caráter irrepreensível, nosso agradecimento pelas sugestões e observações construtivas e principalmente nossa gratidão pelo bem mais precioso, sua amizade.

Ao Prof. Dr. Thales F. de Brito, Professor Titular Emérito de Patologia da Universidade de São Paulo e Professor Titular Emérito de Patologia da Universidade de São Paulo, pela recepção gentil ao nosso projeto e colaboração do seu Laboratório.

Ao Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza, Professor Livre-Docente da Universidade Estadual de Campinas, Dermatologista, pelas sugestões construtivas e oportunas durante nosso exame de qualificação à defesa de doutorado.

A Profa Dra. Maria Natomi Sato, Biomédica, pesquisadora do LIM-56 do Departamento de Dermatologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelas sugestões relevantes a esta tese, durante nosso exame de qualificação à defesa de doutorado.

A Profa. Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira, Dermatologista e Professora do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas diversas sugestões a esta tese quando presente ao exame de qualificação à defesa de doutorado.

A Profa Dra. Marli de Jesus Ferreira Calux, Dermatologista do Serviço de Dermatologia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, pela presença e pelas críticas construtivas a esta tese durante nosso exame de qualificação à defesa de doutorado.

Aos Médicos Residentes do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração no envio de doentes com urticária para este estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) do Departamento de Patologia da FMUSP pela gentileza na disponibilização do uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Ao corpo de enfermagem da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela assistência e apoio.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em particular a Sra. Valéria de Vilhena Lombardi pelo apoio e presteza no auxílio ao levantamento bibliográfico.

À Profa Dra. Celina W. Maruta, Professora do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, sugestões e colaboração no referenciamento de doentes ao nosso estudo.

Aos médicos do Pronto Socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em particular à Profa. Dra. Soraia Baracat Awada, diretora do Pronto Socorro do HC-FMUSP, pelo auxílio no referenciamento dos doentes com urticária aguda.

EPÍGRAFE

“Tupy or not tupy that is the question”

Oswald de Andrade

Manifesto Antropofágico, publicado em 1928.

“Só me interessa o que não é meu. Lei do homem. Lei do Antropófago” anunciava o Manifesto Antropofágico. A Antropofagia recomendava comer-se culturalmente tudo o que se apresentasse, para digerir-se em seguida da forma que determinassem o sol e a selva destas tropicais paragens.

Trecho retirado de “A Capital da Solidão. Uma história de São Paulo das origens a 1900” de Roberto Pompeu de Toledo.

“Da mesma forma, a ciência recomenda comer-se tudo que se apresenta, para digerir-se em seguida da forma que a razão assim determina. Pensamento do autor”.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de biblioteca e documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de siglas	
Lista de figuras	
Lista de quadros e gráficos	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Urticária associada a medicamento	9
3.2 Elementos celulares da resposta inflamatória na urticária	16
3.3 A unidade microvascular dérmica (UMD).....	22
3.4 Ultra-estrutura da urticária.....	52
4. MÉTODOS.....	56
4.1 Universo de doentes	57
4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	57
4.3 Descrição da casuística	58
4.4 Fluxograma	61
4.5 Técnicas.....	62
4.5.1 Técnica de Imunoistoquímica	62
4.5.1.1 Marcação simples pela imunoistoquímica.....	64
4.5.1.2 Dupla Marcação pela Imunoistoquímica:	66
4.5.1.3 Contagem de células à imunoistoquímica.....	67
4.5.1.4 Análise estatística	68
4.5.2 Microscopia Imunoeletrônica de transmissão (MIMET)	68
4.5.2.1 Técnica da microscopia imunoeletrônica de transmissão.....	68
4.5.2.2 Técnica da Dupla microscopia imunoeletrônica de transmissão (DMIMET).....	70
4.5.2.3 Avaliação dos achados ultra-estruturais nas biopsias da pele dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos.....	71

5. RESULTADOS.....	73
5.1 Aspectos Clínicos.....	74
5.2 Microscopia Óptica de Luz (MOL) e Estudo Imunoistoquímico (EI).....	75
5.3 Microscopia imunoeletrônica de transmissão (MIMET).....	99
5.3.1 Aspectos Gerais	99
5.3.2 Organelas Vésico-vacuolares (OVV).....	101
5.3.3 Mastócitos	107
5.3.4 Dendrócitos da Derme.....	117
5.3.5 Dupla microscopia imunoeletrônica de transmissão (DMIMET).....	120
5.3.6 Conjunto de achados ultra-estruturais nas biopsias de pele dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos	135
6. DISCUSSÃO.....	140
6.1 Mastócitos.....	141
6.1.1 Degranulação dos mastócitos na pele aparentemente sã: ..	147
6.2 Fator FXIIIa	151
6.3 Encontro do Fator XIIIa nos grânulos dos mastócitos e nos dendrócitos da derme.....	152
6.4 As Organelas Vésico-vacuolares	158
6.5 Expressão de Dendrócitos Dérmicos FXIIIa positivos na pele urticada e aparentemente sã e possíveis implicações na evolução da urticária	160
6.6 Perspectivas de estudo.....	165
7. CONCLUSÕES.....	166
8. ANEXOS.....	169
9. REFERÊNCIAS	188

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: ácido acetilsalicílico

AINH: antiinflamatório não-hormonal

Anti-COX: anti-ciclooxigenase

Anti-COX1: anti-ciclooxigenase 1

APC: célula apresentadora de antígeno

BSA: albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)

CD: grupo de diferenciação (Cluster of Differentiation)

CDD: células dendríticas dérmicas

CEMD: células endoteliais da microvasculatura da derme

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Calcitonin-Related Peptide)

c-Kit: receptor da tirosina quinase transmembrana (CD117)

CL: célula da Langerhans

COX: ciclooxigenase

CRF: fator liberador de corticotropina

DAN: degranulação tipo anafilática

DD: dendrócitos da derme

DDP: dendrócitos da derme perivasculares

DII: doença inflamatória intestinal

DMIMET: dupla microscopia imunoeletrônica de transmissão

Dr: dendrito do dendrócito da derme

DSB: degranulação em saca-bocado

ECF: fator quimiotático de eosinófilos

EIH: estudo imunoistoquímico

FcεRI: receptor de alta afinidade para imunoglobulina de classe E

FcγRIII: receptor de imunoglobulina de classe G

FXIIIa: Fator XIII ativado do sistema de coagulação

GM-CSF: Fator de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos

HE: hematoxilina-eosina

HLA: antígenos leucocitários humanos

HPCA: antígeno de células progenitoras humanas (CD34)

HRF fator liberador de histamina

HSP: proteína de choque térmico (Heat Shock Protein)

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IgE: imunoglobulina da classe E

IgG: imunoglobulina da classe G

IL: interleucina

IGF: fator de crescimento insulina-símile

INF:interferon

LFA: antígeno associado a função linfocitária (lymphocyte function-associated antigen)

LSBA: estreptoavidina ligada à biotina

LT: leucotrieno

LTB: leucotrieno tipo B

LTC: leucotrieno tipo C

LTD: leucotrieno tipo D

LTE: leucotrieno tipo E

MBP: proteína básica principal

MC: mastócito

MCP (CCL): proteína quimiotática de macrófagos

MCP-1 (CCL2): proteína quimiotática de macrófagos-1

M-CSF: Fator de crescimento de colônia de monócitos

MCT: mastócitos triptase positivos

MCTC: mastócitos triptase e quimase positivos

MDPD: macrófagos dendríticos perivasculares da derme

MGF: fator de crescimento de mastócitos

MHC: principal complexo de histocompatibilidade humano

MIF: fator inibidor de macrófagos

MIMET: microscopia imunoeletrônica de transmissão

MIP (CCL): proteína inflamatória de macrófagos

MIP-1 (CCL2): proteína inflamatória de macrófagos-1

MIP-1 α (CCL3): proteína inflamatória de macrófagos-1

MIP-1 β (CCL4): proteína inflamatória de macrófagos-1

MOL: microscopia óptica de luz

MTC: mastócitos do tecido conectivo

NCF: fator quimiotático de neutrófilos

NGF: fator de crescimento neural

NO: óxido nítrico

OKM-1: molécula dependente da quimioatração, receptor para C3b (Mac-1)

OM: aumento original (original magnification)

OVV: organelas vésico-vacuolares

PAS: ácido periódico de Schiff

PAR: receptor de proteinase ativada

PBS: solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)

PAF: fator ativador plaquetário

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

RANTES (CCL5): proteína (quimiocina) regulada e expressa por ativação de células T normais (regulated upon activation normal T cell express sequence).

Receptor H1: receptor de histamina tipo 1

Receptor H2: receptor de histamina tipo 2

Receptor H3: receptor de histamina tipo 3

rhSCF: fator de crescimento de célula primordial recombinante

rTNF- α : fator de necrose tumoral alfa recombinante

RNA: ácido ribonucléico

SCF: fator de crescimento de célula primordial

TBS: solução salina tamponada com tris (Tris Buffered Saline)

TG: transglutaminase

TGF: fator de crescimento e transformação

Th1: linfócitos T auxiliares tipo 1

Th2: linfócitos T auxiliares tipo 2

TLR: receptor Toll-like

TNF: fator de crescimento tumoral

TSLP: linfopoietina do estroma tímico

UA: urticária aguda

UAAM: urticária aguda associada a medicamento

UCI: urticária crônica idiopática

UCR: urticária crônica recorrente

UMD: unidade microvascular da derme

UP: urticária de pressão

UPT: urticária de pressão tardia

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

VHB: vírus da hepatite B

VHC: vírus da hepatite C

LISTA DE SÍMBOLOS

Å: angstrom

KDa: kilodalton

μ: micra

μm: micrômetro

mm: milímetro

nm: nanômetro

pg: picograma

LISTA DE SIGLAS

CAPEPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

RG: registro geral no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

®: nome comercial

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Unidade Microvascular da Derme (UMD).	23
Figura 3.2. Possíveis estímulos imunes e não-imunes desencadeadores de degranulação mastocitária	38
Figura 3.3. Mediadores pré-formados e neoformados liberados pelos mastócitos humanos	39
Figura 3.4. Elementos celulares da fase imediata e da fase tardia da urtica	40
Figura 3.5. Tipos ultra-estruturais de degranulação mastocitária.....	45
Figura 4.1. Caso 1. Doente apresentando lesões urticadas no dorso de 3 mm a 3 cm de diâmetro	60
Figura 4.2. Caso 4. Doente com lesões urticadas no dorso e região lombar, com diâmetro de 3 mm a 2 cm.....	60
Figura 5.1A. Caso 1: lesão urticada. Observe o edema na derme superficial	76
Figura 5.1B. Caso 1: lesão urticada. Edema intersticial na derme.....	76
Figura 5.2A. Caso 5: lesão urticada. Presença de mastócitos na derme.....	77
Figura 5.2B. Caso 7: lesão urticada. Presença de mastócitos normais e depletados de grânulos.....	78
Figura 5.2C. Caso 7: pele aparentemente saudável. Presença de mastócitos normais	78
Figura 5.3. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcção para CD34	79
Figura 5.4. Caso 2: lesão urticada. Imunomarcção para CD34.....	80
Figura 5.5. Caso 4: lesão urticada. Imunomarcção para FXIIIa	83
Figura 5.6. Caso 4: lesão urticada. Imunomarcção para FXIIIa	83
Figura 5.7. Caso 5: pele urticada. Imunomarcção com FXIIIa	84
Figura 5.8. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcção para triptase	87
Figura 5.9. Caso 6: lesão urticada. Imunomarcção para triptase	88

Figura 5.10. Caso 6: lesão urticada. Imunomarcacão para triptase	89
Figura 5. 11. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa ⁺ e mastócitos triptase ⁺	92
Figura 5.12. Caso 1: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa ⁺ e mastócitos triptase ⁺	93
Figura 5.13. Caso 1: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa ⁺ e mastócitos triptase ⁺	94
Figura 5.14. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa ⁺ e mastócitos triptase ⁺	95
Figura 5.15. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa ⁺ e mastócitos triptase ⁺	96
Figura 5.16. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa ⁺ e mastócitos triptase ⁺	97
Figura 5.17. Caso 4: pele aparentemente sã. Controle negativo.	100
Figura 5.18. Caso 1: lesão urticada. Pequena vênula da derme representada por duas células endoteliais.....	102
Figura 5.19. Caso 4: lesão urticada. Pequena vênula da derme representada por duas células endoteliais.....	103
Figura 5.20. Caso 4: pele aparentemente sã. Vênula constituída por duas células endoteliais	104
Figura 5.21. Caso 3: pele urticada. Célula endotelial apresentando imunomarcacão com ouro para o FXIIIa	105
Figura 5.22. Caso 4: pele urticada. Célula endotelial apresentando dupla imunomarcacão com ouro para o FXIIIa.....	106
Figura 5.23. Caso 1: lesão urticada. Prolongamentos finos e alongados, que constituem os dendritos (dr) dos dendrócitos dérmicos (DD)	107
Figura 5.24A. Caso 1: lesão urticada. Prolongamentos finos e alongados, que constituem os dendritos (dr) dos dendrócitos dérmicos (DD)	108
Figura 5.24B. Caso 1: lesão urticada. Prolongamentos finos e alongados, que constituem os dendritos (dr) dos dendrócitos dérmicos (DD)	109
Figura 5.25. Caso 3: pele aparentemente sã. Mastócito com formato fusiforme.	110

Figura 5.26. Caso 4: pele aparentemente normal. Unidade Microvascular da Derme (UMD).....	111
Figura 5.27. Caso 7: lesão urticada. Degranulação mastocitária.....	112
Figura 5.28A. Caso 4: lesão urticada. Mastócito em degranulação.....	113
Figura 5.28B. Caso 4: pele urticada. Detalhe da foto anterior.	114
Figura 5.29. Caso 5: pele urticada. Mastócito degranulando com canais de degranulação	114
Figura 5.30. Caso 4: pele urticada. Mastócito degranulado e degranulação do tipo anafilática.	115
Figura 5.31. Caso 2: pele aparentemente sã. Dupla imunomarcação com FXIIIa e Triptase.....	116
Figura 5.32. Caso 5: pele urticada. Citoplasma de mastócito depletado de grânulos e grânulos solubilizados..	117
Figura 5.33. Caso 4: pele aparentemente sã. Dendrócito da derme.....	118
Figura 5.34. Caso 2: pele urticada. Dupla imunomarcação	119
Figura 5.35. Caso 3: pele aparentemente sã. Presença de mastócito íntegro com dupla imunomarcação nos seus grânulos.....	121
Figura 5.36. Caso 3: pele urticada. Presença de mastócito íntegro com dupla imunomarcação nos seus grânulos.....	122
Figura 5.37. Caso 5: pele aparentemente sã. Grânulos mastocitários extruídos na derme	123
Figura 5.38. Caso 3: pele urticada. Grânulos mastocitários extruídos na derme.....	124
Figura 5.39. Caso 3: pele urticada.	126
Figura 5.40A. Caso 4: pele urticada. Pequeno vaso representado por uma célula endotelial	128
Figura 5.40B. Caso 4: pele urticada. Dendrócito dérmico intimamente associado com grânulos extruídos pelos mastócitos,	129
Figura 5.40C. Caso 4: pele urticada. Dendrócito dérmico.....	129
Figura 5.41A. Caso 3: pele urticada. Dendrócito dérmico.....	130
Figura 5.41B. Caso 3: pele urticada. Dupla imunomarcação.	130

Figura 5.41C. Caso 3: pele urticada. Dupla imunomarcação.....	131
Figura 5.42. Caso 2: pele urticada. Dendrócito da derme.....	132
Figura 5.43. Caso 4: pele aparentemente sã. Dendrócito da derme.....	133
Figura 5.44A. Caso 5: pele aparentemente sã. Presença de dois mastócitos.....	134
Figura 5.44B. Caso 5: pele aparentemente sã. Presença de mastócito e um dendrócito da derme	134
Figura 5.44C. Caso 5: pele aparentemente sã. Observar grânulo do mastócito fagocitado pelo dendrócito dérmico,	135
Figura 5.45A. Caso 7: pele urticada. Presença de mastócitos e eosinófilo.....	138
Figura 5.45B. Caso 7: pele urticada. Eosinófilo	139
Figura 6.1 Mastócitos humanos e seu envolvimento espectral na imunofisiologia e na doença humana.....	143
Figura 6.2. A dualidade do mastócito.....	144
Figura 6.3. Ações da histamina e outros mediadores mastocitários sobre os dendrócitos da derme	164

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Família das transglutaminases (TG) dos mamíferos	29
Quadro 3.2. Triptase e seus substratos naturais.....	47
Quadro 4.1. Dados demográficos dos doentes incluídos no estudo	59
Quadro 4.2. Anticorpos primários usados nos estudos de imunoistoquímica e imunoeletrônica.....	63
Quadro 5.1. Avaliação da intensidade da urticária.....	74
Quadro 5.2. Contagem de células CD34 ⁺ na pele aparentemente normal ..	81
Quadro 5.3. Contagem de células CD34 ⁺ na pele urticada.....	81
Quadro 5.4. Contagem de células FXIIIa ⁺ na pele aparentemente normal ..	85
Quadro 5.5. Contagem de células FXIIIa ⁺ na pele urticada.	85
Quadro 5.6. Contagem de células Triptase ⁺ na pele aparentemente sã	90
Quadro 5.7. Contagem de células Triptase ⁺ na pele urticada	90
Quadro 5.8. Contagem de células duplamente imunomarcadas na pele aparentemente sã	98
Quadro 5.9. Contagem de células duplamente imunomarcadas na pele urticada	98
Quadro 5.10. Avaliação semiquantitativa dos achados na microscopia imunoeletrônica de transmissão	137

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1. Número de células imunomarcadas com CD34	82
Gráfico 5.2. Número de células imunomarcadas com FXIIIa	86
Gráfico 5.3. Número de células imunomarcadas com Triptase	91
Gráfico 5.4. Número de células duplamente imunomarcadas com FXIIIa e Triptase	99

RESUMO

Criado PR. *A Resposta inflamatória na Urticária aguda induzida por medicamentos: avaliação imunoistoquímica e imunoeletrônica da unidade microvascular da derme* {tese} São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 204p.

INTRODUÇÃO: O conhecimento sobre os tipos celulares envolvidos na patogenia da urticária constitui um elemento essencial para a compreensão da fisiopatologia desta doença. Poucos autores têm dado atenção às interações entre mastócitos e dendrócitos da derme na urticária. Os objetivos deste estudo são orientados no sentido de descreverem-se os tipos de degranulação mastocitária na urticária aguda associada a medicamentos, e o de analisarem-se as interações entre dendrócitos da derme e mastócitos. **MÉTODOS:** Sete doentes com urticária aguda associada com medicamentos foram incluídos neste estudo. Foram obtidas biopsias cutâneas das lesões urticadas e da pele aparentemente normal destes doentes. Os quatorze fragmentos coletados foram divididos em duas partes (28 fragmentos): uma das partes foi enviada para processamento pela coloração de hematoxilina-eosina, para a coloração de Azul de Toluidina e reações de imunoistoquímica com anticorpos anti-CD34, antifator XIIIa (anti-FXIIIa) e antitriptase e o outro fragmento foi processado para uso na microscopia imunoeletrônica, utilizando-se anticorpos para triptase e FXIIIa, além de dupla imunomarcagem com ouro com o uso de anticorpos antitriptase e anti-FXIIIa. **RESULTADOS:** células imunomarcadas com anticorpos anti-CD34 foram observadas de forma esparsa na derme superficial e de forma mais proeminente na derme reticular. Havia múltiplos dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺ na derme superficial e média, dispersos nas regiões subepidérmicas e em torno dos vasos da derme, tanto na pele urticada como na pele aparentemente normal. O número destas células foi similar nos dois grupos de amostras. Não houve diferença estatística entre o número de células triptase-positivas na pele aparentemente normal e na pele urticada, em todos os doentes. Nós observamos mastócitos íntegros na maioria das amostras da pele aparentemente normal. Tanto as amostras de pele aparentemente normal quanto as amostras de pele urticada apresentavam mastócitos em processo de degranulação do tipo anafilático, com inúmeros grânulos extruídos. Após a dupla imunomarcagem com ouro, na imuno-microscopia eletrônica de transmissão foram observadas partículas de ouro de 10 nm (FXIIIa) e 15 nm (Triptase) marcando concomitante os grânulos dos mastócitos indicando que tanto a triptase como o FXIIIa encontraram-se presentes nos grânulos destas células. De forma interessante, nós encontramos uma forte evidência de que grânulos contendo tanto FXIIIa, como triptase, extruídos dos mastócitos são fagocitados pelos dendrócitos da derme. **CONCLUSÕES:** na urticária aguda associada a medicamentos o padrão de degranulação observado foi do tipo anafilático. Este estudo constitui a primeira demonstração da expressão do FXIIIa nos grânulos intracitoplasmáticos e nos grânulos extruídos dos mastócitos, dispersos na matriz extracelular, nos doentes com urticária

aguda associada a medicamentos. Outro fato inédito foi a demonstração da fagocitose dos grânulos extruídos dos mastócitos pelos dendrócitos da derme FXIIIa⁺.

Descritores: 1.Urticária 2.Erupção por droga 3.Imunoistoquímica
4.Microscopia imunoelétrica 5. Mastócitos 6.Inflamação 7.Triptases
8.Fator XIIIa 9.Macrófagos 10.Células endoteliais 11.Fagocitose
12.Terminações nervosas/ultraestrutura 13.Exocitose

SUMMARY

Criado PR. *The inflammatory response in acute drug-induced urticaria: immunohistochemistry and ultrastructure study of dermal microvascular unit* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 204p.

BACKGROUND: The knowledge about the cell types involved in urticaria is an essential element for understanding the pathophysiology of this disease. Few authors have been attempting on interactions among mast cells and dermal dendrocytes in urticaria. The aims of this study are to describe the types of mast cell degranulation in drug-induced acute, besides to analyze the interactions between mast cell and dermal dendrocyte in urticaria. **METHODS:** Seven patients with drug-induced acute urticaria were enrolled in the study. We taken skin biopsies of urticarial lesion and apparently normal skin. The fourteen fragments collected were divided into two parts (28 sections): one to haematoxylin-eosin stain, Toluidine blue stain and immunohistochemistry reactions with anti-CD34, anti-FXIIIa and anti-tryptase antibodies and other part to immunogold electron microscopy using single antibodies to tryptase and FXIIIa, besides double immunogold labelling with anti-tryptase and anti-FXIIIa. **RESULTS:** immunolabelled CD34⁺ cells were observed scattered in the superficial dermis and more prominent in the reticular dermis. There were multiple FXIIIa⁺ dermal dendrocytes in upper and mid dermis, dispersed in subepidermal areas and around blood vessels, both in apparently normal skin and urticarial lesion of drug-induced acute urticaria. The number of these cells was similar in both groups. There was no difference in tryptase positive cells number between apparently normal skin and urticarial lesions, in all patients. We observed intact mast cells in the majority of the sections of the apparently normal skin. Some sections demonstrated a few mast cells in degranulation process, in anaphylactic degranulation type. In urticarial lesions, several mast cells showed degranulation process, in anaphylactic degranulation type. After double immunogold staining, 10 nm (FXIIIa) and 15 nm (Tryptase) gold particles were seen together over the granules in mast cells indicating that tryptase and FXIIIa are each localized into granules of these cells. Interestingly, we found a strong evidence of than the exocytosed mast cell granules contents both FXIIIa and Tryptase immunolabelled are phagocytised by dermal dendrocytes. **CONCLUSIONS:** In drug-induced acute urticaria the degranulation pattern of mast cells found was composed by anaphylatic. This is the first report, in acute urtuicaria, concern of the expression of FXIIIa in the cytoplasmic mast cell and in extruded granules into extracellular matrix. Phagocytosis of the extruded mast cell granules by FXIIIa⁺ dermal dendrocytes in urticaria was observed.

Descriptors: 1.Urticaria 2.Drug eruptions 3.Immunohistochemistry 4.Immunoelectron microscopy 5.Mast cells 6.Inflammation 7.Tryptases 8.Factor XIIIa 9.Macrophages 10.Endothelial cells 11.Phagocytosis 12.Nerve endings/ultrastructure 13.Exocytosis

1. INTRODUÇÃO

A urticária é uma reação cutânea caracterizada por uma erupção súbita de lesões edematosas e pruriginosas, com bordas definidas, de localização, tamanho e formas variadas, na qual, cada lesão cutânea individual dura apenas algumas poucas horas e esta relacionada à liberação de mediadores químicos pelos mastócitos na derme, dos quais o principal é a histamina (Cousin et al., 2001).

A urticária é classificada do ponto de vista de evolução temporal em: aguda (menos que seis semanas) ou crônica (além de seis semanas de curso clínico) (Criado et al., 2005; Zurberbier et al., 2006).

A ocorrência de urticária aguda durante o tratamento com medicamentos constitui um evento freqüente, o qual se confronta com dois enigmas (Cousin et al., 2001): (i) A urticária esta ligada com o uso do medicamento ou com a doença subjacente que determinou a prescrição da droga? (ii) A urticária é alérgica em origem, isto é, desencadeada por eventos imunes específicos, em particular com o envolvimento da IgE dirigida contra o medicamento, ou a urticária é pseudo-alérgica em origem, isto é, decorrente de uma ativação antígeno não-específica dos mastócitos? Esta questão é de vital importância, uma vez que os eventos alérgicos mediados pela IgE são potencialmente fatais, enquanto que, os pseudo-alérgicos são raramente graves (Cousin et al., 2001).

As urticárias alérgicas induzidas por medicamentos são decorrentes de IgEs específicas e geralmente são graves, associando-se a outros sinais de anafilaxia (Cousin et al., 2001). Elas representam felizmente uma pequena proporção, menos de 10%, das urticárias agudas desencadeadas por medicamentos (Cousin et al., 2001).

Nestes casos, a urticária é apenas um dos sinais da anafilaxia, os quais incluem uma coleção de sintomas, com manifestações cutâneas (eritema, urticária), digestivos (náusea, vômito), respiratórios (tosse, dispnéia, broncoespasmo, dificuldade respiratória), sinais cardiovasculares (taquicardia, hipotensão, choque, insuficiência cardiovascular), neurológicos (confusão mental, perda da consciência, crises convulsivas e relaxamento esfinteriano) (Cousin et al., 2001; Brown, 2004).

Os medicamentos mais implicados nas urticárias alérgicas são os antibióticos, particularmente os beta-lactâmicos, os relaxantes musculares (curares) e os hipnóticos (Cousin et al., 2001).

A urticária alérgica isolada é possível, porém um evento raro (Torres et al., 1999). Geralmente é acompanhada por outros sinais graves que precedem a urticária, como o angioedema (Cousin et al., 2001). Certas características clínicas favorecem a existência de um mecanismo dependente da IgE frente a algumas urticárias (Bircher, 1999; Cousin et al., 2001):

1. Urticária generalizada de rápido início após administração de medicamento oral, endovenoso ou intramuscular, com envolvimento mucoso, responsável por dispnéia e agitação intensa do doente;

2. Associação com sinais de choque grave, necessitando de intervenção de emergência e início imediato de tratamento, com injeção subcutânea de epinefrina;
3. Rápido desencadeamento da reação em indivíduo previamente exposto ao medicamento.

Na verdade em torno de 90% das urticárias desencadeadas por medicamento são de natureza pseudo-alérgicas ou idiossincrásicas, não mediadas pela IgE (Bircher, 1999; Cousin et al., 2001). A parte à bem documentada fisiopatogenia das urticárias alérgicas desencadeadas por medicamentos, as outras formas de urticárias desencadeadas por medicamentos não é ainda completamente elucidada (Bircher, 1999).

Previamente Criado et al. (2002; 2006) estudaram sob o ponto de vista da microscopia eletrônica de transmissão cinco doentes com urticária aguda desencadeada pela exposição a medicamentos. Os medicamentos implicados foram: caso 1: bupropiona (Zyban ®); caso 2: dipirona sódica; caso 3: paracetamol, carisoprodol, diclofenaco sódico (Tandrilax ®); caso 4: carbonato e bicarbonato de sódio, ácido cítrico (ENO ®, Sonrisal ®, Estomazil ®), AAS; caso 5: amoxicilina / clavulanato (Clavulin ®). Neste estudo foi observado que o aspecto ultra-estrutural da urticária aguda induzida por droga se assemelha àqueles observados nas urticárias provocadas pela *Urtica dioica*, pela histamina intradérmica e ao da urticária pelo frio. Ainda constatou-se a presença da tríade celular composta por mastócito, célula dendrítica (ou satélite) e linfócito na unidade microvascular dérmica (UMD) sugerindo uma interação funcional entre estas células.

Neste presente estudo, nossos objetivos consistem em analisar-se a resposta inflamatória na urticária aguda associada a medicamentos, para melhor caracterizar os elementos da unidade microvascular da derme do ponto da sua expressão antigênica.

Sueki et al. (1993) demonstraram em pele de prepúcio humano cultivado que os dendrócitos da derme perivasculares FXIIIa positivos encontravam-se intimamente associados com os mastócitos. Após 24 horas da degranulação mastocitária induzida por secretagogos ou adição de rTNF- α , aumentou a expressão do fator XIIIa (FXIIIa) nos dendrócitos dérmicos (DD), sugerindo uma ativação dos dendrócitos induzida pelos mastócitos.

Até o presente momento não se demonstrou o comportamento dos dendrócitos da derme, frente à degranulação mastocitária na urticária. Desta maneira elegemos a urticária aguda associada a medicamentos, como modelo *in vivo* para esta observação.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a interação entre os elementos celulares da Unidade Microvascular da Derme (UMD) nas lesões da urticária aguda associada a medicamentos.

2.2 Específicos

- Caracterizar o tipo de degranulação mastocitária na pele com urticária: tipo degranulação anafilática (DAN) e/ou tipo degranulação em saca-bocado (DSB).
- Observar através da técnica imunoistoquímica a expressão do Fator XIIIa nos dendrócitos dérmicos, nas lesões da urticária aguda associada a medicamentos, comparando-a a pele aparentemente sã do mesmo doente.
- Identificar a natureza dos vacúolos intracitoplasmáticos dos dendrócitos da derme, a fim de observar se estas células fagocitam os grânulos contendo triptase, liberados pelos mastócitos.

Espera-se que os resultados obtidos contribuam para auxiliar o conhecimento dos padrões histopatológicos e ultra-estruturais da resposta inflamatória na urticária aguda associada a medicamentos, definindo o papel e a participação das células da unidade microvascular da derme nestas reações.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Urticária associada a medicamento

Para que se compreenda a fisiopatogenia da urticária associada a medicamento é preciso saber que não importa qual a forma estrutural original que ao medicamento tenha, e sim o modo como será processado e apresentado ao organismo, a fim de que se desencadeie a seqüência de eventos que culminam no surgimento das urticas na pele (Borish e Tilles, 1998).

As urticárias desencadeadas por medicamentos podem ser classificadas, em relação aos mecanismos etiopatogênicos, como (Cousin et al., 2001):

1. Alérgicas: urticárias decorrentes de desencadeadores imunes específicos (imunidade adquirida), como anticorpos ou linfócitos T dirigidos a determinado medicamento. Desta forma, o termo alergia é sinônimo de reação de hipersensibilidade. No caso das urticárias, os desencadeantes são primariamente as imunoglobulinas de classe E (IgE) (hipersensibilidade do tipo I, denominada anafilaxia), mas também pode ocorrer de forma mediada pela imunoglobulina de classe G (IgG) (hipersensibilidade tipo II) ou ainda via imunocomplexos circulantes (hipersensibilidade tipo III).

2. Pseudo-alérgicas: são as urticárias que apresentam todas as características de alergia, mas não têm os desencadeantes imunes subjacentes. Ocorrem pela ativação do sistema imune inato (imunidade natural), como: ativação não-imune dos mastócitos, ativação do sistema do complemento (anafilotoxinas) ou bloqueio da atividade enzimática (ciclooxigenase, bradicininas).

A alergia às penicilinas, relacionada às reações imunes do tipo I de Gell e Coombs, ocorre via produção de linfócitos T auxiliares tipo2 (Th2) e estímulo à produção de IgE. Os antibióticos beta-lactâmicos são altamente reativos e rapidamente se ligam de forma covalente a proteínas autólogas, gerando haptenos, ao contrário de vários outros medicamentos (dapsona, rifampicina, sulfonamidas, fenitoína e carbamazepina), que não são intrinsecamente reativos e necessitam ser metabolizados em formas intermediárias para se ligarem a um carreador e formar um hapteno (Borish e Tilles, 1998).

Já os fatores patogênicos não imunes ou pseudo-alérgicos são representados por substâncias capazes de liberar histamina e outros mediadores químicos da inflamação, por ação direta sobre os mastócitos. Englobam certos medicamentos e polímeros biológicos. Até a acetilcolina, derivada das terminações nervosas colinérgicas da pele, é capaz de induzir a liberação de histamina por vias desconhecidas (Gruchalla, 1998).

Zuberbier et al. (1996) em um estudo com 109 doentes com urticária aguda encontraram como possível causa da urticária, a exposição a medicamento em 9,2% dos doentes, sendo que a maioria, exceto um

doente, também apresentava infecção do trato respiratório superior. Os medicamentos mais implicados foram o ácido acetilsalicílico (quatro doentes), outros analgésicos (cinco doentes) e sulfonamida (um doente). Um total de 20,2% dos doentes usava regularmente outros medicamentos, mas estes puderam ser excluídos como causa da urticária, uma vez que, a urticária desapareceu sem a interrupção do seu uso.

As lesões da urticária desencadeada por exposição a medicamentos ou alimentos parecem ser constituídas por urticas que surgem rapidamente, geralmente desaparecendo em menos de duas horas, sem demonstrar um componente de reação de fase tardia da urticária. Contudo pode haver em alguns casos um componente de resposta tecidual do tipo reação de fase tardia, com infiltrado celular perivascular mononuclear, lembrando àquelas urticas observadas no contexto das urticárias crônicas (Kaplan, 1998).

3.1.1 Urticárias desencadeadas por medicamentos com origem alérgica

Representam uma pequena proporção, menos que 10%, das urticárias agudas desencadeadas por medicamentos (Cousin et al., 2001).

Todos haptenos são capazes de induzir uma resposta alérgica IgE mediada em um determinado indivíduo (Cousin et al., 2001). Este fato é excepcional e depende de fatores complexos, que incluem o estado do sistema imune do hospedeiro durante a sensibilização, a existência de imunossupressão associada, a via de administração, a natureza química do

medicamento e sua capacidade de induzir a ativação do sistema imune natural (inato) (Cousin et al., 2001). Desta forma, todos os medicamentos são capazes de produzir choque anafilático (Cousin et al., 2001). A lista de moléculas que podem determinar choque anafilático é extensa e representa praticamente todas as classes de medicamentos, incluindo anti-histamínicos (Demoly et al., 2000) e contrastes iodados, os quais até recentemente foram imputados com exclusividade responsáveis por acidentes pseudo-alérgicos (Laroche et al., 1999). Contudo, certas moléculas parecem ser mais imunogênicas que outras, sendo mais freqüentemente causa de reações anafiláticas: entre estas se encontram os antibióticos, particularmente os beta-lactêmicos, os relaxantes musculares e os hipnóticos (Cousin et al., 2001).

Em resumo e na prática, a urticária pode ser parte de um quadro complexo de choque anafilático, mas a ocorrência da urticária como manifestação isolada do choque anafilático, sem outros sintomas, constitui uma manifestação incomum da alergia mediada pela IgE (Cousin et al., 2001).

3.1.2 Urticárias desencadeadas por medicamentos com mecanismo pseudo-alérgico

O conhecimento atual tem demonstrado que a maioria das urticárias, as quais se desenvolvem durante o uso de um medicamento, são determinadas por mecanismos pseudo-alérgicos, não envolvendo a IgE específica (Cousin et al., 2001).

Há diferentes circunstâncias que ilustram os mecanismos pseudo-alérgicos das urticárias (Cousin et al., 2001):

1. Exantemas e urticária em crianças usando antibióticos;
2. Urticária causada por intolerância ao ácido acetilsalicílico e antiinflamatórios não hormonais (AINH);
3. Urticária crônica idiopática agravada por medicamento.

1. Urticária desencadeada por medicamento na infância:

As urticárias agudas na infância têm origem infecciosa em cerca de 80% dos casos, com ou sem tratamento antibiótico (Cousin et al., 2001). Há uma grande dificuldade em se dissociar estes dois fatores, infecção e medicamento, como causa da urticária. Ponvert et al. (1999) estudando este tipo de urticária encontrou menos que 10% das crianças tendo urticária alérgica verdadeira. Em outras 90% das crianças, a re-introdução do medicamento não causou urticária. A fisiopatologia destas reações pseudo-alérgicas não se encontra esclarecida (Cousin et al., 2001). Elas ocorrem em crianças com infecções, febris e com uma síndrome inflamatória (Cousin et al., 2001). É possível que as modificações induzidas pela infecção e a resposta inflamatória da imunidade inata (citocinas e quimiocinas) possam determinar ativação de células cutâneas (células endoteliais e mastócitos), os quais se encontram mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos medicamentos (Cousin et al., 2001). Desta forma, dois fatores parecem ser necessários para desencadear a urticária: a síndrome inflamatória e a medicação (Cousin et al., 2001). Assim a introdução do medicamento é bem tolerada quando

não há uma síndrome inflamatória associada, o que nos possibilita excluir a presença de reação imune do tipo I de hipersensibilidade (Cousin et al., 2001). Além disso, o aparecimento de uma nova infecção não determina urticária se a medicação não for re-introduzida. Por outro lado a urticária pode (ou não) novamente ocorrer durante uma infecção posterior tratada com um antibiótico da mesma classe medicamentosa da que levou à reação original (Cousin et al., 2001).

2. Urticária causada por intolerância ao ácido acetilsalicílico (AAS) e antiinflamatórios não hormonais (AINH):

O desencadeamento ou o agravamento da urticária durante o uso dos AINH é comum (Bircher, 1999; Grosshans, 2000). A urticária ocorre quando o AAS ou um dos AINH, principalmente um dos de geração mais antiga (anticiclooxygenase-1, anti-COX-1) é utilizado (Cousin et al., 2001). Todos os AINH podem ser responsabilizados, independentemente de uma classe, em particular (Cousin et al., 2001). Desta forma, determinam uma típica reação pseudo-alérgica decorrente de um efeito farmacológico dos AINH, a inibição da produção de prostaglandinas, via metabolismo do ácido aracídico, pelo seu efeito anti-COX (Yoshida et al., 2000). O bloqueio da via da COX pelos AINH tem como consequência o bloqueio da produção de prostaglandinas com acúmulo intracelular de intermediários metabólicos e desvio dos mesmos para a via da lipooxygenase, que determina excessiva produção de leucotrienos, em particular os sulfidril leucotrienos LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (Cousin et al., 2001).

Os doentes que sofrem de “urticária crônica idiopática” podem ter a doença exacerbada ou angioedema após a exposição aos AINH. Como regra geral não há importantes manifestações respiratórias (Cousin et al., 2001).

A presença de diátese atópica parece ser relevante como fator de risco para intolerância aos AINH, com a prevalência de 80% dos atópicos em qualquer grupo de indivíduos intolerantes aos AINH (Cousin et al., 2001). Os sinais de intolerância neste grupo de doentes são representados principalmente, pela urticária e raramente manifestações respiratórias (Sanchez-Borges et al., 2000).

Doentes sem antecedentes particulares desenvolvem urticária ou reações anafiláticas a uma determinada classe de AINH, especialmente as pirazolonas ou diclofenaco (Bircher, 1999; Cousin et al., 2001).

3. Urticária crônica idiopática agravada por medicamento:

Há várias drogas que podem determinar exacerbação da urticária em doentes com urticária crônica, ou mesmo re-agudizar a doença em doentes com remissão da urticária por vários anos, bem como em doentes com dermatografismo (Cousin et al., 2001). As drogas mais comumente responsáveis são os antibióticos, particularmente as penicilinas, vancomicina, contrastes iodados, relaxantes musculares, AAS e os AINH (Cousin et al., 2001). A urticária nestes casos, geralmente não é grave, iniciando em minutos ou horas após a introdução do medicamento e na maioria dos casos sem sinais de gravidade (choque), mesmo se as

membranas mucosas são envolvidas (Cousin et al., 2001). A fisiopatologia não esta esclarecida nestes casos, contudo se

postula que a urticária ocorra em mastócitos cronicamente ativados com um limiar de degranulação reduzido em resposta a um estímulo físico ou químico, onde o medicamento participaria como um fator irritante adicional, determinando a degranulação dos mastócitos previamente ativados (Cousin et al., 2001).

3.2 Elementos celulares da resposta inflamatória na urticária

Em termos fisiológicos, a localização primordial dos mastócitos em torno dos capilares e pequenas vênulas do tecido conectivo, tem conduzido a uma indicação de sua atividade secretora (Parwaresch et al., 1985).

Os mecanismos pelos quais os precursores dos mastócitos desenvolvem-se em mastócitos maduros encontram-se incompletamente compreendidos. Sabe-se que células agranulares, progenitoras dos mastócitos derivadas da medula óssea, devem migrar do sangue para o interior da derme, e sob a influência de vários fatores de crescimento e citocinas, sofrem maturação formando os mastócitos do tipo contido no tecido conectivo (MTC), triptase e quimase positivos. Um destes fatores de crescimento é o ligante do receptor da tirosina quinase *c-kit*, conhecido como *c-kit* ligante, ou *stem cell factor*, ou fator de crescimento de mastócitos (MGF) e *Stem cell factor* (Weiss et al., 1995). Estes autores demonstraram

que as células endoteliais da derme humana são produtoras do MGF, e os precursores dos mastócitos provavelmente sofram endereçamento para a pele, via canais vasculares e diferenciam-se no espaço perivascular imediatamente adjacente. Isto provavelmente explicaria o encontro dos mastócitos na pele normal, distribuídos preferencialmente nas regiões perivasculares.

À microscopia óptica de luz os mastócitos são caracterizados por certas propriedades distintas, as quais os tornam facilmente identificados. Os mastócitos humanos normais são redondos, ou raramente fusiformes. As formas redondas são observadas principalmente no tecido conectivo frouxo, enquanto as formas fusiformes ocorrem preferencialmente nas áreas de fibrose com um acúmulo denso de fibras colágenas. O citoplasma contém um grande número de grânulos monomórficos. Os núcleos parecem ser parcialmente revestidos em uma zona marginal, por grânulos intracitoplasmáticos, de forma que apenas os mastócitos degranulados ou imaturos, podem apresentar o formato nuclear bem delimitado. Os núcleos dos mastócitos apresentam forma oval ou riniforme. Variantes fusiformes de mastócitos apresentam núcleos alongados (Parwaresch et al., 1985).

Os mastócitos apresentam uma pronunciada metacromasia vermelho-purpúrica, quando corados com corantes básicos azuis, tais como o azul de metileno ou azul toluidina. Esta é a razão pela qual os mastócitos podem ser mais bem visualizados pelo método de coloração de Giemsa. Nos cortes histológicos corados com técnicas da hematoxilina-eosina (HE), van Gieson, Goldner ou Azan, os mastócitos são dificilmente identificáveis. Na reação

pelo ácido periódico de Schiff (PAS), os mastócitos revelam-se fracamente corados (Parwaresch et al., 1985).

Provavelmente, parte da controvérsia em relação aos achados histológicos observados na urticária, deve-se à facilidade no diagnóstico clínico da doença, tornando a biopsia cutânea raramente necessária com propósitos diagnósticos (Solomon Jr, 1985).

Segundo Solomon Jr (1985) além do edema, os leucócitos encontram-se sempre presentes em biopsias de urticária. A densidade celular varia desde apenas umas poucas células inflamatórias esparsas, em torno dos pequenos vasos da derme, a um pólo de um infiltrado celular moderado. A marginação de células nucleadas sangüíneas, particularmente neutrófilos, no interior da luz dos vasos sangüíneos, é geralmente proeminente nas fases iniciais de uma urtica. Embora isto seja observado mais freqüentemente nos vasos da derme superficial, os vasos da derme profunda, e mesmo o subcutâneo pode exibir estas alterações.

As urticas em fase inicial de evolução tendem a demonstrar um pequeno número de neutrófilos fora dos vasos sangüíneos. Com a progressão da lesão, outras células sangüíneas seguem os neutrófilos, de forma que um infiltrado misto de células, constituído agora por neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos encontra-se presente, sendo os mastócitos geralmente proeminentes. Os linfócitos tendem a persistir em torno dos vasos sangüíneos, por períodos mais longos, que os outros leucócitos. Isto pode contribuir, para que alguns observadores interpretem como característica histológica da urticária, o infiltrado perivascular linfocitário.

Desta forma é de crucial importância conceituar que a cronologia de evolução da lesão clínica biopsiada irá definir a histopatologia da lesão (Solomon Jr, 1985).

No tipo comum de urticária, observa-se edema da derme e um infiltrado linfocitário perivascular, que geralmente é esparsos, mas pode ser entremeado

com eosinófilos. No angioedema o edema e o infiltrado celular estendem-se ao tecido celular subcutâneo. Embora os neutrófilos estejam geralmente ausentes na urticária, em alguns casos encontra-se um infiltrado dérmico difuso de neutrófilos, sem evidência de vasculite. Em outros, está presente uma venulite neutrofílica, com neutrófilos nas paredes das pequenas veias da derme, mas sem depósitos fibrinóides, hemorragia ou leucocitoclasia (fragmentação do núcleo dos polimorfonucleares, especialmente neutrófilos) (Lever e Schaumburg-Lever, 1991).

A biopsia da urticária aguda revela edema intersticial e tumefação das células endoteliais, e é notável a ausência de infiltrado celular (Czarnetzki et al., 1990; Huston e Bressler, 1992).

Haas et al. (1998) estudaram a morfologia microscópica das urticárias em 108 doentes portadores de diferentes tipos de urticárias (sendo 20 urticárias agudas). De forma oposta à descrição dos autores anteriores (Czarnetzki et al., 1990; Huston e Bressler, 1992), nos doentes com urticária aguda, as células mononucleares foram mais proeminentes, em relação aos casos de urticária crônica. Na região perivascular, estas células estavam sempre entremeadas com granulócitos no infiltrado.

Solley et al. (1976) estudando as reações de fase tardia das urticas, descreveram um maior edema intersticial e infiltrado celular perivascular em relação às respostas de fase imediata. A contagem celular diferencial em uma lesão estabelecida (oito horas de evolução), após a injeção intradérmica do composto 48/80 demonstrou: 47% de células mononucleares, 36% de neutrófilos, 10% de eosinófilos, 7% de basófilos e mastócitos, de forma similar aos achados observados nas reações de fase tardia obtidas após uma reação alérgica mediada pela IgE.

Winkelmann, Reizner (1988) revisaram 265 casos de urticária, encontrando neutrofilia dérmica difusa em 23 (8,7%) das amostras. Em todos os 23 casos o infiltrado inflamatório continha também eosinófilos. A intensidade da eosinofilia variou de algumas poucas células em dois casos, a até cerca de 10% de eosinófilos. Os mastócitos não apresentaram alterações. Dos doentes com urticária com neutrofilia dérmica, seis apresentavam urticária aguda e dezessete, urticária crônica. Seis doentes tinham história de reações a medicamentos (penicilina em 3 doentes; tetraciclina, salicilatos, vancomicina, sulfametoxazol-trimetropim e propoxifeno constituíram o medicamento imputado em cada caso restante). Nestas lesões de urticária também se observou edema da derme, além de vasos linfáticos dilatados. Os autores concluem que a neutrofilia dérmica difusa pode acompanhar alguns casos de urticária.

Czarnetzki et al. (1990) estudaram os subtipos de macrófagos (ativados, residentes em repouso e macrófagos de tecido de reparação) em 22 casos com diferentes tipos de urticária, sendo nove doentes com urticária

de pressão tardia (UPT), três doentes com urticária aguda (UA), seis doentes com urticária recorrente crônica (UCR) e quatro doentes com urticária pigmentosa (UP), com métodos de rotina de histologia e imunoistoquímica, nos quais a maioria das biopsias era proveniente de lesões de duração individual desconhecida. Entre os doentes com UPT observaram-se grupos de células mononucleares perivasculares e perianexiais, com um número variado de eosinófilos e neutrófilos, agrupados ou isolados, entre as fibras colágenas. Macrófagos ativados foram proeminentes no infiltrado perivascular das urticas.

Ainda no estudo de Czarnetzki et al. (1990), em três de quatro doentes com UA, um número variável de neutrófilos e eosinófilos foi observado, bem como, um infiltrado mononuclear de moderado a intenso, o qual apresentava moderada à acentuada expressão de macrófagos de tecido de reparação e do subtipo de macrófagos residentes e em repouso, em todas as amostras, além de macrófagos ativados em três das quatro amostras. A biopsia de uma urtica de duração inicial, em um dos doentes com UA, demonstrou primariamente edema, com um infiltrado celular esparso e reação negativa aos macrófagos ativados.

Nos seis doentes com UPT, a histologia e o padrão da imunoistoquímica com anticorpos monoclonais, foram similares aos doentes com UA. Estes autores especularam se a presença de macrófagos ativados nas lesões da UPT, UA e UCR poderiam ter como significado fisiopatológico, como o seu envolvimento como células indutoras da resposta imune, uma vez que a sua ausência nas fases tardias da inflamação suporta este conceito.

3.3 A unidade microvascular dérmica (UMD)

Há pouco tempo atrás se considerava a derme como apenas uma camada de revestimento do corpo primariamente responsável por abrigar e proteger os vasos sanguíneos, que serviam para nutrir a epiderme queratinizada (Murphy, 2005). Hoje a derme é tida como um micro-ambiente dinâmico, contendo um conjunto de células e moléculas da matrix, mais complexo e sofisticado que a própria epiderme e seus apêndices (Murphy, 2005). A unidade microvascular da derme (UMD) é o coração deste novo conceito de derme, uma vez que representa um conjunto de células inter-relacionadas responsáveis não apenas pela nutrição cutânea, mas também pelo tráfico de células imunes, regulação do tono vascular e hemostasia local (Murphy, 2005).

Sontheimer et al. (1989), propuseram o termo “unidade microvascular dérmica” para denominar o conjunto de elementos representados pelas células endoteliais da microvasculatura da derme (CEMD) e os outros tipos celulares constituintes da derme (em geral, os MDPD, os mastócitos, pericitos e as células T extravasculares), os quais apresentam uma relação anatômica íntima, com os microvasos da pele humana normal.

Murphy (2005) ampliou o conceito da UMD proposto inicialmente por Sontheimer et al. (1989), de forma que seja constituída pelos seguintes elementos:

- Células dendríticas perivasculares;
- Células endoteliais;

- Pericitos;
- Células veladas;
- Mastócitos;
- Rede neural;
- Fagócitos macrófagos;
- Células inflamatórias migrantes

A UMD encontra-se esquematicamente representada na figura 3.1.

Figura 3.1. Unidade Microvascular da Derme (UMD). É composta pelas células endoteliais da microvasculatura da derme (CE), pelos pericitos (P), que se encontram envolvidos pela membrana basal do vaso, pelas células veladas (VC - externas à membrana basal vascular), mastócitos perivascularares (MC), linfócitos e dendrócitos dérmicos (DD). Notar que os DD possuem prolongamentos citoplasmáticos dendríticos, que envolvem parcialmente os mastócitos e os vasos. H: hemácias intravasculares; MB: membrana basal vascular

As células dendríticas pertencem à família das células apresentadoras de antígeno (APC), que se localizam nos locais de entrada de antígenos estranhos no organismo. Estas células relacionam-se com a função de imunovigilância. As células dendríticas desempenham esta função imune por serem células com mobilidade e demonstrarem na superfície moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (Sotto, 2001).

Sontheimer et al. (1989) estudaram amostras de pele humana normal da região abdominal de mulheres adultas, pele do escroto de neonato e pele da região deltóide de homens adultos, com a finalidade de avaliar a capacidade de

expressão do HLA II nas células endoteliais da microvasculatura da derme humana. Neste estudo os autores identificaram a existência de uma população de células dendríticas perivasculares, a qual demonstrou uma maior expressão do antígeno HLA-DR, em relação às células endoteliais, com as quais se encontravam intimamente relacionadas. A localização perivascular e o fenótipo destas células dendríticas as diferenciaram de outras células que constituem a derme, tais como os “histiócitos” clássicos, as células veladas* e os pericitos. A relativa expressão abundante das três regiões dos principais produtos dos genes do HLA-D, nos macrófagos dendríticos perivasculares da derme (MDPD), sugeriu que estas células possam apresentar um envolvimento significativo na imunobiologia da denominada “unidade microvascular da derme (UMD)”.

* As células veladas são de provável origem mesenquimal. São exclusivas da pele, sendo encontradas externamente a todos os pequenos vasos da derme, separando os vasos do tecido conectivo circundante. Sua função ainda é desconhecida (Singh, Swerlick, 2001).

O estudo acima descrito demonstrou a presença de dois tipos morfológicamente distintos de células residentes na derme humana, os quais expressam antígenos de classe II do HLA: a célula endotelial da microvasculatura e uma célula dendrítica predominantemente localizada no espaço perivascular (MDPD), as quais apresentam maior densidade na derme papilar superficial. A localização perivascular destas células sugere a possibilidade que elas poderiam estar relacionadas aos mastócitos, outro tipo celular normalmente presente nesta localização, ou aos pericitos, o que foi descartado pelo uso de técnicas imunoistoquímicas.

Sontheimer et al. (1989) especulam que caso os MDPD possuam a capacidade de apresentar antígenos, sua localização perivascular é a posição ideal para interagir com os linfócitos T perivasculares e gerar respostas imunes protetoras contra antígenos (em geral, agentes infecciosos ou medicamentos), os quais podem ser entregues a esta área pela circulação sanguínea. Citocinas resultantes dos MDPD ativados, juntamente com a ativação dos linfócitos T perivasculares poderiam provocar uma resposta efetora, por outros elementos constituintes da unidade microvascular dérmica, tais como os mastócitos, uma vez que estas células podem ser capazes de responder a estimulação de certas citocinas.

Certo número de doenças inflamatórias (em geral, a erupção polimorfa à luz, infiltração linfocitária de Jessner, erupções morbiliformes a medicamentos, lúpus eritematoso cutâneo) apresenta um componente proeminente na sua histopatologia, o qual é composto por um padrão vasocêntrico de células linfóides mononucleares no infiltrado. Uma melhor compreensão das interações

imunes funcionais, que ocorrem entre tais células da UMD, na pele normal, poderia servir como um arcabouço para uma melhor caracterização da fisiopatologia destas doenças (Sontheimer et al., 1989).

3.3.1 Dendrócitos da Derme (DD)

Recentemente um grupo de células localizadas na derme com morfologia dendrítica foi identificado como membro importante do sistema imune da pele, constituindo as células dendríticas da pele ou também denominados “dendrócitos dérmicos de Headington”. Na microscopia óptica de luz, os DD se apresentam com aspecto similar ao de fibroblastos (Hoyo et al., 1993). A morfologia varia muito em função da sua localização: na derme papilar são muito volumosos, com o corpo celular bulboso, de onde emanam longos prolongamentos citoplasmáticos (Hoyo et al., 1993). Na derme profunda apresentam um corpo celular mais estreito, fusiforme, com dois ou três pólos de emissão de dendritos, os quais são de tamanhos mais reduzidos (Cerio e Spaul, 1990). Na pele normal os DD são essencialmente encontrados ao nível da derme papilar, notadamente em torno dos vasos sanguíneos (Hoyo et al., 1993). Na derme média e profunda os DD são observados no tecido conjuntivo circunjacente aos anexos cutâneos, glândulas sudoríparas e folículos pilo-sebáceos (Hoyo et al., 1993).

Os DD representam uma porcentagem considerável da população celular residente da derme normal (Hoyo et al., 1993). Isto sugere que estas

células exercem uma função fisiológica importante no tecido conjuntivo da derme (Hoyo et al., 1993). Os DD são dotados de atividade fagocitária, podendo fagocitar coal tar, melanina e hemossiderina, podendo assim representar a população residente de macrófagos da derme (dendrófagos) (Hoyo et al., 1993). A configuração dendrítica dos DD, sua origem medular e seu perfil imunofenotípico particular (HLA-DR/DQ+, CD36+, OKM1-) sugerem que os DD possam fazer parte das células apresentadoras de antígenos (CAP) (Hoyo et al., 1993).

Os DD se dispõem em torno dos vasos capilares da derme papilar, ocupando um local estratégico entre os queratinócitos basais e as células endoteliais, com as quais podem constituir uma unidade funcional (Arrese Estrada e Pierard, 1990). Desta forma, os DD podem atuar como células de vigilância imune aos antígenos provenientes tanto da epiderme como da derme (Hoyo et al., 1993). As células de Lagerhans (CL) distinguem-se dos DD, pois apresentam expressão do antígeno CD1a, da proteína S100 e dos grânulos de Bierbeck (Hoyo et al., 1993).

Nos processos inflamatórios dérmicos, os dendrócitos dérmicos apresentam-se aumentados em número e hipertrofiados no *erythema elevatum diutinum* e na vasculite leucocitoclástica (Pacheco e Sotto, 2000).

Estas células dendríticas caracterizam-se pela expressão do fator de coagulação XIIIa (Fator XIIIa+) no seu citoplasma (DD tipo I) ou CD34+, FXIIIa- (DD tipo II) (Regezi et al., 1992). Na pele normal não se visualiza reatividade para o FXIIIa na epiderme e seus anexos (Hoyo et al., 1993).

3.3.1.1 Dendrócitos da Derme Fator XIIIa+

O Fator XIIIa (FXIIIa) é uma enzima plasmática da cascata de coagulação, pertencente a família das transglutaminases (quadro 3.1), encarregada na estabilização covalente da fibrina, o que é essencial para formação do coágulo (Mosher et al., 1980). O FXIIIa é uma (pro)transglutaminase constituída de dois canais protéicos (a & b); ela existe em duas formas de zimógeno, uma *forma extracelular* (ou plasmática), um tetrâmero não covalente constituído de duas subunidades (a) e duas subunidades (b) (a₂b₂), e uma *forma intracelular*, dimérica, constituída de duas subunidades (a), (a₂), presente em vários tipos celulares como megacariócitos, plaquetas, monócitos circulantes, macrófagos alveolares e peritoniais e nas células dendríticas reticulares dos folículos linfóides (Hoyo et al., 1993).

Quadro 3.1. Família das transglutaminases (TG) dos mamíferos

Nome	Sinônimo	kDa	Tecido	Localização
TG1	TG _K , transglutaminase do queratinócito, TG tipo 1	90	Epitélio	Citossol, membrana
TG2	TG _C , transglutaminase tecidual, TG tipo 2	80	Ubíqua	Citossol, núcleo, extracelular
TG3	TG _E , transglutaminase epidérmica, TG tipo 3	77	Epitélio	Citossol
TG4	TG _P , transglutaminase porstática	77	Próstata	Extracelular
TG5	TG _X , TG tipo 5	81	Epitélio	Citossol
TG6	TG _Y , TG tipo 6	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
TG7	TG _Z , TG tipo 7	80	Ubíqua	Desconhecido
FXIII	FXIIIA, TG plasmática, Fator estabilizador da Fibrina	83	Sangue, plasma e plaquetas	Extracelular
Band 4.2	Proteína eritrocitária band 4.2	77	Eritrócitos	Membrana

Fonte: Esposito C, Caputo I. Mammalian transglutaminases Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. FEBS Journal 2005; 272:615–31.

A descoberta de que células dendríticas expressam o Fator de coagulação XIIIa (FXIIIa) remota de 1984 (Fear et al.), que constataram pela técnica da imunoperoxidase a presença citoplasmática desta proteína nas células do tecido conectivo dos espaços porta hepatocelulares, os quais foram interpretados como fibroblastos. Posteriormente as células dendríticas FXIIIa+ foram observadas em outros tecidos, como nos gânglios linfáticos (Nemes et al., 1987) e na pele (Cerio et al., 1989). Schaumberg-Lever et al. (1994) demonstraram a presença do FXIIIa nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos da pele, sob estudo de microscopia imunoeletrônica de transmissão.

Cério et al. (1989) demonstraram que as células dérmicas dendríticas intensamente marcadas pelo FXIIIa localizavam-se na derme reticular superior e na derme papilar. Estes autores concluíram que as células FXIIIa+ na pele humana representam uma população específica de células dendríticas dérmicas (CDD), um subtipo do sistema monocítico-macrofágico, distintas das células de Langerhans.

Nestle et al. (1993) estudaram as células dendríticas dérmicas usando um painel extenso de 45 diferentes anticorpos monoclonais, sob imunoistoquímica, entre eles CD1a (marcador de células apresentadoras de antígeno da epiderme) e CD14 (marcador de origem mielo-monocítico). Estes autores concluíram a existência de três sub-populações de células dendríticas dérmicas (CDD) FXIIIa+ na pele normal: subtipo 1 (FXIIIa+, CD1a- e CD14-), que representam 65-70% de todas as CDD; subtipo 2 (FXIIIa+, CD1a+ e CD14-), constituindo 15-20% das CDD; e subtipo 3 (FXIIIa+, CD1a- e CD14+) representando 10-15% das CDD. Todos estes subtipos de CDD FXIIIa+ foram negativos para o anticorpo CD34 (marcador de células advindas de progenitor hematopoiético).

Nickoloff e Griffiths (1990) em estudo por dupla marcação pela imunofluorescência direta demonstraram que as células dendríticas ou fusiformes FXIIIa+ na pele normal e na doença cutânea são derivadas de monócitos/macrófagos da medula óssea, porém não são derivados dos fibroblastos mesenquimais.

Os dendrócitos dérmicos fator XIIIa+, representam a principal população celular da derme papilar (Arrese Estrada e Piérard, 1990) , sendo importantes nos processos de cicatrização e na atuação conjunta com os

mastócitos no remodelamento da matriz extracelular. Além disso, essas células que apresentam morfologia dendrítica, são localizadas na derme papilar e ao redor dos vasos e têm participação na apresentação antigênica, na fagocitose, na regulação da síntese de colágeno e na hemostasia dérmica (Soub et al., 2003).

Existem três diferentes populações de células dendríticas FXIIIa⁺: células FXIIIa⁺/HLA-DR⁻, na camada mais interna dos vasos; células FXIIIa⁺/HLA-DR⁺ em uma segunda camada adjacente à anterior; e células FXIIIa⁺/HLA-DR⁺ ao redor dos nervos ou distribuídas ao longo dos feixes colágenos da derme (Carneiro et al., 2005). Também podem ser classificadas em três subtipos: CD1a⁻CD14⁻, CD1a⁺CD14⁻ e CD1a⁻CD14⁺ (Nestle et al., 1993).

A proporção entre células residentes da derme FXIIIa⁺ e FXIIIa⁻ é maior na derme fetal, em crianças jovens e nos indivíduos com sinais de fotoenvelhecimento em relação a locais da pele de adultos fotoprotegida (Arrese Estrada & Piérard, 1990). O número de células FXIIIa⁺ na papila folicular parece ser modulado pelo ciclo do pêlo, sendo mais numerosas nos estágios iniciais da fase anágena (Arrese Estrada & Piérard, 1990). Além disso, os dendrócitos FXIIIa⁺ são mais numerosos e volumosos em várias condições como pápula fibrosa nasal, dermatofibromas, líquen escleroso, no estroma altamente vascularizado circunjacente ao tumor fibroepitelial de Pinkus, no melanoma maligno e no granuloma piogênico, tendo percentagens variadas de positividade nos carcinomas basocelulares (Arrese Estrada & Piérard, 1990).

Frente a determinados estímulos, como o fator de necrose tumoral, especula-se que os dendrócitos dérmicos tipo II se diferenciam em células apresentadoras de antígeno CD1+, ou mesmo ainda em dendrócitos dérmicos Fator XIIIa+ (Sotto, 2001). A importância do fator XIIIa na cicatrização conduziu à hipótese de que os DD representam uma reserva tecidual deste fator, podendo intervir na estabilização da fibrina em caso de injúria cutânea (Penneys, 1990).

Cerio et al. (1989) em estudo das células dendríticas FXIIIa+ da derme normal e da pele inflamada em algumas doenças cutâneas concluíram que estas células representam uma população imune específica com múltiplas propriedades funcionais. Além disso, o FXIIIa pode ser detectado em cortes parafinados de rotina, preservando detalhes morfológicos e permitindo estudos retrospectivos com este marcador celular (Cerio et al., 1989).

3.3.1.2 Dendrócitos da Derme CD34+

O antígeno CD34 ou antígeno de células progenitoras humanas (HPCA-1) é uma glicoproteína transmembrana de 105-120 kDa *M*, constituído de uma cadeia codificada por um gene localizado no cromossomo humano 1q32 (Narvaez et al., 1996). Embora esta molécula originariamente foi considerada ser expressa especificamente por células progenitoras da medula óssea, atualmente sabe-se que são expressas por várias outras células não hematogênicas (Narvaez et al., 1996). Por

exemplo, é expressa na membrana plasmática do endotélio sanguíneo e não no endotélio linfático (com exceção da pleura) (Greaves et al., 1992). Entretanto, Sauter et al. (1998) demonstraram a expressão do antígeno CD34 na membrana plasmática luminal do endotélio microvascular linfático da pele normal, em estudo de microscopia imunoeletrônica.

Demonstrou-se que a derme humana contém uma população de células dendríticas intersticiais CD34+ (Nickoloff, 1991).

Os dendrócitos dérmicos tipo II, identificados pela expressão do antígeno de células progenitoras humanas (HPCA ou antígeno CD34) estão presentes na pele normal preferencialmente na derme reticular e ao redor dos anexos cutâneos (Narvaez et al., 1996). O envolvimento de células CD34+ em alguns tumores mesenquimais cutâneos (tais como o dermatofibrosarcoma protuberante) é bem conhecido (Narvaez et al., 1996). Entretanto a natureza precisa e o imunofenótipo das células CD34+ na pele normal, bem como sua relação com os dendrócitos da derme e as células de Langerhans, ainda são incertas (Narvaez et al., 1996).

Ao contrário das células de Langerhans, as células CD34+ da derme não expressam CD1a e proteína S100, nunca foram detectadas na epiderme e não contém grânulos de Birbeck (Narvaez et al., 1996).

Ao contrário dos DD tipo I, os DD do tipo II não expressam FXIIIa, CD36, ou CD11a; além disso, os DD tipo II localizam-se predominantemente na derme reticular e derme profunda. Em contraste com as células do sistema monocítico-macrofágico e células apresentadoras de antígeno, as células CD34+ não expressam CD11a/LFA-1, CD14, CD36, ou

CD54/molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Em oposição aos miofibroblastos, as células CD34+ não expressam actina muscular e não exibem miofilamentos na ultra-estrutura (Narvaez et al., 1996). Nos estudos de Narvaez et al. (1996) nunca se detectou células que expressavam ao mesmo tempo o FXIIIa e o CD34, tampouco foram observadas formas intermediárias entre estes dois tipos celulares.

Várias hipóteses têm sido levantadas em relação ao papel funcional das células CD34+ da derme (Narvaez et al., 1996):

- Constituem células progenitoras que interagem com as células epiteliais do “bulge” dos folículos pilosos, uma região considerada representar um reservatório de células progenitoras do folículo piloso;
- Nas células endoteliais, o antígeno CD34+ pode atuar como um ligante sialomucina-símile para a L-selectina, regulando assim o tráfico leucocitário na derme;
- A observação de que as células CD34+ desaparecem da derme de doentes com esclerodermia tem projetado a suposição de que estas células estejam envolvidas na regulação da síntese do colágeno;
- Finalmente há a possibilidade de que as células dérmicas CD34+ possam representar uma reserva de células progenitoras mesenquimais; sob determinado estímulo, as células CD34+ poderiam diferenciar-se em tipos celulares dérmicos mais distintos, como fibroblastos, células apresentadoras de antígeno ou em dendrócitos da derme tipo I (FXIIIa+).

3.3.2 Células endoteliais

As células endoteliais caracteristicamente apresentam um retículo endoplasmático bem desenvolvido, feixes espessos de filamentos citoplasmáticos com diâmetro de 5 a 10 nm, e muitas vesículas picnóticas na superfície luminal. Frequentemente podemos observar uma estrutura singular denominada de corpo de Weibel-Palade [†] (Murphy, 2005). Estes corpos são organelas citoplasmáticas elétron-densas, em forma de roda, medindo aproximadamente 0,1 µm em diâmetro e cerca de 3 µm de comprimento (Murphy, 2005). As células endoteliais contêm α-L-fucose, a qual pode ser demonstrada com *Ulex europeus* e também contêm antígeno relacionado ao fator VIII (Murphy, 2005). As células endoteliais também expressam CD31, um marcador que pode ser mais sensível para células endoteliais normais e neoplásicas (Murphy, 2005). As células endoteliais dos capilares sanguíneos contêm antígenos de classe I do HLA (HLA-A, B e C) e de classe II (HLA-DR) (Murphy, 2005). Desta forma sendo o HLA-DR um antígeno fundamental na apresentação antigênica, as células endoteliais e as células dendríticas perivasculares são capazes de apresentação antigênica (Murphy, 2005).

[†] Os corpos de Weibel-Palade foram descritos inicialmente pelo anatomista suíço Ewald R. Weibel e pelo fisiologista romeno George Emil Palade em 1964. O Prof. Palade foi o ganhador do Prêmio Nobel de Fisiologia em 1974 pelo seu trabalho em organelas celulares. Os corpos de Weibel-Palade têm dupla função, na coagulação sanguínea e na resposta inflamatória. Há dois elementos que constituem estes corpos, um é o fator de von Willebrand (vWF), uma proteína multimérica envolvida na cascata de coagulação. O segundo é a P-selectina, a qual se liga como molécula de adesão intercelular aos leucócitos intravasculares. As observações de Weibel e Palade foram publicadas em: Weibel ER, Palade GE. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *Journal of Cell Biology* 1964;23:101-112.

Além disso, as células endoteliais dos capilares sanguíneos e dos linfáticos expressam na membrana luminal CD34, um marcador de linhagem mesenquimal (Sauter et al., 1998). Weiss et al. (1995) demonstraram que as células endoteliais expressam o fator de crescimento de mastócitos (MGF), que em sinergia com várias citocinas, como interleucina 3 (IL-3), IL-4 e IL-1 α , estimulam o desenvolvimento e proliferação de mastócitos, que normalmente se dispõem em torno dos vasos da UMD.

A superfície luminal da célula endotelial que compõem a vênula pós-capilar superficial é o local primário das interações adesivas que iniciam a diapedese subsequente dos leucócitos (Murphy, 2005). A membrana externa do corpo de Weibel-Palade contém uma glicoproteína denominada de CD62, a qual é rapidamente transportada à membrana endotelial luminal sob exposição à histamina ou trombina (Murphy, 2005). Esta molécula permite a adesão inicial ao rolamento leucocitário na superfície endotelial (Murphy, 2005).

3.3.3 Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, portanto, são CD34+, ocorrendo na derme humana normal, em pequeno número, como células ovaladas ou fusiformes com núcleo centralmente localizado, redondo ou oval (Murphy, 2005).

A estimulação dos mastócitos ocorre tanto por mecanismos imunes como não-imunes (Tharp, 2001). O estímulo imune melhor caracterizado aos mastócitos é a ligação de antígenos divalentes específicos aos seus receptores FcεRI. Todos os mastócitos teciduais expressam FcεRI na sua superfície, os quais se ligam à porção Fc dos anticorpos IgE. A ligação de um dado antígeno a IgE específica ligada ao receptor FcεRI, determina fusão das membranas dos grânulos intracitoplasmáticos dos mastócitos com a membrana plasmática da célula, o que resulta na liberação para o extracelular do conteúdo dos grânulos. Após o estímulo imune os mastócitos atravessam por um período refratário a novos estímulos imunes, o que permite a regeneração dos mediadores associados aos seus grânulos (Tharp, 2001). Por outro lado, os receptores FcεRI podem mediar a urticária, não só pela ligação de um antígeno à IgE específica a ele ligada, porém através da ligação com IgE dimerizada, com anticorpos anti-IgE e anticorpos anti-FcεRI (Greaves, 2000).

Nota: Vários estímulos podem desencadear ativação do mastócito, uma vez que há diversos receptores em sua membrana. 48/80 (composto 48/80); IgE (imunoglobulina de classe E); Ag (antígeno); FcεRI (receptor de alta afinidade para a IgE); FcγRI (receptor para imunoglobulina de classe G); PGE2 (prostaglandina E2); TNF (fator de necrose tumoral); TLR (receptores Toll-like); SCF (Stem cell factor, fator de células primordiais); c-kit (receptor da tirosinase para o SCF); Gp 120 (glicoproteína de 120 kd do vírus da imunodeficiência humana – HIV); C3a (terceiro componente do complemento ativado); C5a (quinto componente do complemento ativado); VHB (vírus da hepatite B); VHC (vírus da hepatite C).

Figura 3.2. Possíveis estímulos imunes e não-imunes desencadeadores de degranulação mastocitária

Após estímulos imunes ou não imunes os mastócitos liberam mediadores químicos pré-formados e neoformados, conforme exposto na figura 3.3.

Legenda: os mediadores pré-formados são liberados rapidamente após a ativação dos mastócitos por mecanismos imunes ou não imunes, em intervalo de tempo de 0 a 6 horas. Os mediadores neoformados são compostos pelos derivados de lipídeos (prostaglandinas e leucotrienos, além do fator ativador plaquetário), que são liberados conjuntamente com citocinas após 6 horas do estímulo e produzem a respsota de fase tardia da urticária.

Figura 3.3. Mediadores pré-formados e neoformados liberados pelos mastócitos humanos

Durante a liberação dos mediadores neoformados há estímulo a quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos (resposta de fase imediata) e de outros elementos celulares com a secreção dos mediadores neoformados e das citocinas, configurando a resposta de fase tardia da urtica (figura 3.4).

The Medical Clinics of North Am 1992; 76 (4): 805-40.

Legenda: os mastócitos liberam mediadores pré-formados com a histamina e a triptase que além de aumentar a permeabilidade capilar estimulam as terminações nervosas, produzindo a sensação prurido. Reflexamente os axônios liberam neuropeptídeos como a substância P, que estimulam mais ainda a degranulação mastocitária. Os mediadores pré-formados ainda estimulam a quimiotaxia dos neutrófilos e eosinófilos. Por sua vez os mediadores neoformados e as citocinas promovem o influxo no compartimento extravascular de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Adaptado de: Huston e Bressler (1992).

Figura 3.4. Elementos celulares da fase imediata e da fase tardia da urtica

Os mastócitos são identificados pelos seus grânulos ricos em mucopolissacarídeos e ocorrem em todas as classes de animais vertebrados, dos peixes aos mamíferos, apresentando ampla variação na sua distribuição, número e nos seus constituintes (Lagunof, 1972). Os mastócitos estão geralmente concentrados em torno dos vasos sanguíneos, especialmente nas vênulas pós-capilares (1 a 3 células por corte vascular transversal) (Murphy, 2005). Os grânulos citoplasmáticos não se coram pela coloração de rotina hematoxilina-eosina (Murphy, 2005). Além disso, os mastócitos na pele normal geralmente são indistinguíveis das outras células perivasculares, embora ocasionalmente possam ser reconhecidos pelo material citoplasmático granuloso (Murphy, 2005). Embora o citoplasma dos mastócitos bem desenvolvidos seja dominado pelos grânulos secretórios compactos, observações cuidadosas revelam uma constelação de organelas: mitocôndrias, complexos de Golgi, centríolos, microtúbulos, filamentos, ribossomos, retículo endoplasmático e lisossomos (Lagunof, 1972). Nos mastócitos humanos os grânulos secretórios exibem uma diversidade de estruturas características, contudo, o significado químico e funcional destas várias estruturas são desconhecidos (Lagunoff, 1972). Estes grânulos são corados pelo azul de metileno, os quais estão presentes na coloração de Giemsa, com azul de toluidina e pelo Alcian blue (Murphy, 2005). Apresentam a propriedade da metacromasia com o azul de metileno e azul de toluidina, isto é, se coram de cor diferente do corante azul, apresentando cor vermelha purpúrica (Murphy, 2005).

Tal como em ratos e camundongos, os humanos têm subpopulações de mastócitos, que diferem no conteúdo das proteases neutras (Metcalf et al., 1997). Alguns mastócitos humanos contêm níveis mensuráveis de triptase, quimase, protease catépsina G-símile e carboxipeptidase (Metcalf et al., 1997). Estas células são denominadas de Mastócitos triptase-quimase (MC_{TC}) devido ao seu conteúdo de proteases neutras triptase e quimase (Metcalf et al., 1997). Os mastócitos MC_T contêm apenas triptase (Metcalf et al., 1997). Os MC_{TC} predominam na pele e na submucosa do intestino delgado, enquanto que os MC_T são os que predominam nos septos alveolares dos pulmões e na mucosa do intestino delgado (Metcalf et al., 1997).

As células mais confundidas com os mastócitos são os basófilos (Dvorak, 2005). Os critérios de identificação dos mastócitos nos tecidos humanos incluem a presença de núcleo monolobado; arquitetura da superfície composta por sulcos alongados e estreitos; presença dos grânulos citoplasmáticos típicos e ausência de agregados citoplasmáticos de glicogênio (Dvorak, 2005). O citoplasma contém mitocôndrias, ribossomos livres, filamentos intermediários e corpos lipídicos (Dvorak, 2005). As estruturas de Golgi são pequenas nos mastócitos maduros (Dvorak, 2005).

Os grânulos dos mastócitos maduros são maiores, com forma mais variada, mais numerosos e geralmente, contêm mais padrões subestruturais que os grânulos dos basófilos (Dvorak, 2005). Há quatro padrões morfológicos básicos de grânulos dos mastócitos: “em rolo de pergaminho”, cristalino, particulado e misto (Dvorak, 2005).

3.3.3.1 Degranulação dos Mastócitos

A análise ultra-estrutural dos mecanismos de degranulação, que os mastócitos humanos e basófilos usam para efetuar a liberação dos produtos celulares envolvidos nas respostas inflamatórias revela dois padrões morfológicos básicos (Dvorak, 2005). Estes dois padrões são denominados respectivamente de degranulação anafilática (DAN) e degranulação em saca-bocado (DSB) (Murph, 2005). Ambos os padrões são encontrados em múltiplas circunstâncias, como: basófilos estimulados do sangue periférico, mastócitos estimulados dos pulmões ou na pele, entre outras (Dvorak, 1993).

Degranulação anafilática é um termo geral, usado para descrever o evento secretório rápido presentes nos mastócitos e basófilos (Dvorak, 2005). É um evento secretório rápido e explosivo, completado dentro de minutos da estimulação da célula (Dvorak, 2005). Os grânulos secretórios dos mastócitos humanos da pele na DAN são geralmente extruídos individualmente sem membranas, através de múltiplos poros, formados por fusão de membranas, na membrana citoplasmática da célula (Dvorak, 2005). DAN é induzida pela perturbação no receptor $Fc\epsilon RI$ da IgE, pelo ionóforo do cálcio A23187 e pela aplicação de in vivo na pele do fator recombinante de crescimento de célula primordial (rhSCF) (Murphy et al., 1987; Dvorak, 1993; Dvorak, 2005).

Morfologicamente a degranulação anafilática é caracterizada por uma série de alterações, que consistem em aumento dos grânulos, desorganização e elétron lucência do conteúdo dos grânulos, o que é denominado de *solubilização*, e fusão das membranas dos grânulos

adjacentes, formando condutos alongados. Estes condutos fundem-se com a membrana celular externa e permitem a comunicação dos grânulos desorganizados com o espaço extracelular, por vezes com perda de parte do citoplasma no espaço extracelular (Murphy et al., 1987; Dvorak, 1993).

Outro mecanismo é a degranulação “piecemeal” ou “em saca-bocado” (DSC), a qual é uma forma menos imediata de degranulação, descrita tanto para os mastócitos como para os basófilos (Murphy et al., 1987; Dvorak, 1993). Os estímulos específicos que induzem a DSC são bem menos conhecidos, em relação àqueles que estimulam a DAN (Dvorak, 2005). Na DSC, pequenas vesículas exocitóticas, de 50 a 70 nm de diâmetro, transportam, por fusão de membrana, o conteúdo solubilizado dos grânulos para a membrana externa da célula e finalmente ao espaço extracelular. Este último processo caracteriza a degranulação nas reações de fase tardia da hipersensibilidade do tipo imediata frente a alérgenos (Murphy et al., 1987). A identificação ultra-estrutural da DCS necessita a observação da presença de grânulos isolados, não fundidos, parcialmente vazios e grânulos vazios no citoplasma (Dvorak, 1993). Este padrão ultra-estrutural é a evidência mais comum de degranulação de mastócitos humanos em uma variedade de tecidos (Dvorak, 1993). Já foi observada em mastócitos intra-epiteliais do epitélio tubular renal em doentes com glomerulonefrite e pielonefrite crônicas, em mastócitos intra-epiteliais da mucosa dos seios da face cronicamente inflamada, no íleo de doentes com colite ulcerativa, nos mastócitos da pele com dermatite de contato alérgica, nos mastócitos do melanoma extensivo superficial, no penfigóide bolhoso e na urticária pigmentosa (Dvorak, 1993).

Legenda: a degranulação tipo saca-bocado (piecemeal degranulation – PMD) produz grânulos em solubilização no citoplasma, com áreas de vesículas vazias pela eliminação progressiva dos grânulos. A degranulação anafilática (AND) ocorre como formação de canais de degranulação (Dch), onde os grânulos são parcialmente solubilizados (pdgr) e extruídos na matriz intercelular (eegr).

Figura 3.5. Tipos ultra-estruturais de degranulação mastocitária

3.3.3.2 Triptase

A triptase é a principal enzima que concorre pela atividade tripsina-símile detectada inicialmente em mastócitos humanos por técnicas histoquímicas (Dvorak, 1993). Os mastócitos da pele do prepúcio humano contem 35 pg de triptase por célula, sendo localizada nos grânulos secretórios e liberada em paralelo com a histamina durante a degranulação (Schwartz et al., 1981). Os níveis de triptase concorrem para cerca de 20-50% do conteúdo protéico dos mastócitos (Dvorak, 1993). Níveis

negligenciáveis são detectados nos basófilos humanos (0,04 pg/célula) (Dvorak, 1993). Outros tipos celulares na pele normal, pulmões, pâncreas, baço, fígado e intestino, bem como eosinófilos, neutrófilos, monócitos e linfócitos do sangue periférico, não têm triptase detectável (Castells et al., 1987; Harvima et al., 1989).

Embora várias linhas de evidência sugiram o envolvimento da triptase na patogenia da asma e da inflamação alérgica em animais e em humanos, não há evidência do envolvimento das triptases no choque anafilático e nas outras manifestações clínicas da anafilaxia (Caughey, 2006). Especula-se que as triptases contribuam na patogenia da anafilaxia pela disseminação do sinal de degranulação de mastócito a mastócito (Caughey, 2006). Em teoria, a triptase que ganha a corrente sanguínea poderia disseminar o sinal de ativação mastocitária através do organismo, mas não há evidência de que a triptase no plasma seja cataliticamente ativa (Caughey, 2006).

As triptases podem aumentar a saída do plasma dos vasos sanguíneos pela lise do coágulo, promover broncoconstrição, o que poderia demonstrar seu envolvimento na erupção cutânea edematosa (urticária) e no broncoespasmo na anafilaxia (Caughey, 2006). Em relação especificamente ao choque anafilático, os níveis aumentados de triptase no sangue ocorrem posteriormente ao início do choque e da urticária, além de bem depois do pico na histamina sérica (Caughey, 2006). Desta forma, o surgimento da triptase no sangue provavelmente reflete principalmente a ativação dos mastócitos em uma variedade de tecidos, e não por si só a causa do choque anafilático (Caughey, 2006). No quadro 3.2 podemos observar os vários substratos naturais da triptase.

Quadro 3.2. Triptase e seus substratos naturais

Enzima	Substrato natural
Triptase	VIP Cinínogênio de alto peso molecular Pré-callicreína (ativação) Fibrinogênio Fibronectina PAR-2 (ativação) MMP-3 (ativação)

Nota: VIP, peptídeo intestinal vasoativo; MMP-3, metaloproteinase de matriz 3; PAR-2, receptor de proteinase ativada 2. Fonte: Miller HRP, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* 2002;105:375–90.

A β -triptase humana tem demonstrado induzir escape capilar e infiltração de neutrófilos e eosinófilos (Hallgren e Pejler, 2006). A triptase induz a expressão da Interleucina-8 (IL-8) e da Interleucina 1b (IL-1b) nas células endoteliais humanas, além da indução da expressão da molécula de adesão intracelular (ICAM) em células humanas de origem epitelial (Hallgren e Pejler, 2006). Uma ação autócrina da triptase tem sido demonstrada pela indução da degranulação mastocitária e de eosinófilos do sangue periférico dos doentes com asma, o que certamente demonstra a importância do elo entre a triptase dos mastócitos e a doença alérgica (Payne e Kam, 2004; Hallgren e Pejler, 2006). Embora a triptase possua um grande tamanho (130 kDa), o que pode impedir sua difusão ou movimento no fluido extracelular, ela pode ser detectada no fluido de lavado broncopulmonar (Payne e Kam, 2004). A triptase tem sido implicada em várias doenças como a síndrome da morte súbita infantil,

artrite, esclerose múltipla, encefalomielite auto-imune experimental, psoríase, fibrose e dermatite atópica (Payne e Kam, 2004; Hallgren e Pejler, 2006).

Samorapoompichit et al. (2006) estudaram a imunomarcagem da triptase sob a microscopia imunoeletrônica, em mastócitos de doentes portadores de neoplasias mastocitárias, incluindo mastocitose e leucemia mastocitária, em células cultivadas com fator de crescimento de células primordiais (SCF) e interleucina 6 (IL-6). Como esperado, o número de grânulos citoplasmáticos triptase positivos e a densidade da imunomarcagem (partículas de ouro triptase-positivas por grânulo) aumentou durante a diferenciação celular ao longo do tempo após incubação com SCF e IL-6. Desta forma, os autores encontraram grânulos triptase positivos em todas as fases da mastopoiese nos sistemas de cultura. Os dados deste estudo demonstram que a triptase é um marcador na microscopia imunoeletrônica de mastócitos maduros e imaturos e é produzida nos estágios iniciais do desenvolvimento dos mastócitos. Por outro lado, basófilos imaturos também contêm grânulos imuno-marcados pela triptase, de forma que permanece impossível diferenciar células de linhagem mastocitária e basofílica nos estágios iniciais de desenvolvimento pela microscopia eletrônica de transmissão e pela microscopia imunoeletrônica utilizando-se a triptase como marcador.

3.3.4 Rede Neural

Os nervos somáticos aferentes com as finas fibras não-mielinizadas (C-) ou mielinizadas (A δ -) derivam do gânglio dorsal e inervam a pele (Steinhoff et al., 2003). Ambos os tipos de fibras respondem tanto a estímulos fisiológicos como ao trauma físico (calor, frio, nocicepção, distensão mecânica e luz ultravioleta) e mesmo à baixa estimulação mecânica (Steinhoff et al., 2003). A pele é suprida com nervos sensitivos e nervos autonômicos, os quais permeiam toda a derme com fibras nervosas, com freqüentes ramificações (Murphy, 2005). Os nervos sensoriais e autonômicos diferem no fato de que os nervos sensitivos possuem bainha de mielina nas ramificações terminais, de forma oposta aos nervos autonômicos (Murphy, 2005). Os nervos autonômicos derivam do sistema nervoso simpático, suprem os vasos sanguíneos, o músculo eretor do pêlo, as glândulas écrinas e apócrinas (Murphy, 2005). As glândulas sebáceas não possuem inervação autonômica, tendo apenas estímulo endócrino (Murphy, 2005).

Os nervos estimulados liberam rapidamente neuropeptídeos ativos no microambiente cutâneo (Steinhoff et al., 2003). Além dos fatores desencadeadores exógenos, estímulos endógenos, tais como, prótons (alterações do pH), hormônios, citocinas, proteases, cininas e outros mediadores ainda não identificados liberados por vários tipos celulares envolvidos nos processos inflamatórios induzem a ativação de neurônios aferentes na pele (Steinhoff et al., 2003).

A derme papilar é ricamente innervada por fibras nervosas não mielinizadas, particularmente em torno da unidade microvascular da derme, onde axônios terminam frequentemente em proximidade aos mastócitos (Wiesner-Menzel et al., 1981). Esta íntima relação é de interesse, uma vez que pequenos grânulos neuro-secretórios dentro dos axônios contêm uma variedade de mediadores, incluindo neuropeptídeos, como a substância P, que podem servir como secretagogos aos mastócitos, que degranulam, induzindo à expressão de moléculas de adesão endotélio-leucócitos e assim atuam como agentes pró-inflamatórios (Murphy, 2005).

Dados recentes fortemente sinalizam que as proteases serinas tais como a trombina, catepsina G, triptase e tripsina não são meramente enzimas que degradam proteínas e peptídeos no espaço extracelular (Steinhoff et al., 2003). Elas são capazes também de mediar importantes efeitos durante a inflamação e a resposta imune, tais como, a liberação de citocinas, migração celular, recrutamento de leucócitos e ativação das células endoteliais (Steinhoff et al., 2003). Estes processos são, pelo menos em parte, mediados pela clivagem e ativação de receptores ativados pela proteinase (PAR), os quais são receptores acoplados à proteína G, com 7 domínios transmembrana ativados por clivagem proteolítica (Steinhoff et al., 2003). A ativação do PAR resulta em ativação das vias do sinal de transdução envolvidos na sinalização do processo inflamatório, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína quinase C (Steinhoff et al., 2003).

Na pele, o PAR₂ é expresso pelos queratinócitos, células endoteliais ativadas, nervos sensitivos e mastócitos (Moormann et al., 2006). Via liberação da histamina, os mastócitos se comunicam com os nervos sensitivos e vasos sanguíneos, regulando assim a inflamação neurogênica e o prurido (Steinhoff et al., 2003). A histamina media as respostas de prurido especialmente no início da resposta inflamatória pela ativação dos receptores de histamina nos nervos sensitivos cutâneos (Xie e He, 2005). Normalmente a triptase é liberada conjuntamente com a histamina pelos mastócitos (Moormann et al., 2006).

A ativação do PAR, localizado inclusive nos mastócitos, determina um ambiente de inflamação neuro-microvascular na pele (Moormann et al., 2006). Isto ocorre devido ao estímulo do PAR que determina uma cascata de eventos subseqüentes: aumento do cálcio intracelular e liberação de histamina pelos mastócitos; a histamina induz a ativação do receptor de histamina 1 (H1R) nas células endoteliais e nos nervos sensitivos da pele; a triptase por sua vez estimula a liberação de neuropeptídeos [substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)] nos nervos sensitivos via PAR₂; a triptase ativa os receptores PAR₂ das células endoteliais e alimenta novamente os receptores PAR₂ na membrana dos mastócitos; a substância P dos neurônios induz a liberação de mais histamina e triptase pelos mastócitos, além de induzir a formação de “gaps” no endotélio, extravasamento de plasma, infiltração extravascular de granulócitos, e por sua vez o CGRP induz vasodilatação e eritema nas arteríolas (Moormann et al., 2006).

3.4 Ultra-estrutura da urticária

A microscopia eletrônica da pele é um campo que atualmente reproduz o estudo de várias gerações de pesquisadores. Inicialmente, ela nos auxiliou, tanto a dermatologistas como a cientistas, na compreensão da estrutura e função da pele e tem sido evocada como uma ferramenta importante na pesquisa e no diagnóstico (Zelickson, Zelickson, 1993).

Na microscopia eletrônica de transmissão, os mastócitos da pele normal demonstram um diâmetro de 12 a 17 μ . Os grânulos intracitoplasmáticos específicos, os quais são encontrados em número abundante, são circundados por uma membrana, a qual pode ocasionalmente produzir invaginações redondas ou protusões. Além disso, os mastócitos podem conter múltiplas mitocôndrias, ribossomos e ergatoplasma. O núcleo celular apresenta um halo perinuclear, com pequenas interrupções, contém cromatina marginalmente condensada e às vezes um pequeno nucléolo (Parwaresch et al., 1985).

Murphy et al. (1987) estudaram a ultra-estrutura das lesões urticadas de três doentes com urticária ao frio e 4 doentes com dermatografismo. Na pele dos doentes com urticária ao frio, a degranulação dos mastócitos foi do tipo anafilático e acometeu todos os sub-compartimentos dos grânulos de forma equitativa. Os achados morfológicos nos doentes com dermatografismo demonstraram padrão de degranulação com características tanto do tipo anafilático, como do tipo “em saca-bocado”. No dermatografismo observou-se

um adelgaçamento da parede das vênulas pós-capilares, a qual poderia estar relacionada com a cronicidade de liberação de enzimas dos mastócitos, as quais são capazes de degradar a estrutura da parede e os componentes da matriz.

Lawlor et al. (1989) conduziram um estudo referente a histopatologia, imunofluorescência direta e ultra-estrutura da urticária de contato ao frio idiopática, com biopsias sucessivas, durante um período de 24 horas, após a aplicação de um estímulo frio. As biopsias foram realizadas em 6 doentes, nos intervalos de 10 minutos, 2 horas e 24 horas após a remoção do gelo (estímulo frio), e na pele controle. Nas biopsias realizadas nos intervalos de 10 minutos e 2 horas houve um exsudato considerável entre os queratinócitos e melanócitos, e vesículas preenchidas com fluido, entre alguns queratinócitos. Isto ainda estava presente nas biopsias de 24 horas. Nos intervalos de 10 minutos e 2 horas o exsudato também estava presente entre as fibras colágenas e dentro de vasos linfáticos dilatados. Todos os capilares encontravam-se dilatados, com atividade de micropinocitose no endotélio e pericitos. Hemácias, e ocasionalmente neutrófilos e eosinófilos, além de plaquetas agrupadas, foram observados no lume dos vasos, no intervalo de 10 minutos. Plaquetas degranuladas e ocasionalmente hemácias foram vistas fora do endotélio, entre os pericitos, após 10 minutos. Degranulação dos mastócitos foi observada após duas horas. No período de 24 horas, a epiderme e a derme praticamente retornaram às condições similares à pele controle, com leve infiltração perivascular em um doente. Os autores concluem que na urticária de contato ao frio, o processo é de

natureza mais exsudativa do que infiltrativa, de forma similar ao observado no angioedema vibratório e distinto daquele encontrado na urticária colinérgica, urticária de pressão tardia e no dermatografismo sintomático, onde o caráter de infiltração celular é mais proeminente.

Daroczy, Temesvári (1988) estudaram a microscopia eletrônica (ME) de lesões de urticária de contato, em 10 doentes, desencadeadas por diversas substâncias. A ME demonstrou um infiltrado perivascular de linfócitos, fagócitos mononucleares e mastócitos. A substância fundamental do tecido conectivo perivascular estava aumentada; o número de desmossomos encontrava-se diminuído. Os linfócitos tinham um fino halo de citoplasma denso contendo ribossomos, sendo o seu núcleo redondo ou denteado. As células mononucleares tinham um núcleo lobulado com nucléolo proeminente. O citoplasma com pequenos processos era rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e ribossomas. Havia algumas células dendríticas na epiderme, com citoplasma claro, se interpondo nos espaços intercelulares.

Sueki et al. (1993) demonstraram experimentalmente em cultivo de pele de prepúcio humano neonatal uma íntima relação entre dendrócitos dérmicos perivasculares (DDP) e mastócitos. Além disso, os DDP demonstraram aumento da expressão do Fator XIIIa em resposta a incubação com secretagogos (morfina, TNF α e substância P) e diminuição da expressão quando incubados com cromoglicato e soro anti-TNF α (antagonistas funcionais dos mastócitos).

Baseados em nossos achados prévios (Criado et al., 2002) onde observamos que na urticária aguda induzida pela exposição a medicamentos havia uma aparente interação funcional entre os elementos celulares da UMD, nos propomos a melhor caracterizar estas células, particularmente os dendrócitos dérmicos perivasculares sob o ponto de vista da expressão dos imuno-marcadores FXIIIa e CD34.

4. MÉTODOS

4.1 Universo de doentes

Incluíram-se sete doentes portadores de urticária aguda, associada a medicamentos, atendidos nos ambulatório da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

4.2.1 Critérios de inclusão

Serão incluídos no estudo doentes acima de 18 anos de idade, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico de urticária aguda, com provável etiologia medicamentosa, estabelecida pelo relato da ingestão de medicamentos, de 1 a 14 dias antes do surgimento da urticária e remissão da doença após a retirada do medicamento suspeito, comprovado pelo seguimento do doente por um período não inferior a três meses, a partir da admissão com a queixa de urticária. Anamnese detalhada sobre hábitos alimentares, exposição ocupacional a alérgenos, sintomas ou sinais de

doença infecciosa em atividade ou co-morbidades foram obtidos e investigados quando necessário, a fim de se excluir outras possíveis etiologias. O diagnóstico de urticária aguda associada a medicamentos foi firmado de acordo com os critérios estabelecidos por Moore et al., 1985 (ANEXO I). Foram incluídos apenas os doentes que compreenderam e assinaram o Termo de Consentimento Pós-Informado.

4.2.2 Critérios de exclusão

Não participaram do estudo mulheres gestantes, doentes menores de 18 anos, pessoas com doença cardíaca, respiratória, neurológica, infecciosa ou metabólica concomitantes. Para tanto foram obtidos os dados constantes da anamnese, do exame físico, informações dos prontuários dos doentes e exames complementares necessários.

4.3 Descrição da casuística

Os doentes foram aqui identificados pelas iniciais do nome, pelo número do registro geral (RG) no Hospital, número do estudo histopatológico pela microscopia óptica de luz e número do registro na microscopia eletrônica de transmissão. Os dados demográficos dos doentes incluídos no estudo estão relacionados no quadro 4.1.

Quadro 4.1. Dados demográficos dos doentes incluídos no estudo

Doente (iniciais)	Sexo	Idade	Etnia	Tempo de evolução da urticária	Medicamentos envolvidos	Número das lâminas da microscopia óptica de luz		Registro da microscopia eletrônica de transmissão	
						Pele urticada	Pele aparentemente sã	Pele urticada	Pele aparentemente sã
QCM (Caso 1)	F	42 anos	B	4 semanas	Diclofenaco potássico	1904	1903	IM 63A	IM 63B
ELO (Caso 2)	F	55 anos	N	3 semanas	Ácido acetil salicílico (AAS), dexclorfeniramina, fenilefrina e cafeína	2531	2532	IM 67A	IM 67B
SSM (Caso 3)	F	35 anos	B	2 semanas	Ácido acetil salicílico (AAS), dexclorfeniramina, fenilefrina e cafeína	1429	1430	IM 62A	IM 62B
RCAS (Caso 4)	F	29 anos	B	8 dias	Diclofenaco potássico	2286	2285	IM 65A	IM 65B
MNBS (Caso 5)	F	29 anos	B	3 dias	Sulfato ferroso	3195	3196	IM 68A	IM 68B
DCF (Caso 6)	F	32 anos	N	7 dias	Associação: dipirona, ácido ascórbico, maleato de clorfeniramina (Apracur®); associação: hioscina e dipirona, tintura canforada de <i>Papaver corniferum</i> (Elixir Paregórico®), ranitidina; associação de dimenidrato e cloridrato de piridoxina (Dramin B6®)	3537	3536	IM 69A	IM 69B
MNS (Caso 7)	F	49 anos	N	4 semanas	Dipirona sódica e diclofenaco potássico	3798	3799	IM 70A	IM 70B

Nota: F, sexo feminino; M, sexo masculino; B, etnia branca; N, etnia afro-americana.

Figura 4.1. Caso 1. Doente apresentando lesões urticadas no dorso de 3 mm a 3 cm de diâmetro

Figura 4.2. Caso 4. Doente com lesões urticadas no dorso e região lombar, com diâmetro de 3 mm a 2 cm

4.4 Fluxograma

Dos sete doentes que se apresentaram aos ambulatórios de Dermatologia do HC-FMUSP, com quadro de urticária aguda desencadeada por medicamento e que compreenderam e assinaram o Termo de Consentimento Pós-Informado, foram retirados dois fragmentos de pele, por biopsia incisional, em área não exposta ao sol, de sete doentes, com 1 a 30 dias de evolução da urticária. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPEPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o parecer número 047/06 (ANEXO II)

De forma a homogeneizar previamente a amostra, os casos foram escolhidos de acordo com os dados explicitados na Ficha Clínica (ANEXO III) e Termo de Consentimento Pós-Informado (ANEXO IV).

A biopsia de pele foi efetuada, após consentimento do doente para inclusão no estudo, com “punch” ou trépano de cinco mm, sob anestesia com lidocaína a 2% sem vasoconstritor em infiltração circular, seguida de hemostasia com ponto de sutura com fio mononylon® número quatro. Não foi possível estabelecer o intervalo preciso entre o início da lesão urticada e o ato da biopsia cutânea, mas estimamos um intervalo médio entre 24 a 48 horas. O fragmento denominado A foi obtido da pele lesionada (urtica) e o fragmento denominado B foi obtido da pele aparentemente sã, distante pelo menos cinco centímetros da lesão urticada. Os fragmentos colhidos foram divididos em 2 partes: uma delas foi fixada no formol tamponado a 10% (tampão fosfato 0,02M, pH 7,2), submetidos à técnica histológica de rotina

com coloração pela hematoxilina e eosina (HE) e imunoistoquímica e a outra parte foi fixada em glutaraldeído a 0,2% (Sigma®, No.G-5882, Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) / paraformaldeído a 4% (LADD nº 5-55080) com fosfato a 0.1M (pH 7,4), com tampão cacodilato com sacarose a 2.5% por duas horas e depois processado de acordo com o método proposto por Duarte et al (1992) e Reynolds (1963). Os cortes foram examinados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 (JEOL Ltd, Tóquio, Japão) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, sendo então obtidas fotografias representativas. O exame ultra-estrutural foi executado nos sete doentes com urticária aguda associada a medicamentos.

4.5 Técnicas

4.5.1 Técnica de Imunoistoquímica

Dos blocos de parafina foram obtidos oito cortes com espessura de 4 µm, utilizando-se navalhas descartáveis. Desse total, seis cortes foram reservados para as reações de imunoistoquímica e dois foram reservados para reação histoquímica com azul de Toluidina e hematoxilina-eosina.

As fitas de parafina foram cuidadosamente colocadas em banho-maria histológico e os cortes depositados em lâminas previamente tratadas com 3 aminopropyl-triethoxysilane (Sigma, St. Louis, MO, USA). As lâminas

com os cortes forma levados à estufa a 60° C por um período de 24 horas para melhor adesão do tecido.

As secções foram submetidas à reação de imunoistoquímica utilizando-se o método da estreptavidina ligada à biotina (LSAB) que é uma variante do método avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Hsu e Raine, 1981). As fontes comerciais, suas especificidades e respectivas diluições dos anticorpos primários podem ser observadas no quadro 4.2.

Quadro 4.2. Anticorpos primários usados nos estudos de imunoistoquímica e imunoeletrônica.

Antígeno	Monoclonal (M) ou Policlonal (P)	Fonte	Diluição (Imuno-histoquímica)	Diluição (microscopia imunoeletrônica)
Triptase	M (AAA3) (camundongo anti-humano)	DAKO, Carpinteria, CA, USA	1:2000	1:200
Fator XIIIa (FXIIIa)	P (coelho anti-humano)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA	1:100	1:100
CD34	M	DAKO, Carpinteria, CA, USA	1:100	NE

Nota: M, monoclonal; P, policlonal; NR, não executado.

Foi utilizado o protocolo discriminado a seguir:

4.5.1.1 Marcação simples pela imunoistoquímica

1. Desparafinização das lâminas em um banho de xilol a 56°C por 30 minutos e um segundo banho em xilol a temperatura ambiente por 20 minutos;
2. Passagem em etanol 100%, 95%, 80%, 70% por aproximadamente 5 minutos em cada um;
3. Lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos, água destilada e PBS;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 3%, com três incubações de 10 minutos cada;
5. Lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos, água destilada e PBS;
6. Recuperação antigênica utilizando:
 - Panela a vapor (Steamer) a 85-90°C por 15 minutos em solução retrieval (DAKO pH 6.0);
 - Resfriamento das lâminas por 20 minutos à temperatura ambiente, ainda na solução.
7. Lavagem em água corrente, água destilada e PBS por 5 minutos;
8. Incubação com um painel de anticorpos primários:
 - a. Anticorpo monoclonal anti-CD34 (DAKO, Glostrup, Denmark), diluição 1:100, em câmara úmida à temperatura de 4° C, por um período mínimo de 12 horas (*overnight*).
 - b. Anticorpo policlonal anti-Fator XIIIa (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), diluição 1:200, em câmara úmida à temperatura de 4° C, por um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

- c. Anticorpo monoclonal humano antitriptase (DAKO, Glostrup, Denmark), diluição 1:2.000, em câmara úmida à temperatura de 4° C, por um período mínimo de 12 horas (*overnight*).
9. Lavagem em tampão PBS, pH 7,2-7,4, com duas trocas de 5 minutos cada;
 10. Incubação com anticorpo secundário antiimunoglobulina (anti-Ig) de camundongo e de coelho (DAKO K492, Glostrup, Denmark), a temperatura ambiente, em câmara úmida selada, durante 40 minutos, diluído 1:500, em tampão PBS;
 11. Lavagem em tampão PBS, pH 7,2-7,4, com duas trocas de 5 minutos cada;
 12. Incubação com complexo streptavidina-biotina peroxidase (kit LSAB+ System-HRP) (DAKO, Carpinteria, CA, USA, code K0690), em temperatura ambiente por 40 minutos;
 13. Lavagem em tampão PBS, pH 7,2-7,4, com duas trocas de 5 minutos cada;
 14. Revelação das lâminas com 40 mg do substrato DAB (3,3'Diaminobenzidine) (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído em 100 ml de PBS, acrescido de 1 ml de dimetilsulfóxido e 1,2 ml de peróxido de hidrogênio;
 15. Lavagem em água corrente por 5 minutos;
 16. Contra-coloração com Hematoxilina de Carazzi por 10 segundos;
 17. Lavagem em água corrente por 5 minutos;
 18. Desidratação das lâminas em etanol 70%, 80%, 95% e 100%;

19. Passagem em xilol;
20. Montagem com lâminulas com resina de Entellan (Merk, Darmstadt, Germany), para leitura em microscopia óptica de luz.

4.5.1.2 Dupla Marcação pela Imunoistoquímica:

Dupla marcação foi realizada com a finalidade de se observar grânulos contendo triptase internalizados nos macrófagos dendríticos perivasculares da derme (MDPD) e a expressão do Fator XIIIa, a fim de evidenciar a presença ou ausência de expressão deste fator nos macrófagos perivasculares da UMD nos doentes com urticária aguda por exposição a medicamentos, na pele aparentemente sã e na pele lesionada (urticada).

Para demonstrar se os MDPD expressavam Fator XIIIa e fagocitavam grânulos de triptase extruídos pelos mastócitos, lâminas desparafinizadas, previamente incubadas com anticorpo monoclonal antitriptase, como descrito anteriormente, foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Fator XIIIa diluído a 1/200 em BSA por 30 minutos a 37° C, como descrito a seguir:

1. Revelação das lâminas com 40 mg do substrato 3,3' Diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído em 100 ml de PBS, acrescido de 40 mg de cloreto de níquel, para a reação ficar preta ao invés de marrom;
2. Lavagem das lâminas, duas vezes, em água corrente por 5 minutos e PBS por 5 minutos cada.

3. Incubação com anticorpo policlonal anti-Fator XIIIa (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), diluição 1:200 em tampão BSA, à temperatura de 37° C, por um período de 30 minutos;
4. Lavagem em tampão PBS, pH 7,2-7,4, por 5 minutos, trocado uma vez o PBS;
5. Revelação da reação com cromógeno vermelho, conforme instruções do fabricante;
6. Após a revelação, lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos e contra-corar com Hematoxilina de Carazzi por 40 segundos.
7. Montagem com lâminas com glicerina, as quais foram identificadas com etiqueta.
8. Observadas no microscópio óptico de luz.

4.5.1.3 Contagem de células à imunoistoquímica

As células marcadas com os anticorpos primários anti-FXIIIa, Triptase e CD34 foram contadas e os resultados expressos sob o número total de células marcadas por mm² na lâmina. O número de células imunomarcadas com os anticorpos específicos (FXIIIa, Triptase e CD34), na derme superficial e média (área da pele onde ocorrem os eventos fisiopatogênicos das urticas) foi contado no aumento de 400x em 12 campos ópticos, dispostos ao redor dos vasos, através da microscopia óptica de luz. O número de vasos sanguíneos nestes campos também foi registrado. O

cálculo da densidade de células imunomarcadas ou vasos foi efetuado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Densidade de células /mm}^2 = (\text{soma das células imunomarcadas nos 12 campos} / 12) / 0,0625$$

O coeficiente de variabilidade das contagens em duplicata de todas as lâminas foi menor que 5%. Não foi observada imuno-reatividade nos cortes onde foram omitidos os anticorpos primários.

4.5.1.4 Análise estatística

Os dados foram analisados com o pacote de análise estatística (GraphPad Prisma version 3.00 for windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste *U* de Mann-Whitney test foi utilizado para comparação entre os dois grupos (pele aparentemente sã e pele urticada). Para todos os testes o valor *p* foi menor que 0,05 para consideração de significado estatístico.

4.5.2 Microscopia Imunoeletrônica de transmissão (MIMET)

4.5.2.1 Técnica da microscopia imunoeletrônica de transmissão

Depois de fixados e incluídos na resina LR White (London resin company Ltd), os cortes de 70nm foram colocados na telas de níquel de 300

campos e então cobertas com películas de Formvar (LLAD, USA). A seguir foram então incubados em tampão TBS [tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer saline] na concentração de 0,05M em pH 7,2, à temperatura ambiente, em dois ciclos de 5 minutos e posteriormente colocados em tampão TBS com albumina bovina a 3% (BSA), pH 7,2, por 5 minutos. Depois, as telas foram incubadas com soro normal de cabra (NGS), diluído a 1:30, por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as telas de níquel foram incubadas com anticorpos monoclonais de camundongo antitriptase humana (1:200) ou com anticorpos policlonais de coelho anti-Factor XIIIa humano (1:100), diluídos em TBS 0,05M, pH 7,2 e 3% de BSA, durante a noite à temperatura de 4°C. As fontes comerciais dos anticorpos primários, suas especificidades e diluições encontram-se demonstradas no quadro 4.2. As concentrações ideais de todos os anticorpos utilizados foram determinadas em estudos pilotos.

Após duas lavagens em tampão (TBS+BSA+0,1% de Tween 20) por 5 minutos, os cortes foram incubados durante 30 minutos em tampão TBS com BSA a 1% (pH 8,2), na temperatura ambiente. Posteriormente, nas telas de níquel foram colocados os anticorpos secundários: IgG cabra anticamundongo fixada com partícula de ouro de diâmetro de 15 nm (Electron Microscopy Sciences, USA) na diluição de 1:20 para marcação da triptase e IgG de cabra anticoelho fixada com partícula de ouro de 10 nm de diâmetro (Electron Microscopy Sciences, USA) na diluição de 1:20 para marcação do FXIIIa, em tampão TBS com BSA a 1% (pH 8,2) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após isto, as telas de níquel foram lavadas em

água destilada e fixadas em solução aquosa de glutaraldeído a 2%. Finalmente, os cortes foram contrastados com solução aquosa saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo de Reynolds (Reynolds, 1963). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Foi realizada observação dos cortes e fotografias das telas mais relevantes no Microscópio Eletrônico JEOL 1010. Nos cortes que foram utilizados como controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Nestes cortes não foram identificadas telas marcadas com triptase ou FXIIIa.

4.5.2.2 Técnica da Dupla microscopia imunoeletrônica de transmissão (DMIMET)

Para melhor caracterizar se os MDPV expressam Fator XIIIa e fagocitam grânulos de triptase extruídos pelos mastócitos nas urticas de doentes com urticária aguda associada a medicamentos, utilizamos a técnica de dupla imunomarcacão para estudo pela DMIMET.

No procedimento da dupla imunomarcacão pelo ouro, as telas de níquel foram incubadas durante a noite, a 4°C e por duas horas a 25°C com 20-µgotas da mistura dos anticorpos primários (antitriptase e anti-FXIIIa, nas mesmas diluições utilizadas na imunomarcacão simples com o ouro) diluídas em tampão TBS 0,05M, pH 7,2 e BSA a 3%, durante a noite, a 4°C. Após quatro lavagens em tampão (TBS+BSA+Tween 20 a 0,1%) durante 5 minutos, as telas de níquel foram incubadas durante 30 minutos em TBS com BSA a 1% (pH 8,2), na temperatura ambiente. As telas foram então colocadas em tampão Tris (0,05 M, pH 8,2) contendo BSA a 1% (diluente

para os anticorpos secundários marcados com o ouro) durante 5 minutos, seguido pela incubação em uma mistura de anticorpos de cabra antiamundongo marcados com partículas de ouro de 15nm de diâmetro e anticorpos de cabra anticoelho marcados com partículas de ouro de 10nm de diâmetro (diluição de 1:20) durante 1 hora na temperatura ambiente, com tampão TBS com BSA a 1% (pH 8,2). Os controles foram obtidos com a omissão dos anticorpos primários. Finalmente, as telas de níquel foram contrastadas com solução aquosa saturada de acetato de uranila e citrato de chumbo de Reynolds. Estes procedimentos foram adaptados de Craig e Schwartz (1990). Após as devidas imuno-marcações os cortes ultrafinos foram analisados no Microscópio Eletrônico JEOL 1010.

4.5.2.3 Avaliação dos achados ultra-estruturais nas biopsias da pele dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos

Foram registradas 401 fotos dos campos mais representativos observados ao microscópio eletrônico de transmissão, tanto da pele aparentemente saudável, como da pele urticada, dos sete doentes incluídos no estudo. Procuramos através destas fotos semiquantificar os elementos celulares ou estruturas presentes tanto na pele aparentemente saudável, como na pele urticada. Avaliamos o edema extracelular da derme superficial e média, a presença de organelas vésico-vacuolares no endotélio das vênulas, o tipo de degranulação mastocitária (anafilática ou em saca-bocado), a presença de basófilos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos na derme. Para tanto, atribuímos uma escala em cruzes, a qual representa os seguintes achados: -

(ausência do elemento, elemento celular ou estrutura), + (poucos elementos, elementos celulares ou estruturas), ++ (presença moderada de elementos, elementos celulares ou estruturas), +++ (presença intensa de elementos, elementos celulares ou estruturas) e ++++ (presença muito intensa de elementos, elementos celulares ou estruturas).

O delineamento do trabalho seguiu o de estudo de casos, no qual toda a população envolvida apresenta a doença em estudo.

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos Clínicos

As lesões urticadas em todos os sete doentes se apresentaram distribuídas aleatoriamente em toda a superfície cutânea, com diâmetro variando entre 3 mm a 8 cm; a área genital, bem como o couro cabeludo foram poupados. Nenhum dos doentes com urticária aguda apresentou angioedema associado. Os sintomas eram referidos sob a forma de “pinicação, queimação e coceira” por todos os doentes. A intensidade da urticária foi avaliada entre os sete doentes e a média foi de 4,71 à época das biopsias (quadro 5.1), em escala variando de 0 a 6 de intensidade.

Quadro 5.1. Avaliação da intensidade da urticária

DOENTE	URTICAS	PRURIDO	ESCORE*
Caso 1	1	3	4
Caso 2	2	3	5
Caso 3	2	3	5
Caso 4	2	3	5
Caso 5	2	3	5
Caso 6	2	3	5
Caso 7	1	3	4

*Soma de escores (urticas+prurido)=(0-6). *Adaptado de:* Zuberbier T, et al.. Definition, Classification, and Routine Diagnosis of Urticaria: A Consensus Report. J Investig Dermatol Symp Proc 2001;6:123-7.

5.2 Microscopia Óptica de Luz (MOL) e Estudo Imunoistoquímico (EI)

5.2.1 Coloração pela Técnica da Hematoxilina-Eosina:

As amostras coletadas dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos demonstraram um infiltrado perivascular linfo-monocitário leve a moderado na derme superficial e média, com edema intersticial e esparsos neutrófilos e eosinófilos, em todos os doentes (figuras 5.1A e 5.1B).

Figura 5.1A. Caso 1: lesão urticada. Observe o edema na derme superficial e o leve infiltrado inflamatório perivascularna derme superficial (HE, OM 200x)

Figura 5.1B. Caso 1: lesão urticada. Edema intersticial na derme e leve infiltrado inflamatório perivascular composto por linfomononucleares e eosinófilos (HE, OM 1.000x)

5.2.2 Coloração pelo Azul de Toluidina

Foram identificados mastócitos íntegros em disposição perivascular e perianexial na derme superficial e média na pele aparentemente normal de todos os doentes; os mastócitos demonstravam vários grânulos metacromáticos no seu citoplasma (figuras 5.2A, 5.2B e 5.2C), sendo possível observar raros mastócitos parcialmente exauridos dos seus grânulos. Nas lesões urticadas havia mastócitos intactos e principalmente mastócitos parcialmente degranulados em torno dos vasos sanguíneos da derme papilar e eventualmente na derme reticular.

Figura 5.2A. Caso 5: lesão urticada. Presença de mastócitos na derme (coloração de azul de toluidina, OM 400x).

Figura 5.2B. Caso 7: lesão urticada. Presença de mastócitos normais (■), mastócitos parcialmente depletados de grânulos (●) e grânulos extruídos (seta) (coloração de azul de toluidina, OM 1.000x)

Figura 5.2C. Caso 7: pele aparentemente sã. Presença de mastócitos normais (■), mastócitos parcialmente depletados de grânulos (●) e grânulos extruídos (setas) (coloração de azul de toluidina, OM 1,000x).

5.2.3 Estudo Imunoistoquímico

5.2.3.1 Imunomarcção com anti-CD34

Observamos células CD34⁺ em padrão esparsos na derme superficial e de forma mais proeminente na derme reticular. As células endoteliais da derme superficial e média também se apresentaram imunomarcadas com o CD34, além dos dendrócitos da derme reticular (figuras 5.3 e 5.4).

Figura 5.3. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcção para CD34 (cor castanha). Observe o discreto número de células imunomarcadas na derme superficial e o número mais proeminente de células imunomarcadas na derme profunda. Há presença de células endoteliais imunomarcadas com CD34 nos pequenos vasos (OM, 200x).

Figura 5.4. Caso 2: lesão urticada. Imunomarcção para CD34 (cor castanha). Há presença de células endoteliais imunomarcadas com CD34 nos pequenos vasos (OM, 400x).

Nas lesões urticadas, o número de dendrócitos dérmicos CD34⁺ por mm² (ANEXO V) foi similar ao do grupo controle (pele aparentemente normal) (quadros 5.2 e 5.3) ($p=0,6200$).

Quadro 5.2. Contagem de células CD34⁺ na pele aparentemente normal

Doentes	Pele aparentemente normal	
	Número de Vasos / mm ²	Número de células CD34 ⁺ / mm ²
Caso 1	26.66	61.33
Caso 2	57.33	117,33
Caso 3	44.00	114.66
Caso 4	56.00	41.33
Caso 5	40.00	89,33
Caso 6	64,00	29,33
Caso 7	40,00	74,66

Quadro 5.3. Contagem de células CD34⁺ na pele urticada

Doentes	Pele urticada	
	Número de Vasos / mm ²	Número de células CD34 ⁺ / mm ²
Caso 1	62,66	116,00
Caso 2	84,00	58,66
Caso 3	52,00	77,33
Caso 4	46,66	89,33
Caso 5	28,00	45,33
Caso 6	52,00	29,33
Caso 7	53,33	33,33

P value 0,6200

	Controles	Pele urticada
Minimum	29,33	29,33
Maximum	117,3	116,0
Mean	75,42	64,19
Std. Deviation	34,10	31,74

Gráfico 5.1. Número de células imunomarcadas com CD34 na pele controle (pele aparentemente normal) (*coluna verde*, n = 7) e na pele urticada (*coluna vermelha*, n = 7). Os resultados são expressos sob o número de células imunomarcadas por mm quadrado das amostras biopsiadas.

5.2.3.2 Imunomarcção com anti-FXIIIa

Observamos a presença de células dérmicas difusamente imunomarcadas com FXIIIa, demonstrando aspecto dendrítico, com 2 a 4 prolongamentos citoplasmáticos longos, consistentes com dendrócitos da derme. Havia múltiplos dendrócitos da derme FXIIIa⁺ na derme superficial e média, dispersos nas áreas subepidérmicas e em torno dos vasos sanguíneos, na pele aparentemente normal (figuras 5.5, 5.6 e 5.7).

Figura 5.5. Caso 4: lesão urticada. Imunomarcção para FXIIIa (cor negra). Observe os dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺ (setas) na derme superficial ao redor dos vasos sanguíneos (OM, 400x)

Figura 5.6. Caso 4: lesão urticada. Imunomarcção para FXIIIa (cor negra). Observe os dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺ (setas) na derme superficial ao redor dos vasos sanguíneos (OM, 600x)

Figura 5.7. Caso 5: pele urticada. Imunomarcção com FXIIIa (castanho-enegrecida). Observar vários dendrócitos dérmicos imunomarcados apresentando prolongamentos dendríticos na derme superficial (OM 1.000x)

O número destas células imunomarcadas (ANEXO VI) foi semelhante em ambos os grupos de amostras (quadros 5.4 e 5.5). Na pele urticada, o número de dendrócitos da derme FXIIIa⁺ por mm² foi similar ao do grupo controle (pele aparentemente normal), não havendo diferença estatística significativa (p=0,5350).

Quadro 5.4. Contagem de células FXIIIa⁺ na pele aparentemente normal

Doentes	Pele aparentemente normal	
	Número de Vasos / mm ²	Número de células FXIIIa ⁺ / mm ²
Caso 1	36.00	66.66
Caso 2	53,33	109.33
Caso 3	44.00	114.66
Caso 4	46.66	37.33
Caso 5	44.00	117.33
Caso 6	56.00	94.66
Caso 7	48.00	53.33

Quadro 5.5. Contagem de células FXIIIa⁺ na pele urticada.

	Pele urticada	
	Número de Vasos / mm ²	Número de células FXIIIa ⁺ / mm ²
Caso 1	46.66	62.66
Caso 2	52.00	96.00
Caso 3	52.00	68.00
Caso 4	49.33	101.33
Caso 5	25.33	54.66
Caso 6	54.66	57.33
Caso 7	45.33	60.00

P value 0,5350

	Controles	Pele urticada
Minimum	37,33	54,66
Maximum	117,3	101,3
Mean	84,76	71,43
Std. Deviation	32,20	19,14

Gráfico 5.2. Número de células imunomarcadas com FXIIIa na pele controle (pele aparentemente normal) (*coluna verde*, n = 7) e na pele urticada (*coluna vermelha*, n = 7). Os resultados são expressos sob o número de células imunomarcadas por mm quadrado das amostras biopsiadas

5.2.3.3 munomarcção com antitriptase

Células triptase-positivas foram identificadas em distribuição perivascular e perianexial na derme média e superficial na pele aparentemente normal. Nas lesões urticadas havia mastócitos morfológicamente íntegros, além de mastócitos parcialmente depletados dos seus grânulos, em torno dos vasos sanguíneos da derme papilar (figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

Figura 5.8. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcação para triptase (cor castanha). Observe os mastócitos (cor castanha) (setas) ao redor dos vasos da derme superficial e média. A presença de cor acastanhada ao redor dos mastócitos pode refletir a difusão da triptase no tecido conjuntivo, após a degranulação mastocitária (OM, 400x)

Figura 5.9. Caso 6: lesão urticada. Imunomarcção para triptase (cor castanha). Observe os mastócitos (cor castanha) (setas) ao redor dos vasos da derme superficial e média. A presença de cor acastanhada ao redor dos mastócitos pode refletir a difusão da triptase no tecido conjuntivo, após a degranulação mastocitária (OM, 1.000x)

Figura 5.10. Caso 6: lesão urticada. Imunomarcação para triptase (cor castanha). Observe os mastócitos (cor castanha) (setas) ao redor dos vasos da derme superficial e média. A presença de cor acastanhada ao redor dos mastócitos pode refletir a difusão da triptase no tecido conjuntivo, após a degranulação mastocitária (OM, 1.000x)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células imunomarcadas pela triptase (ANEXO VII) na pele aparentemente normal e na pele urticada (quadros 5.6 e 5.7) ($p=0,6694$).

Quadro 5.6. Contagem de células Triptase⁺ na pele aparentemente sã

Doentes	Pele aparentemente normal	
	Número de vasos / mm ²	Número de células Triptase ⁺ / mm ²
Caso 1	40,00	77,33
Caso 2	42,66	61,33
Caso 3	46,66	116,00
Caso 4	42,66	68,00
Caso 5	41,33	66,66
Caso 6	45,33	53,33
Caso 7	48,00	78,66

Quadro 5.7. Contagem de células Triptase⁺ na pele urticada

Doentes	Pele urticada	
	Número de vasos / mm ²	Número de células Triptase ⁺ / mm ²
Caso 1	48,00	68,29
Caso 2	69,33	112,0
Caso 3	42,66	92,00
Caso 4	45,33	38,66
Caso 5	22,66	54,66
Caso 6	42,66	52,00
Caso 7	113,33	73,33

P value 0,7104

	Controles	Pele urticada
Minimum	53,33	38,66
Maximum	116,0	112,0
Mean	74,47	70,13
Std. Deviation	20,30	25,18

Gráfico 5.3. Número de células imunomarcadas com Triptase na pele controle (pele aparentemente normal) (*coluna verde*, $n = 7$;) e na pele urticada (*coluna vermelha*, $n = 7$;) . Os resultados são expressos sob o número de células imunomarcadas por mm quadrado das amostras biopsiadas

5.2.3.4 Dupla Imunomarcção com antitriptase e anti-FXIIIa

Nas amostras de pele-controle (pele aparentemente sã), foi observada dupla imunomarcção com antitriptase e anti-FXIIIa em várias células da derme superficial e média. Além disso, nos cortes obtidos de lesões urticadas e nos cortes de pele aparentemente normal, observamos em todos os casos a presença de dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (corados em vermelho), mastócitos imuno-marcados pela triptase (corados em negro ou marrom) e dendrócitos da derme duplamente imunomarcados com FXIIIa⁺ (citoplasma difusamente avermelhado) e Triptase⁺ (grânulos castanho-enegrecidos fagocitados no citoplasma dos dendrócitos da derme) (figuras

5.11 a 5.18), demonstrando inequivocamente a presença de fagocitose de grânulos extruídos dos mastócitos, tanto na pele urticada dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos.

Figura 5. 11. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcção dupla com dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (cor vermelha) e mastócitos triptase⁺ (cor castanha-enegegrecida). * (Dendrócitos da derme FXIIIa⁺); ■(mastócitos) e → (dupla imunomarcção). Observar os grânulos dos mastócitos (cor enegrecida) dentro dos dendrócitos da derme (cor vermelha) (OM 1,000x)

Figura 5.12. Caso 1: lesão urticada. Imunomarcção dupla com dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (cor vermelha) e mastócitos triptase⁺ (cor castanha-enechada). * (Dendrócitos da derme FXIIIa⁺); ■(mastócitos) e → (dupla imunomarcção). Observar os grânulos dos mastócitos (cor enegrecida) dentro dos dendrócitos da derme (cor vermelha) e grânulos extruídos (^) na matriz extracelular da derme (OM 1,000x)

Figura 5.13. Caso 1: lesão urticada. Imunomarcção dupla com dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (cor vermelha) e mastócitos triptase⁺ (cor castanha-enechada). * (Dendrócitos da derme FXIIIa⁺); ■(mastócitos) e • (dupla imunomarcção). Observar os grânulos dos mastócitos (cor enegrecida) dentro dos dendrócitos da derme (cor vermelha) e grânulos extruídos (→) na matriz extracelular da derme (OM 1,000x)

Figura 5.14. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcacão dupla com dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (cor vermelha) e mastócitos triptase⁺ (cor castanha-enegrecida). * (Dendrócitos da derme FXIIIa⁺); ■(mastócito) (OM 400x)

Figura 5.15. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcção dupla com dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (cor vermelha) e mastócitos triptase⁺ (cor castanha-enebecida). * (Dendrócitos da derme FXIIIa⁺); ■(mastócito) e • (dupla imunomarcção). Observar os grânulos dos mastócitos (cor enegrecida) dentro dos dendrócitos da derme (cor vermelha) e grânulos extruídos (→) na matriz extracelular da derme (OM 1.000x)

Figura 5.16. Caso 3: lesão urticada. Imunomarcção dupla com dendrócitos da derme FXIIIa⁺ (cor vermelha) e mastócitos triptase⁺ (cor castanha-negrecida). ■(mastócito) e ● (células com dupla imunomarcção). Observar os grânulos dos mastócitos (cor enegrecida) dentro dos dendrócitos da derme (cor vermelha). Presença de polimorfonucleares intra e extravasculares (OM 1.000x)

Houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células duplamente marcadas na pele aparentemente normal e na pele urticada (ANEXO VIII), com maior número de células duplamente marcadas na pele aparentemente sã (quadros 5.8 e 5.9) ($P=0,0070$).

Quadro 5.8. Contagem de células duplamente imunomarcadas na pele aparentemente sã

Doentes	Pele aparentemente sã	
	Número de vasos / mm ²	Número de células duplamente imunomarcadas / mm ²
Caso 1	28,00	40,00
Caso 2	46,66	42,66
Caso 3	34,66	24,00
Caso 4	48,00	65,33
Caso 5	26,66	33,33
Caso 6	37,33	36,00
Caso 7	37,33	44,00

Quadro 5.9. Contagem de células duplamente imunomarcadas na pele urticada

Doentes	Pele urticada	
	Número de vasos / mm ²	Número de células duplamente imunomarcadas / mm ²
Caso 1	29,33	28,00
Caso 2	34,66	24,00
Caso 3	30,66	24,00
Caso 4	33,33	17,33
Caso 5	22,66	17,33
Caso 6	38,66	36,00
Caso 7	28,00	18,66

P value 0,0070

	Controles	Pele urticada
Minimum	24,00	17,33
Maximum	65,33	36,00
Mean	40,76	23,62
Std. Deviation	12,76	6,788

Gráfico 5.4. Número de células duplamente imunomarcadas com FXIIIa e Triptase, na pele controle (pele aparentemente normal) (*coluna verde*, n = 7) e na pele urticada (*coluna vermelha*, n = 7). Os resultados são expressos sob o número de células imunomarcadas por mm quadrado das amostras biopsiadas

5.3 Microscopia imunoeletrônica de transmissão (MIMET)

5.3.1 Aspectos Gerais

Nos cortes das lesões de urticária à MIMET observou-se dilatação vascular, com plaquetas, hemácias e/ou leucócitos na luz vascular. Na área perivascular foram observados mastócitos, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, linfócitos e células dendríticas. Um número variável de neutrófilos polimorfonucleares e eosinófilos foram observados na pele urticada, além de linfócitos. Também foram observados grânulos extruídos dos eosinófilos.

Apenas poucos mastócitos apresentaram aspecto íntegro, enquanto a maioria foi identificada com depleção dos seus grânulos, especialmente nas amostras de pele urticada. Na pele aparentemente sã também observamos a presença de mastócitos degranulados. Em algumas áreas havia a associação íntima de mastócitos degranulados, macrófagos, linfócitos e células dendríticas perivasculares. Alguns macrófagos continham melanina fagocitada e foram caracterizados como melanófagos. A epiderme e a zona de membrana basal encontraram-se preservadas. Os controles negativos foram obtidos através da omissão dos anticorpos primários, e não apresentaram imunomarcação (figura 5.17).

Figura 5.17. Caso 4: pele aparentemente sã. Controle negativo. Mastócito com múltiplos grânulos sem imunomarcação com partículas de ouro (omissão dos anticorpos primários) - (MIMET, OM 62.500x)

5.3.2 Organelas Vésico-vacuolares (OVV)

Em cortes de lesões urticadas encontramos nas pequenas vênulas, a presença de organelas vesiculares intracitoplasmáticas no endotélio, em número múltiplo, por vezes, presentes sob a forma de dezenas de vesículas agrupadas, especialmente em torno das junções do tipo gap entre as células endoteliais (figuras 5.18, 5.19 e 5.20). Ocasionalmente pudemos observar imunomarcação com FXIIIa no citoplasma das células endoteliais, especialmente agrupada nas projeções citoplasmática abluminais (figura 5.21).

Figura 5.18. Caso 1: lesão urticada. Pequena vênula da derme representada por duas células endoteliais. Observar a presença de organelas vésico-vacuolares (seta) organizada sob a forma de numerosas coleções de vesículas citoplasmáticas e vacúolos localizados ao redor das zonas eléctron-densas nas áreas de junção intercelular na lateral das células endoteliais (MIMET, OM 12.500x).

Figura 5.19. Caso 4: lesão urticada. Pequena vênula da derme representada por duas células endoteliais. Observar no detalhe a presença de organelas vésico-vacuolares (seta) organizada sob a forma de numerosas coleções de vesículas citoplasmáticas e vacúolos localizados ao redor das zonas eléctron-densas nas áreas de junção intercelular na lateral das células endoteliais (MIMET, OM 75.000x)

Figura 5.20. Caso 4: pele aparentemente sã. Vênula constituída por duas células endoteliais, com discreta formação de organelas vésico-vacuolares (detalhe a esquerda) - (MIMET, OM 8.000x)

Figura 5.21. Caso 3: pele urticada. Célula endotelial apresentando imunomarcacão com ouro para o FXIIIa no citoplasma (setas) (MIMET, OM 100.000x)

Observamos nas lesões urticadas, células endoteliais com dupla marcação (triptase e fator XIIIa) – (figura 5.22).

Figura 5.22. Caso 4: pele urticada. Célula endotelial apresentando dupla imunomarcacão om ouro para o FXIIIa no citoplasma (seta negra) e triptase (setas brancas) - (DMIMET, OM 100.000x)

5.3.3 Mastócitos

Alguns mastócitos apresentaram-se arranjados sob íntimo contato com dendrócitos da derme, em um arranjo sililar a “bola e luva de baisebol”, com os mastócitos sendo parcialmente envolvidos pelos dendritos dos dendrócitos dérmicos (figuras 5.23, 5.24A e 5.24B).

Figura 5.23. Caso 1: lesão urticada. Prolongamentos finos e alongados, que constituem os dendritos (dr) dos dendrócitos dérmicos (DD) envolvem os mastócitos (MC), que apresenta nesta foto degranulação do tipo anafilática. Observar os canais de degranulação (*) (MIMET, OM 15.000x).

Figura 5.24A. Caso 1: lesão urticada. Prolongamentos finos e alongados, que constituem os dendritos (dr) dos dendrócitos dérmicos (DD) envolvem os mastócitos (MC) - (MIMET, OM 20.000x)

Figura 5.24B. Caso 1: lesão urticada. Prolongamentos finos e alongados, que constituem os dendritos (dr) dos dendrócitos dérmicos (DD) envolvem os mastócitos (MC) - (MIMET, OM 45.000x)

Nós encontramos mastócitos íntegros na maioria dos cortes da pele aparentemente normal e alguns em processo de degranulação (figuras 5.25 e 5.26). Nas lesões de urticária (figuras 5.27, 5.28A, 5.28B, 5.29 e 5.30) havia mastócitos em diferentes estágios de degranulação, em torno dos vasos sanguíneos da derme superficial e média. O tipo de degranulação observada foi degranulação anafilática (DAN) e excepcionalmente do tipo saca-bocado (DSB) (figuras 5.26, 5.27 e 5.31), em maior extensão na pele urticada e em menor monta na pele aparentemente normal.

Figura 5.25. Caso 3: pele aparentemente sã. Mastócito com formato fusiforme. Observar alguns grânulos extruídos adjacentes ao mastócito (setas) (MIMET, OM 15.000x)

Figura 5.26. Caso 4: pele aparentemente normal. Unidade Microvascular da Derme (UMD). MC, mastócito; P, pericito; EC, célula endotelial; LV, lume vascular; VC, célula velada. Observar a degranulação mastocitária tipo saca-bocado (*) – (MIMET, OM 12.500x)

Figura 5.27. Caso 7: lesão urticada. Degranulação mastocitária. Há um padrão misto de degranulação com tipo em saca-bo cado (*) e do tipo anafilática (setas negras) - (MIMET, OM 12.500x)

A degranulação do tipo anafilática foi encontrada em sua apresentação característica, com fusão de grânulos no citoplasma dos mastócitos, solubilização dos grânulos e fusão das membranas, ora de forma simples, ora formando canais de degranulação (figura 5.28A, 5.28B e 5.29). Após a degranulação, muitos mastócitos da pele urticada

encontravam-se estruturalmente alterados, com integridade nuclear, porém com o citoplasma parcialmente depletado de grânulos (figuras 5.30 e 5.31) ou sem grânulos e com vacúolos vazios (figura 5.32) ou em aparente processo de síntese do seu conteúdo. Muitos grânulos extruídos na matriz intercelular da derme apresentavam-se em processo de solubilização, porém exibiam na imunomarcção simples ora com Tryptase, ora com Fator XIIIa. Alguns grânulos aparentemente encontravam-se edemaciados com seu volume muito aumentado, dispostos em meio à matriz intercelular.

Figura 5.28A. Caso 4: lesão urticada. Mastócito em degranulação. Degranulação nanfilática em curso, com formação dos canais de degranulação (setas negras) e imunomarcção para o FXIIIa nos grânulos (setas brancas) (MIMET, OM 62.500x)

Figura 5.28B. Caso 4: pele urticada. Detalhe da foto anterior. Mastócito em degranulação. Presença de degranulação do tipo anafilática em curso e canais de degranulação (setas negras). Imunomarcacão com ouro, partículas de 10nm (FXIIIa – setas brancas) - (MIMET, OM 62.500x)

Figura 5.29. Caso 5: pele urticada. Mastócito degranulando com canais de degranulação (seta) - (MIMET, OM 37.500x)

Figura 5.30. Caso 4: pele urticada. Mastócito degranulado e degranulação do tipo anafilática. Remanescentes dos grânulos (setas) (MIMET, OM 50.000x)

Figura 5.31. Caso 2: pele aparentemente sã. Dupla imunomarcção com FXIIIa (setas negras) e Tryptase (setas brancas). Mastócito com degranulação do tipo saca-bocado (DMIMET, OM 32.000x)

Figura 5.32. Caso 5: pele urticada. Citoplasma de mastócito depletado de grânulos e grânulos solubilizados. Presença de triptase (setas) – (MIMET, OM 100.000x).

5.3.4 Dendrócitos da Derme

Dendrócitos da derme FXIIIa⁺ foram identificados em localização perivascular tanto na pele aparentemente sã, como na pele urticada. A expressão do FXIIIa foi marcada no citoplasma dos dendrócitos da derme (figura 5.33) e nos seus prolongamentos citoplasmáticos. Em alguns dendrócitos da derme o FXIIIa pode ser encontrado em pequena quantidade no núcleo destas células, especialmente sobre a cromatina nuclear.

Figura 5.33. Caso 4: pele aparentemente sã. Dendrócito da derme apresentando imunomarcacão com partículas de ouro para o FXIIIa no citoplasma (setas negras) e na cromatina nuclear (setas brancas) - (MIMET, OM 150.000x)

Nos cortes de pele urticada e mesmo na pele aparentemente normal, encontramos sinais de imunomarcacão com a Triptase em estruturas dentro de vacúolos citoplasmáticos dos dendrócitos da derme, sugerindo prévia fagocitose dos remanescentes de grânulos extruídos pelos mastócitos.

As células identificadas como melanófagos (figura 5.34), por conterem melanina fagocitada, exibiam imunomarcacão com o FXIIIa (partículas de ouro de 10 nm de diâmetro) no seu citoplasma. Nos cortes submetidos à imunomarcacão pela Triptase não foi observada a expressão de partículas de ouro de 15 nm, nestas células ou nas estruturas por elas fagocitadas (melanina).

Figura 5.34. Caso 2: pele urticada. Dupla imunomarcacão (fator XIIIa – partículas de ouro de 10 nm, seta negra e triptase – partículas de ouro de 15 nm, seta branca). Observar no canto inferior direito a presença de melanina sem imunomarcacão com ouro

5.3.5 Dupla microscopia imunoeletrônica de transmissão (DMIMET)

Com a finalidade de se determinar a co-localização subcelular das moléculas de FXIIIa e da Triptase no material fagocitado pelos dendrócitos da derme, amostras de tecido foram examinadas pela imuno-microscopia eletrônica de transmissão.

Após a dupla imunomarcação pelo ouro, com partículas de 10 nm (FXIIIa) e 15 nm (Triptase) encontramos a expressão de ambas nos grânulos intracitoplasmáticos, bem como nos grânulos extruídos dos mastócitos, tanto na pele aparentemente sã (figuras 5.31, 5.35), como na pele urticada (5.36) indicando que ambos são expressos nos grânulos dos mastócitos. Estes achados estavam presentes nos cortes de pele aparentemente sã e na pele urticada de todos os doentes estudados.

Figura 5.35. Caso 3: pele aparentemente sã. Presença de mastócito íntegro com dupla imunomarcagem nos seus grânulos, demonstrando o FXIIIa, partículas de ouro de 10 nm (setas negras) e triptase, partículas de ouro de 15 nm (setas brancas) – (DMIMET, OM 75.000x)

Figura 5.36. Caso 3: pele urticada. Presença de mastócito íntegro com dupla imunomarcagem nos seus grânulos, demonstrando o FXIIIa, partículas de ouro de 10 nm (setas negras) e triptase, partículas de ouro de 15 nm (setas brancas) – (DMIMET, OM 75.000x)

Os grânulos extruídos na matriz intercelular da derme demonstravam a mesma imunomarcagem (figura 5.37). Os grânulos extruídos eram desprovidos de membrana externa e exibiam redução da densidade da sua matriz. Extrusão extensa de grânulos dos mastócitos foi observada nos cortes de pele urticada (figura 5.38).

Figura 5.37. Caso 5: pele aparentemente sã. Grânulos mastocitários extruídos na derme, em permeio ao colágeno. Dupla imunomarcção pelo ouro para Triptase (15nm – seta branca) e FXIIIa (10 nm – seta negra) (MIMET, OM 125.000x)

Figura 5.38. Caso 3: pele urticada. Grânulos mastocitários extruídos na derme, em permeio ao colágeno. Dupla imunomarcacão pelo ouro para Triptase (15nm – seta branca) e FXIIIa (10 nm – seta negra) (MIMET, OM 75.000x).

A observação do aspecto ultra-estrutural da membrana dos grânulos foi impossibilitada por se tratar de procedimento de imuno-microscopia eletrônica de transmissão, que não possibilita o seu delineamento e bom contraste das ultra-estruturas, uma vez que o tecido não é tratado com o tetra óxido de ósmio, que possibilita a visualização ótima das membranas.

A marcação com anticorpos secundários isolados (controles), com a omissão dos anticorpos primários, não produziu marcação nos cortes

avaliados, tanto na pele aparentemente sã como na pele urticada. Quando aplicados apenas os anticorpos primários, com omissão dos anticorpos secundários, também não se observou imunomarcção.

Em todos os casos estudados, a imunomarcção com partículas de ouro de 10nm (FXIIIa), foi mais numerosa, que com as partículas de ouro de 15nm (Tryptase) nos grânulos dos mastócitos.

Observamos que os pequenos nervos da derme em torno dos vasos sanguíneos, nos cortes de pele urticada apresentavam imunomarcção, tanto com Tryptase, como com FXIIIa, em pequena monta no tecido conectivo do nervo, como também nos axônios (figura 5.39).

Figura 5.39. Caso 3: pele urticada. (a) LV, lume vascular; DD, dendrócito da derme; N, nervo) (DMIMET, OM 10.000x). (b) DD, dérmico e nervo adjacente (DMIMET, OM 20.000x). (c) Corte transversal do nervo com imunomarcção com partículas de ouro para o FXIIIa (setas brancas) e Triptase (setas negras) (DMIMET, OM 75.000x). (d) Detalhe.

De forma interessante, encontramos forte evidência de que grânulos extruídos dos mastócitos, expressando Triptase e FXIIIa foram fagocitados por dendrócitos da derme. Assim, os dendrócitos da derme FXIIIa positivos estavam fagocitando grânulos ou remanescentes de grânulos extruídos pelos mastócitos, especialmente na pele urticada (figuras 5.40, 5.41 e 5.42) e em vários cortes de pele aparentemente sã (figuras 5.43, 5.44A, 5.44B e 5.44C), onde havia degranulação mastocitária. Estes achados

demonstrar uma nítida interação entre mastócitos ativados e dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺, na pele urticada e na pele aparentemente normal com grânulos extruídos dos mastócitos.

Observamos em várias ocasiões a presença de extensas projeções citoplasmáticas de dendrócitos da derme (dendritos) no local onde havia remanescentes de grânulos mastocitários extruídos (figura 5.40A).

Figura 5.40A. Caso 4: pele urticada. Pequeno vaso representado por uma célula endotelial em proximidade com um dendrócito dérmico e um mastócito em degranulação. Lume vascular (VL), célula endotelial (EC), pericito (P), dendrócito dérmico (DD), grânulo mastocitário fagocitado (PMCgr), grânulo mastocitário extruído (EMCgr) e extensão dendrítica do citoplasma de um dendrócito dérmico (DDdrpr) (MIMET, OM 15.000x)

Figura 5.40B. Caso 4: pele urticada. Dendrócito dérmico intimamente associado com grânulos extruídos pelos mastócitos, realizando processo de fagocitose (seta) (MIMET, OM 20.000x)

Figura 5.40C. Caso 4: pele urticada. Dendrócito dérmico intimamente associado com grânulos extruídos pelos mastócitos, realizando processo de fagocitose (seta negra cheia). Observar os grânulos mastocitários imunomarcados FXIIIa (seta pontilhada branca), citoplasma do dendrócito dérmico com FXIIIa (seta branca cheia) - (MIMET, OM 50.000x)

Figura 5.41A. Caso 3: pele urticada. Dendrócito dérmico realizando processo de fagocitose de grânulos extruídos pelos mastócitos (seta) - (DMIMET, OM 30,000x)

Figura 5.41B. Caso 3: pele urticada. Dupla imunomarcção. Grânulo mastocitário fagocitado pelo dendrócito dérmico. Triptase (seta branca) e FXIIIa (seta negra) – (DMIMET, OM 62.500x)

Figura 5.41C. Caso 3: pele urticada. Dupla imunomarcção. Detalhe do grânulo mastocitário fagocitado pelo dendrócito dérmico. Triptase (seta branca) e FXIIIa (seta negra)

Figura 5.42. Caso 2: pele urticada. Dendrócito da derme apresentando fagocitose de grânulo de mastócito. Foto maior (MIMET, OM 20.000x) e detalhe maior a esquerda, demonstrando grânulo fagocitado contendo triptase (15nm – seta negra grossa) e FXIIIa (10 nm – seta branca) – (MIMET, OM 100.000x)

Figura 5.43. Caso 4: pele aparentemente sã. Dendrócito da derme apresentando fagocitose de grânulo de mastócito. Foto A (MIMET, OM 20.000x); Foto B (MIMET, OM 75.000x); Foto C demonstrando grânulo fagocitado contendo triptase (15nm – seta branca) e FXIIIa (10 nm – seta negra) – (MIMET, OM 100.000x)

Figura 5.44A. Caso 5: pele aparentemente sã. Presença de dois mastócitos e um dendrócito da derme em aposição (MIMET, OM 20.000x)

Figura 5.44B. Caso 5: pele aparentemente sã. Presença de mastócito e um dendrócito da derme em aposição (MIMET, OM 37.500x)

Figura 5.44C. Caso 5: pele aparentemente sã. Observar grânulo do mastócito fagocitado pelo dendrócito dérmico, com dupla imunomarcacão com ouro (Fator XIIIa – seta negra e triptase – seta branca) - (MIMET, OM 62.500x)

5.3.6 Conjunto de achados ultra-estruturais nas biopsias de pele dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos

Foram registradas 401 fotos dos campos mais representativos observados ao microscópio eletrônico de transmissão, tanto da pele aparentemente sã, como da pele urticada, dos sete doentes incluídos no estudo. Estes achados encontram-se discriminados no quadro 5.10.

Nas amostras obtidas da pele aparentemente sã, o edema extracelular na derme superficial e média foi praticamente ausente e as

organelas vésico-vacuolares foram observadas nas vênulas da derme de quatro dos sete doentes, em leve intensidade. A degranulação mastocitária especialmente do tipo anafilática foi encontrada em todos os doentes na pele aparentemente sã em intensidade variando de pouca a moderada, sendo que em três dos sete doentes foram registrados mastócitos com grau leve de degranulação do tipo saca-bocado. Não foram observados basófilos na pele aparentemente sã dos sete doentes, porém houve um pequeno número de polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos e linfócitos e localização especialmente perivascular na derme destes doentes.

Nas amostras de pele das lesões urticadas, o edema extracelular na derme superficial e média foi observado em todos os doentes em intensidade variando de leve a intensa. As organelas vésico-vacuolares estavam presentes no endotélio das vênulas da derme em todos os doentes, ora em pequena quantidade, ora em número intenso. A degranulação mastocitária foi intensa e especialmente do tipo anafilática, com graus leves do tipo em saca-bocado. Houve uma presença leve a moderada de células inflamatórias em localização especialmente perivascular na derme das amostras de pele urticada, inclusive com alguns doentes apresentando eosinófilos (figura 5.45A e 5.45B).

Quadro 5.10. Avaliação semiquantitativa dos achados na microscopia imunoelétrica de transmissão

Doentes	Edema extracelular na derme superficial e média	Organelas Vésico-vacuolares	Mastócitos		Basófilos	Neutrófilos	Eosinófilos	Linfócitos
			Anafilática (DAN)	Saca-bocado (DSB)				
<i>Pele Aparentemente sã:</i>								
Caso 1	-	+	++	-	-	+	+	+
Caso 2	-	-	+	+	-	+	+	-
Caso 3	-	+	+	-	-	-	-	+
Caso 4	-	+	+	+	-	+	+	+
Caso 5	-	-	+	-	-	-	-	-
Caso 6	-	+	+	-	-	+	+	+
Caso 7	-	-	++	+	-	-	-	-
<i>Pele urticada:</i>								
Caso 1	++	+++	++++	+	+	++	++	+
Caso 2	++	++	++++	+	+	++	+	+
Caso 3	+	+	++++	+	-	+	+	+
Caso 4	++	+	++++	+	-	+	+	+
Caso 5	+	++	++++	+	+	++	++	+
Caso 6	+++	+++	++++	+	+	++	+	+
Caso 7	++	++	++++	+	+	++	++	+

Nota: (-): ausente; (+): pouco observado; (++) : presença moderada; (+++) presença intensa; (++++) presença muito intensa.

Figura 5.45A. Caso 7: pele urticada. Presença de mastócitos e eosinófilo. MC, mastócito; Eo, eosinófilo (MIMET, OM 5.000x)

Figura 5.45B. Caso 7: pele urticada. Eosinófilo (detalhe da foto 5.45A). Observar a presença de cristais de Charcot-Leyden (*) (MIMET, OM 20.000x)

6. DISCUSSÃO

A urticária constitui um padrão de resposta cutânea frente aos mais variados estímulos, imunes e não imunes. Vários elementos celulares encontram-se envolvidos, especialmente aqueles que constituem a unidade microvascular da derme, incluindo as células inflamatórias migrantes (linfócitos T, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos). Todos estes tipos celulares podem em maior ou menor grau se envolverem nos eventos fisiopatogênicos da urticária, como pudemos observar do ponto de vista morfológico no nosso estudo imunoistoquímico e imunoeletrônico da UAAM. Pareceu-nos particularmente relevante o envolvimento de alguns elementos celulares, nos casos por nós estudados, tais como os mastócitos, as células endoteliais e os dendrócitos da derme FXIIIa⁺, que serão discutidos a seguir.

6.1 Mastócitos

Os mastócitos encontram-se distribuídos virtualmente em todos os órgãos e tecidos vascularizados. Encontram-se presentes na pele, no trato gastrointestinal, nas vias aéreas, onde estão em contato íntimo com o meio ambiente externo (Kinet, 2007). Os mastócitos são células ligadas tradicionalmente com as respostas alérgicas. Há longa data sabe-se da

participação dos mastócitos também nos processos inflamatórios, e tem-se tornado claro que os mastócitos são essenciais na promoção da inflamação, não sendo apenas simples participantes secundários (Kinet, 2007).

Há evidências que estas células orquestram as reações inflamatórias. Que evidências são estas? Em nossa opinião, o primeiro experimento-chave que suporta esta afirmativa foi o realizado por Secor et al. (2000), os quais usaram a encefalomielite alérgica (EAE) de camundongos, como o melhor modelo experimental paralelo à esclerose múltipla humana (MS), ao imunizarem camundongos com componentes de mielina, os quais desenvolveram doença desmielinizante do sistema nervoso central similar a MS humana. Quando a população de mastócitos artificialmente restabelecida nestes camundongos, houve re-indução da EAE e desenvolvimento de maior gravidade, demonstrando-se que os mastócitos desempenham uma função fundamental na organização da resposta inflamatória que conduz a doença.

Estudos recentes, como o do grupo de Secor et al. (2000) têm sugerido que estas células podem ser capazes de regular a inflamação, as defesas do hospedeiro, participando da imunidade inata e adquirida (Krishnaswamy et al., 2006). Os mastócitos hoje são reconhecidamente cruciais participantes de vários estados de doença, incluindo doença vascular (na aterogênese, ruptura da placa de ateroma e no remodelamento vascular), nos estados fibróticos (respostas de reparação de feridas e remodelamento tecidual), nas doenças reumatológicas (como esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, artrites e fibromialgia), determinadas

malignidades - onde os mastócitos podem contribuir para a patogênica tumoral e capacidade de invasão do tumor através da indução da angiogênese, secreção de VEGF, bFGF e ativação de collagenases pela triptase (Krishnaswamy et al., 2006). Os mastócitos não são responsáveis apenas pela doença, sua existência também é marcada pela dualidade, uma vez que também contribui com as defesas do hospedeiro contra agentes infecciosos. As múltiplas funções dos mastócitos humanos encontram-se sumarizadas nas figuras 6.1 e 6.2.

Figura 6.1 Mastócitos humanos e seu envolvimento espectral na imunofisiologia e na doença humana. Filogeneticamente os mastócitos são células antigas nos animais, tendo funções primordiais no combate a infecções e infestações. Por outro lado participam da fisiopatogênica de várias afecções no homem, entre elas a aterogênese e o remodelamento tecidual.

Figura 6.2. A dualidade do mastócito. Ora representada pela sua função fisiológica na imunidade inata (contra parasitas e vírus) ou na imunidade adquirida (contra vírus e bactérias), ora em oposição nos processos patogênicos como a alergia IgE mediada ou na auto-imunidade

Atualmente está bem definido que os mastócitos estão envolvidos na resposta imune, como por exemplo, contra parasitas. Um questionamento atual surge a partir desta observação: os mastócitos são ainda necessários e essenciais ao ser humano, na esfera da proteção contra parasitas, especialmente nas sociedades ocidentalizadas desenvolvidas, as quais apresentam poucas parasitoses, incluindo-se infecções bacterianas e uma alta prevalência de doenças inflamatórias como asma e esclerose múltipla? (Kinet, 2007). Há evidências de que como nos indivíduos deste tipo de sociedade, os mastócitos não são solicitados frequentemente em suas funções protetoras, tornaram-se especialmente direcionados à orquestração de doenças inflamatórias (Kinet, 2007). Neste cenário ambiental, os

mastócitos têm se tornado muito sensíveis a estímulos que habitualmente não seriam capazes de direcioná-los a uma resposta inflamatória, caso estas células estivessem empenhadas nas funções de proteção (Kinet, 2007). Este comportamento se encaixa muito bem na “teoria da higiene ambiental” que tem sido proposta para explicar o aumento de incidência da atopia, dos eczemas, da asma, da esclerose múltipla, do diabetes melito tipo 1, das doenças intestinais inflamatórias, além de outras doenças inflamatórias e auto-imunes (Kinet, 2007).

Aplicando-se este conceito ao nosso estudo com doentes com UAAM, poderíamos supor que a reatividade dos mastócitos a agentes medicamentosos pode também estar sendo influenciada pela “hipótese da higiene ambiental”, uma vez que, apesar da população estudada ser de apenas de sete doentes, nenhum deles apresentava qualquer doença bacteriana e negavam antecedentes recentes deste tipo de infecção. Sabidamente a incidência de urticária na população geral é elevada e os mastócitos desempenham um papel central neste processo, de forma que seu limiar de reatividade aos medicamentos pode, pelo menos em alguns doentes com esta afecção, se encontrar diminuído em decorrência desta “higiene ambiental”.

É importante enfatizar que estímulos específicos a secreção mastocitária podem desencadear padrões de secreção de mediadores distintos, porém as vezes superponíveis (Galli et al., 2005a). Por exemplo, embora a IgE e o antígeno específico possam induzir os mastócitos a liberar grandes quantidades de todos os tipos de mediadores, outros estímulos

como neuropeptídeos, podem favorecer a liberação dos mediadores pré-formados, enquanto que lipopolissacárides (LPS) e outros estímulos que são reconhecidos pelos receptores Toll-like (TLR) favorecem a secreção de determinadas citocinas, podendo ou não influenciar a secreção de mediadores pré-formados (Galli et al., 2005). Além disso, evidências morfológicas e de microscopia imunoeletrônica indicam que os mastócitos e basófilos podem liberar mediadores por processo de degranulação em saca-bocado, bem como pela clássica degranulação do tipo anafilática (Dvorak et al., 1972; Dvorak et al., 1992b; Dvorak et al., 1994).

Nossos doentes, em quase sua totalidade apresentaram urticária aguda associada a analgésicos e antiinflamatórios não-hormonais, demonstrando no estudo imunoeletrônico a presença de degranulação principalmente do tipo anafilático, porém também do tipo em saca-bocado. Desta forma, poderíamos supor que frente àquelas drogas, os mastócitos apresentaram ambos padrões de degranulação, predominando o tipo anafilático, o que pode ser decorrente de variados estímulos aos mastócitos, alguns influenciando a liberação de mediadores pré-formados e outros os neoformados como citocinas (especialmente liberadas pela degranulação em saca-bocado).

6.1.1 Degranulação dos mastócitos na pele aparentemente sã:

Observamos a presença de mastócitos degranulados em degranulação tipo anafilática, em pequena monta, também na pele aparentemente sã, dos nossos doentes. Isto poderia ser explicado por uma das seguintes situações: (i) a pele aparentemente sã, já havia em menos de 24 horas sido acometida por urtica, (ii) a pele aparentemente sã já demonstrava degranulação mastocitária precedendo a manifestação clínica do edema e do eritema (urtica), (iii) a degranulação mastocitária em pequena quantidade pode ser observada mesmo em condições fisiológicas na pele, e/ou (iv) manipulação da pele pelo ato da biopsia, quer pela infiltração do anestésico, quer pelo trauma mecânico ocasionado pelo trépano (punch), determinou a degranulação mastocitária.

Esta última alternativa pode ser fundamentada pelos achados de Dvorak et al (1992a) que estudando a ultra-estrutura dos mastócitos da mucosa do intestino humano, em 117 biopsias intestinais de áreas não envolvidas por doença intestinal inflamatória (DII) ou doença intestinal neoplásica ou pré-neoplásica, observaram a presença de evidência de degranulação mastocitária em 60% das amostras, havendo um maior grau de degranulação nas biopsias de tecido intestinal inflamado pela DII, em comparação com as biopsias de intestino não inflamado. Neste estudo os autores encontraram uma preponderância de degranulação do tipo em saca-bocado (degranulação tipo Piecemeal) em relação à degranulação anafilática.

Em contrapartida, Dvorak et al (1998) estudaram sob o ponto de vista ultra-estrutural a pele de doentes que recebiam injeções subcutâneas de Stem Cell Factor humano recombinante (rhSCF), tanto no local da injeção, como na pele aparentemente sã contra-lateral. Na pele aparentemente sã contra-lateral estes autores não encontraram sinais de degranulação quer tipo anafilática, quer tipo em saca-bocado.

Talvez, o fato de termos encontrado sinais de degranulação, possa ser conseqüente à área de pele escolhida para a biopsia distar apenas cerca de 5 cm da área urticada. Esta escolha ocorreu porque nos doentes com urticária as lesões eram múltiplas e, frequentemente, a pele contra-lateral àquela urticada eleita para a biopsia também se encontrar acometida por urtica. É possível que nas nossas amostras de pele aparentemente sã, a leve degranulação mastocitária observada fosse decorrente de um processo de ativação mastocitária já em curso, que tivesse precedido a lesão clínica urticada, ou que na verdade aquela área já houvesse desenvolvido urtica, algumas horas antes da biopsia, fato este não percebido pelos doentes.

Outra hipótese para o encontro de degranulação do tipo anafilática na pele aparentemente sã, e que nos parece mais lógica, é que os doentes portadores de urticária apresentem ativação de toda ou quase toda a pele.

Há longa data demonstrou-se que nas vias aéreas dos doentes asmáticos, observa-se um aumento no número de mastócitos e basófilos degranulados, mesmo quando as biopsias são realizadas em um intervalo de tempo distante das crises agudas de asma (Crimi et al, 1991; Pesci et al., 1993).

Caproni et al. (2005) demonstraram, em doentes com urticária crônica, a presença na pele aparentemente sã, de células inflamatórias ativadas e o aumento da expressão de quimiocinas, o que os levou a concluir pela presença de hiperatividade imune cutânea generalizada, nestes doentes. De forma similar, na urticária aguda, ora determinada área da pele apresenta lesão clínica de urtica, enquanto outras áreas, apesar de demonstrarem degranulação, ainda não manifestam lesão clínica urticada. Esta hipótese também é suportada pela observação de que nos doentes com urticária aguda associada a medicamentos observamos por vezes, urticas que duravam 1 a 2 horas, esmaeciam naquele local e outras surgiam em áreas de pele previamente considerada sã.

Ainda outra observação que pode explicar a presença de degranulação na pele aparentemente sã, sem urtica clinicamente visível, é que naquele dado local os dendrócitos da derme estejam eficientemente promovendo uma retirada dos grânulos dos mastócitos extruídos na matriz, através de um processo ativo de fagocitose, promovendo assim um clareamento (ou depuração) dos mediadores químicos responsáveis pela formação das urticas. Esta hipótese por sua vez pode ser substanciada pelo achado de um maior número de dendrócitos da derme duplamente imunomarcados (pelo FXIIIa e pela Tryptase) na pele aparentemente sã em relação a pele urticada nos nossos doentes ($p=0,007$).

Assim a eficiência da fagocitose realizada pelos DD dos grânulos extruídos pelos mastócitos naquele dado momento, em retirar os mediadores químicos contidos nos grânulos da matriz intercelular da derme,

poderia ser crucial em determinar o desenvolvimento ou não de urtica clinicamente aparente naquela dada área da pele aparentemente sã. Parece-nos, portanto, que na urticária aguda associada a medicamentos os eventos de degranulação mastocitária estão ocorrendo em toda a pele, de maneira mais ou menos intensa e a formação clínica da urtica pode depender do balanço entre a degranulação e da eficiência de fagocitose pelos dendrócitos da derme FXIIIa⁺.

Dvorak & Kissell (1991) observaram em biopsia de pele não estimulada de um paciente com dermatografismo, sob o ponto de vista ultra-estrutural a presença de mastócitos com grânulos citoplasmáticos com condensação central, fato este interpretado pelos autores como um processo de recuperação do conteúdo dos grânulos após a degranulação mastocitária do tipo em saca-bocado (degranulação piecemeal). Estes autores acreditam que os mecanismos de condensação dos grânulos propiciam um meio pelo qual, mastócitos humanos debilitados durante o processo de degranulação em saca-bocado, podem recarregar o seu conteúdo granular. Aspecto morfológico similar ao observado por Dvorak & Kissell (1991), com a presença de grânulos com condensação central elétron-densa, foi observada por nós nos doentes com urticária aguda, com menor frequência na pele aparentemente sã, em relação à pele urticada.

6.2 Fator FXIIIa

O Fator XIIIa é um membro da família das transglutaminases teciduais (TGt). As TGt têm sido implicadas em uma ampla variedade de processos celulares incluindo a apoptose, sinais de transdução, ativação de certas citocinas, além do remodelamento e organização da matriz extracelular (Adany & Bardos, 2003). Atualmente são conhecidas mais que uma dúzia de proteínas que servem de substrato ao FXIIIa, incluindo: (i) proteínas da coagulação e do sistema fibrinolítico, (ii) proteínas de adesão, (iii) proteínas do citoesqueleto. Estas três categorias de substratos correspondem às três principais funções do FXIIIa: (i) envolvimento na coagulação e na fibrinólise, (ii) cicatrização e (iii) determinadas e ainda pouco compreendidas funções celulares (Adany & Bardos, 2003).

6.2.1 Envolvimento na organização e remodelamento do citoesqueleto

A actina e a miosina do músculo esquelético e das plaquetas – os principais elementos do sistema de locomoção contrátil das células – foram os primeiros a serem identificados como substratos do FXIIIa (Adany & Bardos, 2003). Como resultado da ação do FXIIIa, polímeros altamente arranjados de actina e miosina são formados, e representam a estrutura básica da organização da rede do citoesqueleto (Adany & Bardos, 2003).

Na ligação do citoesqueleto à membrana celular, a vinculina, outro substrato do FXIIIa, atua com função significativa e torna-se incorporada ao citoesqueleto nas células ativadas e nas plaquetas. A ligação específica do FXIIIa à proteína de choque térmico HSP27, a qual é importante também na dinâmica da actina e na polimerização, também foi demonstrada por Lambert et al (1999).

Estes achados sugerem fortemente a participação do FXIIIa na regulação e no remodelamento do citoesqueleto de plaquetas (Adany & Bardos, 2003).

Talvez o encontro de um maior número de dendrócitos da derme FXIIIa⁺ na pele aparentemente sã em relação à pele urticada signifique que frente à degranulação mastocitária, que ocorre mesmo na pele sã, o organismo tente alcançar o equilíbrio, sem a formação da urtica através da retirada destes grânulos extruídos pelos dendrócitos dérmicos, os quais poderiam se encontrar em um processo de “limpeza” da derme dos mediadores que causariam o efeito da formação da urtica.

6.3 Encontro do Fator XIIIa nos grânulos dos mastócitos e nos dendrócitos da derme

Dados experimentais demonstram que além da fibrina, certas proteínas do citoesqueleto (actina, miosina e vinculina) são substratos para o FXIIIa (Cohen et al, 1979; Cohen et al, 1980).

Adany et al (2001) investigaram a localização intracelular do FXIIIa durante a diferenciação de monócitos e macrófagos através da imunomicroscopia eletrônica e observaram a presença do FXIIIa tanto em nível do citoplasma como do núcleo em cerca de 90% dos macrófagos em cultura. Estes autores especularam o possível envolvimento do FXIIIa nuclear com processos celulares envolvendo o remodelamento da cromatina, em situações como a morte celular, diferenciação ou proliferação. Adany et al (2001) ainda observaram a presença do FXIIIa frequentemente ligado a microfilamentos no citoplasma dos macrófagos, sugerindo que provavelmente o FXIIIa possua um envolvimento nas interações catalíticas entre macromoléculas do sistema de locomoção do citoesqueleto destas células.

Nos macrófagos, o FXIIIa demonstra localização citoplasmática característica, acumulando-se em torno de vacúolos citoplasmáticos e nos pseudópodos, mas não nos vacúolos fagocíticos (Adany et al, 1985). Em nosso estudo, tanto na pele aparentemente sã, como na pele urticada, observamos achados similares com os pseudópodos dos dendrócitos da derme demonstrando imunomarcação para o FXIIIa. Sugere-se que o FXIIIa possa participar do remodelamento do citoesqueleto celular nos macrófagos, uma vez que a fagocitose é uma função fundamental dos monócitos / macrófagos, na qual o citoesqueleto é profundamente envolvido (Sarvary et al, 2004). Desta forma, não se encontra na urticária aguda medicamentosa diferente comportamento da expressão do FXIIIa nos dendrócitos da derme, em relação aos achados anteriores de Schaumburg-Lever (1994) nos casos estudados de carcinoma basocelular, dermatofibroma e mastocitose maligna.

Nós observamos nos nossos doentes com urticária aguda, tanto na pele aparentemente sã, como na pele urticada a presença de mastócitos exibindo grânulos com imunomarcagem positiva para o FXIIIa. A observação do FXIIIa nos grânulos dos mastócitos só foi anteriormente demonstrada em nível ultra-estrutural por Schaumburg-Lever et al (1994). Estes autores estudaram a localização ultra-estrutural do FXIIIa na pele pela técnica da imuno-microscopia eletrônica em quatro espécimes de dermatofibromas, um de carcinoma basocelular e em um caso de mastocitose maligna. O FXIIIa foi encontrado na porção de aspecto homogêneo dos grânulos dos mastócitos. Esta observação não pode ser reproduzida pela técnica da imunoistoquímica nestes mesmos casos, levando os autores a concluir que a quantidade de imunomarcagem nos mastócitos estava abaixo do limiar de reconhecimento óptico da microscopia de luz, fato este que pode ser também responsável pela não observação do FXIIIa pela imunoistoquímica nos grânulos dos mastócitos nos doentes do nosso estudo.

Pudemos observar no nosso estudo a presença de dendrócitos da derme fagocitando grânulo imunomarcado com FXIIIa, extruído do mastócito, em um processo de transgranulação. Dendrócitos da derme e células endoteliais podem ingerir grânulos dos mastócitos (Schaumburg-Lever et al,1994), porém pela primeira vez nós demonstramos a presença do FXIIIa nestes grânulos fagocitados.

Dvorak et al (1998) observaram dendrócitos dérmicos justapostos a mastócitos em degranulação anafilática fagocitando grânulos, os quais foram interpretados como grânulos extruídos dos mastócitos. Estes autores

estudavam a ultra-estrutura de biopsias de pele de doentes tratados com injeções subcutâneas de Stem Cell Factor humano recombinante (rhSCF), tanto no local da injeção, onde ocorria a formação de urtica, como na pele aparentemente sã contra-lateral. Nós demonstramos fato similar de doentes com urticária aguda associada a medicamentos, onde observamos a presença da fagocitose de grânulos tanto imuno-marcados ora com FXIIIa, ora com triptase, tornando irrefutável, pela primeira vez, este fenômeno de transgranulação, uma vez que grânulos imunomarcados com Fator XIIIa, foram observados como oriundos dos mastócitos, uma vez que eram imunomarcados pela triptase, enzima esta considerada virtualmente específica dos mastócitos.

Baggiolini et al. (1982) estudaram a fagocitose dos grânulos extruídos pelos mastócitos peritoniais, em ratos, após anafilaxia experimentalmente induzida. Os autores utilizaram o método de microscopia eletrônica de transmissão para analisar a fagocitose dos grânulos, porém sem executar a imunomarcção pela triptase, com a finalidade de certificar-se da origem mastocitária do grânulo, como realizado no nosso estudo. Baggiolini et al. encontraram fagocitos mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos fagocitando ora grânulos mastocitários condensados, ora grânulos já em solubilização. O encontro da fagocitose de grânulos ora condensados, ora em solubilização, pelos dendrócitos da derme foi observado também no nosso estudo. Os autores concluíram que os fagocitos mononucleares e os polimorfonucleares têm a capacidade de “limpar” quantidades relevantes de produtos decorrentes da degranulação mastocitária durante a anafilaxia.

Fesus et al (1985) demonstraram a presença de transglutaminase e formação de γ -glutamylhistamina ligada à proteína em mastócitos degranulados de camundongos, ativados tanto por mecanismos imunes, como não imunes. Os autores obtiveram anticorpos antitransglutaminase imunizando coelhos com transglutaminase de hemácias humanas purificadas.

Sarvary et al (2004) demonstraram que a fagocitose de certas partículas (hemácias sensibilizadas e partículas de leveduras adsorvidas de complemento) via receptor $Fc\gamma$ e complemento se encontrava intensamente diminuída nos monócitos de doentes com deficiência congênita do FXIIIa, e as funções fagocitárias dos monócitos / macrófagos cultivados mostravam um paralelo com a expressão do RNAm do FXIIIa e com a síntese protéica. Desta forma, estes resultados fortemente sugerem que o FXIIIa exerça uma função nas atividades fagocitárias dos monócitos / macrófagos.

A ativação clássica dos macrófagos é induzida por estímulos pró-inflamatórios, tais como citocinas de padrão Th1 (como o $\text{interferon-}\gamma$ e produtos de micróbios), e através desta via, ocorre potencialização da capacidade de destruir parasitas intracelulares (Torocsik et al, 2005). Uma ativação alternativa é uma resposta a citocinas padrão Th2, tais como a IL-4 e resulta na expressão de uma ampla variação de receptores de superfície e antagonistas de receptores, os quais possuem funções específicas, tais como eliminar matéria solúvel e particulada (especificamente restos celulares e de tecidos) (Torocsik et al, 2005).

Torocsik et al (2005) demonstraram que macrófagos cultivados com IL4 apresentavam aumento na expressão do FXIIIa, quando comparados

aos macrófagos cultivados e estimulados pela via clássica. Desta forma, os autores concluíram que a expressão do FXIIIa intracelular é um marcador para ativação via alternativa de macrófagos via IL-4.

Extrapolando os resultados dos autores referidos anteriormente, poderíamos propor que os dendrócitos da derme nos doentes com urticária aguda expressam o FXIIIa no citoplasma, quer por estímulo do TNF- α liberado pelos mastócitos, como previamente descrito por Sueki et al (1993), quer pela IL-4 oriunda dos mastócitos degranulados, ativando os dendrócitos da derme via alternativa.

Parece-nos que este corpo de evidências possa suportar nossa especulação de que a presença do FXIIIa nos grânulos dos mastócitos nos nossos doentes, tanto na pele aparentemente sã, como na pele urticada, deva-se ao envolvimento do FXIIIa intracelular (transglutaminase) quer no remodelamento do citoesqueleto do mastócito, quer no processo de degranulação, ou mesmo com finalidade de auxiliar no remodelamento da matriz extracelular após a degranulação, como demonstrado por Fesus et al (1985).

Também o encontro de grânulos extruídos dos mastócitos na matriz extracelular com imunomarcagem para o FXIIIa, pode sugerir que o mastócito, através da extrusão dos seus grânulos, também contribua para a homeostase da matriz extracelular, na urticária aguda, através do FXIIIa. Foi demonstrado que o FXIIIa tem importante função na homeostase do tecido conjuntivo, uma vez que estimula a proliferação de fibroblastos, regula a síntese do colágeno e também atua como enzima de ligações cruzadas nas interações entre fibroblastos e colágeno (Adany & Bardos, 2003).

6.4 As Organelas Vésico-vacuolares

Uma das funções mais críticas do endotélio vascular é mediar a permeabilidade da microcirculação (Stan, 2004). Os mecanismos moleculares subjacentes envolvidos nesta função ainda se encontram desconhecidos, tanto nas situações fisiológicas, como na doença. Diversas estruturas endoteliais subcelulares encontram-se envolvidas neste processo: cavéolas (endotélio capilar), canais transcelulares, fenestras, gaps sinusoidais, junções intercelulares e as organelas vésico-vacuolares (OVV) - (Stan, 2004). As OVV foram objeto do nosso estudo, uma vez que não havia referência ao seu comportamento na urticária.

O VEGF/VPF (fator de crescimento de células endoteliais/ fator de permeabilidade capilar) é sintetizado e secretado por diversas células, inclusive pelos mastócitos da pele (Theoharides et al., 2007). O VEGF/VPF é conhecido como um dos mais potentes indutores de hiperpermeabilidade capilar nas vênulas e pequenas vênulas (Qu-Hong et al., 1995; Feng et al., 2000), atuando nas células endoteliais via receptor tirosina quinase. Estes autores demonstraram a localização do VEGF/VPF na porção abluminal das OVV através de estudo imunoistoquímico e microscopia imunoeletrônica, possibilitando especular-se que o VEGF/VPF aumenta a permeabilidade microvascular por elevar a expressão e a função das OVV.

Pudemos observar na pele urticada a presença das Organelas Vésico-vacuolares (OVV) no citoplasma endotelial das vênulas da derme. As OVV são grandes coleções de vesículas e vacúolos, com número que varia

de vários elementos a centenas, focalmente distribuídas no citoplasma do endotélio venular, frequentemente em localização perijuncional, permitindo conexões entre as membranas plasmáticas luminal, abluminal e lateral, formando complexas estruturas transcelulares (Kohn et al, 1992; Dvorak et al, 1996). As OVV têm como função permitir a passagem de macromoléculas através das células endoteliais mais espessas, do que as células do endotélio capilar (Dvorak, 2005).

Dvorak et al (1994) demonstraram a presença das OVV na pálpebra inflamada de camundongos transgênicos que expressavam quantidades elevadas de IL-4, com mastócitos exibindo degranulação do tipo em sacabocado, sugerindo o aumento das OVV nos processos inflamatórios. Na pele urticada dos nossos doentes com urticária aguda associada a medicamentos, as organelas vésico-vacuolares puderam ser encontradas, em quantidade variando de leve a intensa, nas vênulas da derme. Este fato indica a presença de transporte ativo de macromoléculas do intravascular para o espaço extravascular, além da ativação endotelial nos nossos doentes.

Em resposta aos mediadores vasoativos (entre os quais o VEGF/VPF, triptase e histamina), os diafragmas que separam os elementos individuais das OVV, denominados de vesículas, e que separam as OVV do lume vascular e da área abluminal se abrem, permitindo a passagem transendotelial de substâncias de uma vesícula a outra até que finalmente estas substâncias cruzam a barreira endotelial (Feng et al., 2000).

Provavelmente, além da venodilatação com formação de “gaps” interendoteliais, que permitem o extravasamento de plasma do intra para o

extravascular, como mecanismo da instalação do edema dérmico na urticária, a formação ou o aumento do número de OVV no endotélio venular, poderia também contribuir para o extravasamento de elementos não figurados, causando elevação do gradiente de concentração no meio extravascular, ocasionando a rápida instalação da lesão urticada nos nossos doentes.

Portanto, o encontro de organelas vésico-vacuolares na urticária aguda, até o momento não havia sido descrito. Talvez este achado possa contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no arsenal do tratamento para a urticária.

6.5. Expressão de Dendrócitos Dérmicos FXIIIa positivos na pele urticada e aparentemente sã e possíveis implicações na evolução da urticária

A fagocitose dos grânulos extruídos dos mastócitos pelos dendrócitos da derme FXIIIa⁺ pode conduzir a algumas especulações:

(i) Como já demonstrado por vários autores e revisado por Ying et al (2002), na urticária crônica, quer nos doentes com urticária crônica auto-imune, como nos doentes com urticária sem sinais de auto-imunidade, o padrão de citocinas parece ser do tipo TH0, ou pelo menos há um equilíbrio entre citocinas padrão TH1 e TH2, apesar da freqüente observação da presença de infiltrado inflamatório perivascular especialmente de células

mononucleares, além de eosinófilos e neutrófilos, similar às reações de fase tardia induzidas por alérgenos (padrão de resposta TH2). Talvez a quase contínua degranulação mastocitária nos doentes com urticária, liberando citocinas pró-inflamatórias estocadas, como o TNF- α , e citocinas sintetizadas “de novo” como a IL-4, favoreça o estabelecimento de um meio (milieu) no qual a estimulação da ativação dos dendrócitos encontra-se favorecida. Talvez na urticária aguda não adequadamente controlada, o estímulo da histamina e outras substâncias sobre as células dendríticas FXIIIa positivas na derme possam contribuir para sua cronificação. Além disso, atualmente especula-se que o estímulo crônico dos receptores H1 de histamina nas células macrofágicas, determinaria uma ativação destas células, propiciando inclusive o desenvolvimento de auto-imunidade (Jutel et al, 2005).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno profissionais, que se originam de precursores monocíticos e linfóides e respectivamente adquirem fenótipo de célula dendrítica tipo 1 (CD tipo 1) ou célula dendrítica tipo 2 (CD tipo 2), as quais por sua vez facilitam, respectivamente, o desenvolvimento de linfócitos com padrão de resposta do tipo TH1 e TH2 (Jutel et al., 2005).

A histamina endógena é ativamente sintetizada durante a diferenciação das células dendríticas induzida por citocinas, atuando em padrões autócrino e parácrino e modifica os marcadores das células dendríticas (Szeberenyi et al., 2001). A histamina estimula a diferenciação dos monócitos em CD tipo 1, via receptores H1 e H3, aumentando a capacidade de apresentação antigênica, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e polarização dos

linfócitos Th0 em Th1 (Szeberenyi et al., 2001). Excessiva estimulação dos receptores H1, pode determinar elevada secreção de interferon- γ , determinando auto-imunidade (Jutel et al., 2005). Os DD FXIIIa⁺ são CD do tipo 1, ou seja, apresentam principalmente secreção de citocinas pró-inflamatórias e polarizam as respostas a um padrão Th1, quando a histamina se liga aos seus receptores H1 e H3 (figura 6.3).

Sendo assim talvez os DD FXIIIa⁺ que fagocitam os grânulos extruídos dos mastócitos, contendo histamina, pudessem se tornar “vítimas” de sua própria função, induzindo auto-imunidade em doentes geneticamente predispostos. Sabe-se que cerca de 30 a 50% das urticárias crônicas idiopáticas são urticárias auto-imunes. A fagocitose dos grânulos extruídos dos mastócitos e restos celulares, como porções da membrana celular mastocitária, que contenham receptores de alta afinidade para IgE (Fc ϵ R1 α) poderia contribuir para o desenvolvimento de uma resposta auto-imune contra estes receptores e o estabelecimento da urticária crônica auto-imune nestes indivíduos geneticamente predispostos à auto-imunidade.

Em 2007, Triggiani et al. demonstraram através do estudo de várias células, tais como, monócitos do sangue periférico, macrófagos pulmonares, macrófagos derivados de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos, que a diferenciação dos monócitos em macrófagos ou em células dendríticas associou-se à expressão aumentada dos receptores H1 nestas células, sem alteração na expressão de receptores H2. Desta forma, os autores especulam que as células dendríticas adquirem maior sensibilidade à histamina, via receptores H1, nos locais de inflamação tecidual, propondo

a hipótese de que a expressão aumentada de receptores H1 nestas células, poderia estar envolvida na patogênese de desordens alérgicas como a asma, a urticária e a anafilaxia.

A hipótese levantada por Triggiani et al. Pode perfeitamente ir de encontro aos nossos achados, onde os dendrócitos dérmicos se expõem a um ambiente rico em histamina pela degranulação mastocitária, inclusive fagocitando os grânulos extruídos, talvez desta forma, sofrendo estímulo à acentuada expressão de receptores H1 e conseqüentemente sendo mais ainda ativados e gerando ainda maior resposta inflamatória.

Legenda: As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno profissionais que se maturam a partir de monócitos e precursores linfóides, adquirindo, respectivamente, fenótipo de célula dendrítica tipo 1 (CDD1) ou célula dendrítica tipo 2 (CDD2). As CDD1 facilitam o desenvolvimento de respostas Th1 e as CDD2 de respostas Th2. A histamina ativamente participa nas funções e nas atividades dos precursores das CDD, bem como das formas imaturas e maduras. As CDD imaturas e maduras expressam todos os 4 tipos de receptores de histamina. No processo de diferenciação das CDD1 a partir dos monócitos, os receptores H1 e H3 atuam como estimuladores da capacidade de apresentação antigênica, na produção de citocinas pró-inflamatórias e na elaboração de respostas TH1. Em contraste, o receptor H2 atua como agente supressivo à capacidade de apresentação antigênica, aumentando a secreção de IL-10 e de respostas Th2 [Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. Nat Immunol 2005b;6(2):135-4; Akdis CA & Simons FER. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. Eur J Pharmacol 2006;533: 69-76; 2].

Figura 6.3. Ações da histamina e outros mediadores mastocitários sobre os dendrócitos da derme

(ii) Caproni et al (2003) demonstraram um discreto predomínio de resposta padrão TH2 na pele urticada entre os doentes com urticária crônica. Além disso, os autores demonstraram uma ativação imunológica similar entre a pele urticada e a pele aparentemente sã (controle), concluindo que nos doentes com urticária crônica, a ativação imune ocorreria no sistema imune de toda a pele e não só nas áreas urticadas, tornando toda a superfície cutânea pronta a responder a um estímulo desencadeador da degranulação mastocitária. Desta forma, a marcada expressão de dendrócitos dérmicos FXIIIa⁺, tanto na pele urticada, como na pele aparentemente sã, além da presença de mastócitos degranulados, nos nossos doentes com urticária aguda, poderia refletir a ativação global do sistema imune cutâneo nestes doentes, de forma similar ao observado por Caproni et al (2003) na urticária crônica.

6.6 Perspectivas de estudo

Constitui proposta interessante de pesquisa, a melhor caracterização da presença dos dendrócitos dérmicos nas urticárias crônicas, a fim de se verificar se os casos de urticária aguda que evoluem com cronificação, apresentam um maior número e uma maior atividade funcional dos dendrócitos dérmicos. Além disso, seria também relevante verificar se os casos de urticária crônica auto-imune também apresentam predomínio de dendrócitos dérmicos tipo 1 (CDD1), que sob estímulo persistente e crônico da histamina possam estar contribuindo para a fisiopatogenia da urticária crônica auto-imune.

7. CONCLUSÕES

- A pele aparentemente sã dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos apresenta predominantemente degranulação mastocitária do tipo anafilática.
- Nas lesões urticadas dos doentes com urticária aguda associada a medicamentos predomina o padrão de degranulação mastocitária do tipo anafilática (DAN), independentemente do medicamento associado.
- Demonstrou-se a presença do FXIIIa nos dendrócitos da derme reticular e nos dendrócitos dérmicos perivasculares da derme superficial e média, tanto pela técnica da imunoistoquímica, como pela técnica da microscopia imunoeletrônica.
- Tanto a técnica de imunoistoquímica como a microscopia imunoeletrônica demonstraram semelhança entre a pele urticada e a pele aparentemente sã, em relação à imunomarcagem para o FXIIIa.
- Pela primeira vez, observou-se a presença de grânulos FXIIIa⁺ no interior dos mastócitos e na matriz extracelular de doentes com urticária, tanto na pele aparentemente sã, como na pele urticada.

- Demonstrou-se de forma ainda inédita, do ponto de vista ultra-estrutural, que os dendrócitos da derme fagocitam os grânulos extruídos pelos mastócitos ativados na urticária.
- Na pele urticada há presença de imunomarcção tanto para triptase, como para o FXIIIa nas células endoteliais das vênulas da derme.
- Nas pequenas vênulas da derme dos doentes com urticária aguda associada a medicamento observa-se a freqüente presença de organelas vésico-vacuolares, fato até então não descrito.
- Há presença de imunomarcção para triptase nos pequenos filetes nervosos da derme, na pele urticada, especialmente nos filetes nervosos perivasculares, achado este, ainda anteriormente não demonstrado na urticária aguda.
- Além dos elementos celulares da resposta inflamatória, classicamente descritos na fisiopatogenia da urticária, o dendrócito da derme surge como célula de participação ativa neste processo.

8. ANEXOS

ANEXO I

Metodologia para avaliar a relação entre uma possível reação adversa a medicamento e um dado medicamento suspeito, segundo Moore et al., 1985:

O método pode ser sintetizado em três tabelas (tabela 1 a 3), as quais se referem à atribuição cronológica (C) (tabela 1), atribuição semiológica (S) (tabela 2), que conduzem a uma tabela de decisão final denominada de atribuição intrínseca (I) (tabela 3).

Tabela 1. Atribuição Cronológica

Retirada da droga	Exposição à droga muito sugestiva			Exposição à droga compatível			Exposição à droga incompatível
	R+	R0	R-	R+	R0	R-	
Sugestiva*	C3	C3	C1	C3	C2	C1	C0
Inconclusiva§	C3	C2	C1	C3	C1	C1	C0
Não sugestiva#	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C0

*A regressão do evento parece estar ligada à retirada da droga.

§A regressão do evento parece espontânea ou induzida por tratamento não específico, reconhecidamente efetivo, ou evolução desconhecida ou também tempo de seguimento curto ou ainda lesão irreversível (ou droga não retirada).

#Não houve regressão do evento considerado reversível (ou regressão completa sem a retirada da droga).

R+: re-exposição positiva; R-: re-exposição negativa; R0: re-exposição não realizada.

C3: cronologia sugestiva; C2: cronologia possível; C1: cronologia duvidosa; C0: cronologia incompatível.

Tabela 2. Atribuição Semiológica

Explicação alternativa de causa (não relacionada à droga)	Semiologia sugestiva da droga sendo avaliada (e/ou fator favorecedor muito sugestivo)			Outros casos		
	L+	L0	L-	L+	L0	L-
Nenhuma (após pesquisa)	S3	S3	S1	S3	S2	S1
Possível ou presente	S3	S2	S1	S3	S1	S1

L= teste laboratorial possível e realizável; L+: teste positivo; L-: teste negativo; L0: teste não realizado ou inexistente.

S3: semiologia sugestiva; S2: semiologia possível; S1: semiologia duvidosa.

Tabela 3. Atribuição Intrínseca

Cronologia	Semiologia (S1)	Semiologia (S2)	Semiologia (S3)
C0	10	10	10
C1	11	11	12
C2	11	12	13
C3	13	13	14

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

2. PESQUISADOR: Profa. Dra. Cidia Vasconcellos

CARGO/FUNÇÃO: Médica, LIM 53 HC-FMUSP..... INSCRIÇÃO CONSELHO
REGIONAL Nº 35.713

UNIDADE DO HCFMUSP Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:SEM RISCO ☐RISCO MÍNIMO ☐RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO**1. Justificativa e os objetivos da pesquisa**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa clínica, que tem como objetivo o estudo da resposta inflamatória do organismo humano (sistema imune) frente à URTICÁRIA desencadeada por medicamentos. Participando, você estará contribuindo para a descoberta de um novo caminho para o controle da sua doença.

Antes de tomar uma decisão é importante que você compreenda porque esta pesquisa clínica está sendo realizada e o que ela envolverá. Por favor, leia com atenção este documento, faça as perguntas que desejar e pense bem antes de concordar.

Sinta-se à vontade para perguntar sobre quaisquer dúvidas ou para pedir maiores informações ao seu médico antes de tomar uma decisão sobre sua participação. Se, após a leitura destas informações, você não concordar em participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo quanto ao seu tratamento ou de seu filho no atendimento prestado por este hospital.

Se você escolher participar, você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e você ou seu filho deixará de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento pelo mesmo hospital, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a se retirar do estudo.

O objetivo deste estudo é verificar a resposta do sistema de defesa do organismo humano (sistema imune) frente à urticária aguda induzida por medicamentos através da biopsia da pele.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais.

Se você decidir participar e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você responderá a um questionário sobre sua doença e, após, será submetido ao exame clínico e serão realizadas duas biopsias da pele, uma no local da urticária e outra na pele ao lado aparentemente sã. Estas biopsias serão executadas com anestesia da pele semelhante à anestesia de tratamento dentário, retirando-se um pequeno pedaço da pele de cada local, fechando-se com um ponto em cada região onde se fez a biopsia.

3. Desconfortos e riscos esperados

As biopsias da pele com urticária e da pele aparentemente sã podem causar leve dor local durante a realização das mesmas, dor leve nos sete dias seguintes, coceira na cicatriz alguns meses depois e formação de pequena cicatriz local. Caso estes desconfortos lhe ocorram de maneira intensa, você poderá procurar o Dr. Paulo Ricardo Criado, para tratamento, sem custo algum.

4. Benefícios que poderão ser obtidos

Eventualmente a urticária pode constituir a manifestação de um quadro mais complexo denominado de vasculite urticariforme, no qual a biopsia da pele pode contribuir para estabelecer o diagnóstico e direcionar a escolha do melhor tratamento. A sua participação também estará contribuindo para o estudo desta doença de difícil controle e conhecimento ainda incompleto pela medicina.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Existem outros procedimentos alternativos para o diagnóstico de sua doença se você decidir não participar deste estudo. O seu médico poderá informá-los, caso você deseje não participar do estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Você tem o direito de questionar o médico responsável pelo acompanhamento de seu caso ou de seu filho a qualquer momento, no sentido de esclarecer todas as dúvidas decorrentes do estudo em questão, sejam elas relacionadas com os riscos, benefícios ou quaisquer outros assuntos ligados a este estudo e com o tratamento da doença que o afete. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos e deveres durante a participação no estudo, você deve esclarecê-los com o seu médico.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Você poderá retirar seu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento pela mesma instituição, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a abandonar o estudo, para que esta informação conste na avaliação global dos resultados obtidos com todos os pacientes.

O médico responsável também poderá solicitar que você interrompa os testes, caso isso seja necessário, em função de problemas que possam vir a ocorrer, tais como reações adversas graves.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Em hipótese alguma você terá sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do acompanhamento deste estudo. Estarão, também, mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a sua privacidade e não será possível sua identificação através de fotografias.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Em caso de eventuais danos à sua saúde, o Hospital das Clínicas da FMUSP ficará a sua disposição, tanto para realização de exames, bem como de internação em caso de alguma gravidade.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Em caso de eventuais danos à sua saúde, o Hospital das Clínicas da FMUSP ficará a sua disposição para os procedimentos adequados, sem qualquer ônus de sua parte.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS**

Dr. Paulo Ricardo Criado

Telefone celular 24 horas: 8216-3994

Profa. Dra. Cidia Vasconcellos

Telefone celular 24 horas: 9714-5449

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Pesquisador Profa. Dra. Cidia Vasconcellos

ANEXO III

Ficha Clínica

Iniciais: **Registro:** Idade (acima de 18 anos):

Sexo: Profissão:

Procedência:

Grupo étnico:

História de uso atual de medicamentos para urticária e para outras doenças:

História pregressa de exposição a medicamentos para outras doenças:

Tempo de uso do medicamento atual não relacionado ao tratamento da urticária:

Tabela 1. Atribuição Cronológica

Retirada da droga	Exposição à droga muito sugestiva			Exposição à droga compatível			Exposição à droga incompatível
	R+	R0	R-	R+	R0	R-	
Sugestiva*	C3	C3	C1	C3	C2	C1	C0
Inconclusiva§	C3	C2	C1	C3	C1	C1	C0
Não sugestiva#	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C0

*A regressão do evento parece estar ligada à retirada da droga.

§A regressão do evento parece espontânea ou induzida por tratamento não específico, reconhecidamente efetivo ou evolução desconhecida ou também tempo de seguimento curto ou ainda lesão irreversível (ou droga não retirada). #Não houve regressão do evento considerado reversível (ou regressão completa sem a retirada da droga). R+: re-exposição positiva; R-: re-exposição negativa; R0: re-exposição não realizada. C3: cronologia sugestiva; C2: cronologia possível; C1: cronologia duvidosa; C0: cronologia incompatível.

Tabela 2. Atribuição Semiológica

Explicação alternativa de causa (não relacionada à droga)	Semiologia sugestiva da droga sendo avaliada (e/ou fator favorecedor muito sugestivo)			Outros casos		
	L+	L0	L-	L+	L0	L-
Nenhuma (após pesquisa)	S3	S3	S1	S3	S2	S1
Possível ou presente	S3	S2	S1	S3	S1	S1

L= teste laboratorial possível e realizável; L+: teste positivo; L-: teste negativo; L0: teste não realizado ou inexistente. S3: semiologia sugestiva; S2: semiologia possível; S1: semiologia duvidosa.

Tabela 3. Atribuição Intrínseca:

Cronologia	Semiologia (S1)	Semiologia (S2)	Semiologia (S3)
C0	10	10	10
C1	11	11	12
C2	11	12	13
C3	13	13	14

Tabela de decisão final (relação droga-efeito): 14= muito provável; 13= provável; 12= possível; 11= duvidosa; 10= improvável (excluída).

Imputabilidade atribuída: _____

Sinais e sintomas: _____

Início das primeiras manifestações da urticária

Tabela 4. Avaliação da intensidade da urticária

Escore*	URTICAS	PRURIDO
0	nenhuma	nenhuma
1	Leve (< 20 urticas /24 horas)	Leve
2	Moderada (21-50 urticas/24 horas)	Moderada
3	Grave (> 50 urticas /24 horas ou grandes áreas confluentes de urticas)	Intenso

*Soma de escores (urticas+prurido)=(0-6). Adaptado de Zuberbier T, et al.. Definition, Classification, and Routine Diagnosis of Urticaria: A Consensus Report. J Investig Dermatol Symp Proc 2001;6:123-7.

Soma dos Escores: _____

História prévia de alergia a medicamentos:

Doença(s) associada(s):

História familiar de alergia:

*LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES:

Dados da anatomia patológica [ESTUDO pela MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ, com técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E.) e estudo imunoistoquímico]:

V1) Número da **Biopsia A** (da área da urticária): _____

Data: _____

Descrição histopatológica (HE):

Descrição histopatológica da Imunoistoquímica:

▪ Anti-Triptase:

▪ Anti-CD 34:

▪ Anti-Fator XIIIa:

V2) Número da **Biopsia B** (da área de pele aparentemente sã): _____

Data: _____

Descrição histopatológica (HE):

Descrição histopatológica da Imunoistoquímica:

▪ Anti-Triptase:

▪ Anti-CD 34:

▪ Anti-Fator XIIIa:

Dados da anatomia patológica (ESTUDO PELA IMUNO-MICROSCOPIA ELETRÔNICA):

Número da **Biopsia A** (da área da URTICA): _____

Data: _____

Descrição: _____

Número da **Biopsia B** (da área da PELE APARENTEMENTE SÃ): _____

Data: _____

Descrição: _____

Dados do prontuário médico do paciente:

*Alcoolismo: sim ☐, não ☐

*Abortamento ou perdas fetais ☐ _____

*Doença Infecciosa PRÉVIA: _____

Sífilis ☐

Hanseníase ☐

Tuberculose ☐

Hepatite viral ☐

*Doença Reumatológica PRÉVIA: _____

LES ☐ LED ☐ Esclerodermia ☐ Artrite reumatóide ☐

SD. Sjögren ☐ Poli/Dermatomiosite ☐ Doença de Behçet ☐

PAN ☐ Crioglobulinemia ☐

*Doença Hematológica PRÉVIA: _____

Policitemia vera ☐ PTT ☐ Mielofibrose ☐ Anemia Perniciosa ☐

Plaquetopenia ☐ Doença linfoproliferativa ☐ _____

*Doença Endócrina PRÉVIA: _____

Diabetes mellitus ☐ Doença tireoideana ☐ Doença de Cushing ☐ Oxalose ☐

*Doença Renal PRÉVIA: _____

*Doença Dermatológica PRÉVIA: _____

*Diátese Atópica: _____

*Doença do Ouvido, Nariz e Garganta PRÉVIAS: _____

ANEXO IV

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **047/06**, intitulado: "A resposta inflamatória na urticária aguda induzida por medicamentos: Avaliação imuno-histoquímica e imuno-eletrônica da unidade microvascular da derme." apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Cidia Vasconcellos**

Pesquisador(a) Executante: **Dr. Paulo Ricardo Criado**

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO V

Contagem de células imunomarcadas (CD34) e vasos sanguíneos em 12 campos ópticos, na pele aparentemente sã e na pele urticada, dos sete doentes.

CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PNL	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	2	6	1	4	2	3	1	3	2	4	3	6	2	5	2	4	1	3	2	2	1	4	1	2	20	46
Caso 2	5	6	3	7	5	8	4	7	4	6	1	6	4	10	3	4	5	7	5	8	2	11	1	8	43	88
Caso 3	2	7	6	7	4	6	6	9	3	7	6	11	5	4	2	5	3	5	6	9	4	8	3	4	57	77
Caso 4	1	1	4	2	1	4	3	3	3	4	6	1	4	4	2	3	8	1	3	3	5	2	2	3	42	31
Caso 5	4	7	3	10	4	6	4	7	2	5	2	4	3	6	2	8	2	3	1	3	1	4	2	1	30	64
Caso 6	3	4	6	1	8	6	10	2	3	3	2	2	2	1	3	0	3	1	2	0	4	1	2	1	48	22
Caso 7	7	4	2	6	2	5	3	4	4	2	2	5	2	2	1	7	1	8	2	6	2	6	1	1	30	56
CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PURT	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	2	6	5	5	2	10	7	6	4	7	1	8	6	7	5	6	4	5	2	8	3	9	6	10	47	87
Caso 2	7	4	6	3	5	2	8	5	3	3	5	2	4	2	3	4	3	3	7	5	10	6	2	5	63	44
Caso 3	5	5	4	4	9	6	4	8	3	4	1	3	5	4	1	3	2	5	1	3	2	1	2	2	39	58
Caso 4	2	7	3	4	7	11	3	7	3	5	2	7	3	6	3	1	4	6	3	5	2	5	2	3	35	67
Caso 5	1	4	1	5	2	5	2	3	1	6	2	1	3	3	1	2	1	0	2	1	3	2	2	2	21	34
Caso 6	5	2	2	2	6	1	5	4	43	2	3	1	4	2	1	3	2	1	2	2	3	1	2	1	39	22
Caso 7	4	2	2	3	1	3	3	0	5	2	3	1	5	2	2	2	1	4	4	3	6	2	4	1	40	25

Nota: CS, caso clínico; V, vasos; C, células; TV, total de vasos; TC, total de células; PNL, pele aparentemente normal; PURT, pele urticada.

ANEXO VI

Contagem de células imunomarcadas (FXIIIa) e vasos sanguíneos em 12 campos ópticos, na pele aparentemente sã e na pele urticada, dos sete doentes.

CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PNL	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	2	4	4	4	3	5	3	6	4	3	2	1	3	8	2	3	1	9	1	0	1	3	1	4	27	50
Caso 2	3	4	3	2	4	8	5	7	5	9	4	6	2	4	3	12	4	13	2	9	2	8	2	10	40	82
Caso 3	2	9	4	8	4	12	2	6	2	13	2	10	4	6	5	14	3	2	2	1	2	2	1	2	32	86
Caso 4	2	1	2	3	3	3	4	2	2	5	2	2	4	2	3	2	3	3	3	2	3	1	3	0	35	28
Caso 5	3	5	4	3	6	5	2	9	3	8	3	10	4	6	2	13	2	12	2	8	1	5	1	3	33	88
Caso 6	4	4	5	7	6	14	3	8	1	4	5	7	6	5	4	9	3	6	2	3	1	3	2	1	42	71
Caso 7	3	4	2	3	6	5	3	1	4	3	3	4	3	5	3	4	2	8	2	1	3	1	2	2	36	40
CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PURT	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	3	3	2	7	3	3	2	1	3	3	2	2	2	5	3	6	4	3	6	7	3	5	2	4	34	47
Caso 2	2	8	3	4	2	4	4	5	3	4	4	7	3	13	2	5	5	5	4	3	5	9	3	5	39	72
Caso 3	2	4	11	6	6	5	5	11	4	1	3	2	1	3	2	2	1	4	1	3	1	3	2	6	39	51
Caso 4	2	4	5	11	4	5	2	10	3	15	5	8	2	5	1	3	4	4	2	5	3	3	4	3	37	76
Caso 5	2	4	2	4	2	9	2	10	1	2	1	4	1	2	1	1	2	4	1	0	2	0	1	2	18	41
Caso 6	4	7	3	6	4	4	5	4	3	5	4	3	6	7	1	2	5	1	2	3	3	1	1	0	41	43
Caso 7	2	2	3	4	4	7	3	8	4	4	3	0	2	1	2	2	4	5	2	7	3	3	2	1	34	45

Nota: CS, caso clínico; V, vasos; C, células; TV, total de vasos; TC, total de células; PNL, pele aparentemente normal; PURT, pele urticada.

ANEXO VII

Contagem de células imunomarcadas (Tryptase) e vasos sanguíneos em 12 campos ópticos, na pele aparentemente sã e na pele urticada, dos sete doentes.

CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PNL	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	4	9	2	4	3	5	3	3	2	3	2	5	4	9	4	6	2	6	1	3	1	4	2	1	30	58
Caso 2	3	4	4	1	2	3	3	4	1	1	5	7	2	4	2	3	3	6	3	5	1	4	3	4	32	46
Caso 3	4	8	3	4	2	4	2	6	2	7	3	11	1	7	3	7	6	13	5	10	3	5	1	5	35	87
Caso 4	3	5	5	6	3	7	3	5	4	5	2	5	4	5	2	4	1	3	2	3	1	2	2	1	32	51
Caso 5	3	8	3	4	4	8	4	6	3	5	3	1	2	3	4	3	2	4	1	4	1	2	1	2	31	50
Caso 6	2	2	3	3	3	2	5	6	3	2	2	4	3	4	5	4	1	2	2	4	3	0	2	7	34	40
Caso 7	4	6	2	4	2	3	3	6	4	6	3	1	3	7	3	4	4	9	4	7	2	5	1	1	36	59
CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PURT	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	2	8	3	5	4	10	4	8	3	13	1	3	2	5	3	8	5	6	2	3	2	5	4	8	36	82
Caso 2	3	7	7	11	1	3	4	9	7	8	4	8	5	7	5	7	4	6	3	8	6	4	3	6	52	84
Caso 3	2	4	3	3	3	8	2	12	5	9	4	5	3	8	2	3	3	9	2	5	1	2	2	1	32	69
Caso 4	3	4	4	3	4	4	2	2	1	1	3	2	1	2	4	3	2	1	5	3	3	3	2	1	34	29
Caso 5	3	7	7	11	1	3	4	9	7	8	4	8	5	7	5	7	4	6	3	8	6	4	3	6	52	84
Caso 6	1	4	1	2	4	6	2	4	2	4	2	5	1	2	1	7	1	3	1	2	1	1	1	1	18	41
Caso 7	4	3	3	4	2	0	3	6	3	2	2	4	3	3	1	2	2	4	4	4	4	5	1	2	32	39

Nota: CS, caso clínico; V, vasos; C, células; TV, total de vasos; TC, total de células; PNL, pele aparentemente normal; PURT, pele urticada.

ANEXO VIII

Contagem de células duplamente imunomarcadas (FXIIIa e Triptase) e vasos sanguíneos em 12 campos ópticos, na pele aparentemente são e na pele urticada, dos sete doentes.

CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PNL	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	2	6	2	3	1	2	2	4	2	1	2	2	3	4	1	3	2	2	1	1	2	2	1	0	20	25
Caso 2	4	3	3	2	2	3	2	1	3	3	4	2	4	1	4	2	3	4	4	4	1	5	1	2	35	32
Caso 3	2	1	1	3	3	2	2	5	1	4	3	1	3	3	3	4	3	6	3	4	1	3	1	1	26	18
Caso 4	5	6	6	5	3	4	2	5	2	2	4	4	3	2	3	4	2	4	2	1	2	8	3	4	36	49
Caso 5	1	3	2	3	2	4	2	1	1	3	2	4	3	2	2	1	1	0	1	1	2	1	1	3	20	25
Caso 6	2	1	2	4	3	2	2	3	2	3	3	3	4	3	2	1	2	4	3	1	2	1	1	1	28	27
Caso 7	2	2	1	4	3	3	2	4	2	2	4	3	2	1	2	4	3	3	2	2	3	4	2	1	28	33
CS	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	TV	TC
PURT	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12		
Caso 1	1	1	2	0	2	2	1	3	2	1	3	2	1	2	3	2	3	3	1	1	1	2	2	2	22	21
Caso 2	2	2	2	1	1	2	3	2	4	1	1	2	2	2	3	1	3	1	2	2	2	1	1	2	26	18
Caso 3	2	1	2	2	2	3	2	1	2	2	3	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	0	2	0	23	18
Caso 4	2	1	3	0	2	2	2	1	2	0	2	1	2	0	2	1	3	2	2	1	2	1	1	3	25	13
Caso 5	1	2	1	0	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2	1	0	1	1	2	0	17	13
Caso 6	4	2	4	2	3	5	3	1	1	2	4	3	2	4	2	2	2	3	2	1	1	2	1	0	27	27
Caso 7	2	0	2	2	2	3	1	1	2	1	1	0	2	1	3	2	2	1	2	2	1	0	1	1	21	14

Nota: CS, caso clínico; V, vasos; C, células; TV, total de vasos; TC, total de células; PNL, pele aparentemente normal; PURT, pele urticada.

9. REFERÊNCIAS

Adany R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L. Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol.* 1985; 38 (1):171-3.

Adany R, Bardos H, Antal M, Modis L, Sarvary A, Szucs S, Balogh I. Factor XIII of blood coagulation as a nuclear crosslinking enzyme. *Thromb Haemost.* 2001; 85(5):845-51.

Adany R, Bardos H. Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(6):1049-60.

Akdis CA, Simons FE. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3): 69-76.

Arrese Estrada J, Pierard GE. Factor XIIIa positives dendrocytes and the Dermal Microvascular Unit. *Dermatologica.* 1990;180(1):51-3.

Asijee GM, Muszbek L, Kappelmayer J, Polgar J, Horvath A, Sturk A. Platelet vinculin: a substrate of activated factor XIII. *Biochim Biophys Acta.* 1988; 954 (3):303-8.

Baggiolini M, Horisgerger U, Martin U. Phagocytosis of mast cell granules by mononuclear phagocytes, neutrophils and eosinophils during anaphylaxis. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1982;67(3):219-26.

Bircher AJ. Drug-induced urticaria and angioedema caused by non-IgE mediated pathomechanisms. *Eur J Dermatol.* 1999;9(8):657-63.

Borish L, Tilles SA. Immune mechanisms of drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 1998;18:717-29.

Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(2):371-6.

Caproni M, Volpi W, Macchia D, Giomi B, Manfredi M, Campi P, et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. *Exp Dermatol.* 2003; 12 (5):621-8.

Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D, et al. Chronic idiopathic urticaria: Infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clin Immunol.* 2005;114(3):284-92.

Carneiro SCS, Medeiros R, Magalhães GM, Alves C, Cuzzi T, Sotto MN. Ação da pentoxifilina nos dendrócitos dérmicos FXIIIa de placas de psoríase. *An Bras Dermatol.* 2005;80:S314-22.

Caughey GH. Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(6):1411-4.

Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol.* 1987;138(7):2184-9.

Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol.* 1989;121(4):421-31.

Cerio R, Spaul J. A study of fXIIIa and Mac 387 immunolabeling in normal and pathological skin. *Am J Dermatopathol*. 1990;12(3):221-3.

Cohen I, Young-Bandala L, Blankenberg TA, Siefring GE Jr, Bruner-Lorand J. Fibrinoligase-catalyzed cross-linking of myosin from platelet and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 192(1):100-11.

Cohen I, Blankenberg TA, Borden D, Kahn DR, Veis A. Factor XIIIa-catalyzed cross-linking of platelet and muscle actin. Regulation by nucleotides. *Biochim Biophys Acta*. 1980;628(3):365-75.

Cousin F, Philips K, Favier B, Bienvenu J, Nicolas JF. Drug-induced urticaria. *Eur J Dermatol*. 2001;11(3):181-7.

Craig SS, Schwartz LB. Human MCTC type of mast cell granule: the uncommon occurrence of discrete scrolls associated with focal absence of chymase. *Lab Invest*. 1990;63(4):581-5.

Criado PR. Resposta inflamatória na urticária aguda desencadeada por exposição a medicamentos: estudo ultra-estrutural. Tese de mestrado. Área de concentração: Dermatologia. São Paulo, SP: Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual, 2002.

Criado PR, Criado RFJ, Maruta CW, Martins JEC, Rivitti EA. Urticária. *An Bras Dermatol*. 2005;80(6):613-32.

Criado PR, Criado RF, Valente NY, Queiroz LB, Martins JE, Vasconcellos C. The inflammatory response in drug-induced acute urticaria. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20(9):1095-9.

Crimi E, Chiaramondia M, Milanese M, Rossi GA, Brusasco V. Increased numbers of mast cells in bronchial mucosa after the late-phase asthmatic response to allergen. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(6):1282-6.

Czarnetzki BM, Zwadlo-Klarwasser G, Brocker EB, Sorg, C. Macrophage subsets in different types of urticaria. *Arch Dermatol Res*. 1990;282(2):93-7.

Demoly P, Messaad D, Sahla H, Bousquet J. Hypersensitivity to H1-antihistamines. *Allergy*. 2000; 55(7): 679-80.

Daroczy J, Temesvari E. Light microscopic and electron microscopic (EM) examination of contact urticaria. *Contact Dermatitis*. 1988(2);19:156-8.

Dvorak AM, Dvorak HF, Karnovsky MJ. Uptake of horseradish peroxidase by guinea pig basophilic leukocytes. *Lab Invest*. 1972;26(1):27-9.

Dvorak AM, Kissell S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *J Leukoc Biol*. 1991; 49(2):197-210.

Dvorak AM, McLeod RS, Onderdonk A, Monahan-Earley RA, Cullen JB, Antonioli DA, et al.. Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992a;99(1):74-83.

Dvorak AM. Basophils and mast cells: piecemeal degranulation in situ and ex vivo: a possible mechanism for cytokine-induced function in disease. *Immunol Ser*. 1992b;57:169-271.

Dvorak AM. Ultrastructural analysis of anaphylatic and piecemeal degranulation of human mast cells and basophils. *In* Foreman JC, editor. *Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils*. London, Academic Press; 1993. p. 89-113.

Dvorak AM, Tepper RI, Weller PF, Morgan ES, Estrella P, Monahan-Earley RA, et al. Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release in vivo by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. *Blood*. 1994; 83(12):3600-12.

Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol*. 1996; 59(1):100-15.

Dvorak AM, Costa JJ, Monahan-Earley RA, Fox P, Galli SJ. Ultrastructural analysis of human skin biopsy specimens from patients receiving recombinant human stem cell factor: subcutaneous injection of rhSCF induces dermal mast cell degranulation and granulocyte recruitment at the injection site. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101 (6 Pt 1):793-806.

Dvorak AM. Ultrastructural studies of human basophils and mast cells. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(9):1043-70.

Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CEP. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol*. 1992;16(4):475-82.

Elias J, Boss E, Kaplan AP. Studies of the cellular infiltrate of chronic idiopathic urticaria: proeminence of T-lymphocytes, monocytes, and mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1986;78(5 Pt 1):914-8.

Esposito C, Caputo I. Mammalian transglutaminases Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. *FEBS J*. 2005; 272(3):615–31.

Fear JD, Jackson P, Gray C, Miloszewsky KJ, Losowsky MS. Localization of factor XIIIa in human tissues using an immunoperoxidase technique. *J Clin Pathol*. 1984;37(5):560-3.

Feng D, Nagy JA, Brekken RA, Pettersson A, Manseau EJ, Pyne K, et al. Ultrastructural localization of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptor-2 (FLK-1, KDR) in normal mouse kidney and in the hyperpermeable vessels induced by VPF/VEGF-expressing tumors and adenoviral vectors. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(4):545-55.

Feng D, Flaumenhaft R, Bandeira-Melo C, Weller P, Dvorak A. Ultrastructural localization of vesicle-associated membrane protein(s) to specialized membrane structures in human pericytes, vascular smooth muscle cells, endothelial cells, neutrophils, and eosinophils. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(3):293-304.

Fesus L, Szucs EF, Barrett KE, Metcalfe DD, Folk JE. Activation of transglutaminase and production of protein-bound gamma-glutamylhistamine in stimulated mouse mast cells. *J Biol Chem*. 1985; 260(25):13771-8.

Galli SJ, Kalesnikoff, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005a;23:749-86.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005b;6(2):135-42.

Greaves M, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR. Molecular features of CD34: a hematopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia*. 1992;6(Suppl 1):31-6.

Greaves MW. Immunology and inflammation: type I allergy and intolerance. *J Dermatol Treat*. 2000;11:S27-S30.

Grosshans E. Urticaires médicamenteuses. *Rev Prat*. 2000; 50: 1305-9.

Gruchalla SR. Allergy and immunology. Primary care: Clin Office Practice. 1998;25:791-807.

Harvima IT, Naukkarinen A, Harvima RJ, Horsmanheimo M. Enzyme- and immunohistochemical localization of mast cell tryptase in psoriatic skin. *Arch Dermatol Res*. 1989;281(4):387-91.

Haas N, Toppe E, Henz BM. Microscopy morphology of different types of urticaria. *Arch Dermatol*. 1998;134(1):41-46.

Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J*. 2006;273(9):1871-95.

Hoyo E, Kanitakis J, Schmitt D. Le dendrocyte dermique. *Path Biol*. 1993;41(7):613-8.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(11):1349-53.

Huston DP, Bressler RB. Urticaria and angioedema. *The Medical Clin North Am.* 1992;76(4):805-40.

Joyce NC, Haire MF, Palade GE. Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol.* 1985;100(5):1387-95.

Jutel M, Blaser K, Akdis CA. Histamine in chronic allergic responses. *Investig Allergol Clin Immunol.* 2005;15(1):1-8.

Kaplan AP. Urticaria and Angioedema. In: Middleton Jr. E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson Jr. NF, Yunginger JW, Busse WW eds. *Allergy. Principles & Practice.* 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc; 1998. p.1104-22.

Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunological Rev.* 2007;217:5-7.

Kobza-Black A, Greaves MW, Champion RH, Pye RJ. The urticarias 1990. *Br J Dermatol.* 1991;124(1):100-8.

Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest.* 1992; 67(5):596-607.

Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol* 2006;315:13-34.

Lagunoff D. Contributions of Electron Microscopy to the study of Mast Cells. *J Invest Dermatol.* 1972; 58(5):296-311.

Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem*. 1999; 274(14):9378-85.

Laroche D, Namour F, Lefrancois C, Aimone-Gastin I, Romano A, Sainte-Laudy J, *et al.*. Anaphylactoid and anaphylactic reactions to iodinated contrast material. *Allergy* 1999; 54 (suppl. 58): 13-6.

Lawlor F, Black AK, Breathnach AS, Mckee P, Sarathchandra P, Bhogal B, *et al.* A timed study of the histopathology, direct immunofluorescence and ultrastructural findings in idiopathic cold-contact urticaria over a 24-h period. *Clin Exp Dermatol* 1989;14:416-20.

Lever WF, Schaumburg-Lever G. Doenças eritematosas, papulosas e escamosas não infecciosas. In: Lever WF, Schaumburg-Lever G eds. *Histopatologia da Pele*. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda; 1991. p.137-66. [edição brasileira].

Metcalf DD, Baran D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997;77:1033-64.

Michalowski R. Langerhans' cells in urticaria: an electron microscopic study. *Indian J Dermatol* 1989;34:54-8.

Miller HRP, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* 2002;105:375–90.

Moore N, Paux G, Begald B, Biour M, Loupi E, Boismare F, Royer RJ. Adverse drug reaction monitoring: doing it the French way. *Lancet* 1985; 9(8463):1056-8.

Moormann C, Artuc M, Pohl E, Varga G, Buddenkotte J, Vergnolle N, et al. Functional Characterization and Expression Analysis of the Proteinase-Activated Receptor-2 in Human Cutaneous Mast Cells. *J Invest Dermatol.* 2006 126(4), 746–55.

Mosher DF, Schad PE, Vann JM. Cross linking of collagen and fibronectin by factor XIIIa. *J Biol Chem.* 1980;255(3):1181-8.

Murphy GF, Austen KF, Fonferko E, Sheffer AL. Morphologically distinctive forms of cutaneous mast cell degranulation induced by cold and mechanical stimuli: an ultrastructural study. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;80(4):603-11.

Murphy GF. Histology of the Skin. In Elder DE, Elenitsas R, Johnson Jr BL, Murphy GF, eds. *Lever's histopathology of the skin.* 9 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p37-58.

Narvaez D, Kanitakis J, Faure M, Claudy A. Immunohistochemical study of CD34-Positive Dendritic Cells of Human Dermis. *Am J Dermatopathol.* 1996;18(3):283-8.

Nemes Z, Adany R, Thomazy V. Selectivwe visualization of human dendritic reticulum cells in reactive lymphoid follicles by the immnunohistochemicla demonstration of the subunit A of factor XIIIa. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1987;52(5):453-66.

Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol.* 1993; 151(11):6535-45.

Nickoloff B. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells and perifollicular cells in formalin fixed

normal skin and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. Arch Dermatol 1991;127:523-9.

Nickoloff BJ, Griffiths CE. Not all spindled-shaped cells embedded in a collagenous stroma are fibroblasts: recognition of the "collagen-associated dendrophage". J Cutan Pathol. 1990;17(4):252-4.

Oliver F, Amon EU, Breathnach A, Francis DM, Sarathchandra P, Kobza-Black A, Greaves MW. Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*)—histological, ultrastructural and pharmacological studies. Clin Exp Dermatol. 1991;16(1):1-7.

Pacheco LS, Sotto MN. Factor XIIIa+ dermal dendrocytes in erythema elevatum diutinum and ordinary cutaneous leucocytoclastic vasculitis. J Cutan Pathol. 2000; 27(3):136-40.

Parwaresch MS, Homy HP, Lennert K. Tissue mast cell in health and disease. Path Res Pract. 1985;179(4-5):439-61.

Payne V, Kam PC. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. Anesthesia. 2004;59(7):695-703.

Penneys NS. Factor XIII expression in the skin: Observation and a hypothesis. J Am Acad Dermatol. 1990;22(3):484-7.

Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Olivieri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatics and normal subjects. Am Rev Respir Dis. 1993; 147(3):684-9. Erratum in: Am Rev Respir Dis 1993 Jul;148(1):following 264. Oliveri D [corrected to Olivieri D].

Ponvert C, LeClainche L, de Blic J, Le Bourgeois M, Scheinmann P, Paupe J. Allergy to beta-lactam antibiotics in children. *Pediatrics*. 1999; 104: F1-9.

Qu-Hong, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM. Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(4):381-9.

Regezi JA, Nickoloff BJ, Headington JT. Oral submucosal dendrocytes: Factor XIIIa+ and CD34+ dendritic cell populations in normal tissue and fibrovascular lesions. *J Cutan Pathol*. 1992;19(5):398-406.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963;17:208-13.

Samorapoompichit P, Scherthaner G-H, Worda C, Wimazal F, Krauth M-T, Sperr WR, Valent P. Evaluation of neoplastic human mast cells by tryptase-immunoelectron microscopy. *Histopathology*. 2006, 48, 247–257.

Sanchez-Borges M, Capriles-Hulett A. Atopy is a risk factor for nonsteroidal anti-inflammatory drug sensitivity. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000; 84: 101-6.

Sauter B, Foedinger D, Sterniczky B, Wolff K, Rappersberger K. Immunoelectron Microscopic Characterization of Human Dermal Lymphatic Microvascular Endothelial Cells: Differential Expression of CD31, CD34, and Type IV Collagen with Lymphatic Endothelial Cells vs Blood Capillary Endothelial Cells in Normal Skin, Lymphangioma, and Hemangioma In Situ. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(2):165-76.

Sarvary A, Szucs S, Balogh I, Becsky A, Bardos H, Kawai M, et al.. Possible role of factor XIII subunit A in Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *Cell Immunol.* 2004; 228(2):81-90.

Schaumburg-Lever G, Gehring B, Kaiserling E. Ultrastructural localization of factor XIIIa. *J Cutan Pathol.* 1994; 21(2):129-34.

Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2000;191(5): 813-22.

Singh S, Swerlick RA. Structure and function of the cutaneous vasculature. In: Freinkel, R. K. & Woodley, D. T. eds. *The Biology of the Skin*. 1st ed. New York: The Pathernon Publishing Group; 2001. p. 177-89.

Solley GO, Gleich GJ, Jordon RE, Schroeter AL. The late phase of the immediate wheal and flare skin reaction. Its dependence upon IgE antibodies. *J Clin Invest.* 1976;58(2):408-20.

Solomon Jr. AR. The histologic spectrum of the reactive inflammatory vascular dermatoses. *Dermatol Clin.* 1985;3:171-83.

Sontheimer RD, Matsubara T, Seelig LL. A macrophage phenotype for a constitutive, class II antigen-expressing, human dermal perivascular dendritic cell. *J Invest Dermatol.* 1989;93(1):154-9.

Sotto MN. Dendrócitos em doenças humanas. In: 56^o Congresso Brasileiro de Dermatologia; 2001; Goiânia. *Anais.* Goiânia: Sociedade Brasileira de Dermatologia; 2001. p.329-30.

Soub CRW, Rochael MC, Cuzzi T. Granuloma Anular: distribuição tecidual dos dendrócitos dérmicos fator XIIIa⁺, das células dérmicas trombomodulina⁺ e de macrófagos CD68⁺. An Bras Dermatol. 2003;78:289-98.

Stan RV. Multiple PV1 dimers reside in the same stomatal or fenestral diaphragm. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;286(4):H1347-53.

Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol. 2003 139(11):1479-88.

Sueki H, Whitaker D, Buchsbaum M, Murphy GF. Novel interactions between dermal dendrocytes and mast cells in human skin. Implications for hemostasis and matrix repair. Lab Invest. 1993; 69(2):160-72.

Szeberenyi JB, Pallinger E, Zsinko M, Pos Z, Rothe G, Orso E, Szeberenyi S, Schmitz G, Falus A, Laszlo V. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. Immunol Lett.

2001; 76(3):175-82.

Tharp MD. Skin mast cells. In: Freinkel, R. K. & Woodley, D. T. eds. *The Biology of the Skin*. 1st ed. New York: The Pathernon Publishing Group; 2001. p. 265-79.

Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. Immunol Rev. 2007;217:65-78.

Torocsik D, Bardos H, Nagy L, Adany R. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. Cell Mol Life Sci. 2005; 62(18):2132-9.

Triggiani M, Petraroli A, Loffredo S, Frattini A, Granata F, Morabito P, et al. Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H1 receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(2):472-81.

Weibel ER, Palade GE. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol*. 1964;23:101-112.

Weiss RR, Whitaker-Menezes D, Longley J, Bender J, Murphy GF. Human dermal endothelial cells express membrane-associated mast cell growth factor. *J Invest Dermatol*. 1995;104(1):101-6.

Wiesner-Menzel L, Schulz B, Vakilzadeh F, Czarnetzki BM. Electron microscopical evidence for a direct contact between nerve fibres and mast cells. *Acta Derm Venereol*. 1981;61(6):465-9.

Winkelmann RK, Reizner GT. Diffuse dermal neutrophilia in urticaria. *Hum Pathol*. 1988;19(4):389-93.

Xie H, He SH. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2005;11(19):2851-7.

Yen A, Braverman IM. Ultrastructure of the human dermal microcirculation: the horizontal plexus of the papillary dermis. *J Invest Dermatol*. 1976;66(3):131-142.

Ying S, Kikuchi Y, Meng Q, Kay AB, Kaplan AP. TH1/TH2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109 (4):694-700.

Yoshida S, Ishizaki Y, Onuma K, Shoji T, Nakagawa H, Amayasu H. Selective cyclo-oxygenase 2 inhibitor in patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(6):1201-2.

Zelickson BD, Zelickson AS. Current concepts in electron microscopy. *Int J Dermatol*. 1993;32(4):232-42.

Zuberbier T, Iffländer J, Semmler C, Henz BM. Acute urticaria: clinical aspects and therapeutic responsiveness. *Acta Dermatol Venereol*. (Stockh) 1996;76(4):295-7.

Zuberbier T, Greaves MW, Juhlin L, Kobza-Black A, Maurer D, Stingl G, et al. Definition, Classification, and Routine Diagnosis of Urticaria: A Consensus Report. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001;6(2):123-7.

Zuberbier T, Bindslev-Jensen C, Canonica W, Grattan CE, Greaves MW, Henz BM, et al.. EAACI/GA2LEN/EDF. EAACI/GA2LEN/EDF guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria. *Allergy*. 2006;61(3):316-20.