



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA: EFEITOS SOBRE
GRANULÓCITOS DE PACIENTES ALÉRGICOS AO
VENENO DE *APIS MELLIFERA***

KARLA PRISCILA VIEIRA FERRO

CAMPINAS, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA: EFEITOS SOBRE GRANULÓCITOS DE PACIENTES ALÉRGICOS AO VENENO DE *APIS MELLIFERA*

KARLA PRISCILA VIEIRA FERRO

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação do. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

F417i Ferro, Karla Priscila Vieira, 1981-
Imunoterapia específica: efeitos sobre granulócitos
de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera*. /
Karla Priscila Vieira Ferro. – Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Alergia. 2. Abelha - Veneno. 3. Imunoterapia. I.
Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Specific immunotherapy: effects on granulocytes from *Apis mellifera*
allergic patients

Palavras-chave em inglês:

Allergy

Bee - Venom

Immunotherapy

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Virginia Paes Leme Ferriani

Marcia Regina Brochetto Braga

Maria Marluce dos Santos Vilela

Stephen Hyslop

Data da defesa: 24-11-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Karla Priscila Vieira Ferro

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

1. Prof. Dr. Stephen Hyslop

2. Prof^a. Dr^a. Maria Marluce Dos Santos Vilela

3. Prof^a. Dr^a. Virginia Paes Leme Ferriani

4. Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Brochetto Braga

5. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/11/2011

Dedicatória

À meus amados pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Obrigada por iluminar os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os pudesse trilhar sem medo. Obrigada por muitas vezes se doarem por inteiros e renunciarem aos próprios sonhos para que os meus pudessem ser realizados. Não existem palavras para descrever todo amor e gratidão que sinto por vocês.

Ao meu marido, obrigada pelo companheirismo, paciência e compreensão. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma já não mais o fazia. Obrigada por encher minha vida de alegria. Ao seu lado, sou plenamente feliz.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo de Lima Zollner, por me colocar o desafio de uma tese de doutorado, pela competência científica e orientação dada. Por me ensinar com prazer e dedicação grande parte do que sei e pela disponibilidade e toda confiança depositada em meu trabalho, agradeço.

AGRADECIMENTOS

Para o desenvolvimento deste trabalho pude contar com a participação de muitas pessoas, em diferentes momentos. A todos meu profundo e sincero agradecimento. A lembrança, muitas vezes traiçoeira, pode cometer injustiças, mas injustiça maior seria não citar aqueles que contribuíram, decisivamente, para a conclusão desta tese.

Agradeço aos Professores Stephen Hyslop, Maria Marluce dos Santos Vilela, Marcia Regina Brochetto Braga e Virginia Paes Leme Ferriani pela participação na banca e valiosas sugestões.

Nestes oito anos em que fiz parte do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental, tive a oportunidade de conviver diariamente com diferentes pessoas que deixaram suas marcas e, por esta razão, as tenho como amigas que levarei para toda a minha vida. Agradeço, especialmente, à Bruna, Carina, Glaucia, Ivone, Leonardo, Maira, Priscila, Rhubia, Rika e Thiago, por todos os bons momentos compartilhados que deixaram muitas saudades.

Serei eternamente grata à Conceição. Con, impossível traduzir em palavras tudo o que você fez por mim! Obrigada por tudo o que carinhosamente me ensinou com seu jeito bonito e sereno. Obrigada por toda dedicação, disponibilidade e atenção dadas a mim e a este trabalho. Obrigada por estar sempre disposta a me ouvir pacientemente e por me ajudar a escolher o melhor caminho a percorrer. Obrigada por confiar a mim seus pensamentos, seus sonhos, suas decepções. Sei que sou uma pessoa infinitamente melhor depois que te conheci!

Agradeço à Meg, pelo exemplo de bondade e perseverança, por toda a sua boa vontade em ajudar e ouvir. Obrigada, Meguinha, por todo o seu carinho, por todos os abraços e por todas as vezes que disse que gostava de mim como se fosse sua filha. E, é assim que me sinto ao seu lado, Meguinha, uma filha sempre amparada e fortalecida para seguir em frente quando tudo é incerteza.

Giovanna! Obrigada por deixar mais leve nossa árdua rotina de culturas de células, por toda a disponibilidade e prontidão, por fazer de nossa “equipe de duas” certamente um grande sucesso. Obrigada pela ótima companhia diária que rendeu momentos inesquecíveis e pela amizade sem máscaras e bonita como você!

À Natalia pela força nas últimas etapas, por toda a ajuda com a apresentação da tese, pela amizade.

Às estagiárias Camilinha e Nayara, sempre solícitas e carinhosas, agradeço por toda a contribuição nos procedimentos práticos.

Às meninas do Laboratório de Nefrologia, Pati e Sô, por toda a ajuda nos momentos de sufoco.

Não poderia deixar de agradecer ao senhor José, o seu Zé, por todas as caronas de Piracicaba para a Unicamp e pelo exemplo de amor, dedicação ao trabalho e ao próximo.

Aos funcionários da Pós Graduação, especialmente à Adriana, pela atenção dispensada e pela imensa ajuda com os problemas burocráticos.

À todos os pacientes que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CNPq e a Fapesp pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LITO ANOSSTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS	XXII
RESUMO	XXIII
ABSTRACT	XXVI
1 - INTRODUÇÃO	30
1.1. RESPOSTA ALÉRGICA	31
1.2. GRANULÓCITOS	34
1.2.1. <i>Eosinófilos</i>	34
1.2.2. <i>Neutrófilos</i>	36
1.2.3. <i>Basófilos</i>	41
1.3. HISTAMINA	43
1.4. FATORES DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA	45
1.4.1. <i>HRFs IgE-dependentes</i>	45
1.4.2. <i>HRFs IgE-independentes</i>	46
1.5. RECEPTORES DE HISTAMINA].	46
1.5.1. <i>H1</i>	46
1.5.2. <i>H2</i>	47
1.5.3. <i>H3</i>	48
1.5.4. <i>H4</i>	48
1.6. RECEPTORES DE IGE	50
1.6.1. <i>Receptor de alta afinidade - FcεRI</i>	50
1.6.2. <i>Receptor de baixa afinidade - FcεRII ou CD23</i>	52
1.7. HIPERSENSIBILIDADE A VENENO DE HIMENOPTEROS	53
1.7.1. <i>Componentes do veneno de abelha</i>	54
1.7.2. <i>Epidemiologia</i>	55
1.7.3. <i>Fatores de risco</i>	55
1.7.4. <i>Manifestação clínica</i>	56
1.7.5. <i>Diagnóstico</i>	58
1.8. IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA	59
1.8.1. <i>Supressão imediata de basófilos e mastócitos</i>	61
1.8.2. <i>Indução de linfócitos T reguladores e tolerância periférica</i>	61
1.8.3. <i>Modulação de IgE e IgG alérgeno-específicas</i>	63
1.8.4. <i>Supressão de células efetoras</i>	64
2 – OBJETIVOS	66
2.1. OBJETIVO GERAL	67
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3 – MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO	70

3.2. PROTOCOLO DE IMUNOTERAPIA	73
3.3. PROCEDÊNCIA E PREPARO DO VENENO.....	73
3.4. SEPARAÇÃO DE GRANULÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	74
3.5. CULTURA DE GRANULÓCITOS.....	77
3.6. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (RNAT).....	78
3.7. ANÁLISE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	79
3.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO (cDNA)	79
3.9. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	80
3.10. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	82
3.11. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DOS PRODUTOS DE PCR	83
3.12. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qPCR).....	83
3.13. IMUNOFLUORESCÊNCIA – GATA-1, FcεRIα E FcεRIγ	87
3.14. CITOMETRIA DE FLUXO – ANÁLISE DE CD23.....	88
3.15. DETECÇÃO DE APOPTOSE <i>IN SITU</i> – TÉCNICA TUNEL	89
3.16. ELISA – RANTES E IL-8	90
3.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	91
4 –RESULTADOS	92
4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE APITOXINA	93
4.2. DETERMINAÇÃO IgE ESPECÍFICA AO VENENO DE ABELHA	95
4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DE H1	97
4.4. EXPRESSÃO GÊNICA DE H2	99
4.5. EXPRESSÃO GÊNICA DE H4	101
4.6. RELAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES DE HISTAMINA	103
4.7. EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA (HRF)	105
4.8. EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO DE GRANULÓCITO	107
4.8.1. <i>Expressão Gênica de PU.1</i>	108
4.8.2. <i>Expressão Gênica de C/EBP α</i>	110
4.8.3. <i>Expressão Gênica de C/EBP β</i>	112
4.8.4. <i>Expressão de GATA-1</i>	114
4.9. EXPRESSÃO DE FcεRIα.....	119
4.9.1. <i>Expressão gênica de FcεRIα</i>	119
4.9.2. <i>Expressão protéica de FcεRIα</i>	121
4.10. EXPRESSÃO DE FcεRIγ	124
4.10.1. <i>Expressão Gênica de FcεRIγ</i>	124
4.10.2. <i>Expressão Protéica de FcεRIγ</i>	126
4.11. RELAÇÃO ENTRE FcεRIα/FcεRIγ	129
4.12. EXPRESSÃO DE FcεRII OU CD23.....	131
4.12.1. <i>Expressão Gênica de CD23</i>	131
4.12.2. <i>Expressão Protéica de CD23</i>	133
4.13. SECREÇÃO DE RANTES.....	135
4.14. SECREÇÃO DE IL-8.....	137

4.15. EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES PRÓ E ANTI – APOPTÓTICOS	139
4.15.1. <i>Expressão Gênica de BID.....</i>	139
4.15.2. <i>Expressão Gênica de Bcl-2.....</i>	142
4.16. DETECÇÃO DE APOPTOSE IN SITU	144
5 - DISCUSSÃO	146
6 - CONCLUSÕES	172
7- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	174
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Células estimuladas com veneno de abelha
ADAM10	Desintegrina e metaloprotease 10
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BaP	Precursor de basófilos
BCs	Células em banda
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BID	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIK	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
BMCP	Precursor basófilo/mastócito
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CMP	Progenitor mielóide comum
CONAP	Cooperativa nacional de apicultura
CSFR	Receptor de fatores de crescimento
DAG	Diacylglicerol
DEPC	Dimetil pirocarbonato

dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxiuridina tri-fosfato biotinilada
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EPO	Peroxidase eosinofílica
EoP	Precursor eosinofílico
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FcεRI	Receptor de alta afinidade de IgE
FcεRII ou CD23	Receptor de baixa afinidade de IgE
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
G-CSFR	Receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos/monócitos
GM-CSFR	Receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos/monócitos
GMP	Progenitor de granulócito/monócito
GFi-1	Fator de crescimento independente 1
HDC	Histidina descarboxilase
H1	Receptor de histamina 1
H2	Receptor de histamina 2
H3	Receptor de histamina 3

H4	Receptor de histamina 4
HRF	Fator de liberação de histamina
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência
IP-3	Inositol-3- fosfato
ITAM	Motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
M-CSFR	Receptor do fator estimulador de colônias de monócitos
MBs	Mieloblastos
MCs	Mielócitos
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMs	Metamielócitos
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMs	Promielócitos

qPCR	PCR quantitativo
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RAST	<i>Radioallergosorbent test</i>
ROIs	Espécies reativas intermediárias de oxigênio
SCs	Neutrófilos segmentados
sCD23	CD23 solúvel
SE	Sem estímulo
sIgE	IgE específica
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription protein</i>
TdT	<i>Terminal desoxynucleotidil transferase</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Tm	Temperatura de melting
Treg	Linfócito T regulatório
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling assay</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Apresentação do alérgeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), favorecendo a diferenciação e ativação dos linfócitos Th2. A produção de citocinas por estas células induz a produção de anticorpos IgE alérgeno-específicos pelos linfócitos B e recrutamento e ativação de células efectoras como mastócitos e eosinófilos, que por sua vez secretam uma série de citocinas e mediadores inflamatórios, sendo o principal deles a histamina.....33
- Figura 2** – Esquema dos fatores de transcrição envolvidos na granulopoiese de neutrófilos.Baseado no trabalho de Bjerregaard *et al.* (2003).....40
- Figura 3** – Separação de granulócitos por meio de gradiente descontínuo de Percoll.....76
- Figura 4** - Gráfico representando a viabilidade dos granulócitos submetidos a 72 horas de cultura e estimulados com diferentes concentrações do veneno de abelha. O parâmetro de comparação utilizado foi a sobrevivência de células não estimuladas durante o mesmo período em cultura.....94
- Figura 5** - Determinação sérica da IgE específica ao veneno de abelha ao longo do tempo de imunoterapia.....96
- Figura 6** – Análise semi-quantitativa da expressão gênica de H1. Granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia

específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.98

Figura 7 - Análise semi-quantitativa da expressão gênica de H2. Granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....100

Figura 8 – Análise semi-quantitativa da expressão gênica de H4. Granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....102

Figura 9 - Efeitos da imunoterapia específica sobre a relação entre os receptores de histamina de granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional ou estimuladas com veneno de abelha (AB).....104

Figura 10 – Análise semi-quantitativa da expressão gênica de HRF IgE-dependente. Granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....106

Figura 11 - Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição PU.1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....109

Figura 12 - Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição C/EBP α em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....111

Figura 13 - Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição C/EBP β em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....113

Figura 14 – Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição GATA-1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....115

Figura 15 – Intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica do fator de transcrição GATA-1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha (n=11) e submetidos à imunoterapia específica. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....118

Figura 16 - Quantificação da expressão gênica de $Fc\epsilon R1\alpha$ em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....120

Figura 17 - Intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica de $Fc\epsilon R1\alpha$ em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha (n=11) e submetidos à imunoterapia específica. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....123

Figura 18 – Quantificação da expressão gênica de $Fc\epsilon R1\gamma$ em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em

relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional (A) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (B).....125

Figura 19 - Intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica de FcεR1γ em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha (n=11) e submetidos à imunoterapia específica. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional (A) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (B).....128

Figura 20 - Efeitos da imunoterapia específica sobre a relação entre FcεR1α e FcεR1γ de granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional ou estimuladas com veneno de abelha (AB).....130

Figura 21 - Quantificação da expressão gênica de CD23 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional (A) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (B).....132

Figura 22 – Análise de CD23 por citometria de fluxo em granulócitos isolados de indivíduos não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Porcentagem de células marcadas. Dados expressos como média ± SEM (A). Histogramas representativos da expressão de

CD23 1 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 18 (e) e 24 (f) meses após início do tratamento (traço verde) em overlay com o período pré-imunoterapia (preto) **(B)**. Intensidade média de fluorescência (IMF). **(C)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$ * $p < 0.05$134

Figura 23 - Dosagem de RANTES em sobrenadantes de culturas de granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; $n=5$) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* ($n=11$) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....136

Figura 24 - Dosagem de IL-8 em sobrenadantes de culturas de granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; $n=5$) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* ($n=11$) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.....138

Figura 25 - Análise semi-quantitativa da expressão gênica de BID. Granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; $n=5$) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* ($n=11$) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de

72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB)
(B).....141

Figura 26 - Análise semi-quantitativa da expressão gênica de Bcl-2. Granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB)
(B).....143

Figura 27 -Quantificação de granulócitos apoptóticos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72 h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB)
(B).....145

Figura 28 - Efeitos da imunoterapia sobre granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha.....171

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo dos grânulos de neutrófilos.....	37
Tabela 2 - Caracterização dos pacientes utilizados no estudo, alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica no Ambulatório de Imunologia e Reações Adversas a Venenos de Inseto do Hospital das Clínicas da Unicamp....	71
Tabela 3 – Caracterização dos voluntários sadios, não alérgicos, utilizados como controle no estudo.....	72
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR.....	81
Tabela 5 – <i>Primers</i> para PCR em tempo real.....	86



RESUMO

As reações alérgicas à ferroada de inseto resultam de resposta exacerbada do sistema imune, com produção de elevados níveis de anticorpos IgE alérgeno-específicos e padrão de citocinas Th2, envolvidas na diferenciação de linfócitos B específicos para aquele antígeno em células produtoras de IgE e recrutamento de células efectoras da resposta alérgica. Neste contexto, granulócitos são células efectoras importantes na fase tardia da resposta alérgica e estão envolvidos na patogênese de diferentes doenças. Eosinófilos e neutrófilos, especificamente, modulam a resposta imune por meio de diferentes mecanismos, como a secreção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. A IgE desempenha papel central na patogênese das doenças alérgicas, interagindo com dois receptores de membranas: alta afinidade $Fc\epsilon RI$ e baixa afinidade $Fc\epsilon RII$ (CD23). A ligação da IgE ao seu receptor em mastócitos e basófilos promove a liberação de mediadores inflamatórios, dentre eles, a histamina. A histamina além de induzir os sintomas agudos da reação alérgica, sustenta a reação inflamatória até a fase crônica, sendo estes efeitos mediados através da ativação de diferentes receptores (H1, H2, H3 e H4). Os fatores liberadores de histamina (HRF), particularmente, HRF-dependentes de IgE, induzem a liberação de histamina na fase tardia da resposta alérgica, permitindo a perpetuação dos eventos inflamatórios crônicos. Muitos estudos demonstram a eficácia da imunoterapia específica na dessensibilização e no desenvolvimento de tolerância em indivíduos com quadros graves de hipersensibilidade à ferroada de insetos, sobretudo da classe Hymenoptera. Com base nestas informações, foram objetivos do presente trabalho avaliar os efeitos modulatórios da imunoterapia sobre a expressão gênica dos receptores de histamina (H1, H2 e H4), HRF- IgE dependente e de fatores apoptóticos (Bcl-2 e BID) por RT-PCR, além da expressão gênica, através da técnica de PCR em tempo real de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de granulócitos como PU.1, C/EBP α , C/EBP β e GATA-1, receptores de alta ($Fc\epsilon RI\alpha$ e $Fc\epsilon RI\gamma$) e baixa afinidade de IgE (CD23), cuja detecção protéica foi realizada por imunofluorescência e citometria de fluxo, respectivamente. Além disso, foram avaliados os níveis séricos de IgE específica, secreção de RANTES e IL-8 nos

sobrenadantes das culturas celulares e quantificação de granulócitos apoptóticos através da técnica de TUNEL. Os granulócitos foram isolados de pacientes submetidos à imunoterapia específica ao veneno de abelha, em diferentes períodos do tratamento (Pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses), após injeção subcutânea, e submetidas à cultura por 72 horas, com estímulo de 1 ng/mL veneno de abelha. Indivíduos não alérgicos foram estudados como grupo controle. De maneira geral, a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de modular os elementos analisados, reduzindo significativamente a expressão dos mesmos ao final de 24 meses de tratamento. Não verificamos, apenas, modulação no número de granulócitos apoptóticos ao longo da imunoterapia. Nossos resultados inéditos fornecem informações adicionais sobre os efeitos da imunoterapia sobre granulócitos, reforçando as propriedades supressoras e tolerogênicas desta forma de tratamento.



ABSTRACT

Allergic reactions to insect stings results from a exacerbated response of the immune system, resulting in the production of high levels of allergen-specific IgE antibodies and Th2 cytokine pattern, which are involved in the differentiation process of B lymphocytes, specific for that antigen, into IgE producing cells and the recruitment of effector cells of allergic response. Eosinophils and neutrophils, specifically, modulate the immune response through different mechanisms, such as the secretion of cytokines, chemokines and lipid mediators. IgE plays a central role on allergic diseases pathogenesis, interacting with two membrane receptors: high affinity FcεRI and low affinity FcεRII (CD23). Binding of IgE with receptors on mast cells and eosinophils promotes the release of inflammatory mediators, among them, histamine. Histamine, besides inducing acute symptoms of allergic reaction, supports inflammatory response until its chronic stage; these effects are mediated through the activation of distinct receptors (H1, H2, H3 and H4). Histamine releasing factors (HRF), particularly, IgE dependent HRF, induce histamine release during the late phase of allergic response, allowing the perpetuation of chronic inflammatory events. In this context, many studies have demonstrated the efficacy of specific immunotherapy on desensitization and tolerance development in subjects with severe hypersensitivity to insect stings, especially Hymenoptera. Based on all these information, the aim of the present study were to evaluate the modulating effects of immunotherapy on gene expression of histamine receptors (H1, H2 and H4), IgE dependent HRF and apoptotic factors (Bcl-2 and BID), through RT-PCR; in addition to gene expression, through real time PCR, transcriptional factors involved at granulocytes differentiation as of PU.1, C/EBPα, C/EBPβ and GATA-1, and protein expression of high (FcεRIα e FcεRIγ) and low affinity (CD23) IgE receptors, assessed by immunofluorescence and flow cytometry, respectively. Serum levels of specific IgE were also assessed, along with RANTES and IL-8 secretion in cell culture supernatant and quantification of apoptotic granulocytes through TUNEL technique. Granulocytes were isolated from patients undergoing bee venom specific immunotherapy in different periods of treatment (Pre, 1, 3, 6, 12, 18 and 24 months), after

subcutaneous injection, and cultured for 72 hours, with bee venom 1ng/mL. Non allergic subjects were studied as control group. Overall, bee venom specific immunotherapy was able to modulate the analyzed elements, significantly reducing their expression at the end of 24 months of treatment. Modulation on the number of apoptotic granulocytes were not observed during immunotherapy. Our results provide additional information about the effects of immunotherapy over granulocytes, reinforcing the suppressor and tolerogenic properties of this treatment.



1 - INTRODUÇÃO

1.1. Resposta Alérgica

A fisiopatologia da resposta alérgica é complexa e influenciada por diferentes fatores, incluindo susceptibilidade genética, rota de exposição, dose do alérgeno e, em alguns casos, características estruturais do alérgeno [1]. A resposta imune alérgica requer sensibilização e o desenvolvimento de uma resposta imune específica contra um alérgeno. Durante a fase de sensibilização, o alérgeno estimula a diferenciação de linfócitos CD4⁺ para linfócitos efetores Th2, com subsequente produção de citocinas Th2, como a interleucina 3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF). Estas citocinas estão envolvidas na diferenciação de linfócitos B específicos para aquele antígeno em células produtoras de IgE (IL-4 e IL-13), recrutamento de mastócitos (IL-4, IL-9 e IL-13) e maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF), que são as principais células efectoras da resposta alérgica; além de produção de muco e ativação de células endoteliais para a migração de linfócitos Th2 e eosinófilos para os tecidos [2, 3].

A IgE produzida sensibiliza mastócitos e basófilos ligando-se a receptores Fc específicos para IgE expressos na superfície destas células. Exposições subsequentes ao alérgeno ocasionam o recrutamento e ativação de células inflamatórias, bem como a liberação de mediadores farmacológicos, que caracterizam as fases imediata e tardia das respostas alérgicas. Na fase imediata da resposta alérgica, dentro de poucos minutos após o contato com o alérgeno, os mastócitos IgE-sensibilizados degranulam, liberando mediadores pré-formados como a histamina, leucotrienos e citocinas, que promovem

permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e produção de muco. Os mastócitos também secretam quimiocinas, que direcionam o recrutamento de células inflamatórias que contribuem para o estabelecimento da fase tardia da resposta alérgica, caracterizada pela infiltração de eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos Th2 e neutrófilos [4, 5] (Figura 1, página 33).

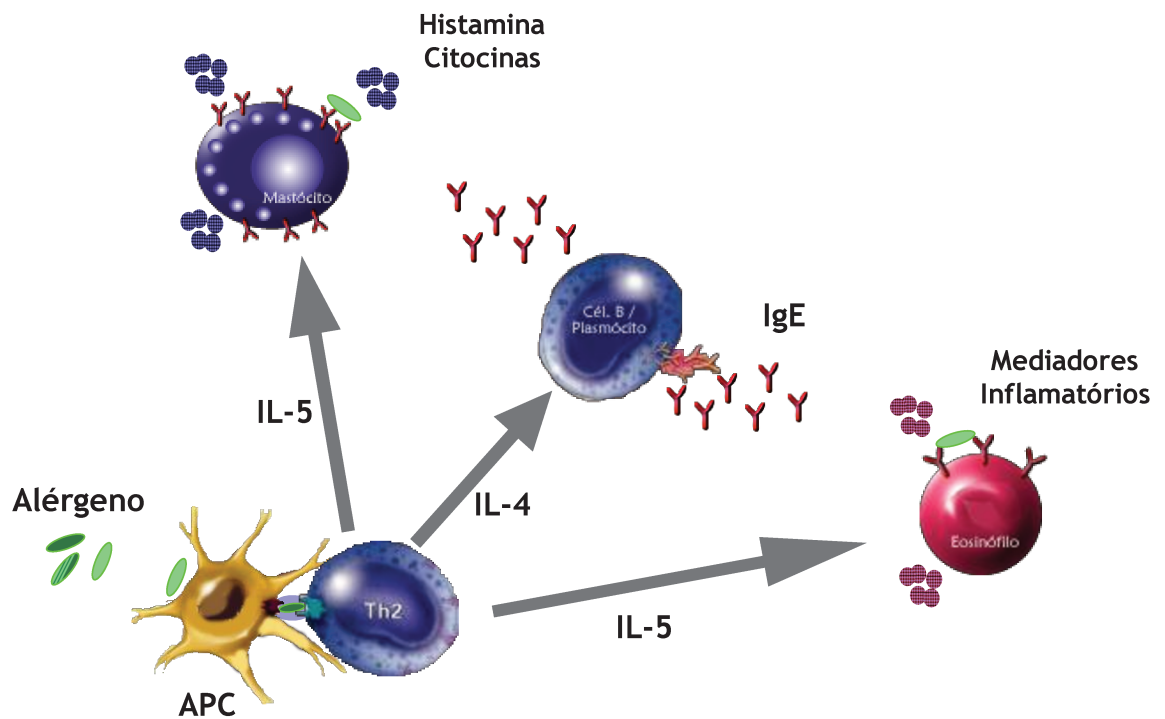


Figura 1 - Apresentação do alérgeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), favorecendo a diferenciação e ativação dos linfócitos Th2. A produção de citocinas por estas células induz a produção de anticorpos IgE alérgeno-específicos pelos linfócitos B e recrutamento e ativação de células efetoras como mastócitos e eosinófilos, que por sua vez secretam uma série de citocinas e mediadores inflamatórios, sendo o principal deles a histamina.

1.2. Granulócitos

1.2.1. Eosinófilos

Eosinófilos são leucócitos multifuncionais implicados na patogênese de numerosos processos inflamatórios, incluindo infecções por helmintos e doenças alérgicas [6, 7]. Em resposta a diferentes estímulos, eosinófilos são recrutados da circulação para o local inflamatório, onde modulam a resposta imune por meio de diferentes mecanismos. Respostas desencadeadas pela ativação de receptores para citocinas, imunoglobulinas e complemento podem levar à secreção de um arranjo de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e TGF-transforming growth factor - α/β), quimiocinas (RANTES e eotaxina-1) e mediadores lipídicos (PAF- fator ativados de plaquetas e leucotrieno C4) [8]. Estas moléculas possuem efeitos pró-inflamatórios, incluindo a regulação positiva de sistemas de adesão, migração celular, permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição da musculatura lisa.

Eosinófilos podem ainda atuar como células efetoras principais induzindo dano tecidual devido à ação de seus grânulos citotóxicos: proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) [9]. MBP, EPO e ECP são tóxicos a uma grande variedade de tecidos, incluindo coração, cérebro e epitélio brônquico [10-12]. MBP altera diretamente a contração muscular e induz a degranulação de mastócitos e basófilos [13-16]. ECP e EDN são ribonucleases com atividade antiviral. Particularmente, ECP promove a formação de poros íons-seletivos nas membranas de células-alvo, facilitando a entrada de outras moléculas citotóxicas

[9, 17-19]. EPO, que constitui aproximadamente 25% da massa de proteínas dos grânulos eosinofílicos específicos, catalisa a oxidação de pseudohalides (tiocianato – SCN⁻), halides (cloreto – Cl⁻), brometo (Br⁻), iodetos (I⁻) e óxido nítrico para formar espécies reativas de oxigênio e metabólitos reativos de nitrogênio. Estas moléculas oxidam alvos protéicos, promovendo estresse oxidativo e subsequente morte celular por apoptose e necrose [20-22].

Eosinófilos são produzidos na medula óssea a partir de células pluripotentes, que primeiramente se diferenciam em um precursor híbrido que compartilha propriedades de basófilos e eosinófilos para então desenvolver uma linhagem eosinofílica. A especificação desta linhagem eosinofílica envolve ao menos três fatores de transcrição, incluindo GATA-1 (pertencente à família GATA cujos membros compartilham um domínio conservado do tipo *zinc finger*, o qual apresenta íons de zinco para estabilização estrutural e que se liga ao DNA na sequência consenso WGATAR, (onde W pode ser uma adenina ou timina e R uma adenina ou guanina), PU.1 (membro da família ETS; liga-se a sequência do DNA rica em purina) e C/EBP (CCAAT/*enhancer-binding protein family*; classe de proteínas que foram originariamente identificadas por sua habilidade em ligar-se à sequência de CCAAT do DNA. A proteína intensificadora de ligação a CCAAT típica forma dímeros e consiste de um domínio de ativação, uma região básica de ligação a DNA, e um domínio de dimerização rico em leucina). Dentre estes fatores de transcrição, GATA-1 é o fator regulador essencial para o desenvolvimento de eosinófilos já que promove seu comprometimento de células progenitoras mielóides e permite a diferenciação terminal em eosinófilos [23, 24].

1.2.2. Neutrófilos

Neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares circulantes mais abundantes em humanos e possuem papel fundamental na resposta imune inata. São recrutados rapidamente ao local inflamatório, onde sua função primordial é eliminar bactérias invasoras e algumas espécies de fungos através de fagocitose, liberação de enzimas e proteínas granulares pré-formadas e pela produção de espécies reativas intermediárias de oxigênio (ROIs). Entretanto, a grande capacidade destrutiva destas células também aumenta potencialmente os danos a tecidos saudáveis, que ocorre em muitas doenças inflamatórias, como por exemplo, artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais [25].

Grande parte das funções exercidas pelos neutrófilos, como por exemplo, adesão e fagocitose, requerem a mobilização de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias, que contêm proteínas microbidas, enzimas, componentes e espécies reativas de oxigênio e diversos receptores ligados à membrana [26]. Especificamente, neutrófilos apresentam quatro tipos de grânulos denominados, azurofílicos ou primários, específicos ou secundários, grânulos de gelatinase e vesículas secretórias (Tabela 1, página 37).

Tabela 1 – Conteúdo dos grânulos de neutrófilos

Grânulos	Componentes	Função
Azurofílicos	Mieloperoxidase (MPO); proteases serinas ;proteínas microbidas	Fagocitose
Específicos	Catelicidinas	Atividade antimicrobiana (fusão com fagossomo ou exocitose)
Gelatinase	Enzimas específicas à matriz e receptores de membrana	Transmigração
Vesículas secretórias	CD11b/CD18; receptor I de complemento; receptor CD14; receptor CD16; leucolisina	Resposta inflamatória mediada por neutrófilos

Neutrófilos se diferenciam a partir de precursores mielóides (mieloblastos - MBs) em um processo denominado granulopoiese, que compreende os estágios de promielócito (PMs), quando grânulos primários tornam-se aparentes, mielócito (MCs), quando não há mais divisão celular e os grânulos secundários ou específicos começam a aparecer, metamielócito (MMs), células em banda (BCs) e finalmente neutrófilo maduro, com núcleo trilobulado e grânulos terciários [27]. Este processo garante a produção contínua de um grande número de neutrófilos maduros a partir de um pequeno número de células progenitoras hematopoiéticas [28].

A granulopoiese é um processo complexo regulado por diversas citocinas e fatores de transcrição mielóides intrínsecos. Borregaard e colaboradores (2003) [26] investigaram a distribuição dos fatores de transcrição mielóides durante a granulopoiese em três populações de neutrófilos humanos da medula óssea: células imaturas (MBs e PMs); células intermediárias (MCs e MMs); células neutrofílicas maduras (BCs) e neutrófilos segmentados (SCs). A expressão de GATA-1 e C/EBP γ foi verificada primariamente no estágio MBs/PMs e uma baixa expressão foi encontrada em células mais maduras. Os níveis de C/EBP α foram constantes em células derivadas da medula óssea; entretanto sua expressão é reduzida em células mais maduras. A expressão de C/EBP β , C/EBP δ e PU.1 foi observada no estágio MC/MM, alcançando seu pico máximo em células mais maduras (Figura 2, página 40).

O principal regulador fisiológico da granulopoiese é o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) cujos efeitos incluem o comprometimento de células progenitoras para linhagem mielóide, proliferação de precursores granulocíticos e liberação de células maduras da medula óssea [25].

Achados recentes demonstram que linfócitos Th17 amplificam a resposta de neutrófilos contra patógenos [29]. Além disso, IL-17, citocina secretada por linfócitos Th17, pode induzir mediadores que promovem a granulopoiese, proliferação e acúmulo de neutrófilos. Outras citocinas derivadas de células Th17, como IL-17, IL-8, IFN- γ , TNF e GM-CSF, favorecem o recrutamento, ativação e sobrevivência prolongada de neutrófilos no local inflamatório [30].

Neutrófilos produzem grandes quantidades de LTB₄, potente quimioatrativo para outros neutrófilos, eosinófilos, monócitos e fibroblastos [31]. LTB₄ também ativa o fator nuclear (NF) κ B [32], promove a síntese de IL-5, IL-6 e IL-8 [33] e aumenta a síntese de IgE [34]. Além disso, neutrófilos ativados são as principais fontes de PAF, que juntamente com a histamina, desempenha papel central nas reações anafiláticas [35, 36].

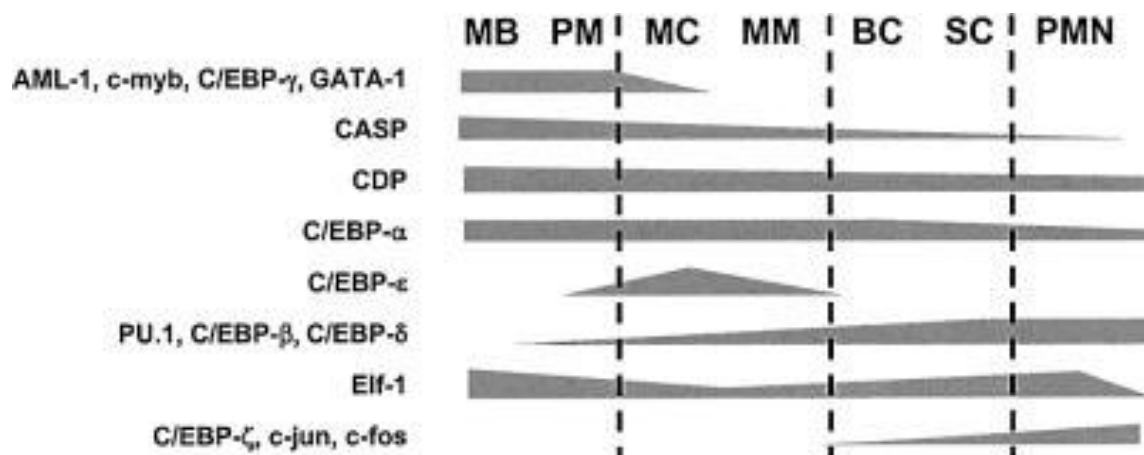


Figura 2 – Esquema dos fatores de transcrição envolvidos na granulopoiese de neutrófilos. Adaptado de Borregaard *et al*, 2003.

1.2.3. Basófilos

Basófilos são os granulócitos com menor abundância na população, abrangendo menos de 1% dos leucócitos presentes no sangue e baço. Embora originalmente descritos por Paul Erlich, em 1879, suas funções efetoras foram elucidadas somente um século após sua descoberta.

Assim, como mastócitos, basófilos podem produzir quantidades abundantes de mediadores secretados que contribuem para as reações de hipersensibilidade imediata. As respostas de basófilos, em humanos, são primariamente associadas com desordens alérgicas [37].

Basófilos se desenvolvem a partir de células progenitoras hematopoiéticas, na medula óssea. Entretanto, a caracterização dos eventos moleculares e das vias de sinalização que determinam o comprometimento da linhagem de basófilos permanece incompleta. Sabe-se que basófilos desenvolvem-se a partir de um precursor granulócito-monócito comum na medula óssea, com capacidade para se desenvolver em precursor eosinofílico (EoP), precursor basófilo-mastócito (BMCP), precursor de mastócito (MCP) e precursor de basófilo (BaP), *in vitro* [38]. Embora, o comprometimento de BaPs e BMCPs para basófilos maduros não seja totalmente compreendido, a expressão dos fatores de transcrição GATA-2 e C/EBP α parece ser um ponto crítico para o desenvolvimento destas células [39]. Adicionalmente à expressão dos fatores de transcrição, eosinófilos, mastócitos e basófilos expressam RNAm de IL-4 e IL-3 durante o processo de maturação. Entretanto o estágio do desenvolvimento em que isto ocorre, e os estímulos e vias de sinalização que regulam esta expressão, ainda não foram determinados [40].

Basófilos podem ser ativados por uma grande variedade de sinais, incluindo citocinas (IL-3, IL-18 e IL-33), imunoglobulinas (IgE, IgG1 e IgD) proteases, ligantes de receptores do tipo toll-like (TLR; TLR2) e fatores do sistema complemento (C5a) [41].

IL-3 é capaz de assegurar *in vitro* a expansão de basófilos maduros de células precursoras na medula óssea e, a administração de IL-3 *in vivo* induz a geração de basófilos em camundongos [42, 43]. Além disso, IL-3 pode aumentar a liberação de mediadores e outras funções efetoras das populações de basófilos; IL-3 aumenta a produção de IL-4 e IL-13 por basófilos em resposta à ativação mediada por IgE [44]. Coletivamente, estes dados suportam a hipótese de que as respostas de basófilos são dependentes da sinalização IL-3 – IL-3R. Entretanto, o desenvolvimento de basófilos é normal na ausência de sinalização IL-3 – IL-3R, sugerindo que outras citocinas ou fatores de crescimento podem ser capazes de regular o desenvolvimento e as funções dos basófilos [42]. Adicionalmente à IL-3, os membros da família IL-1, IL-18 e IL-33, também podem ativar basófilos. IL-18 é produzida por macrófagos e mastócitos e está associada com doenças alérgicas e imunidade contra parasitas [45, 46]. Consistente com seu papel na imunidade mediada por citocinas Th2 e inflamação, a administração de IL-18 a camundongos aumentou a produção de IL-4 e histamina em basófilos [47]. A IL-33 é expressa por fibroblastos dérmicos, células epiteliais das vias aéreas e células de músculo liso nos brônquios e está associada com a produção de IL-4, IL-13 e produção de IgE [48]. A sinalização de IL-33 pode aumentar a produção de IL-4 e IL-13 em basófilos derivados da medula óssea em camundongos. A IL-33 também pode

induzir a produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 em basófilos periféricos humanos [49]. Coletivamente, estes dados demonstram que IL-18 e IL-33 podem ativar diretamente ou induzir a ativação de basófilos [50].

Alguns estudos têm demonstrado a expressão de TLRs em populações de basófilos humanos, incluindo TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9 [51, 52]. Estes dados sugerem que basófilos são capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) expressos por diferentes patógenos. Entretanto, somente ligantes TLR2 são capazes de ativar basófilos, induzindo a produção de IL-4 e IL-13 [51]. Em adição aos TLRs, basófilos humanos também expressam receptores para complemento. Siraganian e colaboradores (1979) [53] demonstraram que basófilos humanos produzem histamina em resposta ao componente C5a de maneira independente de IgE. Estes dados ilustram os mecanismos inatos de ativação de basófilos.

1.3. Histamina

A histamina, identificada como mediador biológico no início de 1900 [54], é uma amina de baixa massa molecular sintetizada a partir da L-histidina, em uma reação de descarboxilação catalisada pela enzima histidina descarboxilase (HDC). É metabolizada pelas enzimas histamina N-metiltransferase e diamina oxidase. A atividade da HDC e, portanto, a produção de histamina é modulada por citocinas como IL-1, IL-13, IL-12, IL-18 e TNF- α . Ela é produzida por muitas células, como neurônios do sistema nervoso central, células da mucosa gástrica,

mastócitos, basófilos e linfócitos. A histamina está envolvida em diversas funções fisiológicas como a proliferação e diferenciação celular, hematopoiese, desenvolvimento embrionário e regeneração. No sistema nervoso central, a histamina afeta as funções de cognição e memória, regulação do ciclo do sono e vigília e homeostasia endócrina. É fundamental ainda para a secreção do suco gástrico, atuando nas células parietais do estômago, nas quais o estímulo de ATPases leva à secreção de íons hidrogênio e à subsequente acidificação para auxiliar no processo de digestão [55].

A histamina desempenha papel importante nas patologias alérgicas devido à sua rápida ação no endotélio vascular e células dos brônquios e músculo liso, levando ao desenvolvimento de sintomas como rinite aguda, broncoconstrição, dentre outros. É, portanto, um dos principais mediadores na resposta inflamatória [56].

Mastócitos e basófilos são as fontes de histamina estocada mais importantes. Nessas células a histamina sintetizada é estocada em grânulos associada à proteoglicanos aniônicos e moléculas de condroitina sulfato. Durante o processo inflamatório essas células degranulam, isto é, liberam a histamina e os outros mediadores estocados, promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e broncoconstrição. Estes efeitos contribuem para o desenvolvimento dos sintomas agudos das reações alérgicas[54].

Além de sua participação na fase aguda, a histamina participa na progressão da resposta alérgica e inflamatória através do aumento da secreção

de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, RANTES e IL-8 em diversos tipos celulares e tecidos[55].

1.4. Fatores de Liberação de Histamina

Os fatores de liberação de histamina (HRFs) pertencem ao grupo de fatores que liberam histamina e outros mediadores de mastócitos e basófilos, estando, dessa forma, envolvidos na patogênese de doenças alérgicas. É um termo coletivo utilizado para caracterizar um grupo heterogêneo de fatores com diferentes modos de ação [57].

1.4.1. HRFs IgE-dependentes

Os Fatores de Liberação de Histamina dependentes de IgE, por definição, requerem a presença de IgE para induzir a liberação de histamina, porém, apenas alguns tipos de IgE, denominadas IgE⁺, exercem essa função [57]. Estes fatores são produzidos por diferentes tipos celulares, como macrófagos, células mononucleares e plaquetas, e apresentam identidade com a proteína p23, inicialmente isolada de células tumorais [58]. A liberação de histamina por HRFs pertencentes a esta categoria é mais lenta e, por isso, acredita-se que os mesmos estejam envolvidos na reação alérgica de fase tardia. Além disso, estimulam a produção de IL-4 e IL-13 pelos basófilos. Alguns dados sugerem que os HRFs pertencentes a este grupo possuem via de sinalização particular, ligando-se a um receptor específico, que difere daquele para a IgE [57].

1.4.2. HRFs IgE-independentes

O grupo dos HRF-IgE independentes é formado principalmente pelas quimiocinas, das quais a família de proteínas quimiotáticas para monócitos (MCP) correspondem aos liberadores de histamina mais potentes deste grupo. Outras quimiocinas como RANTES, MIP-1 α (proteína 1 α inflamatória de macrófagos) e eotaxina também agem como HRF IgE independente, porém, de maneira menos potente que a família MCP. A liberação de histamina estimulada por esses HRFs é extremamente rápida [57].

1.5. Receptores de Histamina

Uma vez liberada, a histamina exerce seus efeitos através da interação com diferentes receptores celulares, induzindo respostas distintas dependendo do receptor ativado. Existem quatro receptores de membrana para a histamina, H1, H2, H3 e H4, todos compostos por sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G [59]. Com exceção de alguns resíduos envolvidos na ativação e na ligação com a histamina, os receptores apresentam baixa homologia de sequência, atingindo apenas 16 a 35% de homologia na molécula de proteína [54].

1.5.1. H1

O receptor 1 (H1) é expresso em muitos tipos celulares, incluindo células endoteliais, células dendríticas, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T e B e células do músculo liso. Através deste receptor a histamina exerce seus efeitos

de vasodilatação e broncoconstrição [54]. A expressão de H1 é observada ainda em células do sistema nervoso, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B e T [56]. A ativação de H1 leva à mobilização de íons cálcio no interior das células, fosforilação da proteína quinase C, levando à formação de mediadores como diacilglicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP3), e ativação de ERK e NF- κ B [60].

Grande parte dos efeitos estimulatórios da histamina é exercida via ativação de H1, o que induz diferentes respostas nas células endoteliais vasculares, incluindo modificações na permeabilidade vascular como resultado da contração celular, síntese de prostaciclina, fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico [61, 62]. Além disso, H1 está envolvido em diferentes processos patológicos, incluindo rinite alérgica, dermatite atópica, conjuntivites, urticária asma e anafilaxia [63].

A ativação de H1 aumenta, ainda, a capacidade de apresentação de antígeno e de ligação com células T, em células dendríticas, envolvidas na imunidade celular, favorecendo, desta maneira, a proliferação de linfócitos Th1 e subsequente produção de citocinas por estas células [63].

1.5.2. H2

O receptor 2 de histamina (H2) é expresso em células do sistema nervoso, musculatura lisa, hepatócitos, condrócitos, células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B e T. O H2 é encontrado ainda nas células parietais do estômago; onde a histamina estimula a liberação do

suco gástrico [54]. A ativação de H2 promove o acúmulo de cAMP na célula por meio da ativação da enzima adenilato ciclase, inibição da síntese de IL-12 e ativação de c-Fos e c-Jun [55, 60].

A ativação de H2 pode inibir uma grande variedade de funções dentro do sistema imune. Este receptor regula negativamente a liberação de histamina de basófilos e mastócitos. Além disso, a estimulação de H2 leva à secreção de IL-10 por células dendríticas e linfócitos T, representando um dos mecanismos de regulação exercido pela histamina no controle da reação inflamatória. Pode-se observar também diminuição na produção de imunoglobulinas, proliferação de linfócitos T e secreção de citocinas [64].

1.5.3. H3

O receptor 3 de histamina, H3, é encontrado em neurônios histaminérgicos, eosinófilos, células dendríticas e monócitos. A ativação deste receptor leva ao acúmulo de cálcio intracelular e inibição de cAMP. O principal efeito exercido pela histamina através do H3 é atuar como neurotransmissor. Está envolvido nos processos cognitivos, ciclo de sono-vigília e barreira hematoencefálica agindo, portanto, na neuroinflamação [54].

1.5.4. H4

O receptor 4 da histamina (H4) é expresso em níveis elevados em células hematopoiéticas, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos T, basófilos e mastócitos. Ele pode se encontrado ainda, em menor abundância, em

hepatócitos, células do timo, pulmão, intestino delgado, cólon e coração [65]. A ativação deste receptor pela histamina leva ao aumento de cálcio intracelular e inibição da sinalização de cAMP. Por intermédio do H4, a histamina estimula a quimiotaxia de mastócitos, eosinófilos e células dendríticas [54]. O receptor 4 está envolvido também na transdução de sinal e na diferenciação de células Th2. Horr e colaboradores mostraram possível papel na modulação da sinalização da via STAT. Utilizando um antagonista de H4, os pesquisadores observaram ativação desta via em indivíduos não atópicos; ou seja, a ligação da histamina com H4 inibe a sinalização de STAT-1 α e conseqüentemente a produção de citocinas como IFN- γ [66]. Por outro lado, em indivíduos atópicos a ligação do H4 com a histamina, leva à inibição de STAT-6 [67]. Camundongos submetidos ao silenciamento gênico de H4 ou à administração de antagonistas específicos para este receptor apresentam diminuição da resposta inflamatória e dos níveis de citocinas Th2 [54, 67].

Além disso, o H4 parece desempenhar papel anti-inflamatório sendo capaz de inibir a secreção de CCL2 por monócitos, quimiocina envolvida na migração de granulócitos e leucócitos na presença de micro-ambiente Th2 [68]. Morgan e colaboradores, utilizando modelo de asma em camundongos, mostraram que a histamina é capaz de induzir migração de leucócitos por meio de H1 e H4, mas não H2. Entretanto, diferentes subpopulações celulares respondem a este estímulo: o H1 induz preferencialmente migração de linfócitos Th2, enquanto o H4 estimula o recrutamento de células T reguladoras [69].

1.6. Receptores de IgE

A imunoglobulina E, IgE, desempenha papel central nas reações de hipersensibilidade. A ligação do complexo IgE-alérgeno aos seus receptores inicia as respostas imunes e inflamatórias. Existem dois receptores para IgE: receptor de alta afinidade, também conhecido como FcεRI, e o receptor de baixa afinidade, FcεRII ou CD23 [70].

1.6.1. Receptor de alta afinidade - FcεRI

O receptor de alta afinidade pode ser encontrado na forma tetramérica, formado por uma cadeia α , uma cadeia β e duas cadeias γ ($\alpha\beta\gamma_2$) em mastócitos e basófilos humanos e em células de camundongos; ou na forma de trímero, composto apenas por uma cadeia α e duas γ ($\alpha\gamma_2$). Esta forma trimérica é encontrada apenas em células humanas, como monócitos, eosinófilos, plaquetas, células apresentadoras de antígeno (APCs), células musculares lisas, dentre outras [71].

A cadeia α possui dois domínios extracelulares responsáveis pela ligação com a IgE. Pertencente à superfamília das imunoglobulinas, apresenta porção intracelular curta e não desempenha nenhuma função de sinalização. A molécula de FcεRI utiliza dois domínios assimétricos para ligação com o fragmento dimérico e simétrico da IgE, o que permite uma relação estequiométrica de 1:1 entre ligante (IgE) e receptor (FcεRI) [72].

A alta afinidade do FcεRI é resultado da baixa taxa de dissociação entre IgE e receptor, que é conseguida pela capacidade apresentada por cada sítio de ligação para IgE do receptor que se encontra dissociado, em se ligar novamente à IgE, quando o outro domínio de ligação está associado [72].

A presença dos motivos de ativação de imunorreceptores baseados em tirosina (ITAMs) nas porções intracelulares das cadeias β e γ permite a interação destas com moléculas envolvidas na sinalização intracelular. A cadeia γ é, de fato, a subunidade indispensável para sinalização, enquanto a cadeia β , em humanos, atua como amplificadora do sinal. Após a ativação do receptor e fosforilação das tirosinas dos ITAMs, uma cascata de moléculas é ativada na célula: a cadeia β ativa Lyn e Fyn, e a cadeia γ recruta Syk. A indução destas vias de sinalização irá promover a ativação da fosfolipase C, com consequente produção de diacilglicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP3), levando à mobilização do cálcio intracelular [72, 73].

A expressão da cadeia β é indispensável para a expressão do receptor em camundongos, mas não em humanos [72]. A cadeia β pode gerar outra molécula por *splincing* alternativo, chamada de FcεRI β T. Quando esta molécula se associa à cadeia β , promove degradação do complexo via proteassomo [74].

A ligação da IgE ao receptor promove a associação deste com os chamados bolsões de lipídeos (*lipid rafts*), regiões da membrana citoplasmática ricas em colesterol e às quais se encontram associadas grande parte das moléculas de sinalização intracelular. De acordo com este modelo, os receptores

de alta afinidade de IgE estão fora desta região, nas células em repouso. Após a ativação e agregação dos receptores, os mesmos são translocados para os bolsões de lipídeos, aproximando-se então das moléculas de sinalização e iniciando a cascata de ativação celular [74].

1.6.2. Receptor de baixa afinidade - FcεRII ou CD23

O receptor de baixa afinidade FcεRII ou CD23 é uma proteína transmembrana do tipo II com três domínios de lectina cálcio-dependente em sua região C-terminal extracelular. É encontrado em linfócitos B, monócitos e macrófagos, eosinófilos, plaquetas, células de Langerhan's epidermais, células dendríticas foliculares e células musculares lisas das vias respiratórias [70].

Algumas regiões da molécula deste receptor podem sofrer proteólise resultando na liberação de fragmentos solúveis (sCD23), cujas atividades dependerão do estado oligomérico. A principal protease endógena responsável pela clivagem do CD23 é a ADAM10 (desintegrina e metaloprotease 10), gerando fragmentos pequenos de diversos pesos moleculares [70]. O sCD23, além de participar na regulação de síntese de IgE [75], está envolvido na manifestação de doenças alérgicas, visto que, níveis elevados de sCD23 têm sido encontrados em pacientes atópicos [76]. Outros estudos indicam que, ao menos em humanos, sCD23 possui propriedades semelhantes à citocinas. Além disso, juntamente com IL-1, sCD23 pode favorecer o crescimento de precursores mielóides e de linfócitos T [77].

A cadeia intracelular do CD23 pode apresentar variação de resíduos de aminoácidos, formando duas classes de moléculas: CD23a e CD23b. O Cd23a é expresso em linfócitos B ativados antes da diferenciação em plasmócitos, isto é, células secretoras de anticorpos; já o CD23b tem sua expressão induzida por IL-4 e é encontrado em uma variedade de células inflamatórias, células B e células epiteliais [71].

O CD23 participa de diferentes eventos imunológicos: estimula a apresentação de antígenos, ativa as células apresentadoras de antígeno, estimula a diferenciação e crescimento celular e regula a síntese de IgE [70]. Além da IgE, uma outra molécula chamada de CD21 pode se ligar ao CD23, com interação mediada por carboidratos. O CD21, principal receptor de fragmentos de C3d do sistema complemento, é encontrado em linfócitos B, células dendríticas foliculares, linfócitos T ativados e basófilos. A ligação do CD23 ao CD21 está envolvida na regulação da síntese de IgE. [71].

1.7. Hipersensibilidade a veneno de Himenopteros

Os insetos da ordem Hymenoptera responsáveis pelo desenvolvimento de respostas alérgicas e até mesmo anafilaxia são pertencentes às famílias Apidae (abelhas e mamangavas), Vespidae (vespas) e Formicidae (formigas de fogo ou lavapés) [78].

A família Apidae é composta por diferentes espécies de abelhas e dentre elas, as abelhas do mel (*Apis mellifera*) e mamangavas (gênero *Bombus*). Os

acidentes envolvendo ferroadas de abelha acontecem principalmente na primavera e verão, porém, como a colméia sobrevive durante o inverno, alguns casos podem ocorrer nos dias quentes desta estação [79].

1.7.1. Componentes do veneno de abelha

Os principais componentes do veneno de abelha são fosfolipase A₂ (Api m 1), hialuronidase (Api m 2), fosfatase ácida (Api m 3) e melitina (Api m 4), além do antígeno Api m 6 descrito por Kettner e colaboradores em 2001 [80].

A fosfolipase A₂, uma glicoproteína composta de 134 aminoácidos e com massa molecular de 16 a 20 kDa, é o alérgeno mais importante do veneno e corresponde a 12-15% do peso seco do veneno de *A. mellifera* [81]. A fosfolipase A₂ pertence ao grupo de enzimas esterases que liberam ácido aracdônico dos fosfolípidos de membrana. Este composto ativa vias celulares responsáveis pela produção de mediadores como prostaglandinas, leucotrienos e fatores de ativação plaquetária, desencadeando parte da resposta alérgica frente à inoculação do veneno [82].

A hialuronidase é o segundo alérgeno principal do veneno de abelha, esta enzima apresenta massa molecular de 43 kDa e é responsável por permitir a dispersão dos outros componentes do veneno, devido à sua capacidade de degradar o ácido hialurônico, principal componente da matriz extracelular [82, 83].

A melitina é o composto mais abundante do veneno de abelha, correspondendo a 50% do peso seco, mas apesar disto é pouco alergênica; é composta por 26 aminoácidos e apresenta massa molecular de 3 kDa. A melitina é

capaz de inserir-se entre as camadas de fosfolipídeos da membrana e, portanto, é altamente tóxica para as células, promovendo a lise celular [81].

1.7.2. Epidemiologia

Estima-se que a incidência de reações sistêmicas à picadas de himenópteros na população geral é de 0.8-5% e, para reações locais graves, cerca de 19%. Picadas de himenópteros são as causas mais comuns de anafilaxia em adultos [84].

Testes cutâneos e anticorpos séricos IgE-específicos ao veneno de himenópteros demonstram que cerca de 25% da população geral apresenta sensibilização mediada por IgE [85].

Nos Estados Unidos ocorrem cerca de 40 mortes/ano [86] decorrentes de picadas de abelhas e vespas. Na Europa, este número aumenta para 100 mortes/ano [87]. Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo apontam que entre 1993 e 2005 foram registrados 8376 acidentes causados por abelhas, sendo que 15% das vítimas apresentaram reações moderadas a graves, com 24 óbitos.

1.7.3. Fatores de risco

As reações sistêmicas ao veneno de himenópteros podem ocorrer na população em geral, tanto na zona rural quanto na área urbana. Adultos jovens e do gênero masculino (2 homens:1 mulher) são ferroados mais freqüentemente e por este motivo apresentam risco mais elevado de desenvolver tais reações. Este

risco aumentado também está relacionado com o avanço da idade, devido à presença de comorbidades, principalmente doenças cardiovasculares. Pacientes que fazem uso de betabloqueadores e angiotensina também apresentam maior risco [88].

Pacientes com mastocitose, mesmo não alérgicos, são predispostos a reações graves após ferroada de himenópteros, com comprometimento cardiovascular ou risco de morte [89]. Outro fator de risco para o desenvolvimento de reações alérgicas graves, bem aceito por muitos autores, é a atopia [90]. Golden e colaboradores [91] demonstraram que sensibilização assintomática a aeroalérgenos está associada com sensibilização também assintomática a veneno de insetos, embora o histórico de sintomas alérgicos não esteja associado com o histórico de reações sistêmicas à ferroada de himenópteros [91].

O tipo de inseto envolvido também eleva as chances de reações sistêmicas e, dentro da ordem Hymenoptera, as abelhas são os insetos que provocam as respostas alérgicas de maior gravidade [92].

1.7.4. Manifestação clínica

As reações mais freqüentes ao veneno de himenópteros são reações locais extensas e reações sistêmicas. As reações locais extensas são caracterizadas por uma reação inflamatória cujo diâmetro pode variar de 5 a 10 cm podendo estender-se desde o sítio da ferroada até a articulação adjacente e que pode persistir por 24 horas. Nas reações sistêmicas, podem ser envolvidos os sistemas gastrointestinal, respiratório, cardiovascular e pele [93].

As reações sistêmicas desenvolvidas em resposta à ferroada de inseto são usualmente agrupadas pelas classificações sugeridas por Mueller [94] e Ring e colaboradores [95]. Ambos sugerem quatro graus de gravidade, contudo a classificação de Mueller não prevê que manifestações cutâneas podem estar ausentes e que um choque cardiovascular isolado poderia ser o único sintoma após a ferroada de inseto. Por outro lado, Ring e colaboradores [95] consideram o comprometimento cardiovascular mais importante que os sintomas respiratórios, por isso, sua classificação é embasada na gravidade do comprometimento cardiovascular.

A classificação de Mueller [94] agrupa as reações ao veneno da seguinte forma:

- ❖ Grau I: sintomas como urticária, mal estar e ansiedade
- ❖ Grau II: um dos sintomas anteriores e pelo menos dois sintomas como angioedema, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal e tontura
- ❖ Grau III: um dos sintomas anteriores e pelo menos dois sintomas como dispnéia, espirros, fraqueza, confusão e rouquidão
- ❖ Grau IV: um dos sintomas anteriores e pelo menos dois sintomas como queda de pressão arterial, colapso, perda de consciência, incontinência e cianose.

1.7.5. Diagnóstico

O diagnóstico é baseado no histórico clínico e na pesquisa de anticorpos IgE específicos ao veneno. Utiliza-se comumente o teste cutâneo (prick teste e/ou teste intradérmico) ou testes *in vitro* , após pelo menos 2 semanas após o evento agudo, para reduzir a probabilidade de resultados falso-negativos durante o período refratário. Esses testes não apenas confirmam o diagnóstico, como também identificam o veneno adequado ser utilizado na imunoterapia [83].

A história clínica deve ser valorizada e detalhada quanto a fatores como:

- inseto responsável pelo acidente
- número e localização das ferroadas
- descrição minuciosa dos sintomas apresentados
- qual tratamento medicamentoso administrado imediatamente após a reação
- histórico de ferroadas anteriores e reações desenvolvidas

Os testes cutâneos são realizados através de prick testes ou por testes intradérmicos. Realiza-se, primeiramente o prick teste com diluições crescentes (0.01 – 100 µg/mL) e , caso seja negativo, realiza-se o teste intradérmico, que de acordo com inúmeros estudos possui maior sensibilidade, cerca de 90% maior do que o prick teste para uma concentração de 1µg/mL [96-100]. No serviço ambulatorial do Hospital das Clínicas/UNICAMP realiza-se apenas o teste intradérmico nas concentrações 10n, 100ng e 1 µg/mL. Testes cutâneos positivos

indicam apenas sensibilização prévia, sendo incapaz de predizer se haverá reação na próxima exposição e a possível gravidade da mesma.

Para determinação de anticorpos IgE séricos específicos ao veneno podem ser utilizados testes radioalergosorventes (RAST) e uma variedade de métodos derivados deste teste [101].

Nos primeiros dias após uma ferroadada, a IgE específica ao veneno pode ser muito baixa ou mesmo indetectável; após alguns dias ou mesmo semanas, estes níveis aumentam. Em seguida a esta fase inicial, a IgE declina vagarosamente, com grande variação entre os indivíduos [13, 102]. Em pacientes com IgE específica indetectável, os testes devem ser repetidos após algumas semanas [13]. Não há uma relação muito clara entre a concentração de IgE específica ao veneno e o estado de reatividade de cada paciente [83].

1.8. Imunoterapia específica

O procedimento definido como imunoterapia data do começo do século XX, com a proposta de Noon e Freeman para prevenção da febre do feno com inoculação de *ragweed* (erva daninha do gênero *Ambrosia*) [103]; desde então a imunoterapia passou por inúmeras modificações e avanços. A imunoterapia consiste na administração repetida de alérgenos específicos a pacientes com reações de hipersensibilidade mediada por IgE, com o objetivo de prevenir e minimizar a manifestação de sintomas alérgicos e reações inflamatórias associadas à exposição natural ao alérgeno. Outros termos são utilizados de maneira menos freqüente para se referir à imunoterapia, como hiposensitização ou dessensibilização alérgeno

específica. A imunoterapia na hipersensibilidade à ferroada de inseto possui eficácia elevada e, desta forma, é indicada para o controle das reações graves nestes pacientes [103].

A imunoterapia específica para veneno de Hymenoptera (VIT) é indicada com base no histórico de reação sistêmica grave e confirmação de reação alérgica por meio de testes cutâneos positivos e detecção de IgE específica no soro. A dose de início da imunoterapia deve estar entre 0,001 e 0,1 µg e a dose de manutenção recomendada é de 100 µg de veneno, o que equivale a aproximadamente duas ferroadas de abelha [79].

Existem diferentes protocolos utilizados na imunoterapia, os principais sendo o método convencional, o rápido e o ultra-rápido [104]. Nos protocolos rápido e ultra-rápido, o tempo necessário para atingir a dose de manutenção é de alguns dias ou mesmo horas, respectivamente. Estes protocolos são mais indicados e utilizados em pacientes com alto risco de exposição à ferroada de inseto, como apicultores, a fim de conseguir a proteção para o paciente em menor período de tempo. O protocolo convencional consiste em injeções semanais durante a fase de indução, com concentrações crescentes do veneno; o tratamento segundo este protocolo dura em média 3 anos. O serviço de Imunologia ambulatorial do Hospital das Clínicas/UNICAMP inicia a VIT com 10 ng com concentração progressiva semanal (convencional) até 100ug, período ao redor de 2 a 3 meses (fase de indução).

O tempo de imunoterapia para garantir proteção de longa duração ao paciente é ainda um assunto controverso. Entretanto, alguns fatores de risco que

poderiam facilitar a ocorrência de novas reações sistêmicas foram identificados: tipo de inseto, idade avançada, gravidade das reações antes do tratamento, reações adversas após as injeções da imunoterapia e mastocitose [105].

Apesar de bem estabelecido o fato de a imunoterapia ser o único tratamento eficaz na indução de tolerância à ferroada de inseto, os mecanismos envolvidos na dessensibilização ainda não são completamente compreendidos.

1.8.1. Supressão imediata de basófilos e mastócitos

Uma observação inicial importante logo após as primeiras injeções de imunoterapia é a diminuição significativa na atividade e degranulação de mastócitos e basófilos. Surpreendentemente, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a VIT modifica ou suprime, dentro de poucas horas, as respostas destas células durante a administração repetida de doses crescentes do alérgeno. Embora possam ser similares à rápida dessensibilização a drogas, os mecanismos exatos que levam à minimização dos sintomas alérgicos e reações inflamatórias ainda são desconhecidos [106].

Alguns fatores imunológicos podem contribuir com a supressão de mastócitos e basófilos, como a indução de linfócitos T reguladores (Tregs) alérgeno-específicos e diminuição dos níveis de IgE específica [107].

1.8.2. Indução de linfócitos T reguladores e tolerância periférica

A indução de tolerância periférica de linfócitos T representa um passo essencial na imunoterapia específica. É caracterizada principalmente pela indução

de linfócitos Tregs específicos ao alérgeno que passam a produzir grandes quantidades de IL-10 e TGF- β , citocinas inibitórias [108, 109].

Há duas subclasses de linfócitos Tregs, com fenótipos distintos e diferentes mecanismos de ação: linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺, que ocorrem naturalmente, selecionados no timo e linfócitos T_R1 induzíveis [61]. A principal função destas células é suprimir a ação de linfócitos Th1 e Th2 alérgeno-específicos. Esta função, no entanto, pode ser parcialmente bloqueada pelo uso de anticorpos neutralizantes contra as citocinas IL-10 e TGF- β secretadas ou ligadas à membrana. Em acordo com esta observação, o estudo realizado por Ling e colaboradores (2004) [110] demonstrou que linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺ de pacientes atópicos possuem capacidade reduzida de suprimir a proliferação de linfócitos T CD4⁺CD25⁻.

A IL-10 pode ser produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs), como linfócitos B [111] e células dendríticas [112], bem como linfócitos T_R1 alérgeno-específicos [61]. Esta citocina suprime linfócitos T, bloqueando sinais coestimulatórios como CD2, CD28 e coestimulador induzível (ICOS) em uma rápida cascata de transdução sinal [113]. A IL-10 também exerce efeitos inibitórios em monócitos e macrófagos ativados, suprimindo moléculas coestimulatórias, reduzindo a expressão de moléculas MHC classe II e sua capacidade de apresentação de antígeno [114, 115].

TGF- β é essencial para a manutenção do estado de tolerância imunológica [116]. Esta citocina induz a expressão de FoxP3 estimulando a conversão de linfócitos T naive CD4⁺CD25⁻ para de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ [117]. Além disso,

TGF- β favorece a expansão in vivo e capacidade imunossupressora de células T CD4⁺CD25⁺ [118].

1.8.3. Modulação de IgE e IgG alérgeno-específicas

A tolerância periférica de linfócitos T é rapidamente induzida durante a imunoterapia específica; no entanto, não há evidências para a tolerância de linfócitos B logo após o início do tratamento [119]. A imunoterapia induz um aumento transitório nos níveis séricos de IgE específica ao alérgeno, seguido por uma diminuição gradual nestes níveis após meses ou anos de tratamento [120]. Assim, as modificações nos níveis de IgE não são capazes de explicar a responsividade diminuída ao alérgeno específico devido à imunoterapia, visto que a diminuição da IgE é relativamente tardia e não correlacionada com a melhora clínica após a imunoterapia [106].

Subclasses de anticorpos IgG, especialmente IgG4, são capazes de capturar o alérgeno antes de este atingir a IgE ligada à membrana de células efectoras prevenindo, desta maneira, a ativação de mastócitos e basófilos [79]. A IgG alérgeno-específica pode ser direcionada contra os mesmos epítomos da IgE, resultando em uma competição direta para a ligação do alérgeno com efeitos bloqueadores [106].

É possível que a diminuição na relação IgE/IgG4 durante a imunoterapia específica seja um efeito da predominância de linfócitos Tregs sobre linfócitos Th2. A citocina IL-10 é uma importante supressora de ambas IgE total e específica ao alérgeno e, simultaneamente, estimuladora da produção de IgG4 [121]. Desta

maneira, a IL-10 não somente gera tolerância em linfócitos T, como também regula a formação de um isotipo específico para a formação de um fenótipo não-inflamatório [106].

1.8.4. Supressão de células efectoras

A imunoterapia específica modula eficientemente a ativação de mastócitos e basófilos e diminui a liberação de histamina mediada por IgE [122]. Linfócitos Tregs parecem desempenhar papel importante neste sentido, uma vez que a produção e secreção de IL10 diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias de mastócitos [123]. Adicionalmente, a IL-10 suprime a atividade e função de eosinófilos, bem como a produção de IL-5 por linfócitos Th2 [124].

Durante imunoterapia específica para pólen, ocorre redução nos níveis plasmáticos de proteína catiônica eosinofílica, um importante marcador de ativação de eosinófilos, bem como de fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos correlacionados com diminuição da hiperreatividade brônquica e melhora clínica [125].

A imunoterapia não está associada somente com a redução da resposta imediata a provocação do alérgeno, mas também das reações de fase tardia na mucosa nasal e brônquica ou na pele. Os mecanismos das reações de fase tardia são diferentes das reações imediatas mediadas por mastócitos e envolvem o recrutamento, ativação e persistência de eosinófilos e de células T ativadas nos locais de exposição ao alérgeno [3]. O sucesso da imunoterapia não somente resulta no aumento da concentração necessária do alérgeno para induzir resposta

imediate ou reação de fase tardia no tecido-alvo, mas também resulta em diminuição da resposta a estímulos inespecíficos [106].



2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho apresentou como objetivo avaliar a ação moduladora da imunoterapia específica em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha em diferentes períodos de imunoterapia específica ao veneno.

2.2. Objetivos específicos

A partir de culturas de 72h de granulócitos de sangue periférico de pacientes submetidos à imunoterapia específica com veneno de abelha, foram objetivos específicos:

- 1- Analisar a expressão gênica
 - de receptores de histamina (H1, H2 e H4) e fatores de liberação de histamina (HRF)
 - PU.1, C/EBP α , C/EBP β e GATA-1 fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de neutrófilos e eosinófilos
- 2 - Avaliar a expressão gênica e protéica dos seguintes elementos:
 - cadeias α e γ do receptor de alta afinidade de IgE (Fc ϵ RI)
 - receptor de baixa afinidade de IgE (CD23)
- 3 – Quantificar a secreção de RANTES e IL-8
- 4 - Verificar a expressão gênica de componentes apoptóticos como BCL-2 (fator anti-apoptótico) e BID (fator pró-apoptótico) bem como a quantificação de células apoptóticas por meio da técnica de Tunel
- 5 - Analisar a expressão destes elementos envolvidos na resposta alérgica ao longo do processo de imunoterapia em comparação com a expressão

observada em indivíduos sadios (não alérgicos) verificando a possível modulação da imunoterapia sobre os mesmos.



3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de Estudo

Os indivíduos participantes do estudo eram provenientes da região metropolitana de Campinas, SP. Onze pacientes alérgicos ao veneno de abelha (*A. mellifera*) (Tabela 2, página 71), com histórico de ao menos uma reação sistêmica anafilática de grau III-IV segundo a classificação de Mueller [94], com início de tratamento coincidente foram selecionados para seguimento (estudo longitudinal) dentre 30 pacientes acompanhados no Ambulatório de Imunologia e Reações Adversas a Venenos de Inseto do Hospital das Clínicas da Unicamp. Todos os pacientes foram submetidos à imunoterapia específica conforme as normas estabelecidas pela European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) [126]. Os períodos de tratamento analisados foram: pré-imunoterapia, um mês, três meses, seis meses, 12 meses, 18 e 24 meses após o início do tratamento. Para cada período, as células de onze pacientes foram submetidas à cultura, com amostras em duplicata. Cinco voluntários saudáveis, não alérgicos, foram utilizados como controle (Tabela 3, página 72). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, nº 187/2006 e os pacientes assinaram termo de consentimento pós-informativo.

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes utilizados no estudo, alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica no Ambulatório de Imunologia e Reações Adversas a Venenos de Inseto do Hospital das Clínicas da Unicamp.

Paciente	Sexo	Idade	sIgE (kU/L)
1	M	8	> 100
2	M	13	17,4
3	M	16	> 100
4	M	23	12,38
5	M	32	8,3
6	M	36	21,8
7	M	43	3,6
8	M	45	7,3
9	M	49	24,05
10	M	56	48,64
11	M	60	6,75

sIgE – IgE específica ao veneno de abelha; M-masculino

Tabela 3 – Caracterização dos voluntários sadios, não alérgicos, utilizados como controle no estudo

Voluntário	Sexo	Idade	sIgE (kU/L)
1	M	21	< 0.35
2	M	26	< 0.35
3	F	29	< 0.35
4	M	34	< 0.35
5	F	60	< 0.35

sIgE – IgE específica ao veneno de abelha; M-masculino; F-feminino

3.2. Protocolo de Imunoterapia

Os pacientes foram submetidos à imunoterapia pelo esquema convencional de indução inicial. O protocolo consiste em injeções subcutâneas semanais do preparado de veneno estéril em concentrações crescentes até que seja atingida a concentração de 100 µg do veneno de abelha (dose de manutenção). A dose inicial está definida como 10 ng/mL de veneno aumentando progressivamente até 100µg/mL. Este processo leva entre 2 e 3 meses, com doses semanais (fase de indução) De acordo com orientações das normas internacionalmente estabelecidas, o tempo de tratamento foi definido em 3 anos. No entanto, caso o paciente apresente qualquer reação adversa ao processo de imunoterapia, o tratamento é, então, prolongado por mais dois anos, somando um total de 5 anos [126].

3.3. Procedência e preparo do veneno

O veneno de abelha bruto, *A. mellifera*, era obtido da Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda – CONAP (Minas Gerais, Brasil). A apitoxina bruta era reconstituída na proporção de 1g em 20 mL de água destilada estéril. Após homogeneização, a mistura era deixada em repouso por 16 horas, a 4°C. A preparação de apitoxina era homogeneizada novamente, submetendo-a em seguida à centrifugação a 30.000 x g, por 20 minutos, a 4°C (centrífuga Jouan MR 23i, França). O sobrenadante era então passado por filtro 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, EUA). A concentração de proteínas era determinada por meio do método de Hartree e a apitoxina aliquoteada e armazenada em freezer a -20°C.

Para realização do teste cutâneo, o veneno de abelha era preparado em solução de Coca (0.5% NaCl, 0.275% NaHCO₃) nas seguintes concentrações: 10 ng; 100ng e 1 µg/mL; como controle positivo era utilizado histamina na concentração de 1 mg/mL e como controle negativo, solução de Coca. A dose de manutenção mensal de 100µg era administrada aos pacientes.

3.4. Separação de granulócitos do sangue periférico

O sangue periférico era coletado em tubos com EDTA. Dos indivíduos alérgicos eram coletados 20 mL de sangue, dez minutos após a injeção subcutânea de veneno; dos indivíduos não alérgicos, eram coletados cerca de 40 mL. Os granulócitos eram isolados como previamente descrito [127, 128] e adaptado no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental. Primeiramente, os eritrócitos eram sedimentados através da adição de 1 mL de Dextran 5% em solução fisiológica para cada 5 mL de sangue total. Após 45 minutos, o plasma rico em leucócitos era coletado e as células linfomononucleares, removidas por centrifugação com o mesmo volume de Ficoll (Ficol-PaqueTM Plus, GE Healthcare, Reino Unido). Os granulócitos eram então lavados com meio RPMI e centrifugados por 10 minutos a 300 x g. Em seguida, os eritrócitos residuais eram removidos com solução hipotônica de lise. Após duas lavagens com meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), 2% de Hepes (Hyclone), 0,1% de 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA), 0,2% de fungizol

(Fungizon, Bristol Mayers Squibb, Nova Iorque, EUA) e 0,5% antibiótico (Penicillin-Streptomycin, Invitrogen, Califórnia, EUA), o pellet contendo os granulócitos era submetido à separação por meio de gradiente descontínuo de Percoll isotônico (GE Healthcare), com 2.0 mL das seguintes densidades: 1.100, 1.095, 1.090, 1.085, 1,080 e 1,075 g/mL. As soluções de Percoll eram preparadas exatamente como descrito pelo fabricante. Após 30 minutos de centrifugação a 600 x g, a 18°C, os granulócitos da interface entre 1.095 e 1.090 g/mL eram coletados, lavados duas vezes com meio RPMI e, então, contados em câmara de Neubauer. Este método de separação de granulócitos assegura 95% de células viáveis com grânulos preservados e uma média de 70% de eosinófilos e 30% de neutrófilos. Estes procedimentos eram controlados com a realização de lâminas e coloração específica (Figura 3, Página 76)

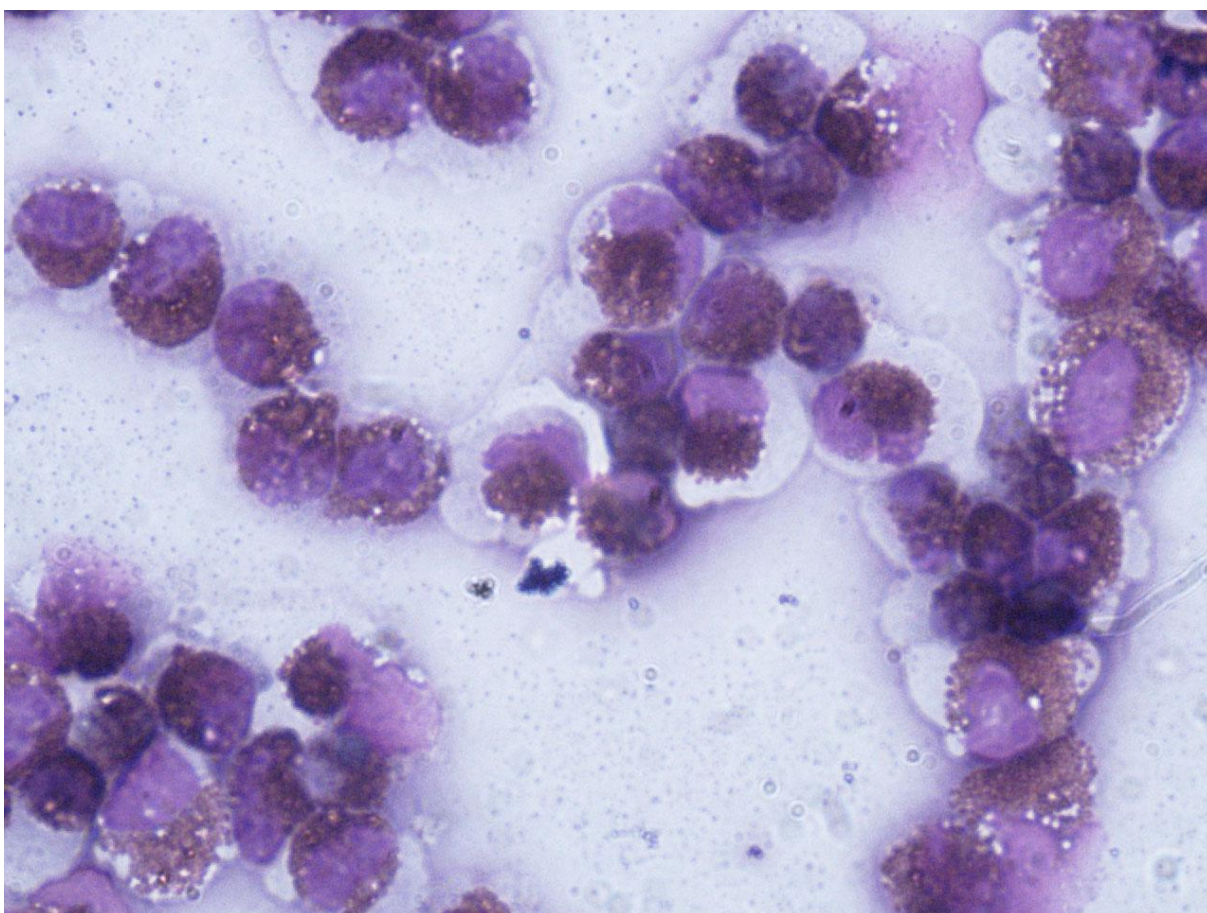


Figura 3 – Separação de granulócitos por meio de gradiente descontínuo de Percoll

3.5. Cultura de granulócitos

Imediatamente após a separação, as células eram submetidas à contagem em câmara de Neubauer, com auxílio do corante azul de Tripán (Sigma), ajustando-se a concentração para 5×10^5 células/mL (aproximadamente $3,5 \times 10^5$ eosinófilos/mL e $1,5 \times 10^5$ neutrófilos/mL). As células eram transferidas para placas de cultura, em duplicata, com volume final de 2 mL/poço e eram divididas em dois grupos:

- ❖ SE - sem estímulo adicional
- ❖ AB - estímulo com veneno de abelha

Após duas horas em repouso em estufa climatizada, as células eram estimuladas com veneno de abelha, *A. mellifera*, na concentração de 1 ng/mL, a qual foi estabelecida por determinação experimental em nosso laboratório, partindo de concentração inicial de 1 µg/mL. A cultura de células era realizada em 72 horas em estufa climatizada a 37°C e 5% de CO₂.

As células retiradas das placas eram destinadas aos seguintes procedimentos: contagem com azul de Tripán (Sigma) para verificação da viabilidade celular, sendo consideradas viáveis as células que não absorveram o corante; obtenção de sobrenadante, células para biologia molecular e lâminas para imunofluorescência.

3.6. Extração de RNA Total (RNAT)

Para obtenção de células para expressão gênica, 500 μ L do conteúdo dos poços eram transferidos para tubos plásticos de 1,5 mL livres de RNase e submetidos à centrifugação a 10450 x g, a 4°C, por 20 minutos. O *pellet* era diluído em 400 μ L de solução 4 M tiocianato de guanidina contendo 2-mercaptoetanol (Sigma) e 0,5% sarcosil pH 7,0 e destinado à extração de RNA total.

O RNA total era extraído dos granulócitos através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol - Clorofórmio [129] adaptado no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) conforme descrição a seguir [130].

Para a separação das proteínas dos ácidos nucleicos era adicionado volume igual de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A seguir, esta mistura era agitada vigorosamente formando emulsão e centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente, a 10450 x g recuperando-se a fase aquosa (superior). Repetia-se, então, a extração com fenol: clorofórmio: álcool Isoamílico. A retirada do excesso de fenol era realizada pela extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 3 volumes de etanol absoluto e 10% acetato de sódio 3 M pH 5,2. Esta preparação era mantida à - 80°C por 24 h.

Para a precipitação do RNA total a preparação era centrifugada a 10450 x g por 20 minutos a 4°C. Ao precipitado, adicionava-se 40 μ L de água ultrapura estéril (DirectQ, Millipore, Massachusetts, EUA) preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC, Sigma) armazenando-se, finalmente, à - 80°C.

3.7. Análise do RNA Total Extraído

A qualidade do RNA total extraído foi analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Califórnia, EUA) nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Eram consideradas adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8. A quantificação do RNA total era feita através da fórmula: (densidade óptica a 260nm/0,025) x diluição de leitura/1000 = RNA µg/µL.

3.8. Transcrição Reversa do RNA total Extraído (cDNA)

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5µg de RNA total. Para a realização da reação de transcrição reversa adicionava-se à amostra 0,5 µL de Oligo d(pt) (Invitrogen, Califórnia, EUA) e água ultrapura em quantidade suficiente para 28 µL. Os tubos eram aquecidos com as respectivas amostras em termociclador (Bio-Rad iCycler, Califórnia, EUA) por 10 minutos a 65°C e posteriormente, resfriados a 4°C por 5 minutos. Para a ligação complementar dos nucleotídeos ao RNA, adicionava-se 21 µl de solução mãe (10 µL de tampão Super RT/5 µL de dNTP mix 0,5 mM/5 µL de DTT 0,1 M, Invitrogen) incubando-se por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1 µL de enzima Super Transcriptase reversa (Super Script, Invitrogen) previamente diluída na proporção 1:5 em água com DEPC, a reação processava-se em termocicladora programada da seguinte maneira : 42° C por 50 minutos, 70° C por 15 minutos e resfriamento da amostra até 4°C. Após a ultima etapa, as amostras com volume final de 50 µL eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

3.9. Amplificação de cDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Para verificar a expressão dos genes de interesse – receptores de histamina (H1, H2 e H4), fatores de liberação de histamina (HRF), Bcl-2 e Bid – utilizamos a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação 2µL de amostra de cDNA, 100ng de primer 5' sense, 100ng de primer 3' anti-sense, 45µl de solução de reação (5 µL de tampão *Taq* polimerase (*Thermus aquaticus* DNA polimerase – Invitrogen); 5 µL de dNTP mix 0,5 mM; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM – Invitrogen, e 33,5 µL de água ultra pura) e 1 µL de óleo mineral. Em seguida, os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidos para termocicladora programada para as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 2 minutos; 80°C por 5 minutos para aplicação de 1 µL da enzima *Taq* polimerase previamente diluída em água ultrapura na proporção 1:2; anelamento 45 segundos, em temperatura específica para cada par de *primers*; extensão dos *primers* a 72°C por 90 segundos; desnaturação dos *primers* a 95°C por 45 segundos; repetição de “n” ciclos; extensão final 72°C por 10 minutos; temperatura de espera 4°C (GeneAmp PCR systems 9700, Applied Biosystems Califórnia,EUA). Os produtos das PCR foram armazenados a -20°C. As sequências de RNAm e cDNA foram submetidas à análise no programa BLAST, juntamente com os primers, utilizando CLC Main Workbench software (CLCBio, Aarhus, Dinamarca) (Tabela 4, página 81).

Tabela 4 – Primers utilizados nas reações de PCR

Primer	Sequência (5' – 3')	Condições/Produto
β-actina	F- GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	58°C/40 ciclos 237pb
	R- GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	
H1	F- TTT CTC TCT TTT CTG TGG GTT ATT	60°C/35 ciclos 387pb
	R- CTT GGG GGT TTG GGA TGG TGA C	
H2	F- TTC ATC GTG TCC TTG GCT ATC	60°C/35 ciclos 804pb
	R- CTG AGA GGC GTT GGA CTT C	
H4	F – AGT CA C TTA GTC GCT TAT	50°C/40 ciclos 455pb
	R- CTG ATT TAG GAC CTG TTG	
HRF	F- ATC AGC CAC GAT GAG ATG TTC	60°C/35 ciclos 437pb
	R- TCA CGG TAG TCC AAT AGA GCA A	
BCL-2	F- GAT GGC AAA TGA CCA GCA GA	54°C/40 ciclos 347pb
	R- TGG CAG GAT AGC AGC ACA GG	
BID	F- AGA CCT GCT GGT GTT GCC	56°C/40 ciclos 448pb
	R- AAG ATG GTG CGT GAC TGG	

F- Forward; R- Reverse; pb- pares de base

3.10. Análise dos Produtos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por Eletroforese em Gel de Agarose

As amplificações dos cDNA através de primers específicos eram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, e revelados com brometo de etídio (Research Organics, Ohio, EUA), através de excitação em luz ultravioleta e documentadas em sistema de documentação fotográfica (ImageQuant 400, Amersham-GE, Reino Unido). A intensidade das bandas foi analisada com auxílio do *software* ImageQuant TL (ImageQuant TL, Amersham-GE).

3.10.1 – Preparo de 50 mL de gel de Agarose 1,5%:

Agarose 1,5% era preparada em tampão TBE (ácido bórico/ tris/ EDTA/H₂O ultrapura) e acrescida de 5 µL de brometo de etídio .

3.10.2 – Preparo das amostras:

As amostras eram preparadas misturando-se 8 µL da reação de PCR, 1,5 µL tampão GBX (tampão de amostra de PCR) e 5,5 µL de água ultrapura. Utilizou-se como tampão de corrida eletroforética tampão TBE adicionado de 5 µL de brometo de etídio. O padrão de DNA (DNA marker ØX174 RF *Hae* III Fragments – Invitrogen) era aplicado em todas as eletroforeses. As condições de eletroforese eram: 50 minutos a 70 volts, 300 mA.

3.11. Análise Semiquantitativa dos Produtos de PCR

A semi-quantificação do RNAm era obtida pela relação entre os volumes de pixel determinados para as bandas correspondentes ao RNA mensageiro em questão e aqueles observados para a β -actina (gene estrutural). Os valores eram normalizados e transformados em unidades arbitrárias (*pixel index*) por meio da seguinte fórmula:

Expressão semiquantitativa (Unidades arbitrárias) = (área de pixel do RNA mensageiro a ser avaliado/ área de pixel da beta actina) x 100.

3.12. PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

A expressão de alguns genes listados na tabela 5 (página 86) foi analisada por PCR em tempo real (*Real-Time PCR*).

Foram feitos testes para padronização da concentração e eficiência de cada conjunto de primers. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva [131, 132]. Os transcritos testados demonstraram altas taxas de eficiência no PCR em tempo real com mais de 99% para todos os iniciadores utilizados (coeficiente de correlação de Pearson $r > 0.95$). A amplificação de β -actina foi utilizada como um controle para determinar a quantidade e qualidade do cDNA produzido.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento Bioneer ExicyclerTM 96 (Daedeok-gu, Daejeon, Korea) utilizando o reagente *SYBRGreen PCR Master Mix*® (Fermentas), que além de conter todos os

reagentes necessários para a realização de uma reação de PCR (*dNTPs*, *MgCl₂*, *Tampão*, *Taq Ampli-Gold*) contém também o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de DNA dupla-fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo pelo equipamento acima citado.

Todas as amostras foram amplificadas sempre em duplicata em placas de 96 poços (Bioneer Global Genomics Partner) com tampas adesivas plásticas que permitem a passagem de luz. As reações foram realizadas em um volume total de 25 µL contendo 100 ng de cDNA das culturas de eosinófilos, 12.5 µL de *SYBRGreen Master Mix PCR* (Fermentas), e 300 nM dos primers. Os dados são coletados na forma de emissão de fluorescência durante os ciclos da reação e analisados em forma de curva.

Para certificação de que a fluorescência emitida não estava sendo gerada por amplificações inespecíficas, foi feita a análise da curva de dissociação, baseada na *T_m* (*melting temperature*) específica de cada produto, que é determinada pela sua composição de nucleotídeos. A cada variação da temperatura, que acontece entre 60°C à 95°C logo após o término do PCR, são coletados dados de fluorescência. A curva de dissociação ocorre quando em determinada temperatura ocorre desnaturação do produto de PCR e conseqüente queda de fluorescência gerada pelo *SYBRGreen*, já que este se intercala somente a fita dupla de DNA.

A determinação dos valores para quantificação da expressão é feita com a determinação do *threshold*, que representa o momento em que o sistema

detecta luz de maneira “inequívoca” nas amostras, diferenciando o sinal real do ruído de fundo. O ponto de encontro entre esta linha e a curva de amplificação é denominado *threshold cycle*, ou *Ct*. Quanto maior a expressão do gene, mais precocemente ele será amplificado e, conseqüentemente, menor será o *Ct*. Os dados de *Ct* de cada gene foram exportados para uma planilha de Excell (Microsoft Corporation, EUA), para análise. O método de quantificação da expressão gênica utilizado é denominado “análise relativa dos dados”, onde a expressão dos genes escolhidos é quantificada em relação a uma situação considerada como referência, que constitui a amostra calibradora [133].

Tabela 5 – *Primers* para PCR em tempo real

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
β-actina	CTG GCC GGG ACC TGA CT	GCA GCC GTG GCC ATC TC
CD23	GCT GTG ATT GTG CCC GCT GAG	TGC GTG GAC TGG GAT TTC TGC
C/EBPα	TCG GTG GAC AAG AAC AG	GCA GGC GGT CAT TG
C/EBPβ	ACA GCG ACG AGT ACA AGA TCC	GCA GCT GCT TGA ACA AGT T
FcER1α	TGT GGC AGCTGG ACT ATG AGT CT	ACT TCT CAC GCG GAG CTT TTA T
FcER1γ	CTG GAT GCC ATC CTG TTT CTG TA	CCT TTC GCA CTT GGA TCT TCA
GATA-1	AGC CTA TTC CTC TCC CAA	TCC GCA GTT CAC ACA CTC
PU.1	TGT TAC AGG CGT GCA AAA TGG	TGC GTT TGG CGT TGG TAT AGA

3.13. Imunofluorescência – GATA-1, FcεRIα e FcεRIγ

Para marcação específica por meio do método de imunofluorescência do fator de transcrição GATA-1 e cadeias α e γ do receptor de alta afinidade de IgE (FcεRI), 100 μ L das células provenientes da cultura (aproximadamente 5×10^4) eram submetidos à centrifugação a 300 x g por 10 minutos (Hettich Zentrifugen Rotofix 32A, Tuttlingen, Alemanha).

A fixação e permeabilização das células eram realizadas mantendo as lâminas submersas em acetona gelada por 10 minutos. Posteriormente, eram realizadas três lavagens com PBS pH 7,4 à temperatura ambiente. Realizava-se então a fase de bloqueio, utilizando-se leite em pó desnatado na concentração de 2% em PBS pH 7,4. O bloqueio era realizado à temperatura ambiente por duas horas. Submetia-se as lâminas novamente a três lavagens com PBS pH 7,4, seguida da incubação com anticorpo primário anti-GATA-1 (produzido em coelho) ou anti- FcεRIα ou anti- FcεRIγ (produzidos em cabra) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) na diluição de 1:200, overnight a 4°C. As lâminas eram, então, lavadas três vezes com PBS pH 7,4 e submetidas à incubação com anticorpo secundário conjugado com Texas Red anti-coelho para GATA-1 e FITC anti cabra para FcεRIα e FcεRIγ (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA) na concentração de 3 μ g/mL, por duas horas, à temperatura ambiente e protegido da luz. O material era lavado novamente com PBS pH 7,4. Finalmente, as lâminas eram montadas em glicerol e analisadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i

(Nikon Instruments Inc., Japão). As imagens eram captadas por câmera RSi1e processadas com auxílio do software NIS Advanced (Nikon Instruments Inc.).

A intensidade de pixels das imagens foi analisada com auxílio do software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, EUA. Versão 1.43q. Programa computacional de licença livre). A intensidade de fluorescência de cada tempo de tratamento, de células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha, foi comparada para verificar possíveis diferenças na expressão protéica.

3.14. Citometria de Fluxo – Análise de CD23

Para análise da expressão de CD23 em granulócitos isolados, 1×10^6 células eram ressuspensas em 100 μL de 5% de soro fetal bovino e PBS e incubadas com 5 μL de anticorpo anti-CD23 conjugado com FITC (Invitrogen) ou 5 μL de anticorpo utilizado para controle isotípico (Invitrogen) por 45 minutos a 4°C , ao abrigo de luz. As células eram, então, lavadas com PBS por 3 vezes sendo centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos. Por fim, os granulócitos eram ressuspensos com 300 μL de paraformaldeído 1%.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton&Dickson), sendo adquiridos um mínimo de 10000 eventos. Os dados foram analisados em programa específico, sendo levadas em consideração a porcentagem de células marcadas e a intensidade média de fluorescência (IMF).

3.15. Detecção de Apoptose *in situ* – técnica TUNEL

A técnica de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labelling) tem sido utilizada na detecção e quantificação de células apoptóticas. Este método baseia-se na ligação específica de desoxiuridina trifosfato biotilada (dUTP) conjugada com fluoresceína ao terminal 3'-OH do DNA (sítios de quebra de DNA), catalisada pela enzima terminal desoxinucleotidil transferase (TdT), com subsequente síntese de um heterodímero.

A reação de TUNEL era realizada segundo instruções do fabricante (In Situ Cell Deth Detection Kit- Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As lâminas de granulócitos eram fixadas em paraformaldeído 4% por 60 minutos em temperatura ambiente e em seguida lavadas em PBS. Após a lavagem, os granulócitos eram permeabilizados por 2 minutos em solução 0,1% Triton-X e 0,1% de citrato de sódio a 4°C. A seguir, as lâminas eram novamente lavadas e aproximadamente 50µL da reação de TUNEL (solução de enzima TdT adicionada a solução label – mistura de nucleotídeos em tampão) eram adicionados, por 1 hora, em câmara úmida e ao abrigo de luz. . As lâminas eram então montadas em glicerol e analisadas no fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc.). As imagens eram captadas por câmera RSi1 e processadas com auxílio do software NIS Advanced (Nikon Instruments Inc.).

3.16. ELISA – RANTES e IL-8

As placas eram adsorvidas com anticorpo de captura específico para a quimiocina RANTES ou IL-8 (Peprotech Inc. NJ, EUA) na concentração de 0,5µg/mL, diluído em PBS (pH. 7.4) e incubadas por 18 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas eram lavadas por 4 ciclos rápidos com PBS e 0,05% de Tween 20 (Merck - Alemanha). Para bloqueio dos sítios inespecíficos utilizava-se solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4), por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente as placas eram lavadas por 4 ciclos rápidos e 100 µL de amostras de sobrenadantes das culturas de granulócitos diluídos 1:2 em 0.05% de Tween 20 e 0.1% BSA em PBS eram adicionados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após o processo de lavagem, eram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção biotinilado na concentração 0.25 µg/mL e incubados em câmara úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida as lavagens, era adicionada solução de avidina/peroxidase, diluído 1:2000 em tampão de ensaio e então, mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor era produzida pela adição de ABTS (Sigma), sendo bloqueada após 30 minutos com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 405nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Para cada experimento, era utilizada curva de referência, para determinação da concentração da quimiocina.

3.17. Análise Estatística

Os resultados eram expressos em função da mediana $\pm$ desvio padrão e os dados submetidos à análise estatística não paramétrica pelos testes de Kruskal-Wallis, com *post-test* Dunn, e Mann-Whitney, com auxílio do software Graphpad Prism 5.0 (San Diego, California, EUA) licenciado para Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp. A comparação entre grupos com e sem estímulo era realizada por meio do teste *t* pareado. Eram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.



4 –RESULTADOS

4.1. Determinação da concentração de apitoxina

Para estabelecermos a concentração ideal de veneno de abelha a ser utilizada como estímulo nas culturas de 72 horas de granulócitos, realizamos uma curva de concentrações do veneno, analisando-se, posteriormente, a viabilidade celular após 72 horas. As concentrações de apitoxina utilizadas foram: 1500 ng/mL, 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 300 ng/mL , 100 ng/mL, 50 ng/mL , 20 ng/mL , 10 ng/mL, 5 ng/mL e 1 ng/mL. Ao final de 72 horas, a viabilidade dos granulócitos foi analisada com o auxílio do corante azul de Tripan. As células foram consideradas vivas quando não absorveram o corante, e consideradas mortas, quando coradas em azul.

Os dados estão representados graficamente na Figura 4 (página 94). A partir destes resultados, a concentração de veneno de abelha utilizada na cultura de células ficou definida como 1 ng/mL.

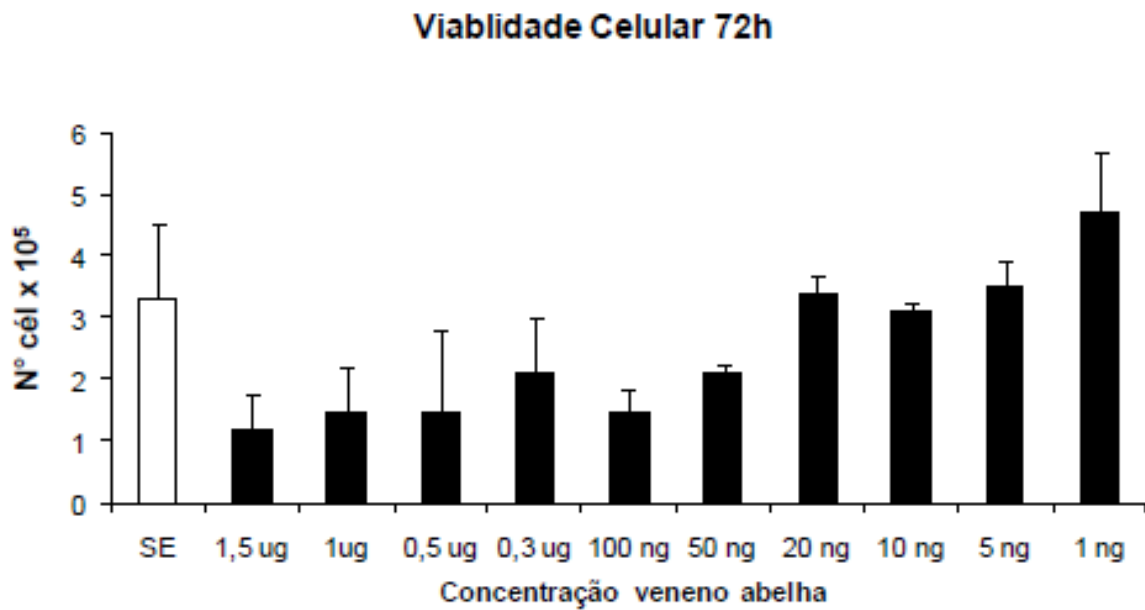


Figura 4 - Gráfico representando a viabilidade dos granulócitos submetidos a 72 horas de cultura e estimulados com diferentes concentrações do veneno de abelha. O parâmetro de comparação utilizado foi a sobrevivência de células não estimuladas durante o mesmo período em cultura.

4.2. Determinação IgE específica ao veneno de abelha

Com objetivo de estabelecer o perfil de resposta da imunoglobulina do isotipo E específica ao veneno de abelha, procedemos a sua quantificação sérica durante o período de imunoterapia. Podemos observar na Figura 5 (página 96) a diminuição dos níveis de IgE específica já no primeiro mês de tratamento ($p < 0.05$; 24.03 ± 12.37) e ainda, após 3 ($p < 0.05$; 16.06 ± 11.8), 12 ($p < 0.05$; 8.34 ± 3.78), 18 ($p < 0.05$; 11.15 ± 4.21) e 24 meses ($p < 0.05$; 4.38 ± 1.74) quando comparado ao período pré-imunoterapia (77.13 ± 23.59).

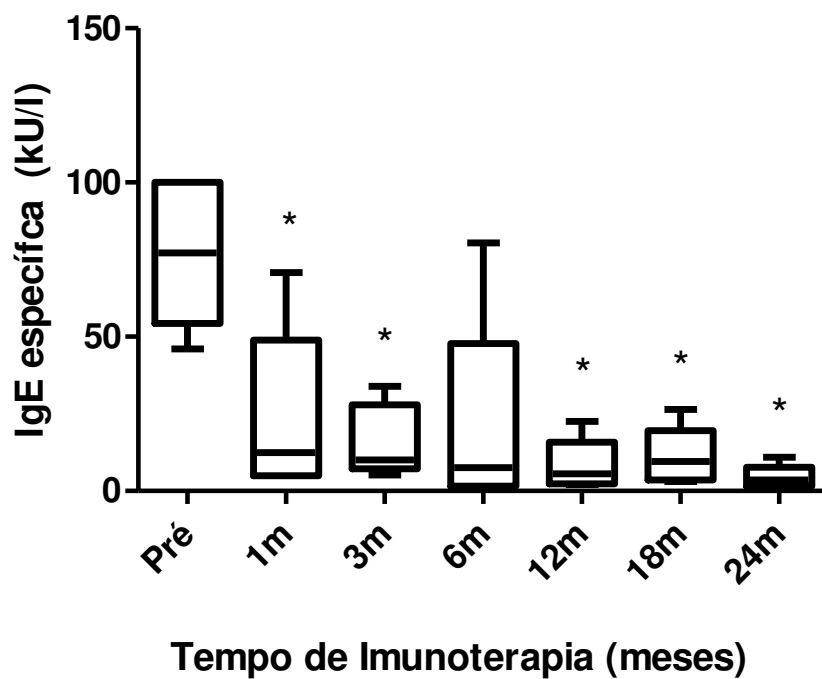


Figura 5 - Determinação sérica da IgE específica ao veneno de abelha ao longo do tempo de imunoterapia. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

4.3. Expressão gênica de H1

A análise dos resultados obtidos para a expressão gênica de H1 em granulócitos submetidos a 72 horas de cultura demonstra que, em células não estimuladas a imunoterapia foi capaz de reduzir significativamente os níveis de RNAm após 1 ($p<0.0001$; 34.28 ± 9.765), 12 meses ($p<0.0001$; 39.95 ± 17.60) e 24 meses ($p<0.05$; 54.32 ± 26.66) de tratamento quando comparado ao período pré imunoterapia (81.88 ± 35.10) (Figura 6A, página 98).

Granulócitos estimulados com veneno de abelha mostraram uma diminuição significativa na expressão gênica de H1 em 1 mês ($p<0.0001$; $29,87 \pm 17.40$) e 24 meses após o início da dessensibilização ($p<0.001$; 60.29 ± 25.26). Entretanto, podemos observar um aumento na expressão deste receptor após 18 meses de tratamento ($p<0.05$; 188.8 ± 42.26), quando comparados com granulócitos pré-imunoterapia (126.8 ± 72.26) (Figura 6B, página 98).

Comparando-se células estimuladas com células não estimuladas, é possível observar diferença estatística no período pré-imunoterapia ($p<0.05$), 3 ($p<0.05$), 6 ($p<0.05$), 12 ($p<0.05$) e 18 meses ($p<0,001$) após o início da imunoterapia específica.

Verificamos ainda, que indivíduos não alérgicos apresentam expressão significativamente reduzida ($p<0.0001$; SE – 27.72 ± 9.3 ; AB- 27.13 ± 7.5) em comparação à pacientes no período pré-imunoterapia.

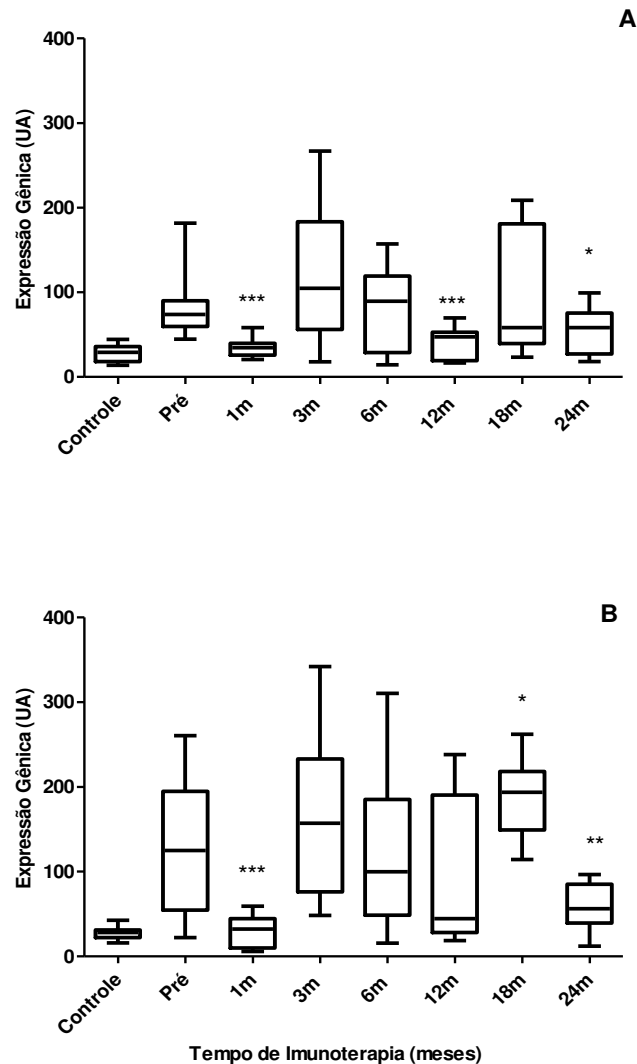


Figura 6 – Análise semi-quantitativa da expressão gênica de H1. Granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.4. Expressão gênica de H2

Analisando a expressão gênica do receptor de histamina 2, representada graficamente na Figura 7, pode-se observar um aumento significativo nos níveis de RNAm de H2 em 3 meses ($p < 0.001$; SE - 60.91 ± 21.94 ; AB - 88.46 ± 42.78), 6 meses ($p < 0.0001$; SE - 147.9 ± 31.93 ; AB - 288.5 ± 152.1) e 18 meses de imunoterapia ($p < 0.0001$; SE - 124.5 ± 30.98 ; AB - 113.3 ± 45.87) tanto em células estimuladas quanto em células não estimuladas com veneno de abelha (Figura 7A, página 100).

Por outro lado, após 12 meses de imunoterapia foi observada uma diminuição significativa na expressão deste receptor ($p < 0.001$; SE - 9.842 ± 4.188 ; AB - 2.739 ± 4.252) quando comparada à granulócitos isolados pré-imunoterapia (SE - 35.08 ± 12.49 ; AB - 37.90 ± 16.46) (Figura 7B, página 100).

Podemos observar, ainda, que granulócitos estimulados com apitoxina provenientes de indivíduos não alérgicos ($p < 0.0001$) e de pacientes que receberam imunoterapia por 12 meses ($p < 0.0001$), apresentam expressão reduzida de H2 quando comparado à células não estimuladas.

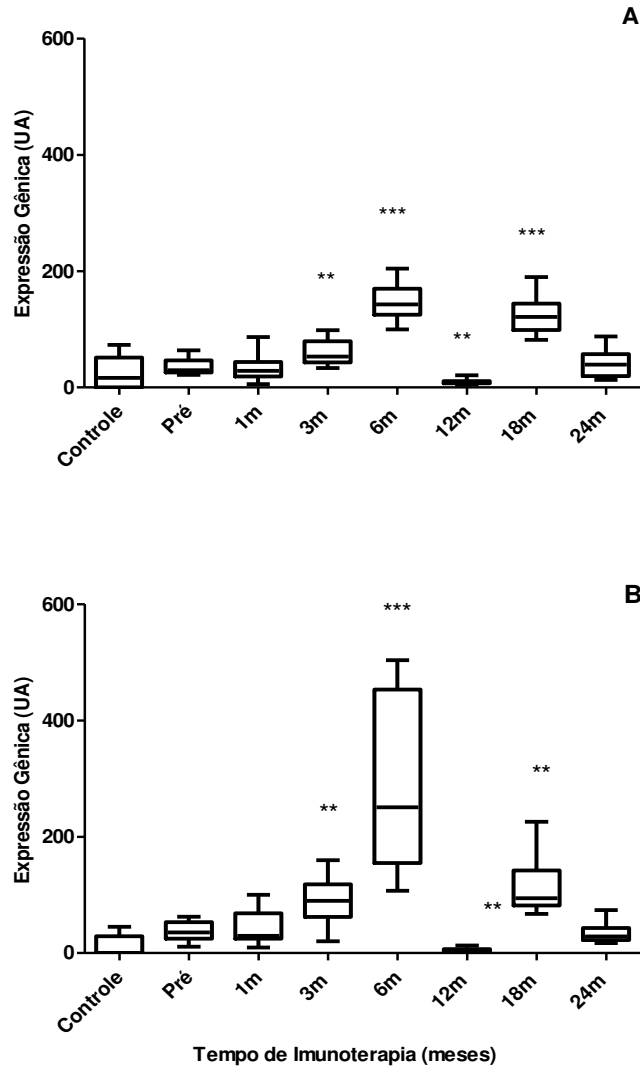


Figura 7 - Análise semi-quantitativa da expressão gênica de H2. Granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.5. Expressão gênica de H4

Os granulócitos isolados e submetidos à culturas de 72h mostram que após 1 ($p<0.0001$; SE - 63.24 ± 17.89 ; AB - 63.03 ± 16.51), 12 ($p<0.0001$; SE - 33.02 ± 18.43 ; AB- 28.46 ± 8.366) e 24 meses ($p<0.0001$; SE- 77.60 ± 12.85 ; AB - 111.5 ± 30.82) há uma redução significativa na expressão gênica de H4 em comparação ao período pré-imunoterapia (SE- 211.7 ± 68.38 ; AB- 238.8 ± 71.31) .

Além disso, em células estimuladas com veneno de abelha também é possível observar esta redução em 3 meses de tratamento ($p<0.05$; 170.90 ± 79.05). Por outro lado, após 18 meses de imunoterapia, ocorre um aumento nos níveis de RNAm de H4 ($p<0.05$; 317.50 ± 75.07).

A análise do comportamento dos granulócitos frente ao estímulo com veneno de abelha em cultura revela que a expressão gênica de H4 é significativamente reduzida com o estímulo após 3 meses ($p<0.001$) de imunoterapia e, após 6 meses ($p<0.0001$), observamos o contrário, ou seja, granulócitos estimulados apresentam uma maior expressão deste receptor quando comparados à granulócitos não estimulados.

Podemos verificar, ainda, que granulócitos de pacientes pré-imunoterapia apresentam expressão gênica de H4 significativamente maior que indivíduos não alérgicos ($p<0.0001$; SE – 92.26 ± 12.41 ; AB- 79.52 ± 3.59) (Figura 8, página 102).

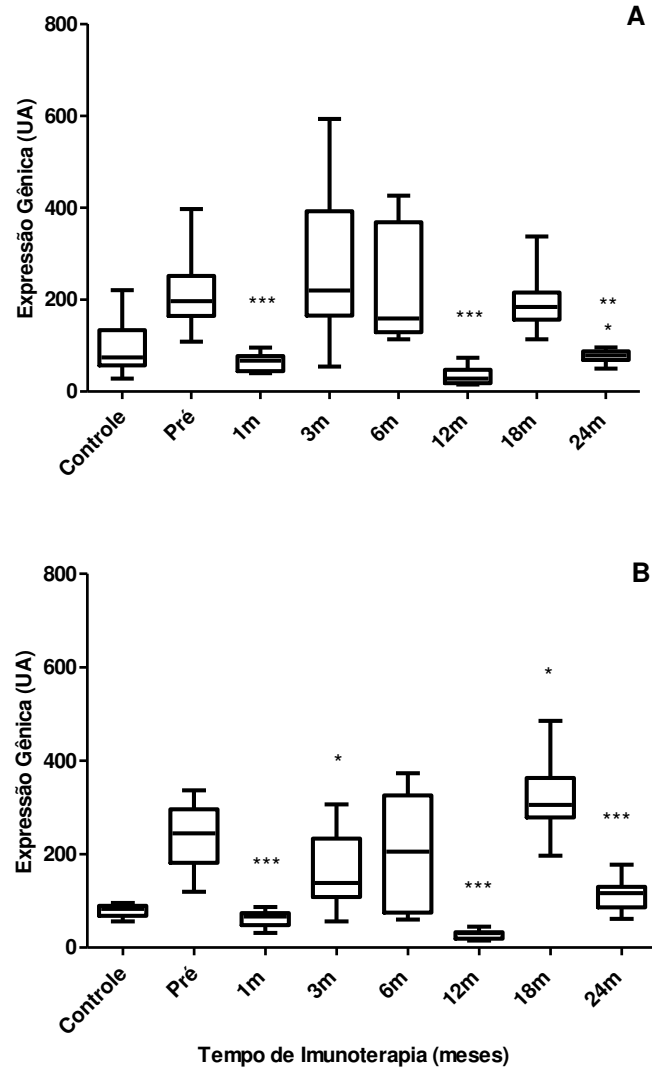


Figura 8 – Análise semi-quantitativa da expressão gênica de H4. Granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.6. Relação entre os receptores de histamina

Para verificarmos as modificações no balanço entre os receptores de histamina durante o curso da imunoterapia, analisamos as relações entre os receptores estudados (H1/H2; H4/H2; H1/H4), representadas graficamente na Figura 9 (página 104).

Granulócitos não estimulados com veneno de abelha em cultura não apresentam grandes variações entre H1/H2. Por outro lado, podemos observar que após 12 meses de imunoterapia específica a relação H1 versus H2 aumenta, indicando aumento na expressão gênica de H1 neste período, tanto em células estimuladas quanto em células não estimuladas (Figura 9A).

O mesmo ocorre na análise de RNAm H4/H2; verificamos um aumento na relação entre estes dois receptores em 12 meses de imunoterapia específica, com aumento na expressão de H4 em células estimuladas com apitoxina (Figura 9B).

Com relação a H1/H4, é possível observar que há um aumento nestes níveis em 3 e 12 meses de imunoterapia específica, em granulócitos estimulados com apitoxina. Adicionalmente, também pode-se observar este aumento em células não estimuladas, após 12 meses de tratamento. Assim, este aumento indica que há um aumento na expressão gênica de H1 em relação a H4 nestes períodos (Figura 9C).

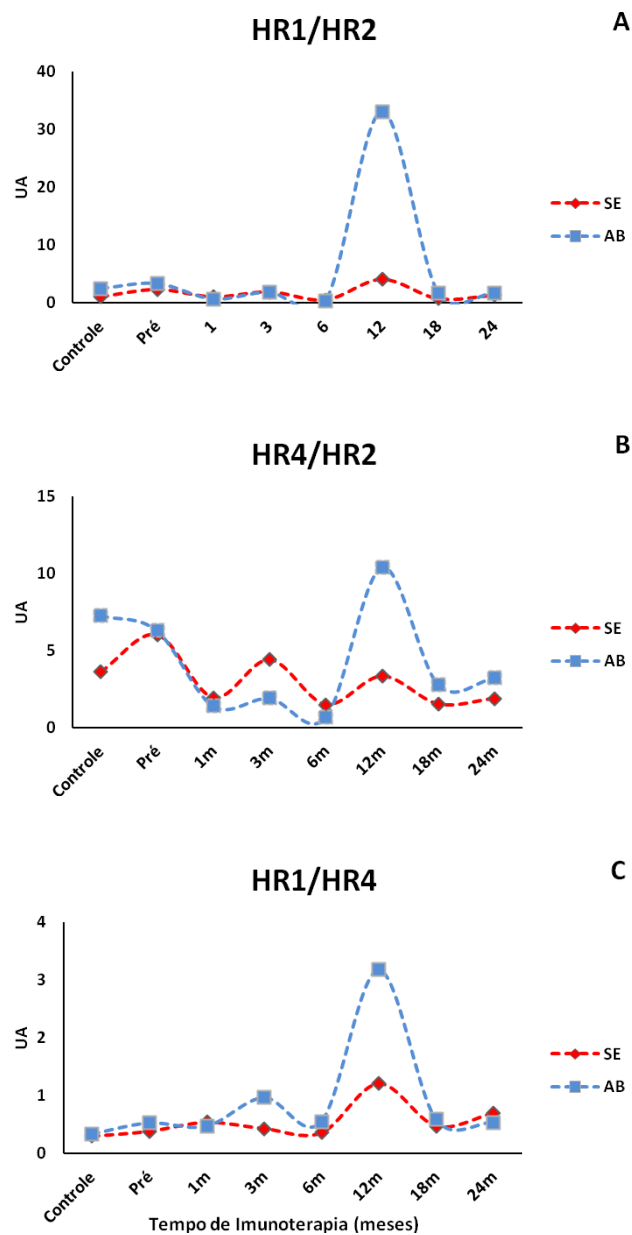


Figura 9- Efeitos da imunoterapia específica sobre a relação entre os receptores de histamina de granulócitos isolados de indivíduos não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional ou estimuladas com veneno de abelha (AB).

4.7. Expressão gênica dos Fatores de Liberação de Histamina (HRF)

A imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de modular a expressão gênica de HRF em 1 ($p < 0.0001$; SE- 57.78 ± 23.47 ; AB - 63.59 ± 47.60), 12 ($p < 0.0001$; SE- 40.58 ± 24.63 ; AB - 10.65 ± 2.46), 18 ($p < 0.05$, SE - 157.90 ± 79.68 ; $p < 0.0001$; AB - 29.17 ± 6.14) e 24 meses ($p < 0.0001$; SE- 84.29 ± 36.65 ; AB - 106.80 ± 39.97) tanto em células não estimuladas quanto em células estimuladas com veneno de abelha quando comparada a granulócitos no período pré-tratamento (SE- 291.0 ± 146.2 ; AB - 231.40 ± 114.40). Além disso, granulócitos estimulados com veneno de abelha apresentaram uma redução significativa na expressão gênica de HRF em 6 meses de tratamento ($p < 0.05$; 130.1 ± 73.37) quando comparado com células obtidas de pacientes no período pré-imunoterapia

Pode-se verificar ainda que granulócitos estimulados com apitoxina apresentam expressão gênica reduzida de HRF após 6 ($p < 0.0001$), 12 ($p < 0.05$) e 18 meses ($p < 0.0001$) de tratamento em comparação à células que não receberam estímulo adicional de veneno.

Indivíduos sadios não alérgicos apresentam níveis de RNAm de HRF significativamente menores ($p < 0.0001$; SE - 56.12 ± 25.72 ; AB - 73.52 ± 49.93) em comparação à pacientes pré-imunoterapia (Figura 10, página 106).

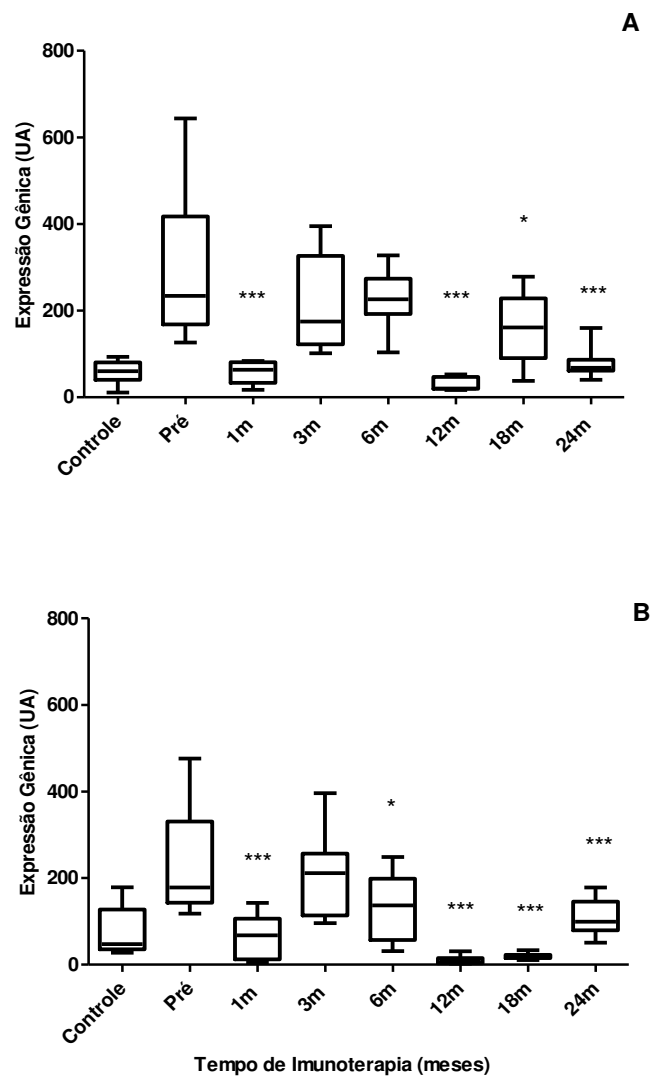


Figura 10 – Análise semi-quantitativa da expressão gênica de HRF IgE-dependente. Granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional (**A**) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (**B**). Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.8. Expressão de Fatores de Transcrição envolvidos na diferenciação de granulócitos

A expressão gênica dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de granulócitos foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão foram normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos”. Neste trabalho foi utilizado o gene da beta actina (β -actina) que é um gene cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresenta pouca variação entre diversas condições. Após a normalização dos dados, foi realizada a calibração dos mesmos utilizando amostras consideradas como referências (calibradoras), que neste estudo foram amostras de granulócitos no período pré-imunoterapia.

4.8.1. Expressão Gênica de PU.1

Conforme representado graficamente na Figura 11, a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de modular a expressão gênica do fator de transcrição PU.1 em granulócitos provenientes de pacientes alérgicos à apitoxina e não estimulados em cultura em todos os períodos analisados (1m- $p < 0.001$, 0.511 ± 0.11 ; 3m- $p < 0.001$, 0.746 ± 0.26 ; 6m- $p < 0.0001$; 0.390 ± 0.07 ; 12m- $p < 0.0001$; 0.333 ± 0.05 ; 18m- $p < 0.0001$; 0.544 ± 0.10 e 24m- $p < 0.01$; 0.662 ± 0.06) de imunoterapia, em relação ao período pré-imunoterapia (Figura 11A, página 109).

Esta modulação também pode ser observada de maneira significativa após 1 (AB- $p < 0.0001$; 0.491 ± 0.03), 12 (AB- $p < 0.0001$; 0.381 ± 0.02), 18 (AB- $p < 0.001$; 0.552 ± 0.06) e 24 meses (AB- $p < 0.001$; 0.786 ± 0.05) de tratamento em granulócitos estimulados com apitoxina e mantidos em cultura por 72h (Figura 11B, página 109).

Com base na análise da expressão de PU.1 em granulócitos frente a um novo estímulo com veneno de abelha, pode-se verificar que granulócitos colocados em cultura no período pré-imunoterapia apresentam níveis de RNAm deste fator de transcrição significativamente menores em comparação à células não estimuladas ($p < 0.05$). Entretanto, em 6 meses de imunoterapia esta ocorrência se inverte ($p < 0.0001$).

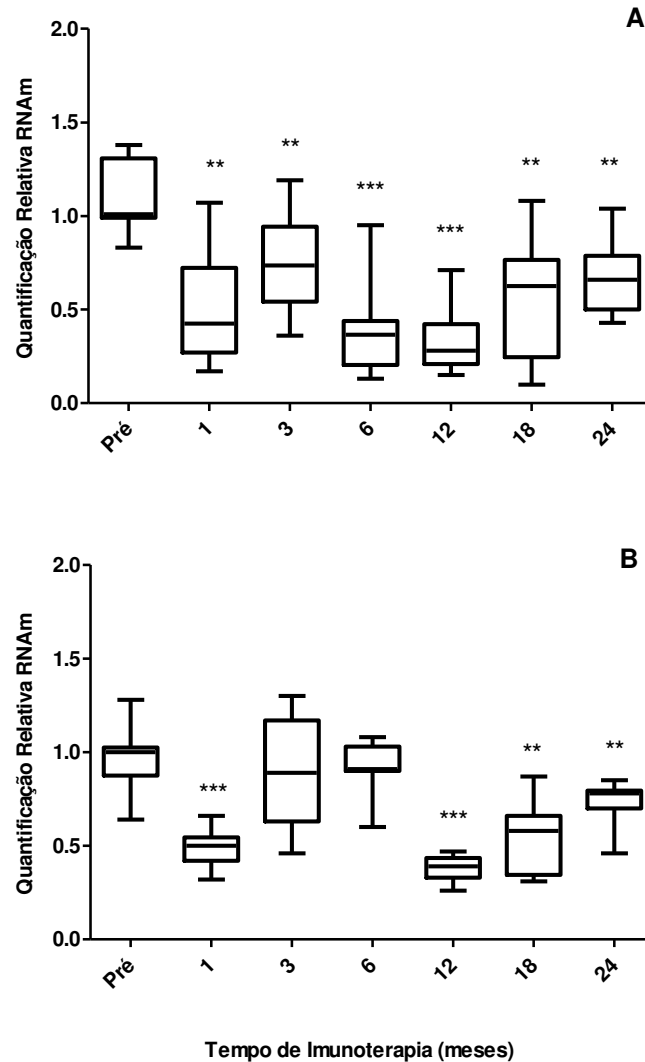


Figura 11 - Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição PU.1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.8.2. Expressão Gênica de C/EBP α

A partir dos resultados obtidos para a expressão gênica de C/EBP α pode-se observar que a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de modular significativamente os níveis de RNAm deste fator de transcrição em granulócitos que não receberam estímulo adicional de apitoxina quando em cultura somente aos 24 meses de tratamento ($p < 0.0001$; 0.631 ± 0.15) (Figura 12A, página 111).

Por outro lado, granulócitos estimulados com veneno de abelha apresentaram diminuição significativa na expressão relativa de C/EBP α ao período pré-imunoterapia após 1 ($p < 0.001$; 0.675 ± 0.25) e 3 meses de tratamento ($p < 0.001$; 0.442 ± 0.26) (Figura 12B, página 111).

Não foram observadas diferenças significativas quanto à expressão de C/EBP α entre células estimuladas e células não estimuladas.

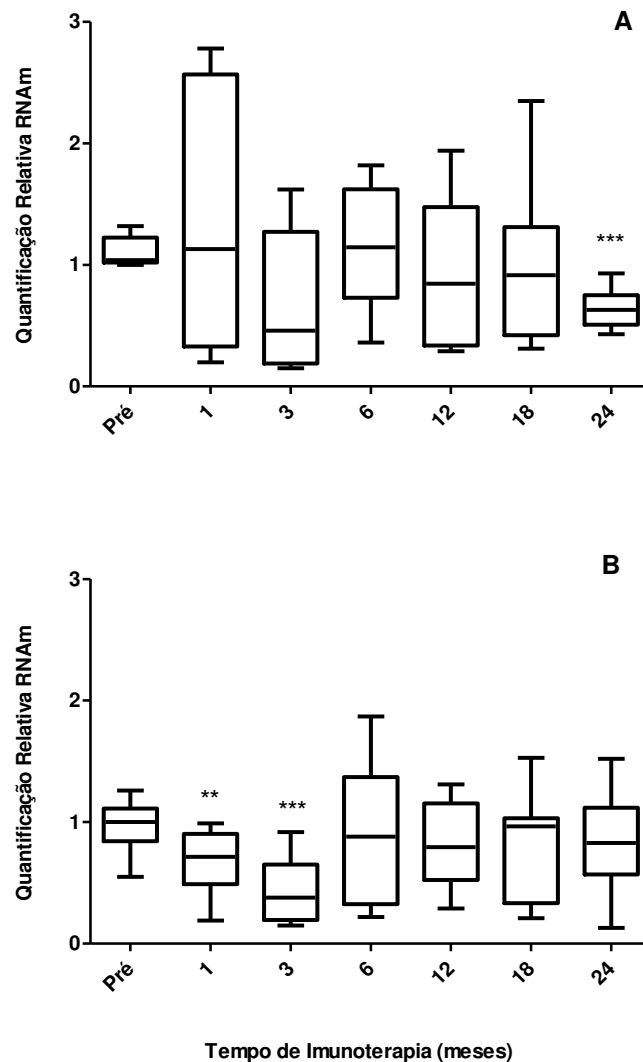


Figura 12 - Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição C/EBP α em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.8.3. Expressão Gênica de C/EBP β

Quanto à expressão gênica de C/EBP β em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, em relação ao período pré-tratamento, podemos observar que células não estimuladas em cultura apresentam aumento significativo nos níveis deste fator de transcrição após 1 mês de tratamento ($p < 0.0001$; 3.290 ± 0.82). Nos outros períodos analisados há redução significativa nos níveis gênicos deste fator de transcrição a partir do sexto mês de tratamento ($p < 0.05$, 6m – 0.789 ± 0.44 ; $p < 0.0001$, 12m – 0.452 ± 0.30 ; $p < 0.0001$, 24m – 0.519 ± 0.25) (Figura 13A, página 113).

Entretanto, em células estimuladas, a imunoterapia foi capaz de reduzir significativamente a expressão gênica de C/EBP β após 3 meses ($p < 0.001$; 0.544 ± 0.31), 6 ($p < 0.001$; 0.552 ± 0.16), 12 ($p < 0.001$; 0.436 ± 0.07), 18 ($p < 0.05$; 0.709 ± 0.25) e 24 meses de tratamento ($p < 0.05$; 0.543 ± 0.20) (Figura 13B, página 113).

Comparando-se a expressão deste fator de transcrição específico para neutrófilos em células estimuladas e não estimuladas, podemos observar que há uma diminuição nos níveis de RNAm de C/EBP β em células estimuladas após 1 ($p < 0.0001$) e 3 meses ($p < 0.05$) de tratamento.

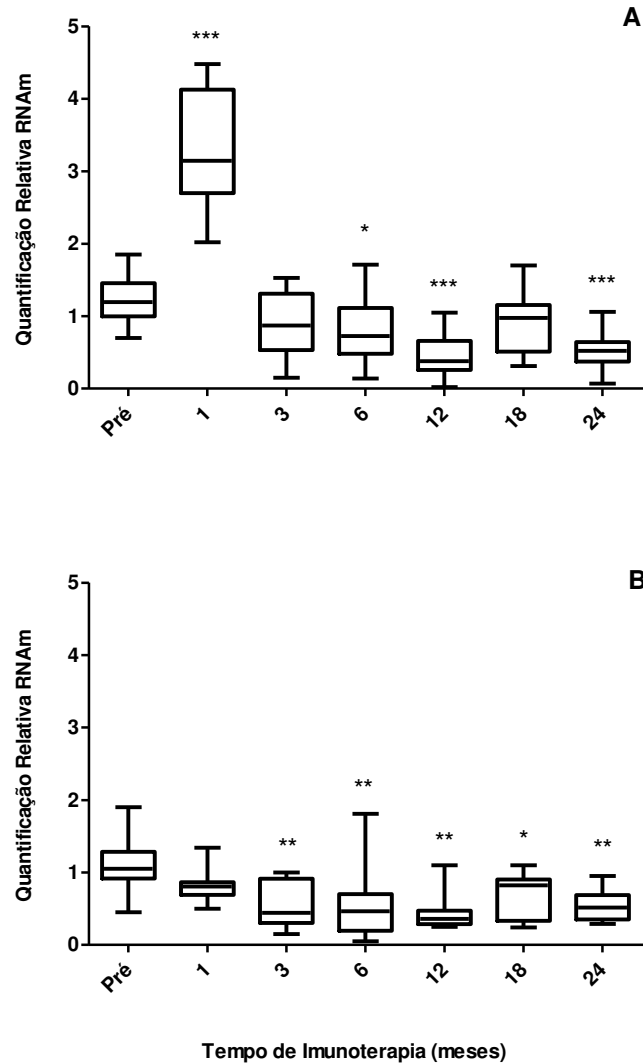


Figura 13 - Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição C/EBP β em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.8.4. Expressão de GATA-1

4.8.4.1. Expressão Gênica de GATA-1

Em células não estimuladas com veneno de abelha, podemos observar alterações significativas na expressão de GATA-1 a partir do 6º mês de tratamento (6m – $p < 0.001$, 0.830 ± 0.40 ; 12m – $p < 0.0001$, 0.697 ± 0.36 ; 18m – $p < 0.001$, 1.022 ± 0.30 ; 24m – $p < 0.05$, 0.755 ± 0.18) (Figura 14A, página 115).

Por outro lado, granulócitos que receberam estímulo adicional de apitoxina em cultura, apresentaram uma diminuição significativa na expressão relativa de GATA-1 em 12 ($p < 0.001$; 0.341 ± 0.21) e 24 meses ($p < 0.001$; 0.638 ± 0.23) (Figura 14B, página 115).

Granulócitos estimulados com veneno de abelha provenientes de pacientes no período pré-imunoterapia e ao final do período analisado apresentam redução significativa na expressão de GATA-1 em comparação à células não estimuladas ($p < 0.05$).

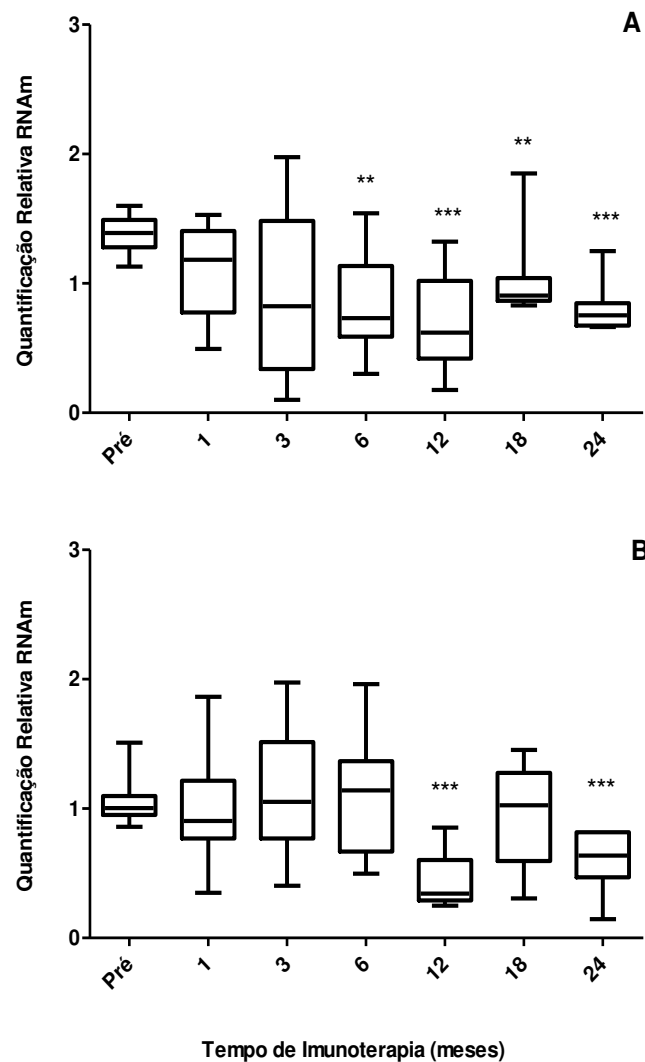


Figura 14 – Quantificação da expressão gênica do fator de transcrição GATA-1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional (**A**) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (**B**). Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.8.4.2. Expressão protéica de GATA-1

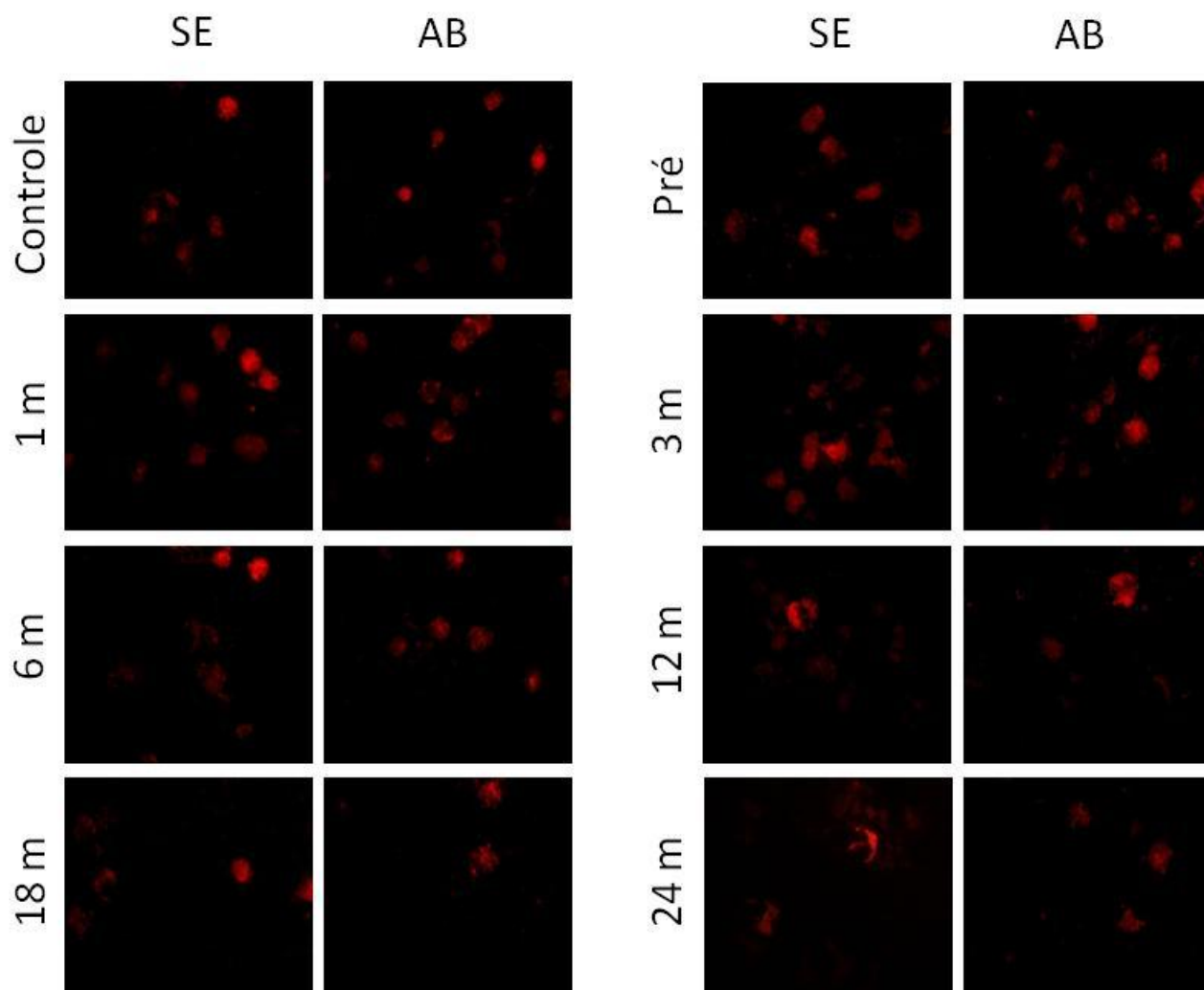
A expressão protéica do fator de transcrição GATA-1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, foi determinada através da técnica de imunofluorescência (Prancha I, página 117). Os resultados estão representados graficamente na Figura 15 (página 118).

Nossos resultados demonstram que a expressão protéica de GATA-1 é significativamente reduzida em 6 (SE – $p < 0.001$; 21.06 ± 1.82 ; AB – 20.42 ± 0.45), 12 (SE – $p < 0.001$; 21.97 ± 3.44 ; AB – 22.08 ± 0.77), 18 (SE – $p < 0.001$; 21.63 ± 1.59 ; AB – 21.41 ± 0.44) e 24 meses (SE – $p < 0.001$; 19.25 ± 1.41 ; AB – 17.89 ± 1.23) após o início da imunoterapia em comparação a granulócitos pré-imunoterapia (SE – 37.55 ± 2.87 ; AB – 32.29 ± 1.01), tanto em células não estimuladas quanto em células estimuladas com o veneno de abelha. Além disso, em células estimuladas com apitoxina, também é possível observar esta redução em 3 meses de imunoterapia ($p < 0.05$; 28.18 ± 0.88).

Podemos observar ainda, que granulócitos de pacientes pré-imunoterapia apresentam níveis protéicos de GATA-1 significativamente maiores que granulócitos provenientes de indivíduos não alérgicos ($p < 0.001$; SE – 24.93 ± 4.8 ; AB – 22.46 ± 1.6).

Não existem diferenças significativas entre células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha nos diferentes períodos analisados.

PRANCHA I - Fotomicrografia representativa da microscopia por Imunofluorescência de granulócitos provenientes de cultura de 72 horas para detecção do fator de transcrição GATA-1.



Aumento: 1000x

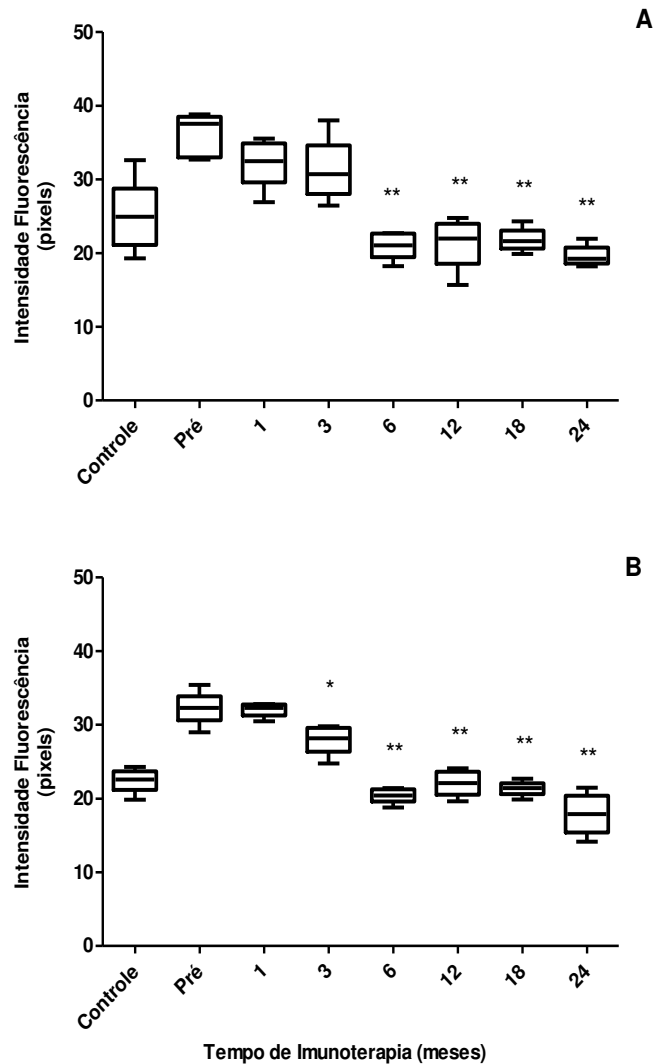


Figura 15 – Intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica do fator de transcrição GATA-1 em granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.9. Expressão de FcεRIα

4.9.1. Expressão gênica de FcεRIα

Quanto à expressão gênica da cadeia α do receptor de alta afinidade de IgE em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha relativa ao período pré-imunoterapia, podemos observar que o tratamento foi capaz de modular significativamente a expressão deste elemento em 3 ($p<0.0001$; 0.433 ± 0.23), 6 ($p<0.0001$; 0.337 ± 0.27), 12 ($p<0.0001$; 0.449 ± 0.23) e 24 meses ($p<0.001$; 0.719 ± 0.12) em células que não receberam estímulo adicional de apitoxina quando em cultura (Figura 16A, página 120).

Entretanto, em granulócitos estimulados com veneno de abelha, esta modulação já acontece logo ao primeiro de mês ($p<0.0001$; 0.435 ± 0.16) de tratamento e se mantém até o final do período analisado ($p<0.001$; 3m -0.380 ± 0.10 ; 6m – $p<0.0001$, 0.263 ± 0.03 ; 12m – $p<0.0001$, 0.338 ± 0.11 ; 18m – $p<0.001$, 0.610 ± 0.22 ; 24m – $p<0.001$, 0.596 ± 0.23) (Figura 16B, página 120).

A análise comparativa entre células estimuladas e células não estimuladas revela que granulócitos estimulados apresentam redução na expressão de FcεRIα após 1 mês e 18 meses de tratamento ($p<0.0001$).

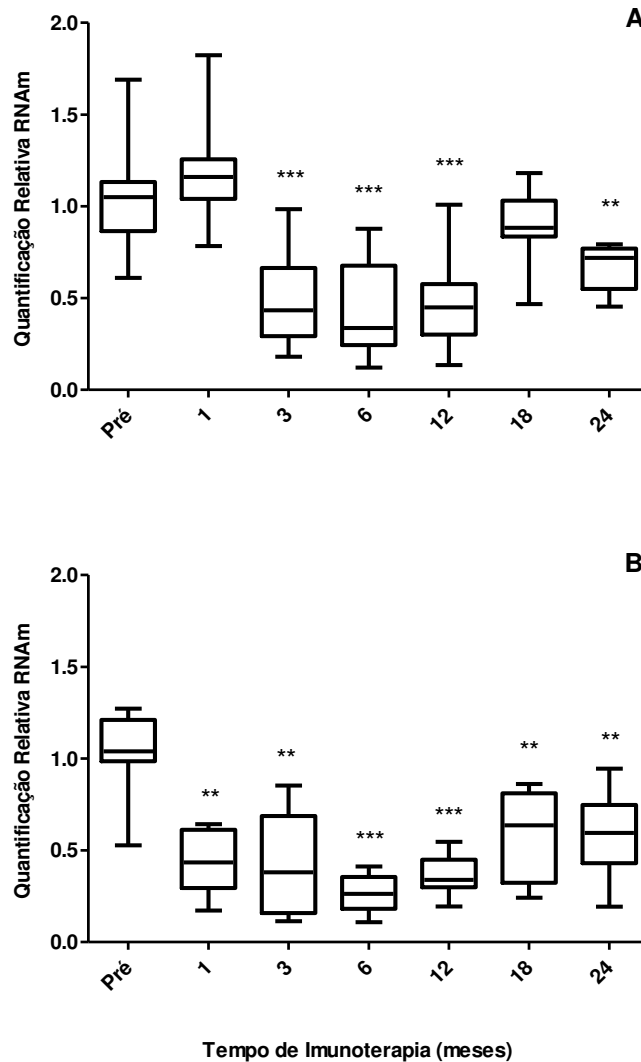


Figura 16 - Quantificação da expressão gênica de $Fc\epsilon RI\alpha$ em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

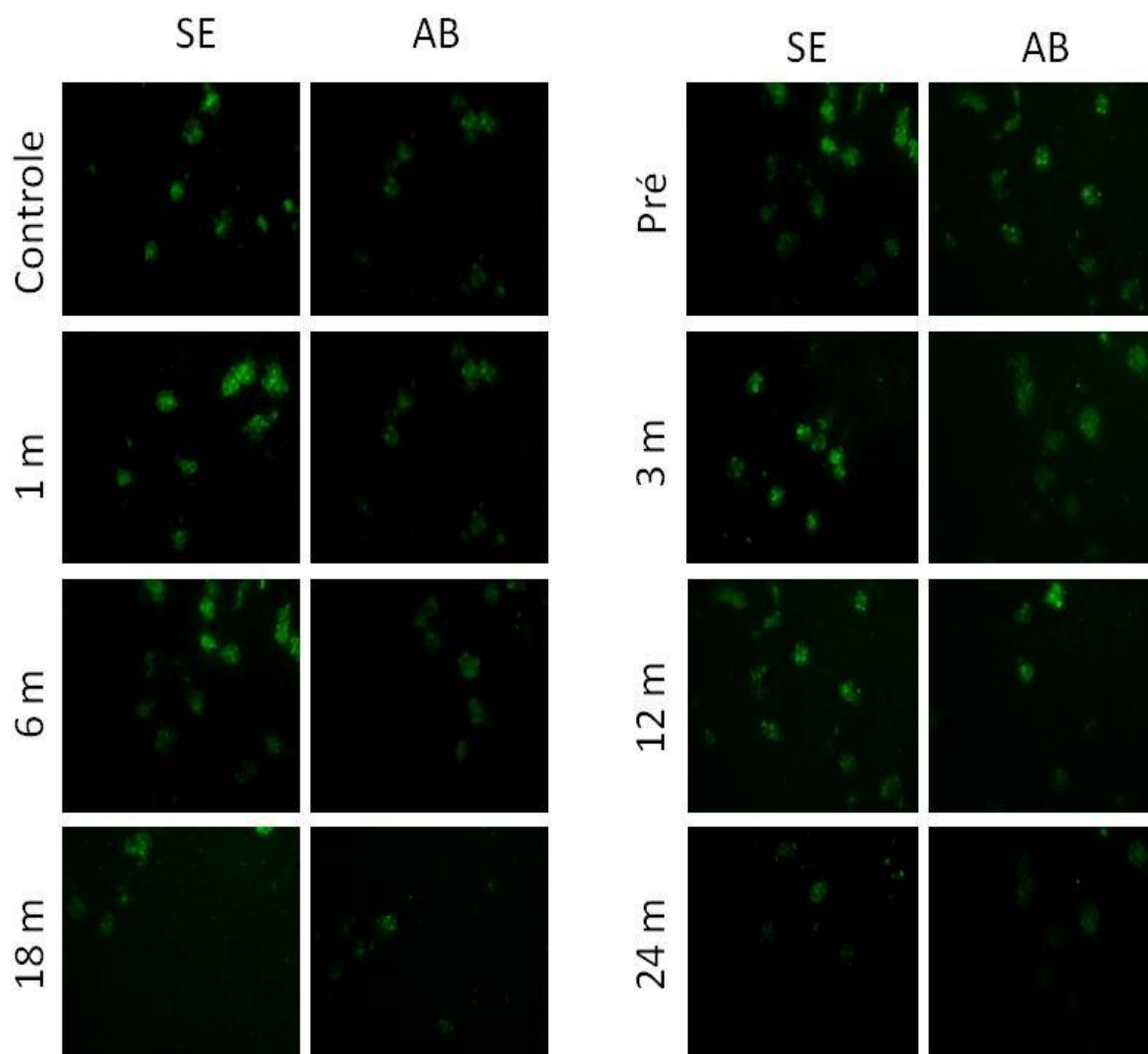
4.9.2. Expressão protéica de FcεRIα

Em granulócitos não estimulados com veneno de abelha, podemos observar que a imunoterapia foi capaz de modular significativamente a expressão protéica da cadeia α do receptor de alta afinidade de IgE apenas com 18 meses ($p < 0.001$; 17.92 ± 2.42) de tratamento quando comparado ao período pré-tratamento (26.84 ± 1.7), embora uma tendência à redução dos níveis desta cadeia já possa ser observada a partir do primeiro mês de tratamento

Por outro lado, células estimuladas com veneno de abelha já demonstram uma diminuição significativa na expressão protéica de FcεRIα em 1 ($p < 0.001$; 18.55 ± 2.36), 3 ($p < 0.05$; 23.00 ± 3.26), 12 ($p < 0.001$; 19.97 ± 2.89), 18 ($p < 0.05$; 22.58 ± 1.82) e 24 meses ($p < 0.001$; 21.47 ± 1.24) de imunoterapia em comparação a culturas pré-imunoterapia (29.48 ± 4.87).

Com base no estímulo de apitoxina em cultura, verificamos que granulócitos estimulados apresentam níveis protéicos mais elevados do que os apresentados por células não estimuladas, após 18 meses de imunoterapia ($p < 0.05$) (Prancha II, página 122; Figura 17, página 123).

PRANCHA II - Fotomicrografia representativa da microscopia por Imunofluorescência de granulócitos provenientes de cultura de 72 horas para detecção do fator de transcrição $Fc\epsilon R1\alpha$.



Aumento: 1000X

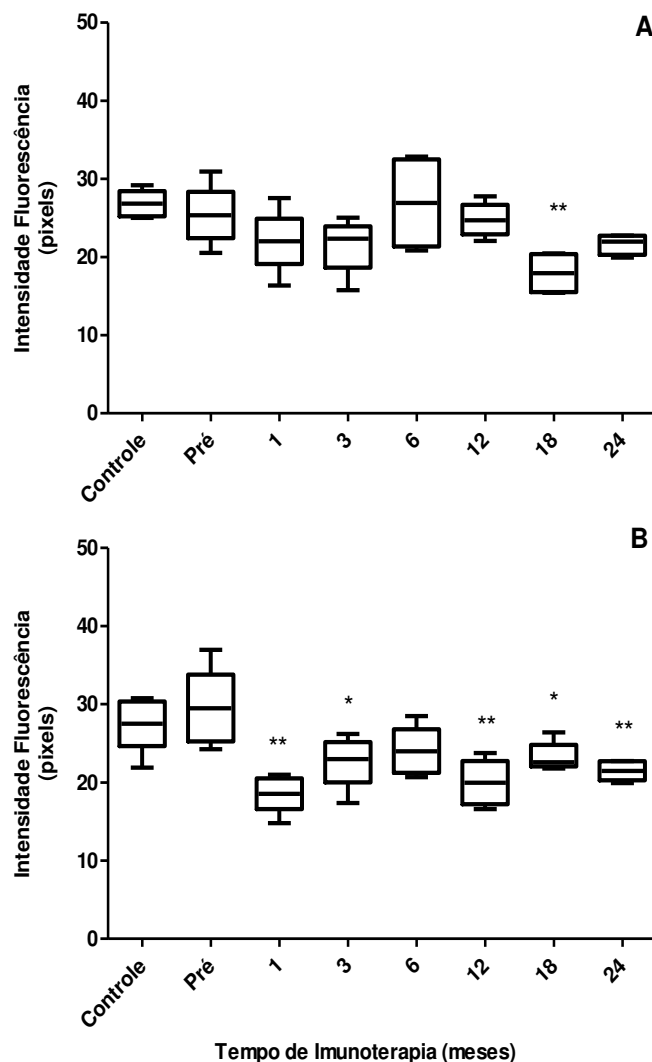


Figura 17 - Intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica de $FC\epsilon RI\alpha$ em granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional (**A**) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (**B**). Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.10. Expressão de FcεRIγ

4.10.1. Expressão Gênica de FcεRIγ

A imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de modular negativamente a expressão gênica de FcεRIγ em granulócitos não estimulados após 3 meses ($p<0.001$; 0.325 ± 0.02), 6 ($p<0.001$; 0.379 ± 0.17), 12 ($p<0.001$; 0.424 ± 0.14) e 24 ($p<0.05$; 0.762 ± 0.12) meses de tratamento em relação a granulócitos no período pré-tratamento (Figura 18A, página 125).

Entretanto, granulócitos que receberam estímulo adicional de apitoxina em cultura tiveram uma redução significativa na expressão gênica da cadeia γ em todos os períodos analisados: 1 mês ($p<0.001$; 0.289 ± 0.13), 3 ($p<0.001$; 0.488 ± 0.14), 6 ($p<0.001$; 0.662 ± 0.21), 12 ($p<0.0001$; 0.438 ± 0.16), 18 ($p<0.001$; 0.637 ± 0.26) e 24 meses ($p<0.001$; 0.702 ± 0.11) em comparação à células pré-imunoterapia (Figura 18B, página 125).

De maneira semelhante aos dados encontrados relativos à expressão gênica de FcεRIα, observamos que células estimuladas com veneno de abelha apresentam níveis de RNAm de FcεRIγ significativamente reduzidos após 1 e 18 meses de imunoterapia em comparação à células não estimuladas ($p<0.05$).

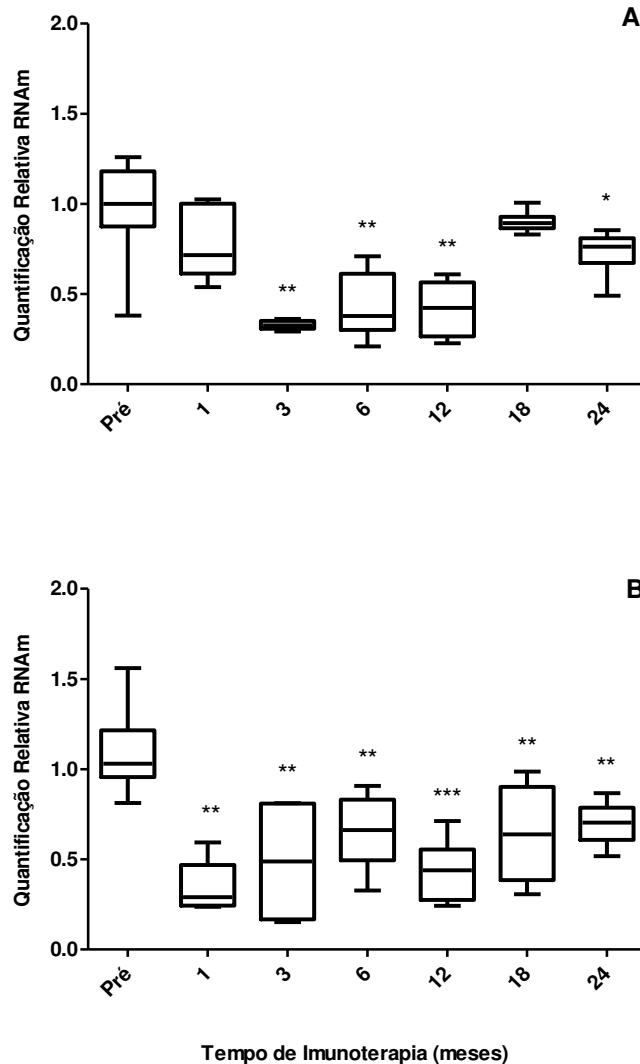


Figura 18 – Quantificação da expressão gênica de $Fc\epsilon R1\gamma$ em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

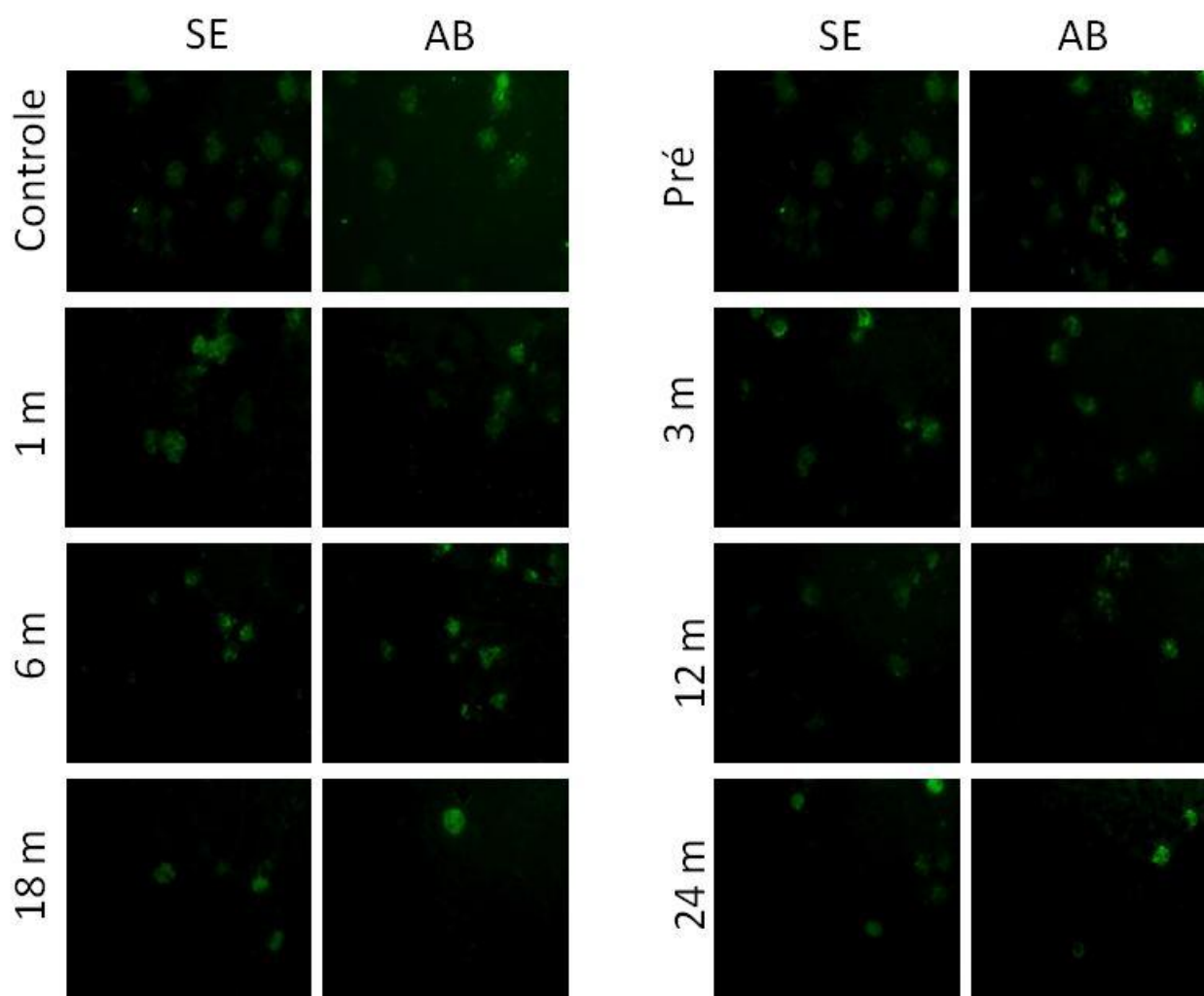
4.10.2. Expressão Protéica de FcεR1γ

A partir da análise dos resultados de imunofluorescência de FcεR1γ, podemos constatar que a imunoterapia específica foi capaz de modular a expressão protéica desta cadeia do receptor de alta afinidade de IgE. Especificamente, em células não estimuladas com veneno de abelha, em 1 (p<0.05; 16.83 ± 3.59), 3 (p<0.05; 23.43 ± 1.94), 12 (p<0.05; 23.58 ± 1.12) e 18 meses (p<0.05; 19.66 ± 3.05), podemos observar uma redução significativa nos níveis protéicos de FcεR1γ com relação a granulócitos pré-imunoterapia (25.84 ± 1.41).

Já em granulócitos que receberam estímulo adicional de veneno de abelha, esta diminuição significativa na expressão de cadeia γ foi observada logo após 1 mês (p<0.001; 17.96 ± 2.16) de tratamento, e em 3 (p<0.001; 20.20 ± 2.98), 12 (p<0.001; 26.13 ± 2.82), 18 (p<0.001; 17.95 ± 0.93) e 24 meses (p<0.001; 23.32 ± 2.03) quando comparados ao período pré-imunoterapia (34.29 ± 6.92). Verificamos ainda, que granulócitos de indivíduos saudáveis também apresentam expressão reduzida de FcεR1γ (p<0.001; 23.87 ± 3.5) em comparação à células pré-imunoterapia

Não encontramos diferenças significativas entre células não estimuladas e células estimuladas nos diferentes períodos analisados (Prancha III, página 127; Figura 19, página 128)

PRANCHA III - Fotomicrografia representativa da microscopia por Imunofluorescência de granulócitos provenientes de cultura de 72 horas para detecção do fator de transcrição FcεR1γ.



Aumento:1000x

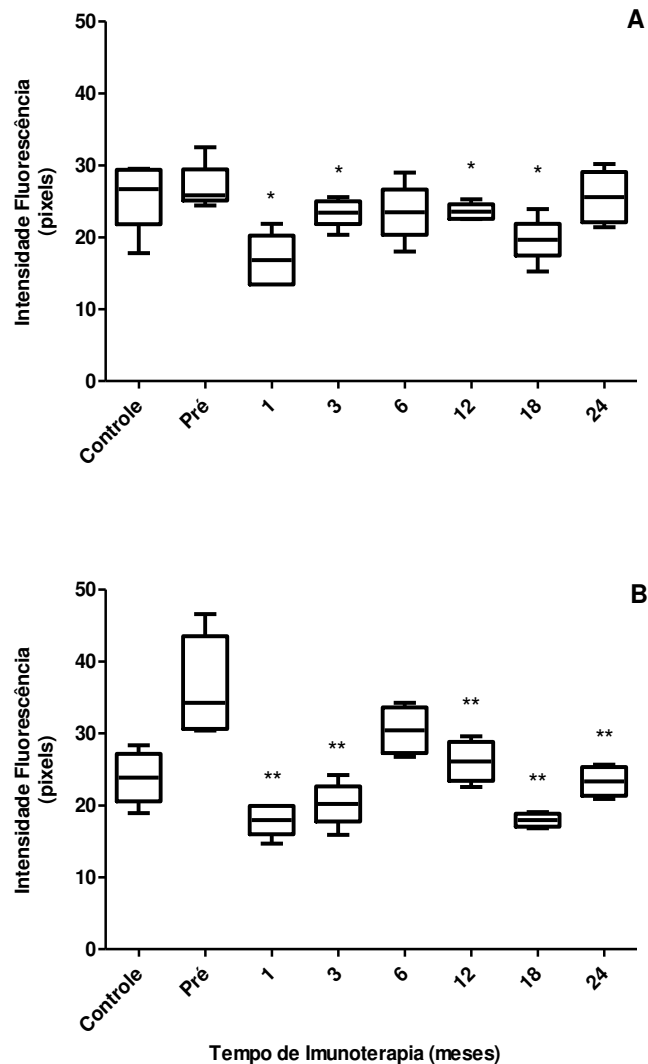


Figura 19 - Intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica de $Fc\epsilon R1\gamma$ em granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional (**A**) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (**B**). Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.11. Relação entre FcεRIα/FcεRIγ

A análise da relação FcεRIα versus FcεRIγ em nível gênico nos permite observar que o comportamento de granulócitos estimulados e não estimulados com apitoxina é o mesmo ao longo da imunoterapia; entretanto, células não estimuladas apresentam maiores níveis de RNAm. Após 6 meses de imunoterapia, granulócitos estimulados apresentam redução significativa nesta relação, indicando aumento na expressão gênica de FcεRIγ em comparação à FcεRIα (Figura 20A, página 130).

Quanto à expressão protéica das cadeias do receptor de alta afinidade de IgE, nossos resultados demonstram que em células não estimuladas temos aumento na relação FcεRIα/FcεRIγ após 1 mês de tratamento. Por outro lado, em granulócitos estimulados com apitoxina é possível observar este aumento aos 18 meses de imunoterapia específica, indicando, desta maneira, uma diminuição na expressão protéica de FcεRIγ em relação à FcεRIα (Figura 20B, página 130).

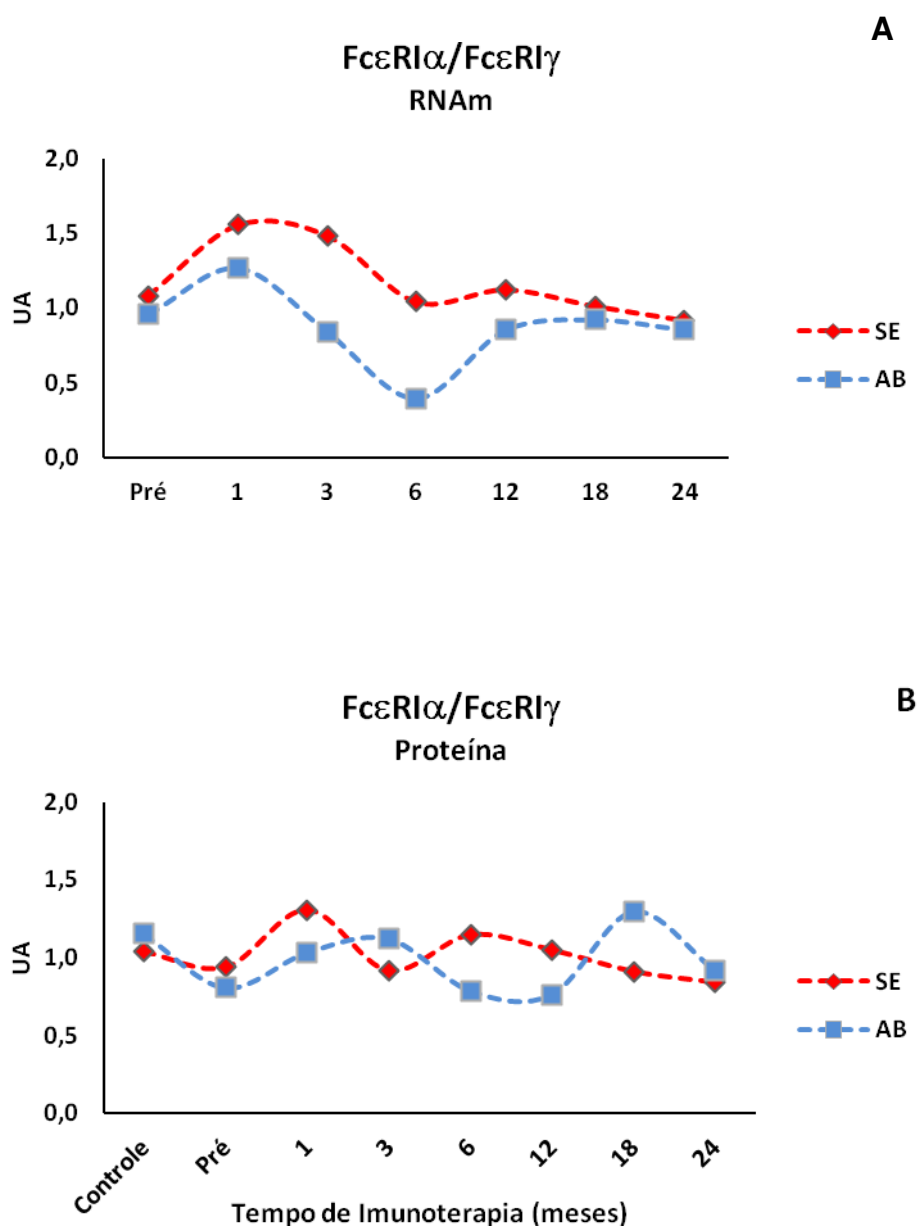


Figura 20 - Efeitos da imunoterapia específica sobre a relação entre FcεRIα e FcεRIγ de granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional ou estimuladas com veneno de abelha (AB).

4.12. Expressão de FcεRII ou CD23

4.12.1. Expressão Gênica de CD23

A análise dos resultados obtidos para expressão gênica de CD23 demonstra que em granulócitos não estimulados com veneno de abelha, a imunoterapia específica foi capaz de reduzir os níveis de RNAm deste receptor em 1 ($p<0.0001$; 0.758 ± 0.14), 3 ($p<0.0001$; 0.334 ± 0.09), 6 ($p<0.0001$; 0.317 ± 0.08), 12 ($p<0.0001$; 0.427 ± 0.05) e 24 meses ($p<0.0001$; 0.745 ± 0.09) após o início do tratamento em relação a granulócitos pré-imunoterapia (Figura 21A, página 132).

Por outro lado, granulócitos estimulados com veneno de abelha quando em cultura, apresentaram redução significativa na expressão de CD23 em todos os períodos analisados ($p<0.0001$; 1m – 0.614 ± 0.134 ; 3m – 0.151 ± 0.05 ; 6m – 0.202 ± 0.16 ; 12m – 0.310 ± 0.08 ; 18m – 0.348 ± 0.04 ; 24m – 0.291 ± 0.04) (Figura 21B, página 132).

Pode-se observar ainda, que ao compararmos células estimuladas e não estimuladas, verificamos uma diminuição na expressão gênica deste receptor em 3 ($p<0.05$), 12 ($p<0.05$), 18 ($p<0.0001$) e 24 meses ($p<0.0001$) após o início da imunoterapia, em células estimuladas com veneno de abelha em cultura.

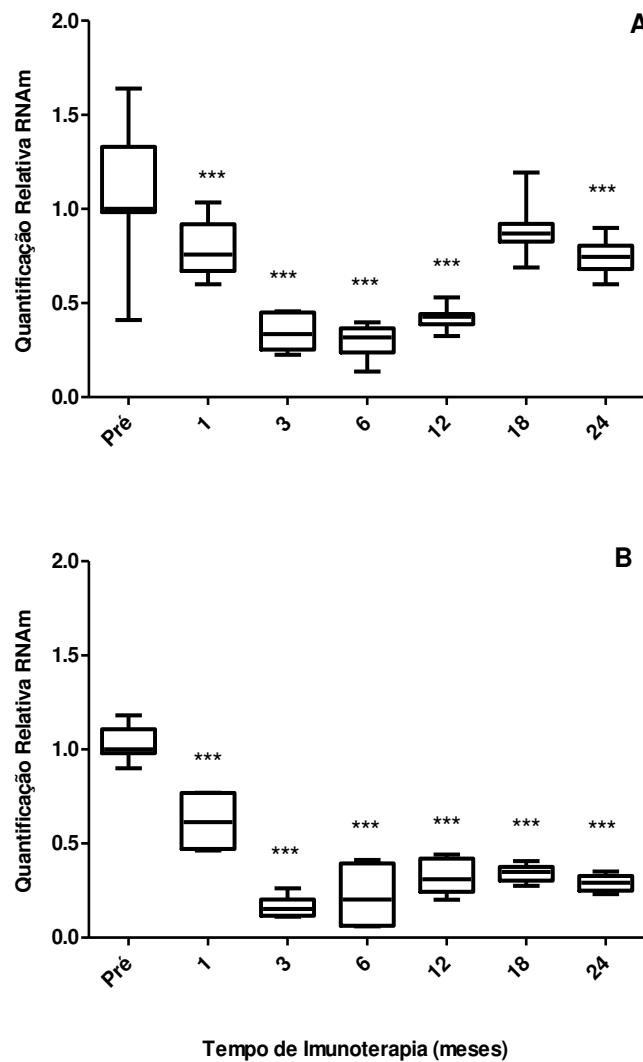


Figura 21 - Quantificação da expressão gênica de CD23 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento) em relação ao período pré-imunoterapia. Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 *p < 0.05.

4.12.2. Expressão Protéica de CD23

A partir dos resultados representados graficamente na figura 22A (página 134), podemos observar que não há diferença significativa na porcentagem de células que expressam o receptor de baixa afinidade para IgE ao longo da imunoterapia quando comparados a granulócitos pré-imunoterapia. Por outro lado, a o número de células de indivíduos não alérgicos ($6.63 \pm 1.1\%$) com expressão de CD23 foi significativamente menor em comparação à indivíduos alérgicos a apitoxina e submetidos à imunoterapia (Pré – $50.77 \pm 0.2\%$; 1m – $59.81 \pm 8.7\%$; 3m – $46.23 \pm 2.9\%$; 6m – $46.43 \pm 3.6\%$; 12m – $42.17 \pm 6.1\%$; 18m – $35.06 \pm 5.4\%$; 24m – $58.67 \pm 5.2\%$).

A intensidade média de fluorescência (IMF), que representa a densidade de receptores presentes na superfície das células, demonstra que a imunoterapia é capaz de modular significativamente a expressão do receptor de baixa afinidade de IgE em 6 meses ($p < 0.001$; 4330 ± 608.5), 12 ($p < 0.05$; 5485 ± 566.8), 18 ($p < 0.05$; 5095 ± 469.5) e 24 meses ($p < 0.001$; 3092 ± 595.0) em comparação a granulócitos pré-imunoterapia (6527 ± 861.2).

Granulócitos provenientes de indivíduos não alérgicos apresentam expressão reduzida de CD23 ($p < 0.0001$; 6.63 ± 3.3) em comparação à pacientes pré-imunoterapia (Figura 22B e 22C, página 134).

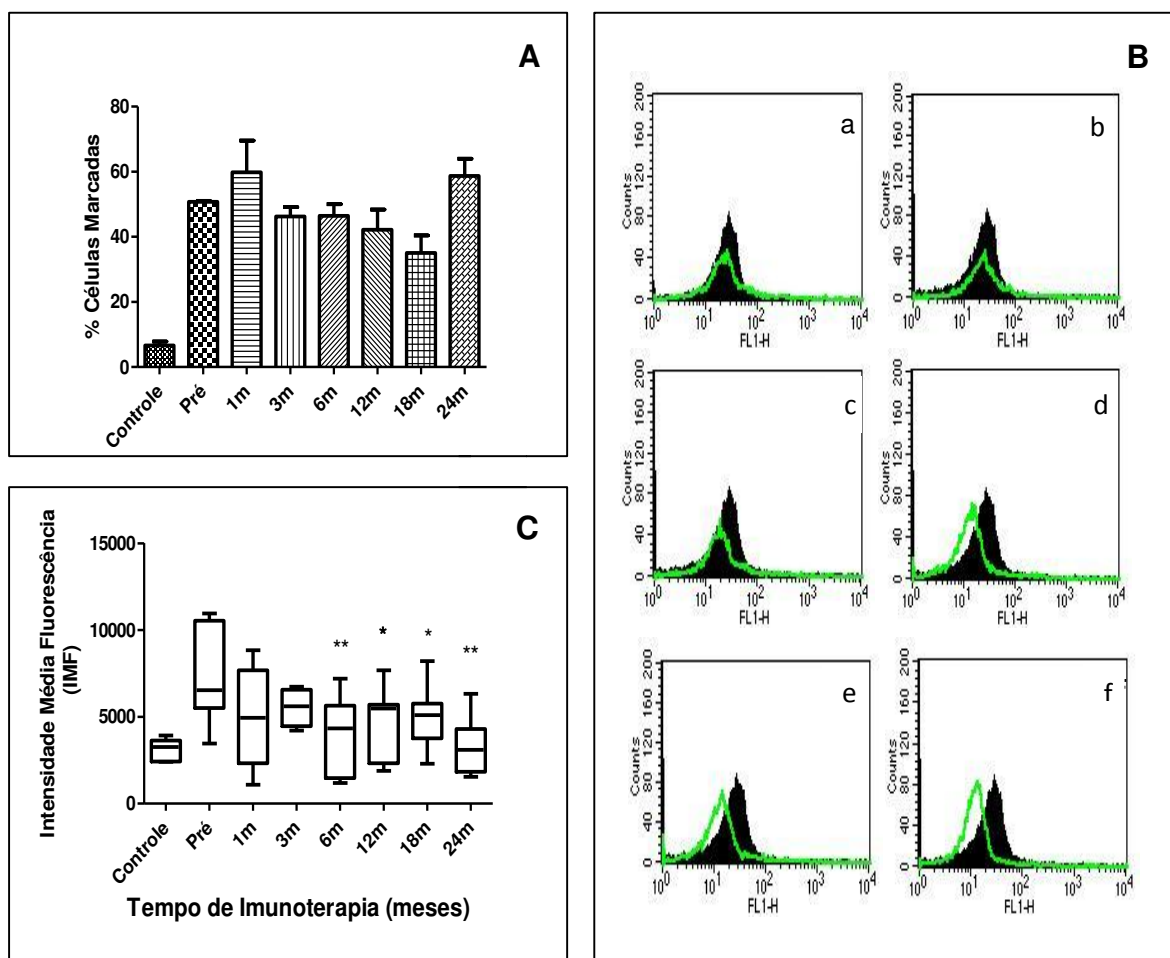


Figura 22 – Análise de CD23 por citometria de fluxo em granulócitos isolados de indivíduos não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Porcentagem de células marcadas. Dados expressos como média ± SEM **(A)**. Histogramas representativos da expressão de CD23 1 (a), 3 (b), 6 (c), 12 (d), 18 (e) e 24 (f) meses após início do tratamento (traço verde) em overlay com o período pré-imunoterapia (preto) **(B)**. Intensidade média de fluorescência(IMF). **(C)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 e *p < 0.05.

4.13. Secreção de RANTES

Os resultados para a secreção da quimiocina RANTES avaliada através da técnica de Elisa, demonstram que a imunoterapia foi capaz de reduzir os níveis desta quimiocina em sobrenadantes de culturas de granulócitos não estimulados em 1 ($p<0.001$; 0.08 ± 0.02), 3 ($p<0.05$; 0.141 ± 0.05) e 24 meses ($p<0.0001$; 0.06 ± 0.02) após o início do tratamento em comparação à células pré-imunoterapia (0.205 ± 0.06) (Figura 23A, página 136).

Já em granulócitos que receberam estímulo adicional de apitoxina, além de 1 ($p<0.001$; 0.135 ± 0.04), 3 ($p<0.05$; 0.187 ± 0.05) e 24 meses ($p<0.0001$; 0.09 ± 0.02), esta modulação também pode ser observada em 6 ($p<0.001$; 0.142 ± 0.03) e 12 meses ($p<0.05$; 0.172 ± 0.05) de tratamento quando comparados a células que ainda não receberam imunoterapia específica para o veneno de abelha (0.277 ± 0.04). Verificamos ainda que células de indivíduos do grupo controle apresentam níveis de RANTES significativamente reduzidos ($p<0.05$; 0.21 ± 0.03) em comparação à células pré-imunoterapia (Figura 23B, página 136).

Entre células estimuladas e não estimuladas, verificamos que há um aumento na secreção de RANTES em células estimuladas com veneno de abelha no período pré-imunoterapia ($p<0.001$) e em 1 ($p<0.05$), 3 ($p<0.05$) e 24 meses ($p<0.001$) em comparação à granulócitos não estimulados.

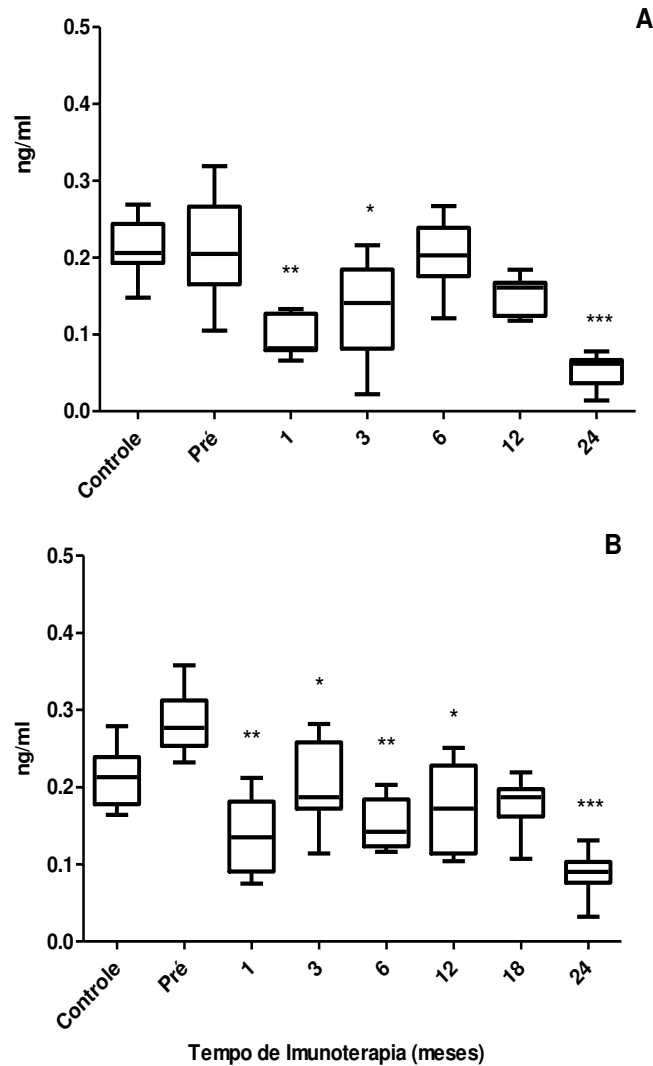


Figura 23 – Dosagem de RANTES em sobrenadantes de culturas de granulócitos isolados de indivíduos sadios não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$ e * $p < 0.05$.

4.14. Secreção de IL-8

A secreção de IL-8 avaliada no sobrenadante de culturas de granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, foi reduzida significativamente já no primeiro mês de tratamento (SE – $p < 0.001$, 1.115 ± 0.26 ; AB – $p < 0.0001$, 1.237 ± 0.15) assim como em 3 (SE – $p < 0.0001$, 0.507 ± 0.07 ; AB - $p < 0.0001$, 0.580 ± 0.05), 12 (SE - $p < 0.0001$, 0.485 ± 0.04 ; AB - $p < 0.0001$, 0.686 ± 0.06), 18 (SE - $p < 0.0001$, 0.495 ± 0.07 ; AB - $p < 0.0001$, 0.841 ± 0.15) e 24 meses (SE – $p < 0.0001$, 0.452 ± 0.06 ; AB - $p < 0.0001$, 0.388 ± 0.03), tanto em células não estimuladas quanto em células estimuladas com apitoxina em culturas de 72h, quando comparadas a granulócitos do período pré-imunoterapia (SE – 3.199 ± 0.48 ; AB – 3.818 ± 0.69).

Granulócitos de indivíduos não alérgicos apresentam níveis de IL-8 significativamente reduzidos em comparação à pacientes pré-imunoterapia, tanto em células não estimuladas ($p < 0.0001$; 1.93 ± 0.03) quanto em células estimuladas ($p < 0.05$; 1.79 ± 0.2).

Não observamos diferenças significativas na secreção de IL-8 entre células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha, nos diferentes períodos analisados (Figura 24, página 138).

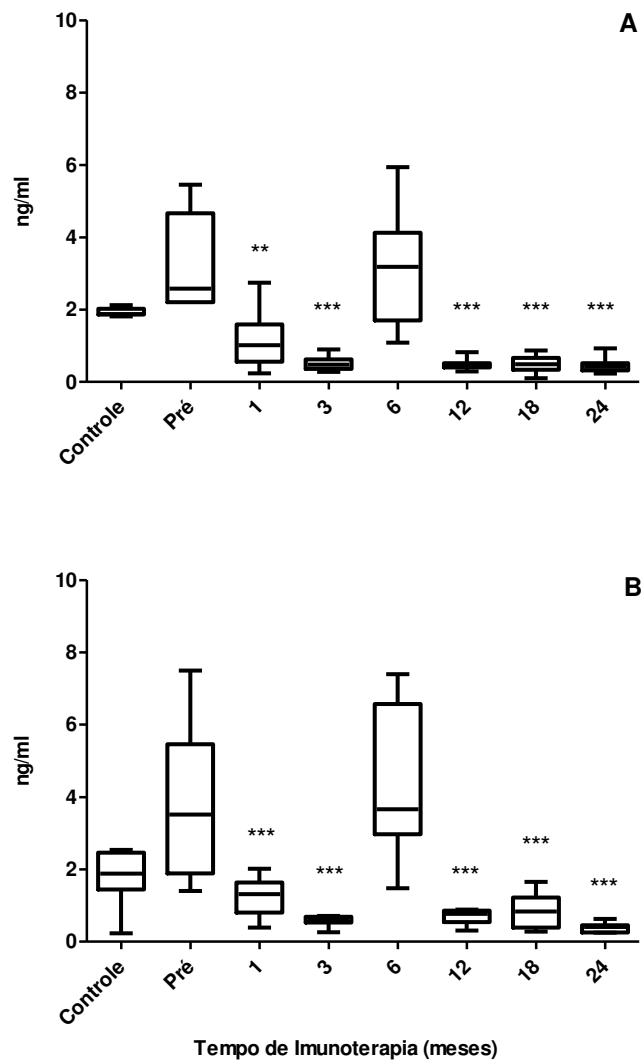


Figura 24 - Dosagem de IL-8 em sobrenadantes de culturas de granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional (**A**) ou estimuladas com veneno de abelha (AB) (**B**). Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 e *p < 0.05.

4.15. Expressão Gênica de Fatores Pró e Anti – Apoptóticos

Para verificar se a modulação decorrente da imunoterapia específica sobre os diversos fatores analisados, seria um resultado da apoptose de eosinófilos, decidimos avaliar fatores pró-apoptóticos (BID) e anti-apoptóticos (BCL-2) bem como quantificar granulócitos em apoptose por meio da técnica de TUNEL.

4.15.1. Expressão Gênica de BID

Conforme representado graficamente na Figura 25 (página 141), a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de aumentar significativamente a expressão gênica de BID ao longo do tratamento. Em culturas de granulócitos não estimuladas e estimuladas com apitoxina, este aumento é significativo em 1 (SE – $p < 0.05$; 76.15 ± 8.45 ; AB – 53.11 ± 4.14), 12 ($p < 0.0001$; SE - 169.1 ± 25.85 ; AB – 194.2 ± 29.64), 18 ($p < 0.0001$; SE - 208.3 ± 23.10 ; AB – 395.9 ± 45.49) e 24 meses ($p < 0.0001$; SE – 385.7 ± 49.28 ; AB – 886.3 ± 139.2) após o início da terapia de dessensibilização, em comparação ao período pré-imunoterapia (SE – 65.79 ± 5.63 ; AB – 44.34 ± 4.46). Granulócitos estimulados, adicionalmente, também apresentam um aumento significativo na expressão deste fator, com 6 meses de tratamento ($p < 0.0001$; 116.9 ± 5.11).

Entretanto, em culturas não estimuladas temos uma redução significativa na expressão gênica de BID em 3 ($p < 0.0001$; 38.02 ± 2.04) e 6 meses ($p < 0.05$; 49.33 ± 5.48) de imunoterapia específica em relação a granulócitos pré-imunoterapia.

Esta diminuição em 3 meses, embora não significativa, também pode ser observada em células estimuladas com veneno de abelha.

A expressão gênica de BID é aumentada em granulócitos estimulados com veneno de abelha nos indivíduos saudáveis e em pacientes submetidos à imunoterapia específica após 6 meses, 18 e 24 meses de tratamento ($p < 0.001$), em comparação à células não estimuladas nos respectivos períodos de análise.

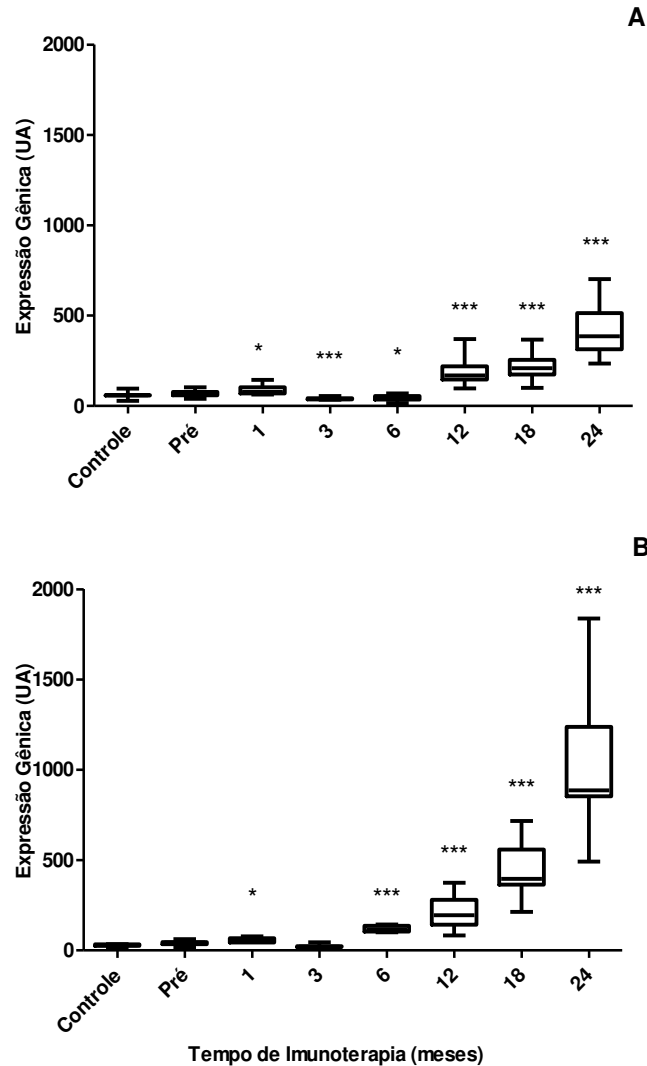


Figura 25 - Análise semi-quantitativa da expressão gênica de BID. Granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 e *p < 0.05.

4.15.2. Expressão Gênica de Bcl-2

Os resultados de expressão gênica de Bcl-2, família de proteínas com propriedades anti-apoptóticas, demonstram um aumento significativo nos níveis de RNAm de Bcl-2 em 3 ($p < 0.001$; SE – 252.2 ± 71.5 ; AB – 253.5 ± 66.1) e 6 meses (SE – $p < 0.05$, 204.8 ± 89.16 ; AB – $p < 0.001$, 267.3 ± 67.6) tanto em granulócitos não estimulados quanto em granulócitos estimulados com apitoxina.

Por outro lado, pode-se observar que ao final do período analisado a expressão deste fator anti-apoptótico é significativamente reduzida em ambas culturas de granulócitos ($p < 0.0001$; SE – 35.8 ± 4.8 ; AB – 60.4 ± 13.4) em comparação a granulócitos pré-imunoterapia (SE – 132.0 ± 53.1 ; AB – 137.3 ± 22.3).

Não há diferenças estatísticas entre células não estimuladas e células estimuladas com apitoxina nos diferentes períodos analisados (Figura 26, página 143).

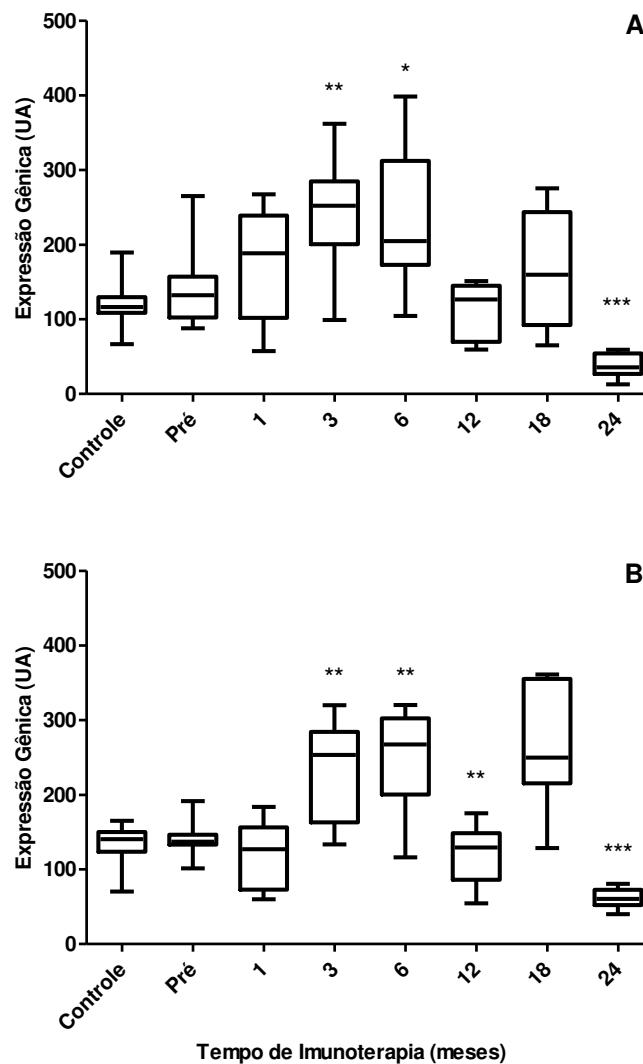


Figura 26 - Análise semi-quantitativa da expressão gênica de Bcl-2. Granulócitos isolados de indivíduos saudáveis não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**. Análise estatística baseada no ANOVA, seguida pelo teste Mann-Whitney, onde ***p<0.0001; **p<0.001 e *p < 0.05.

4.16. Detecção de Apoptose In Situ

Utilizando a técnica de Tunel, é possível verificar que apenas em 1 mês de imunoterapia específica há um aumento significativo na apoptose de granulócitos não estimulados (Figura 27A, página 145).

Por outro lado, como demonstrado graficamente na figura 27B (página 145), culturas estimuladas com apitoxina apresentam aumento no número de granulócitos em apoptose após 1 e 3 meses de imunoterapia específica quando comparado a culturas de granulócitos pré-tratamento.

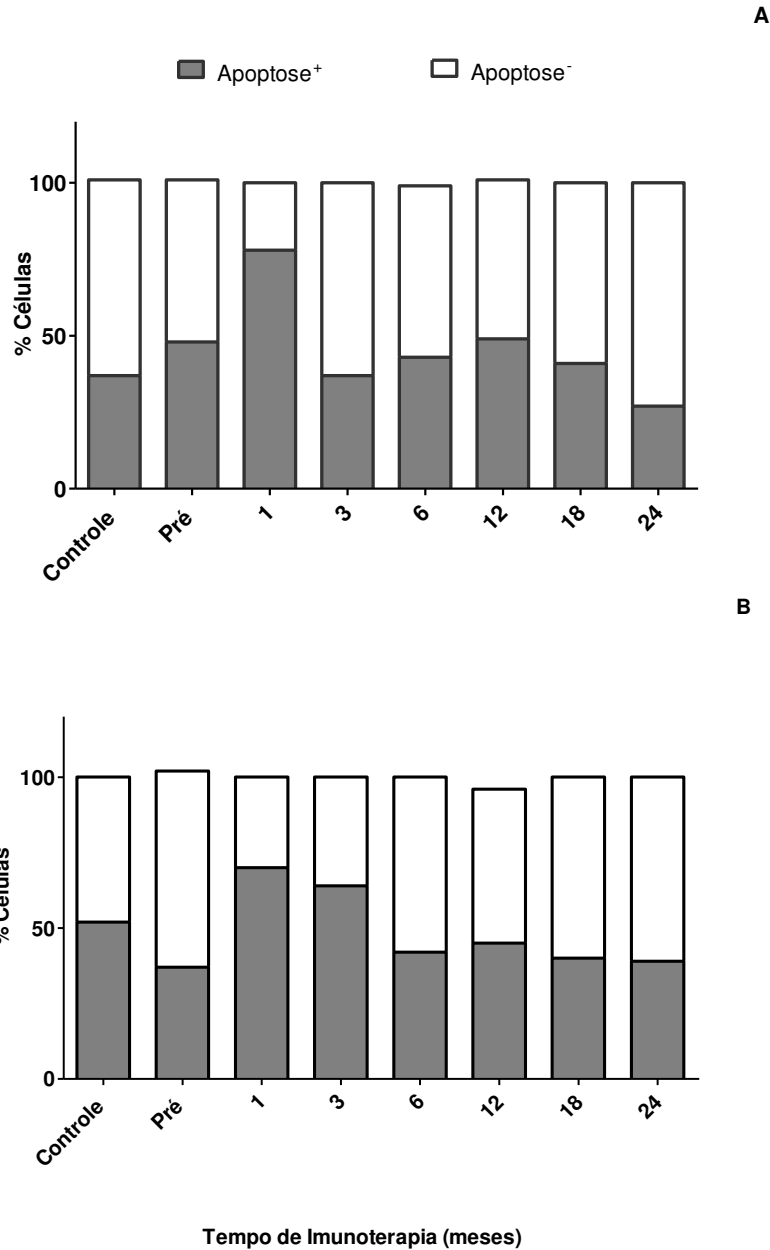


Figura 27 - Quantificação de granulócitos apoptóticos isolados de indivíduos não alérgicos (controle; n=5) e de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* (n=11) e submetidos à imunoterapia específica (pré, 1, 3, 6, 12, 18 e 24 meses após início do tratamento). Culturas de 72h sem estímulo (SE) adicional **(A)** ou estimuladas com veneno de abelha (AB) **(B)**.



5 - DISCUSSÃO

Em decorrência do veneno, ferroadas de himenópteros podem causar reações alérgicas sistêmicas graves e, ocasionalmente, reações anafiláticas fatais [93]. Os últimos dados epidemiológicos confirmam a importância e relevância de alergias a ferroadas de inseto como causa de anafilaxia. A prevalência de reações sistêmicas em resposta à picada de himenópteros tem sido o objetivo de diferentes estudos. Nos Estados Unidos, o desenvolvimento de reações sistêmicas frente à ferroadada de inseto atinge cerca de 0.5 a 3.3% da população adulta [134]. Na Europa, estudos epidemiológicos apontam que 0.3 a 7.5% da população apresentam este tipo de reação [84].

A imunoterapia específica é utilizada há 100 anos como a única terapia de dessensibilização a alérgenos nas doenças alérgicas com alto potencial de cura, sendo considerada como o único tratamento capaz de gerar tolerância a longo prazo. A especificidade ao alérgeno é crucial para o entendimento dos benefícios da imunoterapia e de seus mecanismos, os quais estão sendo lentamente elucidados [135]. Em 1911, o estudo original de Noon sugeriu que extratos de pólen, utilizados na imunoterapia para febre do feno, induziriam uma toxina responsável pelo aparecimento dos sintomas alérgicos. Os autores sugeriram que em resposta à injeção de extrato de pólen, o organismo desenvolvia anti-toxinas, prevenindo, então, o desenvolvimento da doença. Mais tarde, estudos de Cooke [136] e Lichtenstein [137] demonstrariam a geração de anticorpos neutralizantes, como IgG e sobretudo, IgG4, durante a imunoterapia. Posteriormente, o conhecimento de que linfócitos T ativados e seus produtos teriam papéis importantes na patogênese de doenças alérgicas fez com que linfócitos T

alérgeno-específicos fossem considerados como o principal alvo da imunoterapia [138, 139]. O sucesso da imunoterapia foi então associado à mudança no padrão de citocinas produzido, de Th2 para Th1 [140], e ainda, à indução de linfócitos T reguladores (Tregs), com propriedades imunossupressoras e perfil de citocinas distinto de linfócitos Th1 e Th2, com aumento na produção de IL-10 e TGF- β [141-143].

Neste contexto, granulócitos são células efetoras importantes na fase tardia da resposta alérgica e estão envolvidos na patogênese de diferentes doenças [144]. Sabe-se que a atividade destas células pode ser modulada por mediadores liberados na degranulação de mastócitos, especialmente a histamina [145].

Em geral, o efeito da histamina sobre granulócitos é complexo, podendo ser estimulatório ou inibitório. Os receptores H1 são geralmente estimulatórios [146], mediando a produção de ions superóxido [145], produção de quimiocinas [147] e expressão de receptores C3b [148]. Nossos resultados demonstram que a imunoterapia específica é capaz de modular a expressão de H1 em granulócitos não estimulados ou estimulados com veneno de abelha, reduzindo os níveis de RNAm deste receptor logo no primeiro mês de tratamento e ao final do período analisado. Podemos verificar, ainda, que indivíduos alérgicos ao veneno de abelha e não submetidos à imunoterapia (pré-imunoterapia) possuem expressão mais elevada de H1 do que indivíduos não alérgicos, sugerindo padrão diferencial de expressão gênica deste receptor nas duas populações estudadas. Jutel e colaboradores [135] verificaram que a imunoterapia ultra-rápida, que atinge a dose

de manutenção em poucas horas, é capaz de modular a expressão de H1 em células linfomononucleares. Entretanto, não há dados na literatura que relacionem a expressão deste receptor em granulócitos à imunoterapia específica.

Por outro lado, os receptores H2 são geralmente inibitórios [146], com participação na indução de tolerância periférica ou supressão ativa de respostas inflamatórias [135]. São capazes, ainda, de regular negativamente a liberação de histamina de mastócitos e basófilos [149]. No presente trabalho, podemos verificar um aumento na expressão gênica deste receptor em 3, 6 e 12 meses de imunoterapia quando comparados a granulócitos no período pré-imunoterapia. Podemos observar ainda, com exceção do período de 12 meses, que ao longo da imunoterapia tem-se um aumento nos níveis de RNAm de H2 em comparação a indivíduos não alérgicos. Como demonstrado por Ezeamuzie e colaboradores [150], a histamina, via estimulação de receptores H2 e conseqüente elevação nos níveis intracelulares de AMP cíclico, é capaz de inibir a degranulação de eosinófilos, bem como, inibir a liberação de enzimas, espécies reativas de oxigênio e adesão de neutrófilos [151-154]. Outros trabalhos sugerem ainda, que a ativação de H2 em eosinófilos e neutrófilos, resulta na inibição da quimiotaxia destas células, induzindo dentro deste contexto, a inibição da biossíntese de leucotrienos, potentes quimioatrativos e ativadores destas células [147, 155-157]. Porém, não foram encontrados dados na literatura que demonstrem o comportamento deste receptor durante a imunoterapia específica.

O H4 está principalmente envolvido no recrutamento e ativação de células que participam na resposta inflamatória, como eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos T e células dendríticas [158-160]. Além disso, H4 desempenha papel importante na regulação de algumas funções do sistema imunológico, incluindo a quimiotaxia e secreção de citocinas [161-163]. A expressão de H4 em eosinófilos, mastócitos, basófilos e células dendríticas aponta a participação deste receptor na resposta alérgica. Durante a fase de sensibilização, células dendríticas capturam antígenos e migram para o linfonodo drenante para a ativação de linfócitos T. A histamina liberada de mastócitos pode afetar as funções das células dendríticas via H4 e influenciar a ativação dos linfócitos T. Em encontros subseqüentes com o alérgeno, a exposição de mastócitos a este antígeno leva à degranulação destas células com conseqüente liberação da histamina. A histamina, então, ativando receptores do subtipo 4, pode favorecer o acúmulo de mastócitos no local inflamatório e recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, estabelecendo a fase tardia da resposta alérgica [160, 164].

Em resposta à histamina, eosinófilos modificam sua forma celular, aumentam a expressão de moléculas de adesão em sua superfície e, conseqüentemente, sua capacidade migratória. Utilizando um antagonista específico para H4, Ling e colaboradores [160] demonstraram definitivamente que todos estes efeitos da histamina sobre eosinófilos são mediados pelo receptor 4 de histamina.

Nossos resultados demonstram que a imunoterapia específica foi capaz de reduzir significativamente a expressão gênica de H4 em granulócitos não estimulados ou estimulados com apitoxina após 1, 6 e 24 meses de tratamento em comparação a pacientes pré-imunoterapia. Podemos observar, ainda, que os níveis de RNAm encontrados para estes períodos foram equivalentes aos encontrados em granulócitos de voluntários sadios.

Os resultados encontrados para a expressão gênica dos receptores de histamina em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica fazem parte do conjunto de alterações encontradas na VIT. Adicionalmente, é possível que os efeitos desencadeados pela histamina possam ser consequência do balanço entre as sinalizações estimulatórias e inibitórias, decorrentes da diversidade e abundância de receptores expressos na superfície celular e que serão ativados pelo mediador.

A liberação da histamina é influenciada por diversos fatores, chamados de fatores de liberação de histamina (HRF). Alguns destes fatores são independentes, outros, dependentes de IgE. O primeiro grupo é formado por quimiocinas como MCP-1, RANTES e MIP-1 α , enquanto o segundo é composto por um conjunto de fatores que promovem a liberação de histamina na presença de IgE [57]. O grupo de fatores de liberação de histamina avaliado neste estudo é dependente de IgE (HRF-IgE) e foi identificado e caracterizado por MacDonald e colaboradores [165]. Nossos resultados mostraram que, tanto em células não estimuladas como naquelas estimuladas com veneno de abelha, pacientes pré-

imunoterapia apresentam expressão gênica de HRF em níveis mais elevados que indivíduos não alérgicos, sugerindo diferentes padrões de expressão entre esses dois grupos de indivíduos. Adicionalmente, os valores observados para pacientes pré-tratamento foram maiores que aqueles obtidos após 1, 6, 12, 18 e 24 meses de tratamento. Estes resultados são ainda mais evidentes em granulócitos que receberam estímulo adicional de apitoxina em cultura. Assim, nossos resultados indicam que a imunoterapia reduz significativamente os níveis de RNAm dos fatores de liberação de histamina. Além disso, podemos verificar que os níveis de IgE específica para o veneno de abelha diminuíram no decorrer da imunoterapia. Uma vez que este HRF analisado pertence ao grupo de fatores dependentes de IgE, a redução nos níveis de expressão gênica encontrada no presente trabalho poderia estar relacionada com a diminuição nos níveis de IgE.

O processo que leva ao comprometimento de linhagens celulares a partir de células progenitoras multipotentes é controlado por diferentes fatores de transcrição, capazes de ativar a expressão de genes envolvidos e inativar a expressão de outros, de maneira a conduzir à diferenciação de diferentes tipos celulares [166]. Células mielóides maduras incluem monócitos/macrófagos e granulócitos que se diferenciam a partir de um progenitor mielóide comum (CMP) proveniente de células hematopoiéticas pluripotentes, que origina precursores denominados granulócitos/monócitos (GMP). Diversos modelos de *knockouts* murinos revelaram que o desenvolvimento e diferenciação destas células são controlados por diferentes fatores de transcrição e, dentre eles PU.1, família C/EBP e fatores do tipo GATA [27, 167].

Os promotores restritos ao GMP são regulados pelos fatores de transcrição PU.1 e/ou C/EBP α [27]. Estes fatores cooperam na regulação de genes codificantes de receptores de fatores de crescimento mielóides (CSFR), como M-CSFR, G-CSFR, e GM-CSFR [27, 168]. Estes receptores influenciam a sobrevivência, proliferação, maturação e capacidade funcional das células [169].

Em camundongos PU.1-deficientes, todas as células mielomonocíticas são ausentes. A deleção condicional de PU.1 na medula óssea de adultos leva à perda completa de CMPs e GMPs [170, 171]. Camundongos deficientes em C/EBP α não desenvolvem neutrófilos e eosinófilos; a inativação condicional na medula óssea reduz o número de CMPs e leva à ausência específica de GMPs, fazendo com que ocorra diminuição na formação das linhagens celulares subseqüentes [172].

No presente trabalho, analisamos a expressão gênica destes dois fatores de transcrição envolvidos no comprometimento de linhagens granulocíticas e, portanto, de neutrófilos e eosinófilos. Os dados de expressão gênica de PU.1 em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia demonstram que o tratamento foi capaz de reduzir os níveis gênicos deste fator de transcrição, tanto em células estimuladas quanto em células não estimuladas com apitoxina em cultura. Entretanto, quanto à expressão gênica de C/EBP α , podemos observar que células que receberam estímulo adicional de apitoxina em cultura, apresentam uma tendência a redução nos níveis de RNAm deste fator de transcrição já no primeiro mês de tratamento. Ao final do período analisado, ou seja, aos 24 meses, podemos observar que a expressão de

C/EBP α torna-se mais homogênea, tanto em granulócitos não estimulados, quanto em granulócitos estimulados com veneno de abelha em cultura.

Dahl e colaboradores [173] demonstraram que a atividade diferencial de PU.1 pode direcionar a diferenciação de células durante a hematopoiese. Assim, o aumento na expressão gênica deste fator de transcrição permite o desenvolvimento de progenitores de macrófagos; por outro lado, a diminuição na expressão de PU.1 aumenta o desenvolvimento de progenitores de granulócitos. C/EBP α é capaz de antagonizar a atividade transcricional de PU.1, diminuindo a expressão deste fator a níveis inferiores ao necessário para induzir a diferenciação de macrófagos. Paradoxalmente, ambos, C/EBP α e PU.1, são requeridos para o desenvolvimento de granulócitos e de muitos outros genes ligados à diferenciação mielóide [27]. Citocinas também são capazes de regular a relação entre fatores de transcrição e, particularmente, G-CSF pode direcionar a diferenciação granulocítica modificando a relação entre C/EBP α e PU.1. Assim, estes resultados demonstram que citocinas também participam na determinação do destino celular, modulando a expressão de fatores de transcrição linhagem-específicos.

Eosinófilos se desenvolvem a partir de células progenitoras na medula óssea sob o controle de citocinas como IL-3, GM-CSF e IL-5. Nas doenças alérgicas, eosinófilos são especificamente recrutados para o local inflamatório através do aumento da expressão de moléculas de adesão e de moléculas quimioatrativas; na medula óssea ocorre um aumento na produção destas células. Fatores do tipo GATA compreendem uma família de fatores de transcrição cujos membros compartilham um domínio conservado do tipo *zinc finger*. Dentre os seis

membros existentes, GATA-1, GATA-2 e GATA-3 desempenham importantes papéis nos sistemas imunológico e hematopoiético, especialmente no desenvolvimento de células eritróides, células progenitoras e linfócitos Th2, respectivamente [174-178]. Hirasawa e colaboradores [23] demonstraram que GATA-1 promove o comprometimento de eosinófilos a partir de células progenitoras mielóides e ainda suporta sua diferenciação terminal. Desta maneira, GATA-1 é um fator regulador essencial para o desenvolvimento de eosinófilos.

A análise da expressão gênica e protéica em granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica demonstra que esta ferramenta para dessensibilização é capaz de reduzir significativamente a expressão de GATA-1 nestas células, ao final do período analisado. Assim, uma vez que mastócitos e eosinófilos são em grande parte responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da resposta alérgica, e que GATA-1 é predominantemente expresso nestas células no local inflamatório, Hirasawa sugere que este fator de transcrição pode vir a ser um alvo terapêutico para o tratamento local da alergia [23]. Nossos resultados corroboram esta observação.

Já é bem estabelecido que o processo de diferenciação de neutrófilos é regulado por diferentes fatores de transcrição durante todo o desenvolvimento e amadurecimento da célula (Figura 1) e, Borregaard e colaboradores [26] demonstraram que em neutrófilos mais maduros há grande expressão de C/EBP β . Estudos utilizando camundongos deficientes em C/EBP β demonstram que estes animais perdem a capacidade de produzir neutrófilos em situação de emergência em resposta a citocinas e/ou infecção [179]. Outra característica marcante

proveniente desta deficiência é a capacidade aumentada destes neutrófilos sofrerem apoptose [180]. Desta maneira, estes achados sugerem que C/EBP β está essencialmente envolvido na produção e sobrevivência de neutrófilos.

Nós verificamos que a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de reduzir significativamente a expressão gênica de C/EBP β em culturas de granulócitos estimulados com apitoxina. Portanto, estes resultados indicam que esta forma de tratamento também é capaz de modular este fator de transcrição envolvido especificamente na diferenciação de neutrófilos, reforçando a importância destas células no desenvolvimento de respostas inflamatórias e alérgicas, aspecto pouco explorado até o momento, principalmente no desenvolvimento de hipersensibilidade ao veneno de himenópteros.

O receptor de alta afinidade de IgE (Fc ϵ RI) pode ser encontrado, em humanos, na forma de tetrâmero, formado pela junção das cadeias $\alpha\beta\gamma_2$, ou trímero, composto apenas pela combinação $\alpha\gamma_2$. A cadeia α possui dois domínios extracelulares imunoglobulina-relacionados que ligam uma única molécula de IgE, um domínio transmembrana que contém resíduo conservado de aspartato e uma curta cauda citoplasmática sem função de sinalização aparente. A molécula de Fc ϵ RI utiliza dois domínios assimétricos para ligação com o fragmento dimérico e simétrico da IgE, o que permite relação estequiométrica de 1:1 entre ligante (IgE) e receptor (Fc ϵ RI). A alta afinidade do Fc ϵ RI é resultado da baixa taxa de dissociação entre IgE e receptor, que é conseguida pela capacidade apresentada por cada sítio de ligação para IgE do receptor que se encontra dissociado, em se ligar novamente à IgE, quando o outro domínio de ligação está associado [72]. As

cadeias β e γ apresentam os motivos de ativação de imuoreceptores baseados em tirosina, os ITAMs, que se localizam nas porções intracelulares destas cadeias, que permitem a interação destas com moléculas envolvidas na sinalização intracelular. A cadeia gama é de fato, a subunidade indispensável para sinalização, enquanto a cadeia beta, em humanos, atua como amplificadora do sinal. Estes eventos de sinalização levam à degranulação de mastócitos e basófilos, secreção de mediadores inflamatórios estocados, como a histamina, e síntese e liberação de leucotrienos e prostaglandinas, citocinas e quimiocinas [181].

Nossos resultados demonstram que a expressão gênica e protéica das cadeias α e γ do receptor de alta afinidade de IgE em granulócitos é significativamente reduzida durante a imunoterapia específica ao veneno de abelha. Para entender estes resultados vale a pena analisarmos a regulação da expressão de Fc ϵ RI na superfície celular. Em humanos, a IL-4 pode induzir a produção da cadeia α ainda imatura, no retículo endoplasmático (RE). Sinais desconhecidos levam a produção das outras cadeias, β e γ . A cadeia γ , então, mascara o sinal do motivo de retenção da cadeia α no RE, fazendo com que a estrutura tetramérica ou trimérica, dependendo do tipo celular, seja exportada para o complexo de Golgi, onde sofre glicosilações finais para ser finalmente transportado para a superfície celular [182, 183]. Portanto, a presença da cadeia γ é fundamental para garantir que a cadeia α , responsável pela ligação com a imunoglobulina E, atinja a superfície celular, estabelecendo, desta maneira, uma

relação de interdependência entre as cadeias para que o complexo seja de fato expresso na superfície celular.

Como a ligação da IgE ao receptor na superfície é o primeiro passo na cascata de eventos que desencadeia as reações alérgicas, a quantidade de receptor expressa na superfície é, portanto, regulada pela abundância de IgE, que o estabiliza na superfície celular. Esta estabilização impede a degradação deste receptor e mantém sua síntese basal [72]. Desta maneira, temos um aumento progressivo destes receptores na superfície. Assim, a redução na expressão gênica e protéica de $Fc\epsilon RI\alpha$ e $Fc\epsilon RI\gamma$ em granulócitos ao longo da imunoterapia específica ao veneno de abelha, pode também estar associada à diminuição dos níveis de IgE específica ao veneno de abelha ocorrida durante o tratamento.

Com base em relatos prévios de que neutrófilos de pacientes portadores de asma alérgica, mas não indivíduos saudáveis, expressam $Fc\epsilon RI$, Mora e colaboradores [184] investigaram o papel da IgE sérica sobre a expressão de $Fc\epsilon RI$ em neutrófilos provenientes de pacientes asmáticos com diferentes níveis de gravidade. Estes autores verificaram que a expressão de $Fc\epsilon RI$ em neutrófilos permanece constante em pacientes com diferentes níveis de IgE sérica, e que, somente 8% dos neutrófilos de pacientes asmáticos alérgicos são $Fc\epsilon RI^+$ contra 5% de neutrófilos de indivíduos controles. Basófilos dos mesmos pacientes apresentam a correlação esperada entre os níveis de IgE encontrados e a expressão de $Fc\epsilon RI$ na superfície destas células. Consistente com os baixos níveis de expressão de $Fc\epsilon RI$, IgE ligada à superfície de neutrófilos também foi minimamente detectada.

Correlacionando níveis de IgE ligada à superfície de células do sangue periférico provenientes de pacientes pediátricos, com IgE total sérica e receptores de IgE, Dehlink e colaboradores [185] demonstraram que a expressão de FcεRI em neutrófilos nesta população não é regulada pela IgE sérica ou mesmo pela IgE ligada à superfície celular.

Assim, visto que a expressão de FcεRI em neutrófilos é mínima e que não é regulada pelos níveis de IgE séricos, podemos inferir que a modulação induzida pela imunoterapia específica ao veneno de abelha na expressão de FcεRI α e FcεRI γ , encontrada no presente trabalho, reflete a maior participação de eosinófilos na análise em questão.

Nishiyama e colaboradores [186] analisaram a expressão de FcεRI em mastócitos provenientes da medula óssea de camundongos *knockout* para GATA-1 com o intuito de elucidar o papel de GATA-1 na expressão de FcεRI. A expressão das cadeias α e β foi menor em mastócitos de camundongos *knockout* para GATA-1 em comparação ao grupo controle de animais selvagens. A resposta de mastócitos de camundongos que sofreram deleção de GATA-1 à estimulação antígeno/IgE via FcεRI também mostrou-se diminuída, dados consistentes com a redução dos genes codificadores das cadeias α e β deste receptor. Estes resultados demonstram que a expressão de FcεRI é de fato controlada pelo fator de transcrição GATA-1, que particularmente neste estudo, foi negativamente modulado ao longo da imunoterapia específica ao veneno de abelha.

O receptor de baixa afinidade para IgE, FcεRII ou CD23 é uma glicoproteína de cadeia única amplamente distribuída pelas células do organismo, incluindo linfócitos B [187], monócitos e macrófagos [188], eosinófilos [189, 190], plaquetas [191], células dendríticas [192] e células do músculo liso de vias aéreas superiores [193]. Participa de diferentes eventos imunológicos como estimulação e ativação de APCs, diferenciação e crescimento celular, além de regular a síntese de IgE [74]. Eosinófilos uma vez ativados via CD23, liberam diferentes produtos que amplificam a reação inflamatória, como por exemplo, espécies reativas de oxigênio e TNF- α [194, 195], ocorrendo também o aumento na expressão de receptores e moléculas de adesão em sua superfície a fim de permitir a migração destas células [190]. Por outro lado, neutrófilos isolados do sangue periférico e imediatamente analisados não expressam CD23 em suas superfícies [196]. Entretanto, Yamaoka e colaboradores [197] verificaram que GM-CSF é capaz de induzir sinais positivos para a expressão de CD23 em neutrófilos humanos de doadores saudáveis após 24h de incubação, o que não é detectado em neutrófilos não estimulados.

Sendo assim, podemos sugerir que a imunoterapia foi capaz de modular os níveis de RNAm de CD23 nos eosinófilos presentes em nossas culturas, uma vez que neutrófilos não expressam este receptor, reduzindo sua expressão logo após o primeiro mês de tratamento e até o final do período analisado em comparação a eosinófilos pré-imunoterapia.

Estudos prévios descreveram que as diferenças na expressão de CD23 podem não ser aparentes quando as células são cultivadas *in vitro*. Frotscher e colaboradores [198], após cultivar células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) não encontraram diferenças significativas na expressão de CD23 e sCD23 entre indivíduos alérgicos e indivíduos não sensibilizados. Entretanto, outro estudo que analisou CD23 *in vivo* em pacientes alérgicos a veneno de vespa também não encontrou alterações significativas na expressão protéica deste receptor. Roever e colaboradores [199] analisaram os mecanismos de regulação do CD23 induzidos pelo alérgeno durante a imunoterapia específica a pólen. Estes autores verificaram que após a injeção de alérgeno *in vivo*, tem-se uma redução na expressão de CD23 na presença do alérgeno *in vitro* em linfócitos B e monócitos, que seria mediada pela produção das citocinas IL-10 e IFN- γ .

Tendo em vista todos estes dados conflitantes, optamos por realizar a análise da expressão protéica de CD23 *in vivo*, ou seja, as células isoladas dos pacientes logo após a injeção subcutânea do veneno, não foram submetidas à cultura de 72h. Assim, com a análise por citometria de fluxo, podemos verificar que não há diferença significativa na porcentagem de células marcadas durante a imunoterapia quando comparada a células de pacientes que ainda não receberam tratamento. Entretanto, quando analisamos a densidade de receptores na superfície através da intensidade média de fluorescência (IMF), observamos que a partir de 6 meses de imunoterapia há diminuição significativa na expressão de CD23 que se mantém até o final do período analisado. Adicionalmente, podemos observar que granulócitos de pacientes pré-imunoterapia possuem expressão

mais elevada de CD23 quando comparada a granulócitos de indivíduos sadios, tanto em porcentagem de células marcadas quanto em densidade de receptores presentes na superfície.

Quimiocinas (citocinas quimiotáticas) pertencem a uma família com cerca de 40 pequenas moléculas distintas, porém estruturalmente relacionadas, que regulam principalmente o tráfego de leucócitos por meio de interação com uma subclasse de receptores transmembrana acoplados à proteína G [200]. São importantes não somente na regulação do recrutamento de leucócitos, mas também em outras atividades, como a ativação celular, liberação de mediadores inflamatórios, indução de respostas do tipo Th2 e regulação da síntese de IgE [201]. Algumas quimiocinas, como RANTES, eotaxina, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e MIP-1 α , são capazes de ativar basófilos e eosinófilos fazendo com que estas células degranulem e liberem seus mediadores inflamatórios estocados [202].

A partir dos resultados obtidos para a expressão protéica de RANTES em culturas de granulócitos provenientes de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, podemos observar redução significativa desta quimiocina em células submetidas ao tratamento, mais evidente em granulócitos estimulados com apitoxina quando em cultura. Além disso, células estimuladas com veneno de abelha de pacientes pré-imunoterapia apresentam valores mais elevados do que indivíduos do grupo controle, evidenciando, mais uma vez, um padrão diferencial de expressão entre estas duas populações.

Plewako e colaboradores [203] realizaram um estudo com pacientes com sintomas de rinoconjutivite sazonal, 3 a 5 anos após o término da imunoterapia específica a pólen. Estes autores confirmaram que pacientes alérgicos a pólen e submetidos à imunoterapia apresentam reduções nos sintomas e na necessidade de medicação durante a primavera (estação do pólen). Em decorrência da imunoterapia, foi possível observar uma diminuição no número de eosinófilos e mastócitos na mucosa nasal de pacientes tratados. Além disso, a imunoterapia foi capaz de prevenir os aumentos sazonais no número de células positivas para RANTES presentes na mucosa nasal.

Outros achados que reforçam os resultados por nós encontrados são provenientes do estudo de Akoum e colaboradores [204]. Neste estudo, pacientes tratados com imunoterapia do tipo ultra-rápida apresentaram redução na expressão gênica e protéica de RANTES em PBMCs em comparação a pacientes alérgicos e não tratados e também a indivíduos saudáveis do grupo controle [204].

IL-8, outra importante quimiocina, também possui amplo espectro de atividades biológicas em diferentes tipos celulares como neutrófilos, linfócitos T e basófilos [205]. Suas propriedades biológicas incluem quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T [206], ativação de neutrófilos [207], aumento na expressão de moléculas de adesão [205] e leucocitose [208], evidenciando desta maneira, sua importante participação na patogênese de doenças inflamatórias [206]. Inicialmente, acreditava-se que a IL-8 era produzida primariamente por monócitos. Atualmente, sabe-se que esta proteína de 72-77 aminoácidos é secretada por uma

variedade de células, incluindo neutrófilos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), citocinas inflamatórias (IL-1 IL-6, TNF), toxinas microbianas, dentre outras condições que desequilibram a hemostasia [209, 210]. Como o acúmulo de neutrófilos nos tecidos é uma característica da inflamação, e, uma vez que são capazes de produzir IL-8, estas células podem aumentar o recrutamento de novos neutrófilos para o local inflamatório. Desta maneira, se faz necessária uma regulação na migração dos neutrófilos para controle das reações inflamatórias [211].

Hsieh e colaboradores [212] são os únicos investigadores até o momento que analisaram a produção de IL-8 frente à imunoterapia específica. Neste estudo, as concentrações de IL-8 e outras quimiocinas foram avaliadas no plasma e em culturas de células mononucleares (através da técnica de ELISA) provenientes de pacientes pediátricos asmáticos e submetidos à imunoterapia por um período médio de 30 meses. Todos os pacientes analisados apresentaram um aumento na produção de IL-8, tanto espontaneamente quanto após estímulo com fitohemaglutinina (PHA) ou com antígenos específicos para ácaros, em comparação à indivíduos controles saudáveis.

No presente trabalho, contrariamente aos achados de Hsieh e colaboradores [212], verificamos que a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de reduzir os níveis protéicos de IL-8 em granulócitos não estimulados com apitoxina em cultura. Estes comportamentos conflitantes são

provenientes, provavelmente, do tipo celular analisado e do alvo da imunoterapia específica.

Para avaliar as reações de fase tardia ao alérgeno alguns estudos empregaram o uso de “câmaras cutâneas” a fim de analisar os tipos celulares e os mediadores liberados na câmara durante a resposta de fase tardia [213, 214]. Nish e colaboradores [214] avaliaram os efeitos de altas doses de imunoterapia nas reações cutâneas de fase tardia em pacientes com rinite alérgica. Estes autores utilizaram câmaras cutâneas antes do início do tratamento e após 3 e 6 meses de imunoterapia para analisar as modificações no influxo celular. O número de neutrófilos diminuiu após 3 e 6 meses de imunoterapia em comparação ao período pré-imunoterapia. Por outro lado, o número de eosinófilos aumentou em 3 meses seguido por uma diminuição em 6 meses. No presente trabalho não avaliamos o influxo de células diretamente no compartimento cutâneo; porém podemos correlacionar os dados encontrados por Nish com a modulação das principais quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e eosinófilos, IL-8 e RANTES, respectivamente, encontrada em nosso trabalho.

Com o objetivo de verificarmos se os efeitos observados até agora seriam decorrentes da apoptose de granulócitos ativados, decidimos analisar a expressão gênica de proteínas envolvidas com a apoptose, como BCL-2, uma proteína anti-apoptótica, e BID, uma proteína pró-apoptótica.

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações

morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados [215]. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, como FasL ou TNF- α .. Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, que ativam um ou mais proteínas pró-apoptóticas (BAD, BID, BIK, dentre outros), cujos sinais convergem principalmente para a mitocôndria, induzindo a oligomerização dos membros BAX e/ou BAK na membrana externa da mitocôndria, permitindo o efluxo de citocromo c e outras proteínas mitocondriais para o citosol. As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 bloqueiam apoptose, prevenindo a oligomerização dos membros pró-apoptóticos [216].

Os resultados de expressão gênica de Bcl-2 revelaram aumento significativo nos níveis de RNAm desta proteína em 3 e 6 meses de imunoterapia com subsequente redução em 12 e 18 meses. Ao final do período analisado, ou seja, em 24 meses, a expressão gênica de Bcl-2 é reduzida a níveis ainda menores do que os encontrados para o grupo controle.

Quanto à expressão gênica de BID, verificamos redução significativa em 3 meses, mesmo período em que temos um aumento nos níveis de RNAm da proteína anti-apoptótica Bcl-2. A partir daí, temos um aumento significativo e

gradual na expressão gênica de BID até 24 meses de tratamento, tanto em células estimuladas quanto em células não estimuladas com veneno de abelha.

Maa e colaboradores [217] demonstraram que eosinófilos de pacientes asmáticos possuem uma sobrevivência maior do que células de controles saudáveis e, que este número aumentado de eosinófilos está diretamente relacionado à clínica e gravidade da doença. Eles comprovaram que a expressão de Bcl-2 é aumentada nos indivíduos asmáticos quando comparada aos controles, sugerindo que o Bcl-2 desempenha papel importante na manutenção da inflamação eosinofílica persistente na asma.

Outros autores investigaram o papel do BID na apoptose de eosinófilos nas vias aéreas. Utilizando camundongos *knockout* para BID, eles demonstraram que esta proteína possui papel crucial na apoptose *in vitro* de eosinófilos e que ainda limita a ativação de linfócitos bem como a produção de citocinas Th2. BID também regula, *in vivo*, a eosinofilia induzida pelo alérgeno, apoptose de eosinófilos e a produção de IL-5, potente fator quimiotático, ativador e de sobrevivência de eosinófilos. Estes autores mostram ainda que a deficiência na proteína BID em camundongos estimulados com ovalbumina resulta em eosinofilia no lavado broncoalveolar como consequência da produção aumentada de IL-5 por linfócitos, migração de eosinófilos para o local inflamatório, ativação e diminuição na apoptose de eosinófilos [218].

Em condições homeostáticas, são produzidos diariamente aproximadamente 10^{10} neutrófilos que apresentam tempo de vida curto e

constante após deixarem a medula óssea para ganhar a circulação [219]. Sem ativação, estes neutrófilos deixam a circulação e são removidos por células reticuloendoteliais no baço, fígado, pulmões e medula óssea [220]. Em um ambiente inflamatório, a sobrevivência dos neutrófilos é diretamente afetada pela ativação e exposição a reguladores extracelulares [221]. Durante a resposta imune, neutrófilos podem integrar sinais de sobrevivência e de apoptose de diferentes fontes para regular seu tempo de vida. Neste contexto, Croker e colaboradores [222] examinaram o papel de vias intrínsecas da apoptose no controle da cinética de apoptose dos neutrófilos iniciada pela ativação de receptores de morte (vias extrínsecas). Assim, estes autores demonstraram que BID é capaz de acelerar a apoptose destas células, mas, no entanto, não é essencial para a morte celular. Por outro lado, a expressão aumentada de Bcl-2 previne a apoptose induzida pela estimulação com Fas, indicando que a via de apoptose regulada pela família de proteínas Bcl-2 pode interferir diretamente com a apoptose disparada por Fas. Desta maneira, estes dados demonstram que as vias intrínsecas da apoptose controlam diretamente a cinética de apoptose induzida por Fas em neutrófilos.

Em contrapartida, encontramos aumento significativo no número de granulócitos apoptóticos, detectados por meio da técnica de TUNEL, apenas no período inicial de imunoterapia, ou seja, após 1 mês de tratamento. A apoptose *in situ* pode ser subestimada devido ao rápido *clearance* de células inflamatórias apoptóticas por meio da fagocitose de macrófagos e células epiteliais [223, 224]. Adicionalmente, foi demonstrado que a fagocitose precede a fragmentação do

DNA (característica detectada na técnica de TUNEL), e, a digestão de células apoptóticas por macrófagos é acompanhada por perda da capacidade de coloração da técnica de TUNEL [225, 226]. Alternativamente, a raridade de células apoptóticas, particularmente eosinófilos, pode refletir a existência de outros mecanismos para a eliminação de células inflamatórias nos tecidos, como entrada luminal, recirculação sistêmica ou drenagem nos linfonodos [227, 228].

O processo da apoptose é necessário, fundamental e altamente organizado para o desenvolvimento e a manutenção da integridade do organismo, além de ser tão complexo quanto à divisão e à diferenciação celulares. Seu controle é orquestrado tanto no desenvolvimento embrionário e na renovação tecidual como na resposta patológica à lesão celular (ruptura do DNA) ou à infecção por patógenos, ou seja, situações que representam ameaças à integridade do organismo [229]. Como já discutimos anteriormente, uma rede complexa de moléculas regula a apoptose cujos principais componentes são as caspases (enzimas proteolíticas) que podem ser ativadas pela via mitocondrial ou intrínseca e a família de receptores para a morte TNF e Fas, que constituem a via extrínseca da apoptose. No entanto, é preciso lembrar que ainda há muito por ser pesquisado. Precisamos elucidar os eventos que regulam a apoptose durante a imunoterapia específica, como pode ser reparada ou desencadeada seletivamente para induzir suicídio de células ativadas. Enfim, há uma série de aspectos, vias e mecanismos que necessitam ser mais bem compreendidos e esclarecidos.

Neste contexto, nossos resultados reforçam as propriedades tolerogênicas e supressivas da imunoterapia específica, capaz de modificar diferentes aspectos do sistema imunológico e dentre eles, as respostas de células efetoras, particularmente eosinófilos e neutrófilos, células pouco exploradas até o momento.

GRANULÓCITOS (NEUTRÓFILOS E EOSINÓFILOS)

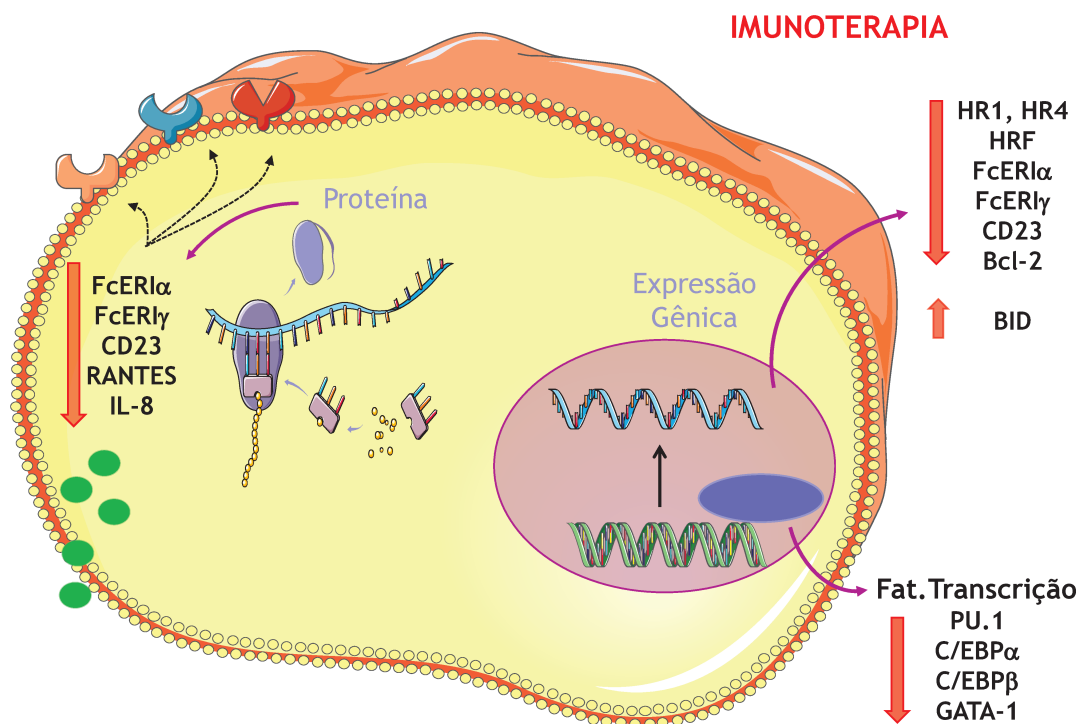


Figura 28 - Efeitos da imunoterapia sobre granulócitos de pacientes alérgicos ao veneno de abelha. Após 24 meses de imunoterapia, observamos redução na expressão gênica de receptores de histamina H1 e H4, HRF dependentes de IgE, fatores de transcrição Pu.1, C/EBPα, C/EBPβ e GATA-1 bem como, modulação de proteínas envolvidas com apoptose, especificamente, BCL-2, importante fator anti-apoptótico, e BID, fator pró-apoptótico. A imunoterapia foi capaz de modular expressão gênica e protéica de receptores de baixa e alta afinidade de IgE e a secreção das quimiocinas RANTES e IL-8 envolvidas no recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente.



6 - CONCLUSÕES

Ao final do período analisado, ou seja, aos 24 meses, a imunoterapia específica ao veneno de abelha mostrou-se capaz de modular os seguintes elementos em granulócitos:

1 - Reduzir a expressão gênica de receptores de histamina (H1 e H4) e fatores de liberação de histamina (HRF), bem como dos fatores de transcrição PU.1, C/EBP α , C/EBP β

2 - Reduzir a expressão gênica e protéica dos seguintes elementos:

- Cadeias α e γ do receptor de alta afinidade de IgE (Fc ϵ RI)
- Receptor de baixa afinidade de IgE (CD23)
- Fator de transcrição GATA-1

3 - Modular a expressão gênica de componentes apoptóticos, diminuindo a expressão de BCL-2 (fator anti-apoptótico) e aumentando os níveis de RNAm de BID (fator pró-apoptótico)

4 - Reduzir a secreção de RANTES e IL-8

5 - Indivíduos alérgicos ao veneno de abelha apresentam expressão gênica e níveis protéicos destes fatores aqui analisados mais elevados que indivíduos não alérgicos, sugerindo padrão diferencial de expressão entre indivíduos alérgicos ao veneno de abelha e indivíduos não alérgicos.



***7- CONSIDERAÇÕES
FINAIS***

Desde 1911, quando dois cientistas ingleses, Leonard Noon e John Freeman, criaram a primeira vacina para tratar a rinite alérgica utilizando extrato de pólen, inúmeros estudos científicos foram realizados, solidificando o uso da imunoterapia nestes 100 anos de existência. Muitos relatos demonstram a eficácia clínica e imunológica da imunoterapia específica, bem como sua capacidade de prevenir a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida de pacientes alérgicos. Entretanto, muitos dos seus mecanismos de ação permanecem desconhecidos.

Nossos resultados reforçam a importância dos granulócitos como células efetoras na patogênese de reações alérgicas, especificamente hipersensibilidade ao veneno de abelha, fornecendo dados inéditos para estudos futuros que visem a compreensão mais adequada dos mecanismos envolvidos que fazem da imunoterapia específica sucesso na prática clínica. Abrem, ainda, novas linhas investigativas sobre o desenvolvimento da tolerância imunológica, no que diz respeito à ação de células efetoras e seus produtos no microambiente e modulação de receptores específicos ao alérgeno nestas células.

***8- REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91:195-203.
2. Cousins DJ, Lee TH, Staynov DZ. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2498-506.
3. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):761-71.
4. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):218-30.
5. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Mar;113(3):395-400.
6. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147-74.
7. Weller PF. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol*. 1994 Feb;6(1):85-90.
8. Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Apr;97(4):889-92.
9. Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 May;83(10):3146-50.

10. Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest.* 1980 Jan;42(1):35-43.
11. Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol.* 1979 Dec;123(6):2925-7.
12. Tai PC, Hayes DJ, Clark JB, Spry CJ. Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells in vitro. *Biochem J.* 1982 Apr 15;204(1):75-80.
13. Goldberg A, Confino-Cohen R. Timing of venom skin tests and IgE determinations after insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Aug;100(2):182-4.
14. Jacoby DB, Costello RM, Fryer AD. Eosinophil recruitment to the airway nerves. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Feb;107(2):211-8.
15. Piliponsky AM, Pickholtz D, Gleich GJ, Levi-Schaffer F. Human eosinophils induce histamine release from antigen-activated rat peritoneal mast cells: a possible role for mast cells in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jun;107(6):993-1000.
16. Zheutlin LM, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):2180-5.

17. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol.* 2001 Nov;70(5):691-8.
18. Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J Immunol.* 1986 Nov 1;137(9):2913-7.
19. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature.* 1986 Jun 5-11;321(6070):613-6.
20. Agosti JM, Altman LC, Ayars GH, Loegering DA, Gleich GJ, Klebanoff SJ. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1987 Mar;79(3):496-504.
21. MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS, et al. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5763-72.
22. Wu W, Chen Y, Hazen SL. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25933-44.
23. Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, et al. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med.* 2002 Jun 3;195(11):1379-86.

24. Rothenberg ME, Cohen MB. An eosinophil hypothesis for functional dyspepsia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Oct;5(10):1147-8.
25. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010 Aug;31(8):318-24.
26. Borregaard N, Faurschou M. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(14):1317-27.
27. Friedman AD. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 2002 May 13;21(21):3377-90.
28. Skokowa J, Fobiwe JP, Dan L, Welte K. Absence of LEF-1 transcription factor in myeloid progenitors of patients with severe congenital neutropenia resulted in abrogated expression of neutrophil elastase and defective granulopoiesis. *Haematol-Hematol J*. 2007 Jun;92:163-.
29. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):479-89.
30. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2011 Aug;11(8):519-31.
31. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B-4 that mediates chemotaxis. *Nature*. 1997 Jun 5;387(6633):620-4.

32. Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Interleukin 6 production by mononuclear phagocytes can be stimulated by leukotrienes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1992;40(1):17-21.
33. Yamaoka KA, Kolb JP. Leukotriene B4 induces interleukin 5 generation from human T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1993 Oct;23(10):2392-8.
34. Yamaoka KA, Dugas B, Paul-Eugene N, Mencia-Huerta JM, Braquet P, Kolb JP. Leukotriene B4 enhances IL-4-induced IgE production from normal human lymphocytes. *Cell Immunol*. 1994 Jun;156(1):124-34.
35. Jonsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*. 2011 Apr 1;121(4):1484-96.
36. Xu X, Zhang D, Zhang H, Wolters PJ, Killeen NP, Sullivan BM, et al. Neutrophil histamine contributes to inflammation in mycoplasma pneumonia. *J Exp Med*. 2006 Dec 25;203(13):2907-17.
37. Schroeder JT. Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol*. 2009;101:123-61.
38. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18105-10.
39. Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, Shigematsu H, Iino T, Iwasaki H, et al. Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of

hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell*. 2007 Oct 11;1(4):416-27.

40. Gessner A, Mohrs K, Mohrs M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):1063-72.

41. MacGlashan DW, Jr., Schleimer RP, Lichtenstein LM. Qualitative differences between dimeric and trimeric stimulation of human basophils. *J Immunol*. 1983 Jan;130(1):4-6.

42. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):90-3.

43. Ohmori K, Luo Y, Jia Y, Nishida J, Wang Z, Bunting KD, et al. IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *J Immunol*. 2009 Mar 1;182(5):2835-41.

44. Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, Albrecht C, Vollrath IB, Noll T, et al. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol*. 1996 Oct;26(10):2493-8.

45. Helmby H, Grecis RK. IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN-gamma during *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol*. 2002 Sep 1;169(5):2553-60.

46. Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, et al. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):607-16.
47. Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, et al. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13962-6.
48. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2443-9.
49. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. 2008 Aug;20(8):1019-30.
50. Siracusa MC, Comeau MR, Artis D. New insights into basophil biology: initiators, regulators, and effectors of type 2 inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan;1217:166-77.
51. Bieneman AP, Chichester KL, Chen YH, Schroeder JT. Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;115(2):295-301.
52. Komiya A, Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Suzukawa M, Kawakami A, et al. Expression and function of toll-like receptors in human basophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140 Suppl 1:23-7.

53. Siraganian RP, Hazard KA. Mechanisms of mouse mast cell activation and inactivation for IgE-mediated histamine release. *J Immunol.* 1979 May;122(5):1719-25.
54. Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Jan;7(1):41-53.
55. Jutel M, Blaser K, Akdis CA. The role of histamine in regulation of immune responses. *Chem Immunol Allergy.* 2006;91:174-87.
56. Jutel M, Blaser K, Akdis CA. Histamine receptors in immune regulation and allergen-specific immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006 May;26(2):245-59, vii.
57. Budde IK, Aalberse RC. Histamine-releasing factors, a heterogeneous group of different activities. *Clin Exp Allergy.* 2003 Sep;33(9):1175-82.
58. MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science.* 1995 Aug 4;269(5224):688-90.
59. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature.* 2001 Sep 27;413(6854):420-5.
60. Damaj BB, Becerra CB, Esber HJ, Wen Y, Maghazachi AA. Functional expression of H4 histamine receptor in human natural killer cells, monocytes, and dendritic cells. *J Immunol.* 2007 Dec 1;179(11):7907-15.

61. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Crameri R, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1567-75.
62. Leurs R, Hoffmann M, Alewijnse AE, Smit MJ, Timmerman H. Methods to determine the constitutive activity of histamine H2 receptors. *Methods Enzymol*. 2002;343:405-16.
63. Togias A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Oct;112(4 Suppl):S60-8.
64. Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec;14(6):735-40.
65. Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24;275(47):36781-6.
66. Horr B, Borck H, Thurmond R, Grosch S, Diel F. STAT1 phosphorylation and cleavage is regulated by the histamine (H4) receptor in human atopic and non-atopic lymphocytes. *Int Immunopharmacol*. 2006 Oct;6(10):1577-85.
67. Zampeli E, Tiligada E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br J Pharmacol*. 2009 May;157(1):24-33.
68. Dijkstra D, Leurs R, Chazot P, Shenton FC, Stark H, Werfel T, et al. Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H4 receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug;120(2):300-7.

69. Morgan RK, McAllister B, Cross L, Green DS, Kornfeld H, Center DM, et al. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):8081-9.
70. Rosenwasser LJ, Meng J. Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005 Aug;29(1):61-72.
71. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):205-17.
72. Kraft S, Kinet JP. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):365-78.
73. Kraft S, Novak N. Fc receptors as determinants of allergic reactions. *Trends Immunol*. 2006 Feb;27(2):88-95.
74. Zhang M, Murphy RF, Agrawal DK. Decoding IgE Fc receptors. *Immunol Res*. 2007;37(1):1-16.
75. Sarfati M, Delespesse G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2195-9.
76. Forman SO, Reddy MM, Mazza DS, Meriney DK, Grieco MH. Effect of immunotherapy on sCD23 levels in patients allergic to Hymenoptera venom. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1996 Oct;77(4):282-4.
77. Abdelilah S, Driever W. Pattern formation in janus-mutant zebrafish embryos. *Dev Biol*. 1997 Apr 1;184(1):70-84.

78. Lang R, Hawranek T. Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2006;16(4):224-31.
79. Muller U, Golden DB, Lockey RF, Shin B. Immunotherapy for hymenoptera venom hypersensitivity. *Clin Allergy Immunol*. 2008;21:377-92.
80. Kettner A, Hughes GJ, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, et al. Api m 6: a new bee venom allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 May;107(5):914-20.
81. Stuhlmeier KM. *Apis mellifera* venom and melittin block neither NF-kappa B-p50-DNA interactions nor the activation of NF-kappa B, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates. *J Immunol*. 2007 Jul 1;179(1):655-64.
82. Monti MC, Casapullo A, Santomauro C, D'Auria MV, Riccio R, Gomez-Paloma L. The molecular mechanism of bee venom phospholipase A2 inactivation by bolinaquinone. *Chembiochem*. 2006 Jun;7(6):971-80.
83. Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005 Nov;60(11):1339-49.
84. Bilo BM, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;8(4):330-7.
85. Przybilla B, Rueff F. Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010 Feb;8(2):114-27; quiz 28-30.
86. Nall TM. Analysis of 677 death certificates and 168 autopsies of stinging insects deaths. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;75:207-12.

87. Muller UR. Hymenoptera venom hypersensitivity: an update. Clin Exp Allergy. 1998 Jan;28(1):4-6.
88. Lantner R, Reisman RE. Clinical and immunologic features and subsequent course of patients with severe insect-sting anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol. 1989 Dec;84(6 Pt 1):900-6.
89. Ludolph-Hauser D, Rueff F, Fries C, Schopf P, Przybilla B. Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. Lancet. 2001 Feb 3;357(9253):361-2.
90. Novembre E, Cianferoni A, Bernardini R, Veltroni M, Ingargiola A, Lombardi E, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity in children and its correlation to clinical and atopic features. Clin Exp Allergy. 1998 Jul;28(7):834-8.
91. Golden DB, Marsh DG, Kagey-Sobotka A, Freidhoff L, Szklo M, Valentine MD, et al. Epidemiology of insect venom sensitivity. JAMA. 1989 Jul 14;262(2):240-4.
92. Annala I. Bee venom allergy. Clin Exp Allergy. 2000 Dec;30(12):1682-7.
93. Bilo MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. Clin Exp Allergy. 2009 Oct;39(10):1467-76.
94. Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. J Asthma Res. 1966 Jun;3(4):331-3.

95. Ring J, Seifert J, Struif E, Messmer K, Brendel W. [Incidence of anaphylactoid reactions following infusion with colloid volume substitutes]. *Chir Forum Exp Klin Forsch*. 1977 Apr;31-5.
96. Georgitis JW, Reisman RE. Venom skin tests in insect-allergic and insect-nonallergic populations. *J Allergy Clin Immunol*. 1985 Dec;76(6):803-7.
97. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Lichtenstein LM. Diagnosis of allergy to stinging insects by skin testing with Hymenoptera venoms. *Ann Intern Med*. 1976 Jul;85(1):56-9.
98. Meriney D, Nall T, Wallace D, Rosenzweig D, Goel Z, Grieco MH. Comparison of venom and whole-body rast and intradermal testing in vespid-sensitive patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1980;62(4):442-52.
99. Patrizzi R, Muller U, Yman L, Hoigne R. Comparison of skin tests and RAST for the diagnosis of bee sting allergy. *Allergy*. 1979 Aug;34(4):249-56.
100. Wuthrich B, Wick H, Crass B, Wyss S. [Diagnosis of hymenoptera sting hypersensitivity. A comparison between case history, skin test results and specific IgE (RAST) with venom extracts (author's transl)]. *Schweiz Rundsch Med Prax*. 1981 May 19;70(21):934-43.
101. Jeep S, Kirchhof E, O'Connor A, Kunkel G. Comparison of the Phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom. *Allergy*. 1992 Jun;47(3):212-7.

102. Mosbech H, Christensen J, Dirksen A, Soborg M. Insect allergy. Predictive value of diagnostic tests: a three-year follow-up study. *Clin Allergy*. 1986 Sep;16(5):433-40.
103. Allergen immunotherapy: a practice parameter second update. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3 Suppl):S25-85.
104. Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*. 2009 Apr;64(4):543-8.
105. Bilo BM, Bonifazi F. Advances in hymenoptera venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Dec;7(6):567-73.
106. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1):18-27.
107. Bussmann C, Xia J, Allam JP, Maintz L, Bieber T, Novak N. Early markers for protective mechanisms during rush venom immunotherapy. *Allergy*. 2010 Dec;65(12):1558-65.
108. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1255-61.
109. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003 May;33(5):1205-14.

110. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 2004 Feb 21;363(9409):608-15.
111. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*. 2003 Feb 17;197(4):489-501.
112. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):725-31.
113. Taylor A, Akdis M, Joss A, Akkoc T, Wenig R, Colonna M, et al. IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jul;120(1):76-83.
114. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.
115. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
116. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-61.

117. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
118. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol*. 2004 Dec 1;173(11):6526-31.
119. Akdis CA, Akdis M, Blesken T, Wymann D, Alkan SS, Muller U, et al. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest*. 1996 Oct 1;98(7):1676-83.
120. Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wijk RG, De Jong N, Brewczynski PZ, et al. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 1997 Jan;27(1):68-74.
121. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008 Nov;63(11):1455-63.
122. Pierkes M, Bellinghausen I, Hultsch T, Metz G, Knop J, Saloga J. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Feb;103(2 Pt 1):326-32.

123. Marshall JS, Leal-Berumen I, Nielsen L, Glibetic M, Jordana M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J Clin Invest.* 1996 Feb 15;97(4):1122-8.
124. Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T, et al. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol.* 1994 May 1;152(9):4368-74.
125. Rak S, Hakanson L, Venge P. Immunotherapy abrogates the generation of eosinophil and neutrophil chemotactic activity during pollen season. *J Allergy Clin Immunol.* 1990 Nov;86(5):706-13.
126. Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms. (EAACI) The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy.* 1993;48(14 Suppl):36-46.
127. Frick WE, Sedgwick JB, Busse WW. The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Jun;139(6):1401-6.
128. Moser R, Fehr J, Olgiati L, Bruijnzeel PL. Migration of primed human eosinophils across cytokine-activated endothelial cell monolayers. *Blood.* 1992 Jun 1;79(11):2937-45.
129. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

130. Vieira KP, de Almeida e Silva Lima Zollner AR, Malaguti C, Vilella CA, de Lima Zollner R. Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice. *Cytokine*. 2008 Apr;42(1):92-104.
131. Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tonnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn*. 2001 May;3(2):55-61.
132. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
133. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
134. Moffitt JE, Golden DB, Reisman RE, Lee R, Nicklas R, Freeman T, et al. Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;114(4):869-86.
135. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy*. 2006 Jul;61(7):796-807.
136. Cooke RA, Barnard JH, Hebard S, Stull A. Serological Evidence of Immunity with Coexisting Sensitization in a Type of Human Allergy (Hay Fever). *J Exp Med*. 1935 Nov 30;62(6):733-50.

137. Lichtenstein LM, Norman PS, Winkenwerder WL, Osler AG. In vitro studies of human ragweed allergy: changes in cellular and humoral activity associated with specific desensitization. *J Clin Invest.* 1966 Jul;45(7):1126-36.
138. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol.* 1997 May;27(5):1131-9.
139. Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med.* 1999 Aug 12;341(7):468-75.
140. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol.* 1995 Apr 15;154(8):4187-94.
141. Chen Y, Takata M, Maiti PK, Mohapatra S, Mohapatra SS, Sehon AH. The suppressor factor of T suppressor cells induced by tolerogenic conjugates of ovalbumin and monomethoxypolyethylene glycol is serologically and physicochemically related to the alpha beta heterodimer of the T cell receptor. *J Immunol.* 1994 Jan 1;152(1):3-11.
142. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
143. Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance

between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med*. 1994 Feb 1;179(2):589-600.

144. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990 Oct 11;323(15):1033-9.

145. Pincus SH, DiNapoli AM, Schooley WR. Superoxide production by eosinophils: activation by histamine. *J Invest Dermatol*. 1982 Jul;79(1):53-7.

146. Zollner RLT, G.; Vieira, K. P. ; Vilella, C. A. In vivo study of basal transcription factor GATA-3, histamine receptors 1 and 2, IgE-dependant histamine-releasing factor mRNA expression changes in peripheral mononuclear blood cells during bee venom immunotherapy. *Allergy*. 2008;63(Suppl. 88):12.

147. Wadee AA, Sher R. The effects of a soluble factor released by sensitized mononuclear cells incubated with *S. haematobium* ova on eosinophil migration. *Immunology*. 1980 Dec;41(4):989-95.

148. Anwar AR, Kay AB. H1-receptor dependence of histamine-induced enhancement of human eosinophil C3b rosettes. *Clin Exp Immunol*. 1980 Oct;42(1):196-9.

149. Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy*. 2009 Dec;39(12):1786-800.

150. Ezeamuzie CI, Philips E. Histamine H(2) receptors mediate the inhibitory effect of histamine on human eosinophil degranulation. *Br J Pharmacol*. 2000 Oct;131(3):482-8.

151. Bury TB, Corhay JL, Radermecker MF. Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T-lymphocyte proliferation in man. *Allergy*. 1992 Dec;47(6):624-9.
152. Francis JW, Todd RF, 3rd, Boxer LA, Petty HR. Histamine inhibits cell spreading and C3bi receptor clustering and diminishes hydrogen peroxide production by adherent human neutrophils. *J Cell Physiol*. 1991 Apr;147(1):128-37.
153. Hirasawa N, Watanabe M, Mue S, Tsurufuji S, Ohuchi K. Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous histamine without affecting vascular permeability responses in air-pouch-type carrageenin inflammation in rats. *Inflammation*. 1991 Apr;15(2):117-26.
154. Leino L, Tuominen HB, Akerman KE. Histamine modulation of Ca^{2+} homeostasis in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1993 Dec;54(6):584-9.
155. Clark RA, Sandler JA, Gallin JI, Kaplan AP. Histamine modulation of eosinophil migration. *J Immunol*. 1977 Jan;118(1):137-45.
156. Sedgwick JB, Frick WE, Sondel PM, Hank JA, Borden E, Busse WW. The appearance of hypodense eosinophils during interleukin-2 treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Mar;85(3):557-66.
157. Flamand N, Plante H, Picard S, Laviolette M, Borgeat P. Histamine-induced inhibition of leukotriene biosynthesis in human neutrophils: involvement of the H_2 receptor and cAMP. *Br J Pharmacol*. 2004 Feb;141(4):552-61.

158. Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, Williams KN, Karlsson L, Thurmond RL. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):7062-70.
159. Gutzmer R, Diestel C, Mommert S, Kother B, Stark H, Wittmann M, et al. Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5224-32.
160. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(1):161-71.
161. Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor. *Br J Pharmacol*. 2003 Nov;140(6):1117-27.
162. Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB. Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Oct;303(1):300-7.
163. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, et al. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Apr;309(1):404-13.
164. Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Dec;307(3):1072-8.

165. Macdonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular-Identification of the Ige-Dependent Histamine-Releasing Factor (Hrf). *J Allergy Clin Immun.* 1995 Jan;95(1):175-.
166. Iwasaki H, Akashi K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity.* 2007 Jun;26(6):726-40.
167. Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002 Aug 1;365(Pt 3):561-75.
168. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature reviews Cancer.* 2003 Feb;3(2):89-101.
169. Anderson KL, Smith KA, Conners K, McKercher SR, Maki RA, Torbett BE. Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3702-10.
170. Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med.* 2005 May 2;201(9):1487-502.
171. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, et al. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood.* 2005 Sep 1;106(5):1590-600.
172. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 2004 Dec;21(6):853-63.

173. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol.* 2003 Oct;4(10):1029-36.
174. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12355-8.
175. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 1997 Jul 1;16(13):3965-73.
176. Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, Suwabe N, Hayashi N, Yanai N, et al. Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19):12611-5.
177. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* 1994 Sep 15;371(6494):221-6.
178. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 1997 May 16;89(4):587-96.
179. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol.* 2006 Jul;7(7):732-9.

180. Akagi T, Saitoh T, O'Kelly J, Akira S, Gombart AF, Koeffler HP. Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBP β -deficient hematopoietic cells. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):2999-3004.
181. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:749-86.
182. Albrecht B, Woisetschlager M, Robertson MW. Export of the high affinity IgE receptor from the endoplasmic reticulum depends on a glycosylation-mediated quality control mechanism. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5686-94.
183. Novak N, Kraft S, Bieber T. Unraveling the mission of Fc ϵ RI on antigen-presenting cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jan;111(1):38-44.
184. Mora J, Riggs EK, Fu J, MacGlashan DW, Jr., Fox SA, Yu B, et al. Expression of the high affinity IgE receptor by neutrophils of individuals with allergic asthma is both minimal and insensitive to regulation by serum IgE. *Clin Immunol*. 2009 Jul;132(1):132-40.
185. Dehlink E, Baker AH, Yen E, Nurko S, Fiebiger E. Relationships between levels of serum IgE, cell-bound IgE, and IgE-receptors on peripheral blood cells in a pediatric population. *PLoS One*. 2010;5(8):e12204.
186. Nishiyama C, Ito T, Nishiyama M, Masaki S, Maeda K, Nakano N, et al. GATA-1 is required for expression of Fc ϵ RI on mast cells: analysis of mast cells derived from GATA-1 knockdown mouse bone marrow. *Int Immunol*. 2005 Jul;17(7):847-56.

187. Kikutani H, Suemura M, Owaki H, Nakamura H, Sato R, Yamasaki K, et al. Fc epsilon receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. *J Exp Med*. 1986 Nov 1;164(5):1455-69.
188. Williams J, Johnson S, Mascali JJ, Smith H, Rosenwasser LJ, Borish L. Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects. *J Immunol*. 1992 Oct 15;149(8):2823-9.
189. Abdelilah SG, Bouchaib L, Morita M, Delphine A, Marika S, Andre C, et al. Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII/CD23 expressed by human eosinophils. *Int Immunol*. 1998 Apr;10(4):395-404.
190. Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. Stimulation of eosinophil IgE low-affinity receptor leads to increased adhesion molecule expression and cell migration. *Eur Respir J*. 2000 Nov;16(5):940-6.
191. Klouche M, Klinger MH, Kuhnel W, Wilhelm D. Endocytosis, storage, and release of IgE by human platelets: differences in patients with type I allergy and nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Aug;100(2):235-41.
192. Sluyter R, Wiley JS. Extracellular adenosine 5'-triphosphate induces a loss of CD23 from human dendritic cells via activation of P2X7 receptors. *Int Immunol*. 2002 Dec;14(12):1415-21.
193. Hakonarson H, Carter C, Kim C, Grunstein MM. Altered expression and action of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII (CD23) in asthmatic airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Sep;104(3 Pt 1):575-84.

194. Arock M, Legoff L, Becherel PA, Dugas B, Debre P, Mossalayi MD. Involvement of Fc-Epsilon-Rii/Cd23 and L-Arginine Dependent Pathway in Ige-Mediated Activation of Human Eosinophils. *Biochem Bioph Res Co*. 1994 Aug 30;203(1):265-71.
195. Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. LFA-1 expression by blood eosinophils is increased in atopic asthmatic children and is involved in eosinophil locomotion. *European Respiratory Journal*. 1998 Nov;12(5):1094-8.
196. Truong MJ, Gruart V, Kusnierz JP, Papin JP, Loiseau S, Capron A, et al. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):243-8.
197. Yamaoka KA, Arock M, Issaly F, Dugas N, Le Goff L, Kolb JP. Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces Fc epsilon RII/CD23 expression on normal human polymorphonuclear neutrophils. *Int Immunol*. 1996 Apr;8(4):479-90.
198. Frotscher B, Anton K, Worm M. Inhibition of IgE production by the imidazoquinoline resiquimod in nonallergic and allergic donors. *J Invest Dermatol*. 2002 Nov;119(5):1059-64.
199. Roever AC, Heine G, Zuberbier T, Worm M. Allergen-mediated modulation of CD23 expression is interferon-gamma and interleukin-10 dependent in allergic and non-allergic individuals. *Clin Exp Allergy*. 2003 Nov;33(11):1568-75.
200. Murphy PM. Chemokine receptor cloning. *Methods Mol Biol*. 2000;138:89-98.

201. Gangur V, Oppenheim JJ. Are chemokines essential or secondary participants in allergic responses? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000 Jun;84(6):569-79; quiz 79-81.
202. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol*. 2002 May;38(12-13):881-5.
203. Plewako H, Holmberg K, Oancea I, Gotlib T, Samolinski B, Rak S. A follow-up study of immunotherapy-treated birch-allergic patients: effect on the expression of chemokines in the nasal mucosa. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jul;38(7):1124-31.
204. Akoum H, Duez C, Vorng H, Fahy O, Wallaert B, Tonnel AB, et al. Early modifications of chemokine production and mRNA expression during rush venom immunotherapy. *Cytokine*. 1998 Sep;10(9):706-12.
205. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*. 1991 Oct 4;254(5028):99-102.
206. Baggiolini M, Imboden P, Detmers P. Neutrophil activation and the effects of interleukin-8/neutrophil-activating peptide 1 (IL-8/NAP-1). *Cytokines*. 1992;4:1-17.
207. Djeu JY, Matsushima K, Oppenheim JJ, Shiotsuki K, Blanchard DK. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J Immunol*. 1990 Mar 15;144(6):2205-10.
208. Jagels MA, Hugli TE. Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis. A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J Immunol*. 1992 Feb 15;148(4):1119-28.

209. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today*. 2000 Sep;21(9):418-20.
210. Strieter RM, Phan SH, Showell HJ, Remick DG, Lynch JP, Genord M, et al. Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1989 Jun 25;264(18):10621-6.
211. Monteseirin J, Chacon P, Vega A, El Bekay R, Alvarez M, Alba G, et al. Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation. *J Leukoc Biol*. 2004 Sep;76(3):692-700.
212. Hsieh KH, Chou CC, Chiang BL. Immunotherapy suppresses the production of monocyte chemotactic and activating factor and augments the production of IL-8 in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Sep;98(3):580-7.
213. Charlesworth EN, Hood AF, Soter NA, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Lichtenstein LM. Cutaneous late-phase response to allergen. Mediator release and inflammatory cell infiltration. *J Clin Invest*. 1989 May;83(5):1519-26.
214. Nish WA, Charlesworth EN, Davis TL, Whisman BA, Valtier S, Charlesworth MG, et al. The effect of immunotherapy on the cutaneous late phase response to antigen. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Feb;93(2):484-93.
215. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37.
216. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Mar;9(3):231-41.

217. Maa SH, Wang CH, Liu CY, Lin HC, Huang KH, Kuo HP. Endogenous nitric oxide downregulates the Bcl-2 expression of eosinophils through mitogen-activated protein kinase in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Oct;112(4):761-7.
218. Maret M, Ruffie C, Letuve S, Phelep A, Thibaudeau O, Marchal J, et al. A role for Bid in eosinophil apoptosis and in allergic airway reaction. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5740-7.
219. Price TH, Lee MY, Dale DC, Finch CA. Neutrophil kinetics in chronic neutropenia. *Blood*. 1979 Sep;54(3):581-94.
220. Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J*. 2008 Sep;22(9):3111-9.
221. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009 Jun;75(6):475-81.
222. Croker BA, O'Donnell JA, Nowell CJ, Metcalf D, Dewson G, Campbell KJ, et al. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13135-40.
223. Druilhe A, Letuve S, Pretolani M. Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action. *Apoptosis*. 2003 Oct;8(5):481-95.
224. Sexton DW, Blaylock MG, Walsh GM. Human alveolar epithelial cells engulf apoptotic eosinophils by means of integrin- and phosphatidylserine receptor-

dependent mechanisms: a process upregulated by dexamethasone. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Dec;108(6):962-9.

225. Odaka C, Mizuochi T. Macrophages are involved in DNA degradation of apoptotic cells in murine thymus after administration of hydrocortisone. *Cell Death Differ*. 2002 Feb;9(2):104-12.

226. Verhoven B, Krahling S, Schlegel RA, Williamson P. Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ*. 1999 Mar;6(3):262-70.

227. Sexton E, Van Themsche C, LeBlanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Mol Cancer*. 2006;5:45.

228. Uller L, Lloyd CM, Rydell-Tormanen K, Persson CG, Erjefalt JS. Effects of steroid treatment on lung CC chemokines, apoptosis and transepithelial cell clearance during development and resolution of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jan;36(1):111-21.

229. Simon HU. Cell death in allergic diseases. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):439-46.