

Giovanna Trevizan

Imunoterapia específica: efeitos sobre expressão de receptores de histamina, fator de liberação de histamina, GATA-3 e cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera*.

Campinas

2010

Giovanna Trevizan

Imunoterapia específica: efeitos sobre expressão de receptores de histamina, fator de liberação de histamina, GATA-3 e cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera*.

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Campinas

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T729i Trevizan, Giovanna
Imunoterapia específica: efeitos sobre expressão de receptores de histamina, fator de liberação de histamina, GATA-3 e cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de *Apis mellifera* / Giovanna Trevizan. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

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

Título em inglês : Specific immunotherapy : effects on the expression of histamine receptors, histamine releasing factors, GATA-3 and γ chain of high affinity IgE receptor on lymphomononuclear cells from *Apis mellifera* allergic patients

Keywords: • Allergy
• Bees, venom
• Histamine, receptors

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Prof^o. Dr^o. Virgínia Paes Leme Ferriani
Prof^a. Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

Data da defesa: 31-03-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Giovanna Trevizan

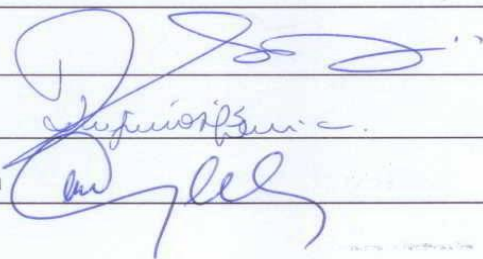
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

1. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

2. Profª. Drª. Virginia Paes Leme Ferriani

3. Profª. Drª. Maria Marluce dos Santos Vilela



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/03/2010

DEDICO

À minha família.

Aos meus pais, José Alexandre e Maria Cristina, e à minha irmã, Milena. Agradeço por todos os anos de luta e dedicação; pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis. Com o exemplo de perseverança de vocês cheguei até aqui e serei capaz de ir ainda mais longe. Dividimos o mérito dessa conquista juntos.

Pai (Zo), obrigada por ser sempre solícito e presente, pelo carinho e por todas nossas “idas e vindas”!

Mãe! Exemplo incontestável. Orgulho-me de ser sua filha e espero seguir muitos dos seus passos. Obrigada por absolutamente tudo.

Mi (Tatá), espelho de força e dedicação. Obrigada pelo carinho, palavras e abraços. Devo muito a você nessa vitória.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela oportunidade e orientação, pela confiança em meu trabalho e por acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

As Professoras Maria Marluce do Santos Vilela e Virgínia Paes Leme Ferriani por aceitarem compor a presente banca, pelas considerações e sugestões.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental: Dr. Ricardo, Conceição, Karla, Meg, Rika, Carina, Priscila, Camila, Luis Guilherme, Natália, Bruna, Augusto, Fernanda, Lucía, Mariana, Michele e Isabele. Obrigada pelos ensinamentos, prontidão e boas risadas. Equipe indispensável! Foi uma honra compartilhar esses quatro anos e meio com todos vocês.

A Conceição, pela amizade e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, profissionais e pessoais; pelo carinho e por todos os conselhos, sempre amigos e maternais. Con, impossível esquecer o que você fez por mim!

A Karla, por toda disponibilidade, parceria, ensinamentos e prontidão incondicionais. Obrigada pela “equipe de duas pessoas”, pela ótima companhia diária (e nas viagens) e pelo exemplo, muito mais que profissional. Acima de tudo, obrigada pela amizade indispensável. Serei sempre grata!

A Meg, por ser sempre solícita. Obrigada por toda a ajuda durante esses anos e pelo exemplo de vida.

Aos meus amigos, presentes em todos os momentos. Obrigada pelo carinho, compreensão e, principalmente, pela paciência. Naty e Amandinha, há 10 anos vocês acompanham meu crescimento. Obrigada por tudo, principalmente pelo apoio e suporte nos últimos meses; vocês são fundamentais! Sempre!

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Veloso pelo uso e disponibilização do microscópio de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Silveira Corrêa por aceitar fazer parte de minha banca de qualificação, pela prontidão e pelo auxílio com a estatística.

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT.....	XV
1- INTRODUÇÃO	16
1.1 – HIPERSENSIBILIDADE – RESPOSTA ALÉRGICA	17
1.2 – FATOR DE TRANSCRIÇÃO GATA-3 E DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS Th2	17
1.3 – FATORES DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA.....	21
1.4 – RECEPTORES DE HISTAMINA	25
1.5 – RECEPTORES DE IgE	28
1.6 – HIPERSENSIBILIDADE À FERROADA DE INSETO	33
1.7 – IMUNOTERAPIA	35
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3 – MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 – POPULAÇÃO DE ESTUDO	42
3.2 – PROTOCOLO DE IMUNOTERAPIA	42
3.3 – PROCEDÊNCIA E PREPARO DO VENENO.....	43
3.4 – SEPARAÇÃO DE CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	44
3.4.1 – Recalcificação do plasma:.....	45
3.5 – CULTURA DE CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES	46
3.6 – EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (RNAT).....	47

3.7 – ANÁLISE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	48
3.8 – TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO (cDNA)	48
3.9 – AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) ...	49
3.10 – ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	51
<i>3.10.1 – Preparo de 50 ml de gel de Agarose 1,5%:.....</i>	<i>51</i>
<i>3.10.2 – Preparo das amostras:.....</i>	<i>51</i>
3.11 – ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DOS PRODUTOS DE PCR.....	52
3.12 – IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA FATOR DE TRANSCRIÇÃO GATA-3	52
3.13 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4 – RESULTADOS.....	55
4.1 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VENENO DE ABELHA:.....	56
4.2 – ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR:	56
4.3 – CINÉTICA DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR 1 DE HISTAMINA (HR1):	59
4.4 – EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR 1 DE HISTAMINA:	59
4.5 – CINÉTICA DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR 2 DE HISTAMINA (HR2):	62
.....	63
4.6 – EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR 2 DE HISTAMINA:	64
4.7 – CINÉTICA DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR 4 DE HISTAMINA (HR4):	66
4.8 – EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR 4 DE HISTAMINA:	68
4.9 - CINÉTICA DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA (HRF):.....	70
4.10 – EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA (HRF):	70

4.11 – CINÉTICA DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CADEIA γ DO RECEPTOR DE ALTA	
AFINIDADE DE IGE (FcϵRI γ):	74
4.12 – EXPRESSÃO GÊNICA DA CADEIA γ DO RECEPTOR DE ALTA AFINIDADE DE IGE	
(FcϵRI γ):	74
4.13 – EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO GATA-3:	78
5 – DISCUSSÃO	82
6 – CONCLUSÕES	91
7- CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

Lista de Abreviaturas

AB	Células estimuladas com veneno de abelha
ADM10	Desintegrina e metaloprotease 10
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CONAP	Cooperativa nacional de apicultura
DAG	Diacil glicerol
DEPC	Dimetil pirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditioteitol
EAACI	<i>European academy of allergy and clinical immunology</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FcεRI	Receptor de alta afinidade de IgE
FcεRII ou CD23	Receptor de baixa afinidade de IgE
GFi-1	Fator de crescimento independente 1
HDC	Histidina descarboxilase
HR	Receptor de histamina
HRF	Fator de liberação de histamina
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP-3	Inositol 3 fosfato
ITAM	Motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina
LIAE	Laboratório de imunologia e alergia experimental
MAP quinase	Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	Células <i>natural killer</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
RNA _m	RNA mensageiro
SE	Células não estimuladas
STAT	<i>Signal trasnducers and activators of transcription</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
Tbet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	<i>T helper</i> /T auxiliar
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VIT	Imunoterapia específica ao veneno
UA	Unidades arbitrárias

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. A diferenciação de linfócitos Th2 e a secreção de citocinas por estas células são reguladas pelo fator de transcrição GATA-3. A ligação da IgE ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) em mastócitos e basófilos, promove a liberação de mediadores inflamatórios. 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. A histamina é o principal mediador liberado durante a resposta alérgica; através da ativação de diferentes receptores (HR1, HR2, HR3 ou HR4) as células do sistema imune podem ser tanto inibidas como estimuladas. Via HR1, a histamina estimula principalmente linfócitos Th1, enquanto inibe linfócitos Th2 via HR2. O receptor 4 desempenha papel central na diferenciação de linfócitos Th2 e também é capaz de modular a produção de citocinas. A liberação de histamina é regulada por fatores de liberação de histamina (HRF), sendo que os HRF dependentes de IgE induzem a liberação de histamina na fase tardia das reações alérgicas. Considerando-se todas essas informações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos modulatórios da imunoterapia na expressão gênica dos receptores de histamina (HR1, HR2 e HR4), fatores de liberação de histamina (HRF) e cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE, além da expressão protéica do fator de transcrição GATA-3, em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha. As células foram isoladas de pacientes submetidos à imunoterapia, 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 veneno de abelha a 1 ng/ml. Indivíduos não alérgicos foram estudados como grupo controle. Com objetivo de avaliar a expressão gênica foram realizadas extração de RNA, seguida de síntese de cDNA e PCR, para avaliação da expressão protéica, utilizou-se a técnica de imunofluorescência. A expressão gênica de HR1 e HR4, assim como de HRF e da cadeia gama do FcεRI foi significativamente reduzida ao final do período analisado. O receptor 2 de histamina não apresentou alterações bem definidas após 24 meses de imunoterapia. O fator de transcrição GATA-3 apresentou diminuição significativa na expressão a nível protéico. Nossos resultados demonstram que a imunoterapia específica ao veneno de abelha foi capaz de modular elementos envolvidos na resposta imune.

ABSTRACT

Allergic disease is an abnormal response from the immune system, with high levels of allergen specific IgE antibodies and Th2 pattern of cytokines. Development of Th2 cells and the production of cytokines are regulated by transcription factor GATA-3. Binding of IgE to its high affinity receptor (FcεRI) in mast cells and basophils induces inflammatory mediators' release. Many studies have shown the efficacy of specific immunotherapy. Histamine is an important mediator in allergy, through activation of distinct histamine receptors (HR1, HR2, HR3 or HR4) in the immune system; cells can be either stimulated or inhibited. Histamine can stimulate, by HR1 receptor, especially Th1 response, and inhibit particularly Th2 cells through HR2 activation. HR4 plays a central role in Th2 polarization and also modulates cytokine profile production. IgE-dependent histamine releasing factors (IgE-HRF) induce histamine release in late phase reaction. In regard of this information, the aim of this study was to evaluate the modulating effects of specific immunotherapy in gene expression of histamine receptors (HR1, HR2 and HR4), histamine releasing factor (HRF), in patients with allergy and the gamma chain of FcεRI, and also GATA-3 protein levels. Bee venom allergic subjects underwent specific bee venom immunotherapy (VIT) in different stages of treatment (Pre, 3, 6, 12, 18 and 24 months) were studied. Peripheral blood mononuclear cells were isolated after subcutaneous venom injection and submitted to culture for 24, 48 and 72 hours stimulated with 1ng/ml of bee venom. In parallel healthy subjects were studied as well. Total RNA extraction, followed by cDNA synthesis and PCR were used to evaluate gene expression; GATA-3 protein expression was analyzed by immunofluorescence assay. Data from all time of cell culture - 24, 48 and 72 hours - were grouped and analyzed. Gene expression from HR1 and HR4 and also HRF and γ chain of FcεRI were significantly reduced at the end of 24 months of immunotherapy. Histamine receptor 2 didn't show well established alterations. For transcription factor GATA-3 significant decrease at protein level was observed. Together, our results indicate that bee venom specific immunotherapy was able to modulate some of the elements involved in the immune response.

1- Introdução

1.1 – Hipersensibilidade – Resposta alérgica

As doenças alérgicas, classificadas como reações de hipersensibilidade do tipo I, resultam de resposta exacerbada, não balanceada, do sistema imune, gerando anticorpos IgE alérgeno-específicos. Essa resposta é dependente da produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 por linfócitos T auxiliares, do tipo Th2, alérgeno-específicos, gerados a partir de precursores virgens. As citocinas IL-4 e IL-13 regulam a secreção de anticorpos IgE pelos linfócitos B, enquanto a IL-5 tem papel fundamental no recrutamento de eosinófilos para o local de inflamação. Além disso, a própria IL-4 estimula a diferenciação em linfócitos Th2, por *feedback* positivo, ou seja, por meio de mecanismo de retro-alimentação [1].

A exposição ao alérgeno pode causar reações locais, locais extensas ou até reações sistêmicas, resultando em sintomas cutâneos, respiratórios e/ou vasculares. Alguns indivíduos podem ainda apresentar sintomas atípicos em órgãos como intestino, coração e útero [2].

1.2 – Fator de transcrição GATA-3 e Diferenciação de linfócitos Th2

Após o reconhecimento de regiões específicas do antígeno chamadas de epítomos, os quais são apresentados por células apresentadoras de antígeno (APCs), os linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar em pelo menos duas subpopulações distintas de linfócitos T auxiliares: Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ , atuam na resposta imune contra patógenos intracelulares e estão associados a doenças auto-imunes. Os linfócitos Th2, por outro lado, produzem IL-4, IL-5 e IL-13, atuando na resposta imune humoral contra patógenos

extracelulares; apresentando, ainda, papel central nas reações e doenças alérgicas [3].

A expressão de citocinas Th2 é regulada principalmente pelo fator de transcrição GATA-3, o qual também é responsável pela diferenciação destas células. Em humanos, existem seis fatores de transcrição pertencentes à família GATA, todos eles 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. Os fatores GATA 1, 2 e 3 são encontrados nas células hematopoiéticas, enquanto os fatores GATA 4, 5 e 6 são expressos predominantemente em tecidos de origem endodérmica, como coração e intestino [4].

O GATA-3 foi primeiramente clonado como fator de transcrição específico de células T em 1991 [5]; posteriormente, sua expressão foi observada durante o desenvolvimento embrionário em células do sistema nervoso central, pele, glândulas mamárias e rins. Camundongos com silenciamento gênico (*knock-out*) para GATA-3 morrem prematuramente com danos neurológicos severos e erros no desenvolvimento de células T, dificultando o estudos através deste modelo [6].

O fator de transcrição GATA-3 apresenta papel fundamental na diferenciação de linfócitos Th2 a partir de células CD4⁺ virgens. A diferenciação de linfócitos Th1, por outro lado, é inibida por GATA-3 e estimulada pelo fator de transcrição T-bet (*T-box expressed in T cells*) [6, 7]. Este inibe a função de GATA-3, através da ligação do T-bet fosforilado ao próprio GATA, impedindo que o mesmo se ligue ao DNA. A apresentação antigênica e o microambiente presente

na matriz extracelular também interferem na diferenciação dos linfócitos, de forma que a predominância de IL-4 estimula a diferenciação Th2 e de IL-12, estimula a diferenciação Th1. A IL-4 ativa o fator de transcrição STAT-6, principal regulador da expressão de GATA-3. O GATA-3 induz, ainda, a sua própria expressão em um mecanismo de retro-alimentação [8].

O GATA-3 ativa seletivamente os promotores dos genes de IL-4, IL-5 e IL-13 através da reorganização da cromatina; para que isto aconteça precisa ser translocado do citoplasma para dentro do núcleo da célula. Isto é possível graças a uma proteína de importação nuclear, chamada importina- α , que reconhece a sequência sinal presente no fator de transcrição. A afinidade da ligação do GATA-3 com a importina- α é regulada por fosforilação e a MAP quinase p38 aumenta esta afinidade, estimulando o transporte do GATA-3 para o núcleo [4]. A fosforilação de GATA-3 por esta enzima é induzida pelo aumento de cAMP intracelular; em células Th1, por outro lado, o cAMP não induz atividade da MAP quinase p38, sugerindo ser esta uma via preferencialmente observada em células Th2 [9].

O GATA-3 interage também com outras proteínas, como ROG, FOG, Smad3 e PU.1, sendo que FOG e PU.1 atuam como inibidoras da atividade de GATA-3 [6].

A diferenciação de linfócitos Th2 pode ser induzida por outra via, a qual envolve o fator de transcrição STAT-5 e a citocina IL-2. A sinalização desta via parece ser independente do aumento da expressão de GATA-3. Inibindo-se ou induzindo-se a ativação de STAT-5, o aumento da expressão de GATA-3 em

resposta à estimulação com IL-4 não é afetado. Além disso, a super expressão de GATA-3 em linfócitos Th2 não é capaz de reverter a produção deficiente de IL-4 quando a via de STAT-5 é inibida. Células expressando GATA-3 e STAT-5 simultaneamente são capazes de produzir IL-4 em maior concentração. Ou seja, estas duas vias atuam em sinergismo. Ambos são capazes de se ligar ao gene de IL-4, mas a região de ligação ao DNA é diferente e específica para cada um deles [10].

Zhu e colaboradores [10] sugerem que o GATA-3 pode induzir a diferenciação de Th2 por meio de mecanismos distintos: como já citado anteriormente, o GATA-3 é importante para a produção de citocinas do tipo Th2, e pode ter sua expressão aumentada por vias independentes de IL-4, atuando de maneira sinérgica com o STAT-5 para induzir a produção inicial e tardia de IL-4; além disso é indispensável para a produção de IL-5 e IL-13 mesmo por células Th2 completamente diferenciadas. Células expressando níveis elevados de GATA-3 necessitam também da estimulação de GFi-1 (fator de crescimento independente-1) para proliferação e indução de resposta Th2. Finalmente, o ultimo mecanismo de atuação de GATA-3 seria a inibição da resposta Th1; sem a expressão de GATA-3 a resposta Th1 ocorre mesmo na ausência de fatores indutores, como IL-12 e IFN- γ . O bloqueio da resposta de Th1 pelo GATA-3 ocorre por inibição do fator de transcrição T-bet. Dessa forma, existe um limiar de expressão de GATA-3 necessário para a manutenção de linfócitos T CD4⁺ com fenótipo não-polarizado. Durante a resposta Th1 a expressão de GATA-3 é diminuída, possivelmente, liberando o T-bet de seu efeito repressor e permitindo

que o mesmo induza, então, a produção de citocinas Th1, proliferação dos linfócitos Th1 e inibição da resposta Th2 [10].

1.3 – Fatores de liberação de histamina

A histamina, identificada como mediador biológico no começo de 1900 [11], é uma amina de massa molecular baixa sintetizada a partir da L-histidina, em uma reação de descarboxilação catalisada pela enzima histidina descarboxilase (HDC). A histamina 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. 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 [12].

A histamina desempenha papel importante nas patologias alérgicas devido à sua ação no endotélio vascular e células dos brônquios e músculo liso, sendo, portanto, um dos principais mediadores na resposta inflamatória [13]. Mastócitos e basófilos são as mais importantes fontes de histamina estocada. Nessas células a

histamina sintetizada é estocada em grânulos associada a 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 [11].

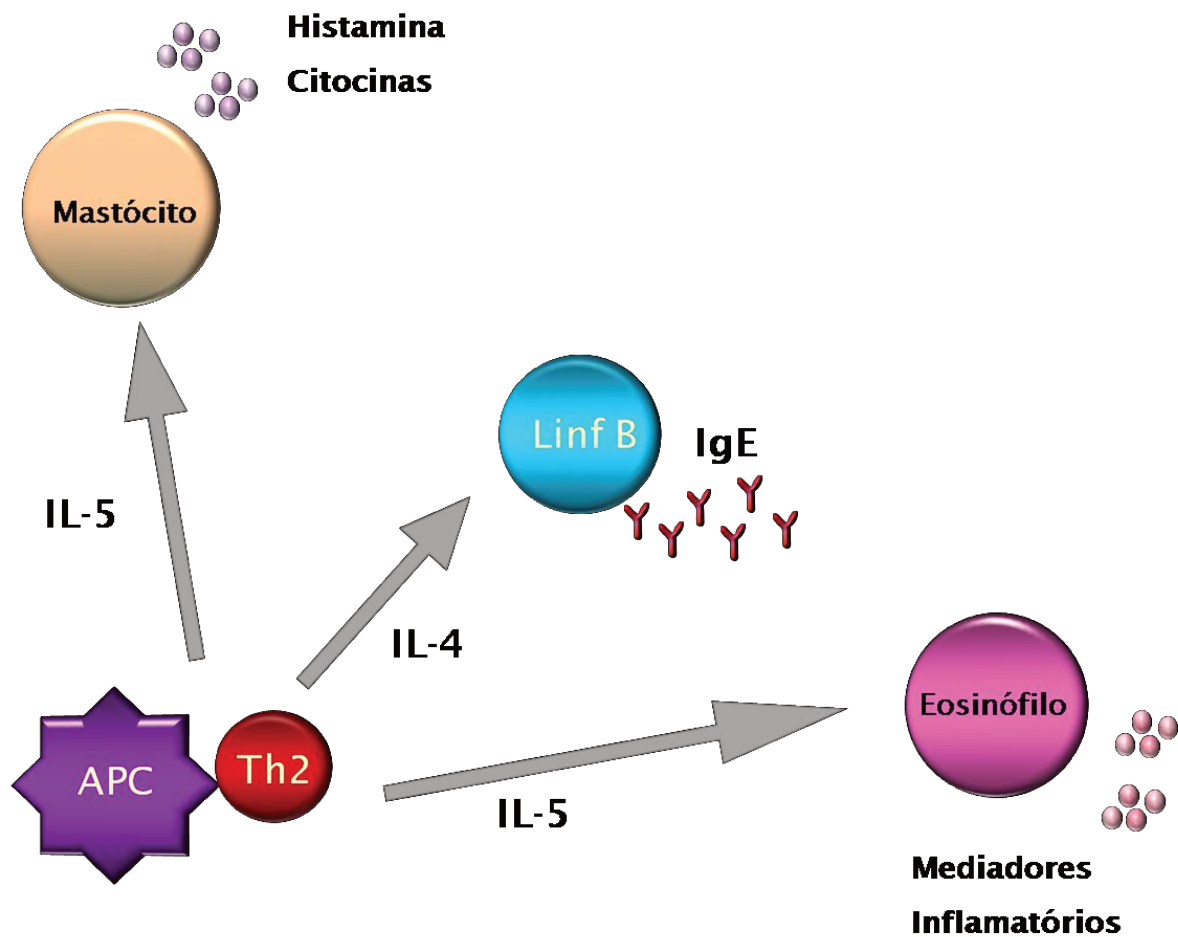
Além de sua participação na fase aguda, a histamina participa da progressão da resposta alérgica e inflamatória através do aumento da secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, RANTES e IL-8 [12].

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. Alguns HRFs são dependentes de IgE, e outros 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 mais potentes deste grupo. Outras quimiocinas como RANTES, MIP-1 α (proteína 1 α inflamatória de macrófagos) e eotaxina são liberadores menos potentes que os pertencentes à família MCP. A liberação de histamina estimulada por esses HRFs é extremamente rápida [14].

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 [14]. 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 [15]. 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 [14].

A interação entre estes diferentes elementos envolvidos na resposta alérgica encontra-se representada na figura 1 (página 23).



LIAE - Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental

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.

1.4 – 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 (HR1, HR2, HR3 e HR4), todos compostos por sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G [16]. 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 [11].

O receptor 1 (HR1) é expresso em muitos tipos celulares, incluindo células endoteliais e músculo liso; através deste receptor a histamina exerce seus efeitos de vasodilatação e broncoconstrição [11]. A expressão de HR1 é observada ainda em células do sistema nervoso, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B e T [13]. A ativação de HR1 leva à mobilização de íons cálcio no interior das células, fosforilação da proteína quinase C, levando à formação de mediadores como diacil-glicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP3), e ativação de ERK e NF- κ B [17].

O receptor 2 de histamina (HR2) é expresso em células do sistema nervoso, musculatura lisa, hepatócitos, condrócitos, células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B e T. O HR2 é encontrado ainda nas células parietais do estômago; onde a histamina estimula a liberação do suco gástrico [11]. A ativação de HR2 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 [12, 17].

Em função da ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, estes dois receptores promovem efeitos distintos quando ligados à histamina. A maioria dos efeitos estimulatórios da histamina é exercida via HR1, enquanto a ligação da mesma com o receptor 2 está envolvida principalmente com os efeitos de supressão [18]. A diferença no padrão de expressão destes dois receptores em linfócitos T determina a resposta das subpopulações Th1 e Th2 frente ao estímulo com histamina. As células Th1 apresentam expressão predominante, mas não exclusiva, de receptores HR1, enquanto as células Th2 apresentam expressão mais elevada de receptores HR2. Assim, a histamina estimula principalmente a resposta Th1 através da ativação do receptor HR1, e inibe ambas as respostas, Th1 e Th2, via HR2 [19]. A estimulação de HR2 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. Dessa forma, a histamina induz proliferação e secreção de IFN- γ nas células Th1; enquanto atua como inibidor da proliferação e secreção de IL-4 e IL-13 nas células Th2. Este mecanismo de regulação celular afeta diretamente a produção de anticorpos pelos linfócitos B; ou seja, a estimulação da síntese de citocinas tipo Th1, via HR1, bloqueia a resposta humoral, isto é, a produção de anticorpos, estimulando a resposta do tipo celular. Por outro lado, a inibição da secreção de citocinas por ambas as subpopulações de linfócito T, via HR2, bloqueia a resposta celular, induzindo, portanto, a imunidade humoral e a produção de imunoglobulinas [20].

Analogamente, a ativação de HR1 aumenta a capacidade de apresentação de antígeno e de ligação com células T, em células dendríticas, envolvidas na

imunidade celular; enquanto o HR2 induz a secreção de IL-10, inibindo a apresentação de antígenos e favorecendo o desenvolvimento de células T reguladoras [13].

O receptor 3 de histamina, HR3, 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 HR3 é atuar como neurotransmissor; o receptor 3 parece estar envolvido, ainda, na barreira hematoencefálica e, portanto, na neuroinflamação [11].

Finalmente, o receptor 4 da histamina (HR4) 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 [21]. A ativação deste receptor pela histamina leva ao aumento de cálcio intracelular e inibição da sinalização de cAMP. Por intermédio do HR4, a histamina estimula a quimiotaxia de mastócitos, eosinófilos e células dendríticas [11]. Damaj e colaboradores mostraram a presença de RNAm de HR4 em células *Natural Killer* (NK), no entanto, nem a expressão protéica ou a função do receptor nestas células são conhecidas [17]. 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 HR4, os pesquisadores observaram ativação desta via em indivíduos não atópicos; ou seja, a ligação da histamina com HR4 inibe a sinalização de STAT-1 α e conseqüentemente a produção de citocinas como IFN- γ

[22]. Por outro lado, em indivíduos atópicos a ligação do HR4 com a histamina, leva à inibição de STAT-6 [23]. Camundongos submetidos ao silenciamento gênico de HR4 ou à administração de antagonistas específicos para este receptor apresentam diminuição da resposta inflamatória e dos níveis de citocinas Th2 [11, 23].

Além disso, o HR4 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 [24]. Morgan e colaboradores, utilizando modelo de asma em camundongos, mostraram que a histamina é capaz de induzir migração de leucócitos por meio de HR1 e HR4, mas não HR2. Entretanto, diferentes subpopulações celulares respondem a este estímulo: o HR1 induz preferencialmente migração de linfócitos Th2, enquanto o HR4 estimula o recrutamento de células T reguladoras [25].

1.5 – 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 [26]. O FcεRI é capaz de se ligar à IgE monomérica, enquanto o FcεRII liga-se preferencialmente à IgE complexada [27].

O receptor de alta afinidade pode ser encontrado na forma de tetrâmeros, 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 [28]. Em humanos, o gene da cadeia β encontra-se no cromossomo 11, enquanto os genes das cadeias α e γ encontram-se no cromossomo 1 [29].

A cadeia α possui dois domínios extracelulares responsáveis pela ligação com a IgE, enquanto os motivos de ativação de imunorreceptores baseados em tirosina (ITAM) localizam-se nas porções intracelulares das cadeias β e γ . A cadeia α pertence à superfamília das imunoglobulinas, apresenta porção intracelular curta e não desempenha nenhuma função de sinalização. A molécula de Fc ϵ RI 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 (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 [30].

A presença dos motivos ITAMs nas 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 amplificador do sinal. Após a ativação do receptor e fosforilação das tirosinas dos ITAMs, uma cascata de moléculas são ativadas 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 [30, 31].

As cadeias do receptor de alta afinidade são sintetizadas e reunidas no retículo endoplasmático. Neste complexo, a cadeia α encontra-se imatura, sendo necessário o transporte do conjunto para o complexo de Golgi, onde a mesma sofre glicosilações que permitem o dobramento adequado das cadeias e finalização do receptor. Este, agora, é transportado para a membrana celular [30]. Em células humanas como mastócitos e APCs, a IL-4 pode induzir a expressão da cadeia α , este fenômeno não é observado em células de camundongos [32].

A ligação da IgE ao seu receptor é o primeiro passo para desencadear a resposta alérgica, a abundância de receptores expressos na superfície celular tem grande importância no desenvolvimento da mesma. A expressão concomitante de cadeia γ é fundamental para que a cadeia α atinja a superfície celular, portanto, a expressão do receptor como um todo requer a expressão da cadeia γ . Quando não há síntese de cadeia γ , a cadeia α fica retida no retículo endoplasmático em sua forma imatura, isso porque a interação com a cadeia γ mascara o motivo de retenção no retículo endoplasmático presente na cadeia α , permitindo a exportação do complexo do receptor. A expressão da cadeia β é indispensável para a expressão do receptor em camundongos, mas não em humanos [30]. A cadeia β pode gerar outra molécula por *splincing* alternativo, chamada de Fc ϵ RI β_T . Quando esta molécula se associa à cadeia α promove degradação do complexo via proteassomo [29].

Uma vez expresso na superfície celular o FcεRI passa a ser controlado pela disponibilidade e abundância de ligante, ou seja, pela concentração de IgE. A ligação da IgE ao receptor impede que o mesmo seja internalizado e degradado pela célula [29].

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 FcεRI 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 [29].

A ligação do receptor ao complexo IgE-alérgeno, em mastócitos, leva à liberação de mediadores vasoativos, síntese de prostaglandinas e leucotrienos, e transcrição de citocinas [27]. A expressão do FcεRI em APCs pode facilitar a apresentação do complexo IgE-antígeno para a via do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II, induzindo a resposta Th2 [29]. Além disso, a presença de IgE específica e do receptor de alta afinidade na superfície de células dendríticas aumenta a eficiência de captura e apresentação de antígeno por essas células em 100 a 1000 vezes [32]. Em células da musculatura lisa das vias aéreas, a ligação da IgE ao receptor de alta afinidade leva à mobilização de cálcio intracelular, com conseqüente contração muscular;

promovendo ainda a liberação de citocinas inflamatórias como IL-2, IL-5, IL-13 e eotaxina, que irão amplificar e perpetuar a inflamação [29].

O receptor de baixa afinidade de IgE, FcεRII ou CD23, 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 [26]. O CD23 pertence à superfamília das lectinas do tipo C, apresentando em sua forma de membrana três domínios de lectina. Algumas regiões da molécula 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 ADM10 (desintegrina e metaloprotease 10), gerando fragmentos pequenos de diversos tamanhos. 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; enquanto o CD23b tem sua expressão induzida por IL-4 e é encontrado em uma variedade de células inflamatórias, células B e células epiteliais [28].

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 [26]. 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 basófilo. A ligação do CD23 ao CD21 está envolvida na regulação da síntese de IgE. [28]

1.6 – Hipersensibilidade à ferroada de inseto

Dentro da ordem Hymenoptera, na classe Insecta, encontram-se as três famílias de insetos cujos membros são potenciais causadores de reações alérgicas ou, até mesmo, anafiláticas; são elas: Apidae, Vespidae e Formicidae [33]. Dados da Europa e Estados Unidos, sugerem que 0,3 a 7,5% da população geral sofrem de reação alérgica sistêmica relacionada ao veneno de Hymenoptera [34, 35].

A família Apidae é composta pelas 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 [36].

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 [37]. A fosfolipase A₂, uma glicoproteína composta de 134 aminoácidos e com peso 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* [38]. 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 [39].

A hialuronidase é o segundo principal alérgeno do veneno de abelha, esta enzima apresenta peso 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 [39, 40].

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 peso molecular de 3 kDa. A melitina é capaz de inserir-se entre as camadas de fosfolípidos da membrana e, portanto, é altamente tóxica para as células, promovendo a lise celular [38].

As reações sistêmicas desenvolvidas em resposta à ferroada de inseto são usualmente agrupadas pelas classificações sugeridas por Mueller [41] e Ring [42]. 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 considera o comprometimento cardiovascular mais importante que os sintomas respiratórios, por isso, sua classificação é embasada na gravidade do comprometimento cardiovascular [2].

A classificação de Mueller agrupa as reações ao veneno da seguinte forma [41]:

- 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 – Imunoterapia

A imunoterapia consiste na administração repetida de alérgenos específicos a pacientes com reações de hipersensibilidade mediadas 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. 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*); desde então a imunoterapia passou por inúmeras modificações e avanços [43].

A imunoterapia específica para veneno de *Hymenoptera* 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 [44].

Existem diferentes protocolos utilizados na imunoterapia, os principais sendo o método convencional, o rápido e o ultra-rápido [44]. 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 ferroadada 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 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 [45].

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

imunoterapia afeta os níveis de IgE e IgG, diminuindo a concentração de IgE no plasma; no entanto, não foi encontrada nenhuma correlação entre os níveis destes anticorpos e a evolução clínica dos pacientes. A imunoterapia modifica tanto a resposta humoral como a celular, promovendo aumento na proporção de citocinas Th1/Th2 e indução de linfócitos T reguladores. A produção de IL-10 por monócitos, macrófagos, células B e T é estimulada durante o tratamento; esta citocina junto com TGF- β , que também tem seus níveis elevados, pode contribuir para a função de regulação de linfócitos T reguladores e para a mudança de classe de imunoglobulinas para IgA, IgG1 e IgG4. Estes anticorpos competem com a IgE na ligação com o alérgeno, diminuindo a captura e apresentação de antígeno que é facilitada pela IgE em complexo com seus receptores, Fc ϵ RI e CD23 [46]. As células T reguladoras são caracterizadas como um subtipo de célula T CD4⁺ CD25⁺ que expressa o fator de transcrição FoxP3 e que é capaz de produzir citocinas inibitórias como TGF- β e IL-10 [47].

Acredita-se ainda que a histamina e seus receptores tenham papel importante no desenvolvimento da tolerância periférica. A histamina induz a produção de IL-10 por células dendríticas e linfócitos Th2; além disso, aumenta a atividade supressora do TGF- β em células T. Todos estes efeitos da histamina são exercidos via receptor 2, sugerindo que o mesmo pode ter participação no desenvolvimento de tolerância periférica ou na supressão de respostas inflamatórias envolvidas na reação alérgica durante a imunoterapia[13]. A expressão do receptor 1 de histamina (HR1), o qual apresenta efeitos opostos ao HR2, é diminuída após a dessensibilização com protocolo ultra-rápido, levando a

sinalização predominante de HR2, ou seja, há predomínio de sinais inibitórios que regulam a resposta imune e garantem a eficácia da imunoterapia [13, 20, 48].

Em estudo *in vivo* desenvolvido em nosso laboratório, acompanhando 21 pacientes em diferentes períodos de imunoterapia, verificou-se redução significativa nos níveis séricos de IgE específica, corroborando os dados encontrados na literatura. Não houve, no entanto, diferença significativa na expressão gênica dos receptores de histamina HR1 e HR2 ou do fator de transcrição GATA-3 [49].

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

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

2.2 – Objetivos específicos

A partir de células linfomononucleares de sangue periférico de pacientes submetidos à imunoterapia específica com veneno de abelha, avaliamos:

1- A expressão gênica de receptores de histamina (HR1, HR2 e HR4) e fatores de liberação de histamina (HRF)

2- A expressão gênica da cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE (Fc ϵ RI)

3- A presença do fator de transcrição GATA-3

4- A expressão destes elementos envolvidos na resposta alérgica ao longo do processo de imunoterapia em comparação com a expressão observada na população sadia não relacionada (não alérgica) 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. Cinco pacientes alérgicos ao veneno de abelha (*Apis mellifera*) com início do 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. As idades dos pacientes eram 7, 15, 29, 45 e 59 anos. Todos submetidos à imunoterapia específica conforme as normas estabelecidas pela European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI). Os períodos de tratamento a serem analisados eram: pré-imunoterapia, um mês, três meses, seis meses, 12 meses, 18 e 24 meses. Para cada período, as células de cinco pacientes eram submetidas à cultura, com amostras em duplicata. Cinco voluntários sadios, não alérgicos, foram utilizados como controle. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, nº 187/2006 e aos pacientes foi entregue o termo de consentimento pós informativo.

3.2 – Protocolo de Imunoterapia

Os pacientes eram 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 era determinada com o auxílio de teste epicutâneo (end-point), que define como concentração preliminar aquela titulação negativa imediatamente superior à

concentração que provocou reação cutânea considerada positiva. De acordo com orientações das normas internacionalmente estabelecidas o tempo de tratamento foi definido em 3 anos. No entanto, caso o paciente apresentasse qualquer reação adversa ao processo de imunoterapia, o tratamento seria, então, prolongado por mais dois anos, somando um total de 5 anos.

3.3 – Procedência e preparo do veneno

O veneno de abelha bruto, *Apis 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 18°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, nas seguintes concentrações: 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml e 20 µg/ml. A dose de manutenção de 100 µg era administrada aos pacientes.

3.4 – Separação de células linfomononucleares de sangue periférico

Aproximadamente 20 ml de sangue eram coletados dos pacientes em frascos contendo EDTA 1,25mM a fim de evitar a coagulação do mesmo e permitir a separação de células; 10 ml de sangue em frasco sem anticoagulante eram coletados e submetidos à centrifugação a 600 x g, por 20 minutos a 18°C (Centrifuga Fanem Mod. 280R, São Paulo, Brasil) para obtenção e armazenamento em banco de soro. A fim de estabelecer o padrão basal de resposta dos indivíduos alérgicos e avaliar a alteração do mesmo frente ao estímulo com veneno, o sangue dos pacientes submetidos à imunoterapia era coletado 30 minutos após estímulo com veneno de abelha, enquanto os indivíduos-controle e os pacientes no período pré-imunoterapia não receberam nenhum estímulo prévio. Todas as soluções utilizadas na obtenção das células para cultura eram previamente passadas por filtro 0,22 µm (Millipore).

A separação de células era realizada com auxílio da sedimentação de eritrócitos com Dextran 5% à temperatura ambiente, por uma hora. Posteriormente, coletou-se o a suspensão celular não sedimentada à qual era acrescentado o mesmo volume de Ficol (Ficol-PaqueTM Plus, GE Healthcare, Reino Unido) para separação das células linfomonucleares. O material era centrifugado a 600 x g, por 20 minutos a 18°C. O anel de linfócitos era recolhido utilizando-se pipeta Pauster estéril e transferido para tubo cônico também estéril, acrescentando-se em seguida 5 ml de PBS pH 7,4. Realizava-se nova centrifugação a 380 x g, por 15 minutos a 18°C (Centrifuga Fanem Mod. 280R, São Paulo, Brasil). O sobrenadante era descartado e o *pellet* dissolvido em 5 ml

de tampão de lise, permanecendo em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente. Eram realizadas, então, duas lavagens com PBS pH 7,4, seguidas de centrifugação a 380 x g, por 15 minutos, a 18°C. Finalmente, o sobrenadante era desprezado e o *pellet* diluído em 2 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP), suplementado com 10% de soro AB, 2% de Hepes (Hyclone – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), 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 (Penicilin-Streptomycin, Invitrogen, Califórnia, EUA).

3.4.1 – Recalcificação do plasma:

Prince e colaboradores [50] mostraram que alguns componentes do plasma, como a fibronectina, podem inibir a resposta de linfócitos a mitógenos. Para evitar esta resposta inibitória, o soro do tipo AB humano, obtido no Hemocentro da Unicamp, utilizado para suplementar o meio de cultura era submetido a um processo de recalcificação para retirada dos componentes responsáveis pela cascata de coagulação. Primeiramente, o plasma foi descongelado à temperatura ambiente e centrifugado a 20000 x g por 20 minutos, a 4°C (Centrífuga Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge, Califórnia, EUA), para retirada da fração lipídica. Em seguida o plasma era aquecido em banho térmico até atingir aproximadamente 30°C. Ao mesmo tempo era adicionada então solução recém preparada de cloreto de cálcio diidratado a 30%, incubando-se em banho térmico a 37°C por duas horas para a formação do coágulo. O material era centrifugado a 1270 x g, por 30 minutos a 4°C para recuperação do soro.

Para retirada do excesso de sal, o soro era submetido à diálise em

membrana de nitrocelulose (Sigma) por 24h a 4°C, realizando-se seis trocas de solução salina 0,95%. Finalmente, o soro era filtrado em membrana 0,22 µm (Millipore) e armazenado a -20° C. No momento do uso, o soro era inativado por aquecimento em banho térmico a 56°C por 30 minutos.

3.5 – Cultura de células linfomononucleares

Imediatamente após a separação, as células eram submetidas à contagem em câmara de Neubauer, com auxílio do corante azul de Tripan (Sigma), ajustando-se a concentração para 5×10^5 células/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 1ng/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, com coletas nos tempos 24, 48 e 72hs.

As células retiradas das placas nos tempos estabelecidos eram destinadas aos seguintes procedimentos: contagem com azul de Tripan (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.

Para obtenção de células para expressão gênica, 500 µl 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 µl de solução 4M guanidina tiocianato contendo 2-mercaptoetanol (Sigma) e 0,5% sarcosil pH 7,0; destinado à extração de RNA total.

3.6 – Extração de RNA Total (RNAT)

O RNA total era extraído das células linfomononucleares através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol - Clorofórmio [51] adaptado no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE) conforme descrição a seguir [52].

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 3M pH 5,2. Esta preparação era mantida à - 80°C por 24 horas.

Para a precipitação do RNA total a preparação foi centrifugada a 10450g por 20 minutos a 4°C. Ao precipitado, adicionava-se 40µl 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 0,5µl de Oligo d(pt) (Invitrogen, Califórnia, EUA) e água ultra pura em quantidade suficiente para 28µl. Os tubos eram aquecidos com as respectivas amostras em termocicladora (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 (10µl de tampão Super RT / 5µl de dNTP mix 0,5mM/ 5µl de DTT 0,1M, Invitrogen) incubando-se por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1µl de enzima Super Transcriptase reversa (Super Script, Invitrogen) previamente diluída na proporção 1:5 em água com DEPC, a reação processava-se em termocicladora (GeneAmp PCR systems 9700, Califórnia, Applied Biosystems) programada da seguinte maneira : 42° C por 50

minutos, 70° C por 15 minutos e resfriamento da amostra até 4°C (adaptado no LIAE). Após a última 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 (HR1, HR2 e HR4), fatores de liberação de histamina (HRF) e cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE – utilizamos a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação 2 µl de amostra de cDNA, 100 ng de primer 5' sense, 100 ng de primer 3' anti-sense, 45 µl de solução de reação (5 µl de tampão Taq polimerase; 5 µl de dNTP mix 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 (*Thermus aquaticus* DNA polimerase – Invitrogen) previamente diluída em água ultrapura na proporção 1:2; anelamento 45 segundos, em temperatura específica; 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, Califórnia, Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram armazenados a -20°C.

Tabela 1: Os *primers* utilizados com suas seqüências descritas abaixo obedeceram à estratégia sense e anti-sense: **pb**= pares de bases.

Primer	Seqüência (5'-3'):	Condições PCR e Tamanho do amplicon:
Beta actina	GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	58°C / 40 ciclos 237 pb
	GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	
HR1	TTT CTC TCT TTT CTG TGG GTT ATT	60° C/ 35 ciclos 387 pb
	CTT GGG GGT TTG GGA TGG TGA CTT C	
HR2	TTC ATC GTG TCC TTG GCT ATC	60° C/ 35 ciclos 804 pb
	CTG AGA GGC GTT GGA CTT C	
HR4	AGT CAT CTT AGT CGC TTA T	50°C / 40 ciclos 455 pb
	CTG ATT TAG GAC CTG TTG	
HRF	ATC AGC CAC GAT GAG ATG TTC	60° C / 35 ciclos 437 pb
	TCA CGG TAG TCC AAT AGA GCA A	
FceRI γ	ATG ATT CCA GCA GTG GTC TTG	58° C / 55 ciclos 283 pb
	CTA CTG TGG TGG TTT CTC	

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 ultra violeta e documentadas em sistema de documentação fotográfica (ImageQuant 400, Amershan-GE, Reino Unido). A intensidade das bandas foi analisada por com auxílio do *software* (ImageQuant TL, Amershan-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, 1,5µl 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 5µl de brometo de etídio. O padrão de DNA (DNA marker φX174 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 – Imunofluorescência para Fator de Transcrição GATA-3

Para marcação específica por meio do método de imunofluorescência, 100 μ l das células provenientes da cultura eram submetidos à centrifugação a 300 x g por 10 minutos (Hettich Zentrifugen Rotofix 32A, Tuttlingen, Alemanha).

Para análise do fator de transcrição GATA-3 optamos por utilizar as células provenientes da cultura após 24 horas.

A fixação e permeabilização das células era realizada mantendo as lâminas submersas em acetona gelada por 15 minutos. Posteriormente, eram realizadas três lavagens com salina tamponada 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-3 (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 anti-mouse conjugado com Texas Red (Vector Laboratories Inc., Califórnia, EUA) na concentração de 3 µg/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 Leica DM 4500B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). As imagens eram captadas com auxílio do software Leica FW 4000 (Leica Microsystems).

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, era comparada para verificar possíveis diferenças na expressão protéica.

3.13 – Análise Estatística

Os resultados eram expressos em função da mediana 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 SPSS versão 16.02 (SPSS Inc., Illinois, EUA) licenciada para Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp. Eram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os dados foram, então, representados pelo box-plot. Esta representação gráfica é um resumo baseado no esquema dos cinco números (mínimo, primeiro quartil, mediana, terceiro quartil e máximo). Na estatística descritiva, quartil é um dos três

valores que divide um conjunto ordenado de dados em quatro partes iguais, de forma que o primeiro quartil delimita os 25% inferiores dos dados; o segundo quartil, equivale à mediana e o terceiro quartil delimita os 25% superiores. No box-plot, a caixa central se estende desde o primeiro até o terceiro quartil, com marcação central em seu interior para indicar a posição da mediana e representa os 50% dos dados que se concentram em torno da mesma. As duas retas representam os outros 50% dos dados (25% inferiores e 25% superiores, delimitados pelo primeiro e terceiro quartil, respectivamente). Este tipo de gráfico é utilizado em análises não paramétricas e permite visualizar a dispersão dos resultados em relação à posição central, ou seja, à mediana.

4 – Resultados

4.1 – Determinação da concentração de veneno de abelha:

Com objetivo de estabelecer a melhor concentração de veneno de abelha a ser utilizada como estímulo em cultura, foi realizada uma curva de concentrações do veneno partindo de uma concentração inicial de 1µg/ml, analisando-se, posteriormente, a viabilidade celular após 72 horas. Os dados estão representados graficamente na figura 2 (página 56).

A partir destes resultados, a concentração de veneno utilizada na cultura de células ficou definida como 1ng/ml.

4.2 – Análise da Viabilidade celular:

Depois de transcorridos os tempos de cultura, a viabilidade das células provenientes de pacientes em diferentes períodos de imunoterapia foi avaliada com auxílio do corante azul de Tripan (Sigma). As células foram consideradas vivas quando não absorveram o corante, e consideradas mortas, quando coradas em azul. Dados representados na figura 3 (página 57).

De maneira geral as células apresentaram manutenção da viabilidade após os tempos de cultura, com alguma redução depois de transcorridas as 72 horas.

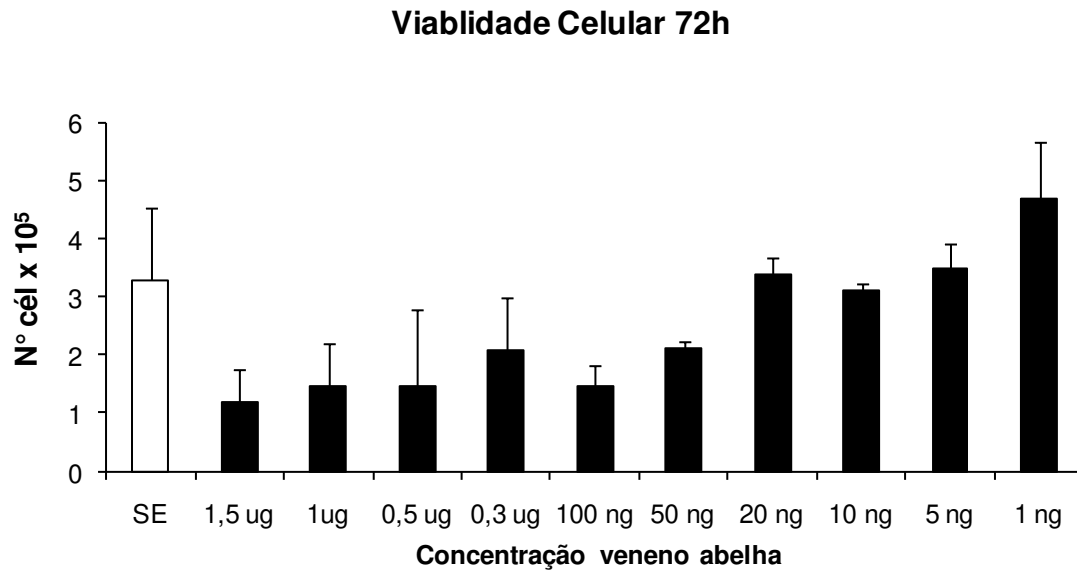


Figura 2: Gráfico representando a viabilidade das células em 72 horas de cultura, estimuladas com diferentes concentrações do veneno de abelha. O parâmetro de comparação utilizado foi a sobrevivência de células não estimuladas durante o mesmo período em cultura.

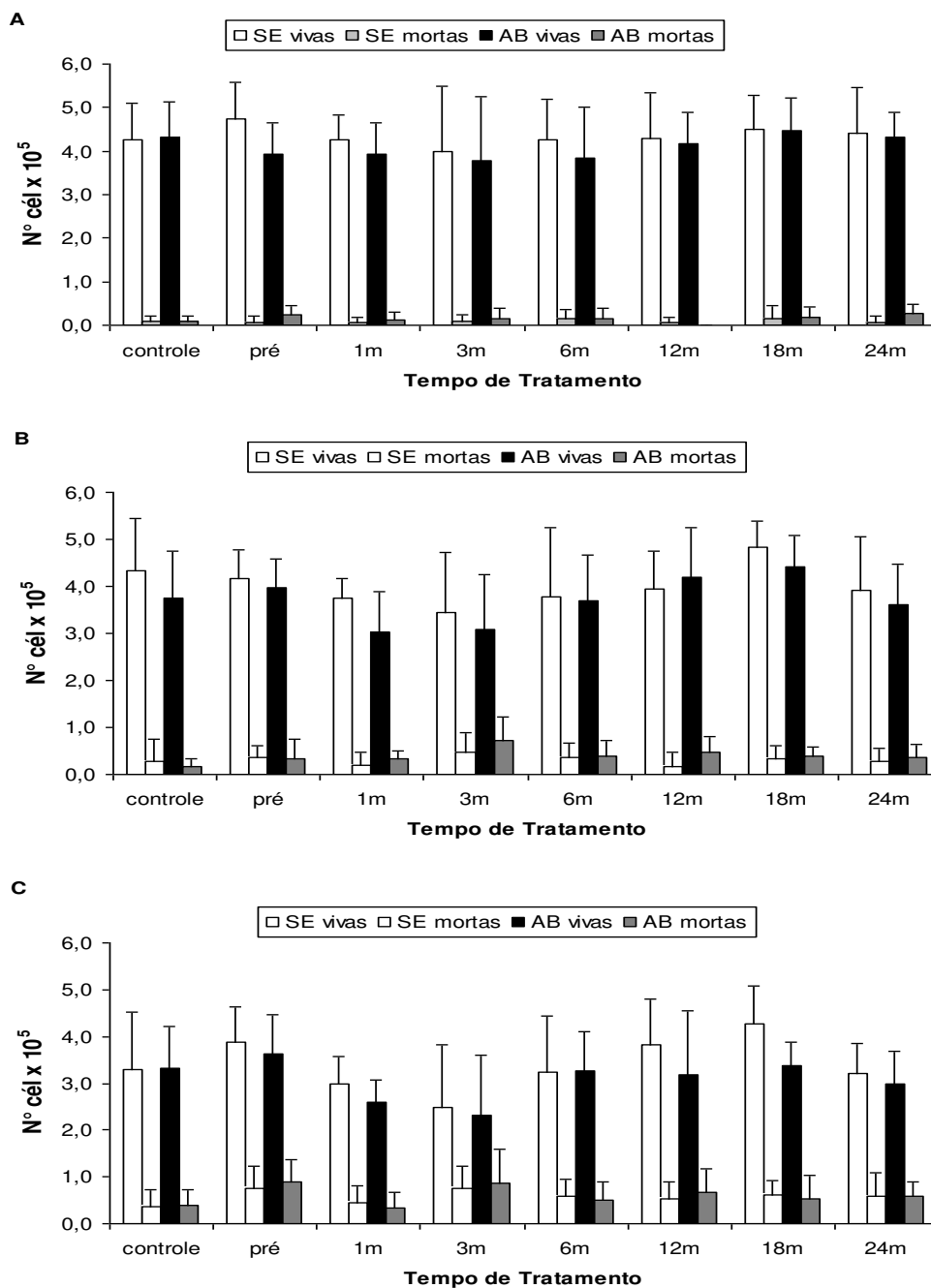


Figura 3: Gráfico representando a viabilidade celular após 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) de cultura, nos diferentes períodos de tratamento. O número de células vivas e de células mortas foi obtido por contagem em câmara de Neubauer.

4.3 – Cinética da Expressão Gênica do Receptor 1 de Histamina (HR1):

Após a separação dos fragmentos amplificados em gel de agarose 1,5%, os dados foram organizados de acordo com o período de tratamento correspondente a cada amostra e encontram-se representados na figura 4 (página 59).

Pacientes submetidos a três meses de imunoterapia apresentaram expressão distinta de todos os outros períodos, com elevação nos níveis de RNAm no período de 48 horas de cultura. Comportamento diferencial também foi apresentado por pacientes após 12 meses de tratamento, os quais mostraram aumento de expressão gênica com 72 horas de cultura.

4.4 – Expressão gênica do Receptor 1 de Histamina:

Considerando-se a expressão gênica do HR1 durante as 72 horas de cultura, obtivemos a mediana da expressão, representado graficamente na figura 5 (página 60) por meio de box-plot.

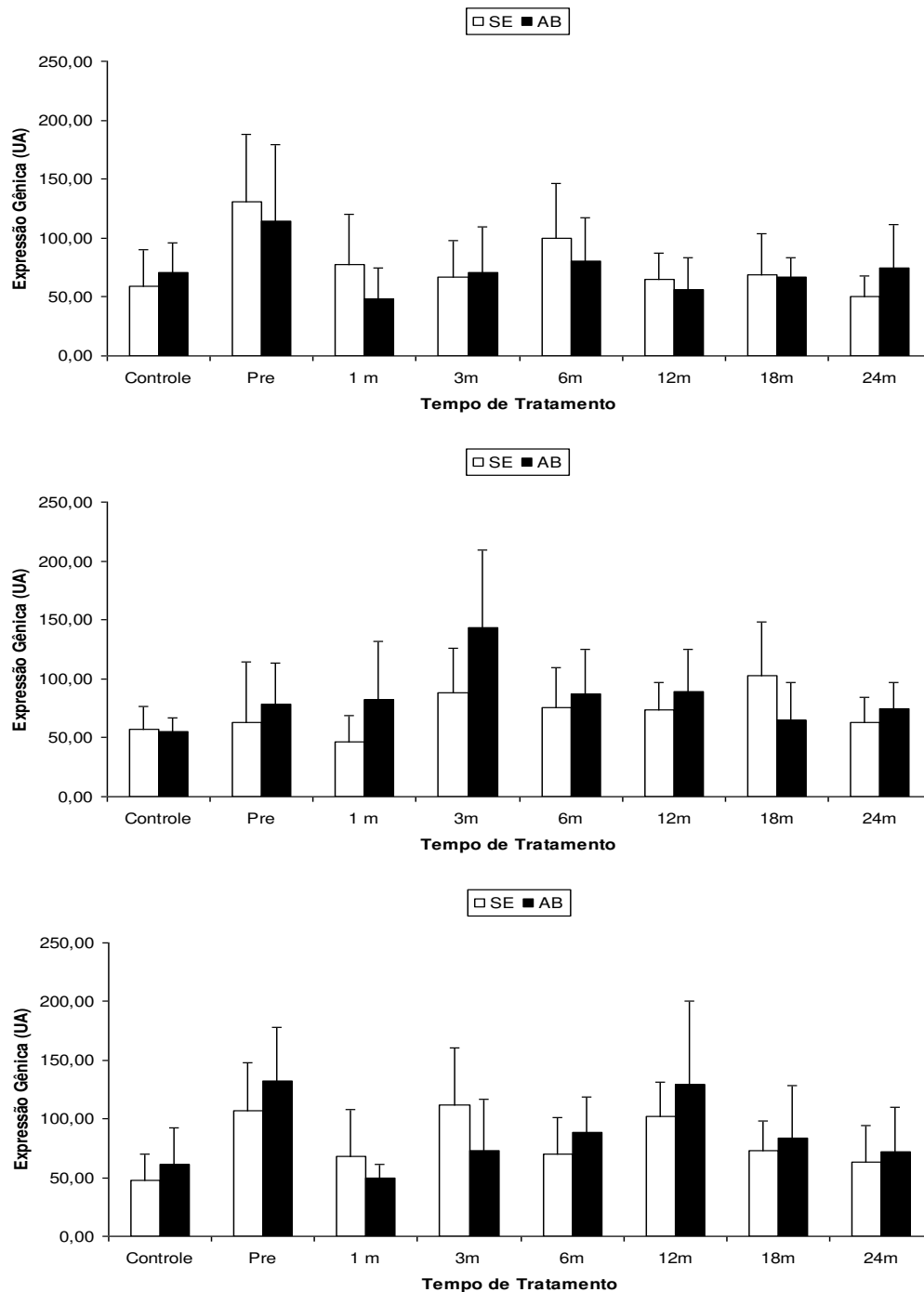


Figura 4: Expressão gênica do receptor 1 de histamina (HR1) em Unidades Arbitrárias (UA), em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, após 24 (A), 48 (B) e 72 horas de cultura (C). Dados expressos em função da média e desvio padrão.

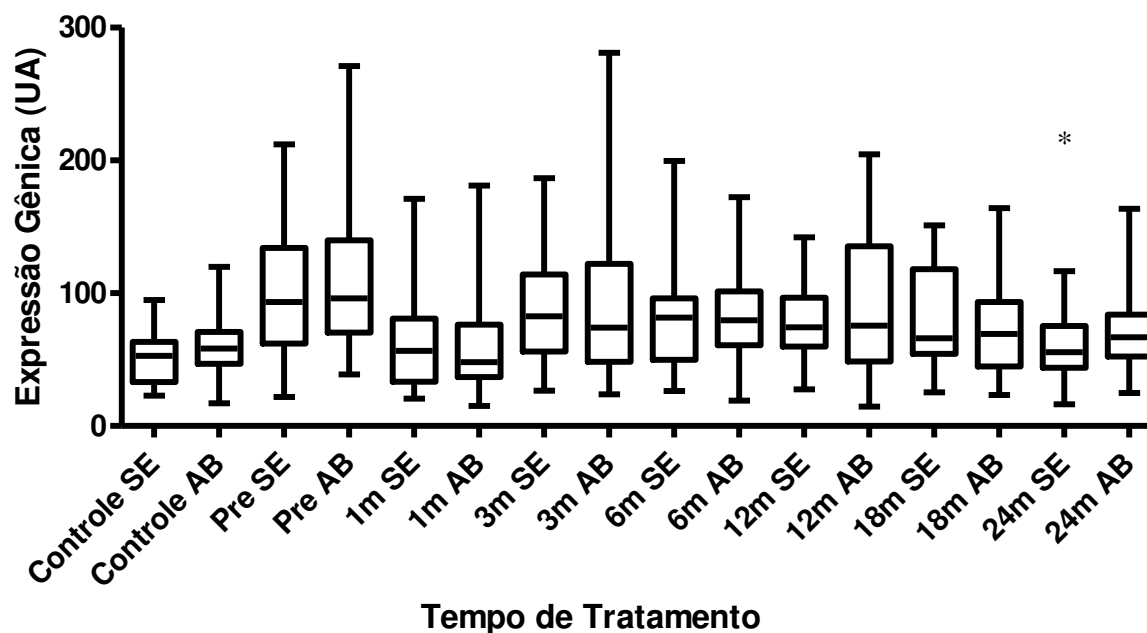


Figura 5: Representação gráfica da expressão gênica do receptor 1 de histamina (HR1) durante as 72 horas em cultura, em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica. Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com diferença significativa considerada para valores de $p < 0,05$ (*).

Os resultados obtidos para expressão gênica do HR1 durante as 72 horas em cultura mostram que, em células não estimuladas, indivíduos não alérgicos (53,58), apresentaram expressão significativamente menor ($p < 0,05$) que a observada em pacientes pré-imunoterapia (93,33) e pacientes após três (82,72) e seis meses de tratamento (81,58). Pacientes pré-imunoterapia (93,33) apresentaram também expressão significativamente maior que as observadas em pacientes após um mês (56,70) e com 24 meses de tratamento (55,65).

Com relação às células estimuladas com veneno de abelha, diferença significativa foi observada entre indivíduos controle, não alérgicos (57,87) e pacientes pré-imunoterapia (96,01). A expressão de HR1 em células estimuladas de pacientes pré-imunoterapia também foi significativamente maior que aquela observada em pacientes após um mês de tratamento (48,01) e pacientes com 18 (69,33) e 24 meses (66,76).

Não houve diferença significativa entre células estimuladas com veneno de abelha e células não estimuladas dentro dos períodos analisados.

4.5 – Cinética da Expressão Gênica do Receptor 2 de Histamina (HR2):

Não foi verificada nenhuma alteração relevante durante a cultura para o HR2 (Figura 6, página 62).

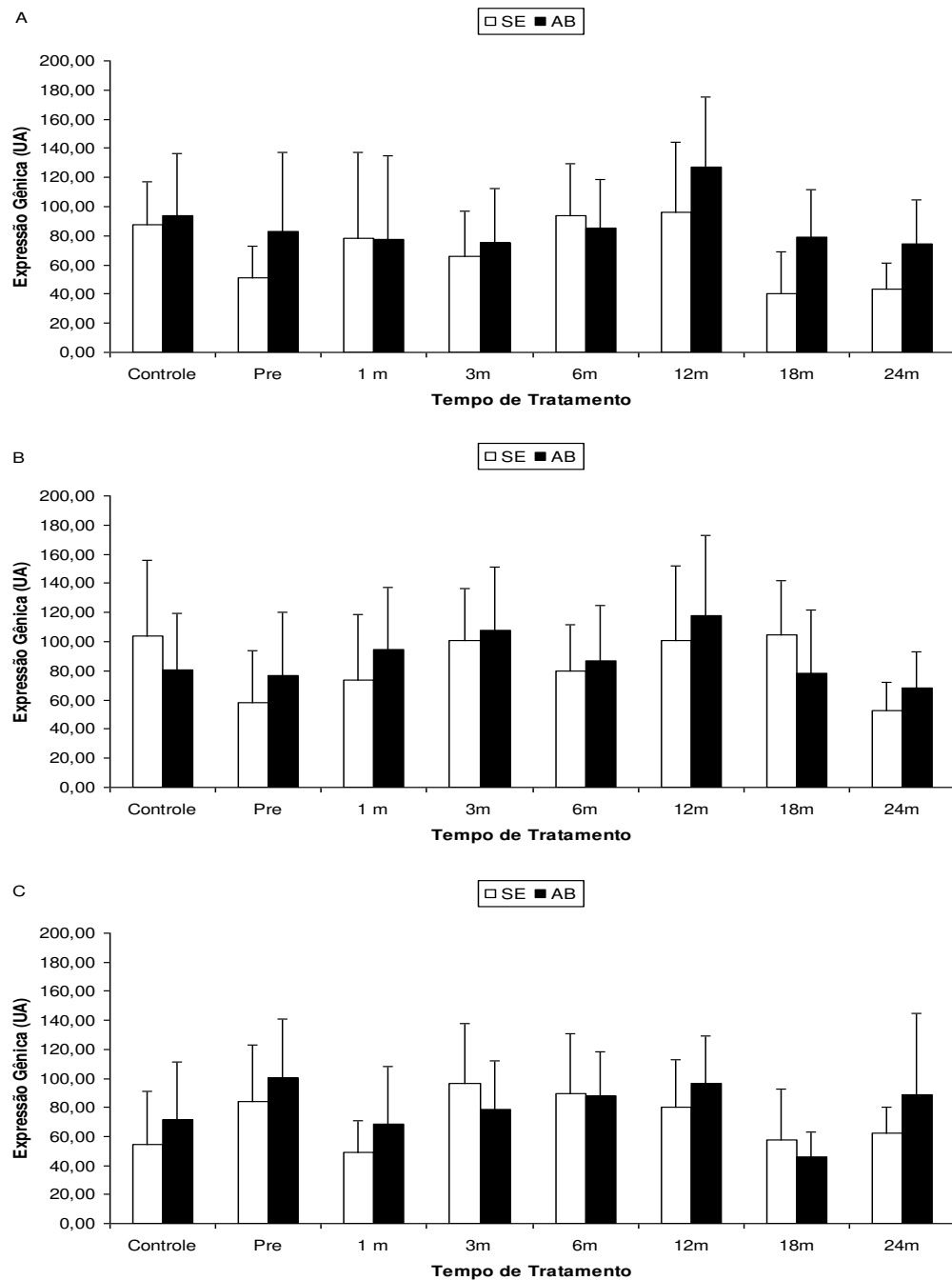


Figura 6: Expressão gênica do receptor 2 de histamina (HR2) em Unidades Arbitrárias (UA), em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, após 24 (A), 48 (B) e 72 horas de cultura (C). Dados expressos em função da média e desvio padrão.

4.6 – Expressão gênica do Receptor 2 de Histamina:

A expressão gênica do HR2 durante as 72 horas de cultura encontra-se representada graficamente na figura 7 (página 64).

A expressão gênica de HR2 foi significativamente menor ($p < 0,05$) em células não estimuladas de pacientes após 24 meses de tratamento (55,09), quando comparadas às células de pacientes com seis meses de tratamento (88,92). Pacientes pré-imunoterapia apresentaram expressão significativamente menor (58,93) que pacientes submetidos a três (78,96), seis (89,92) e 12 meses de imunoterapia (85,07).

Em relação às células estimuladas com veneno de abelha, os pacientes com 18 meses de tratamento (63,43) apresentaram redução significativa nos níveis de HR2 em comparação aos pacientes após 12 meses de imunoterapia (108,15).

No período de 24 meses de tratamento, os níveis de RNAm em células estimuladas com veneno de abelha (71,41) foi significativamente maior que em células não estimuladas (55,09).

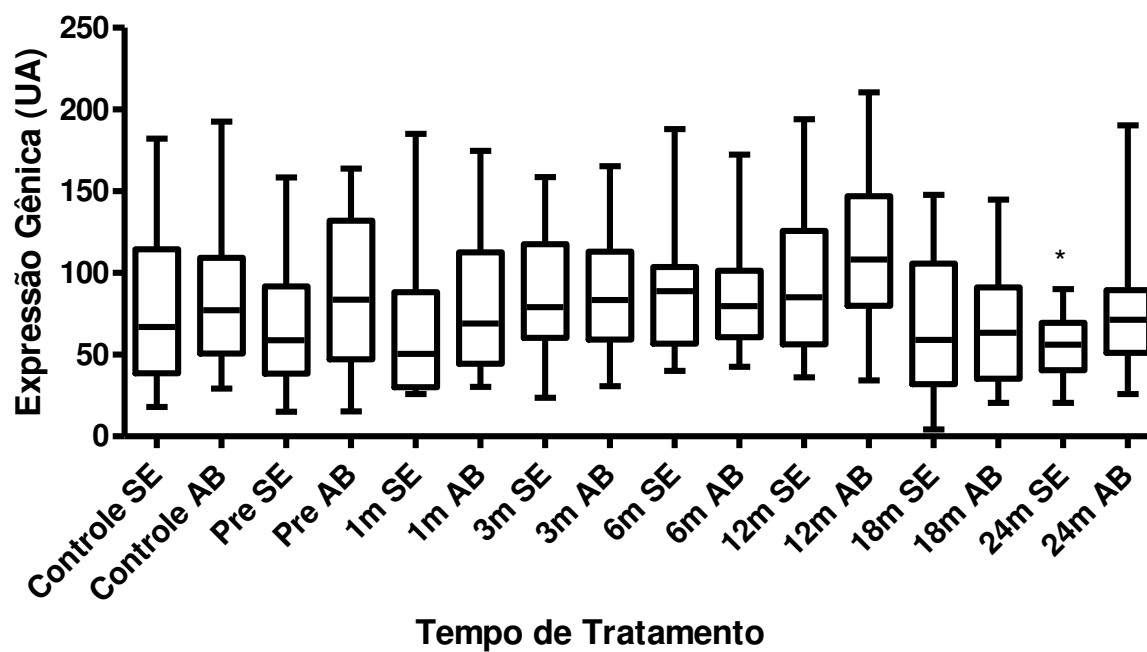


Figura 7: Representação gráfica da expressão gênica do receptor 2 de histamina (HR2) durante as 72 horas em cultura, em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica. Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com diferença significativa considerada para valores de $p < 0,05$ (*).

4.7 – Cinética da Expressão Gênica do Receptor 4 de Histamina (HR4):

Os resultados (figura 8, página 66) mostraram que há alteração na expressão de HR4 em células de pacientes submetidos a 18 meses de tratamento em comparação com pacientes com seis meses de imunoterapia, pois aqueles apresentam aumento nas primeiras 24 horas de cultura, seguido de diminuição, enquanto estes aumentam a expressão gênica apenas após 72 horas.

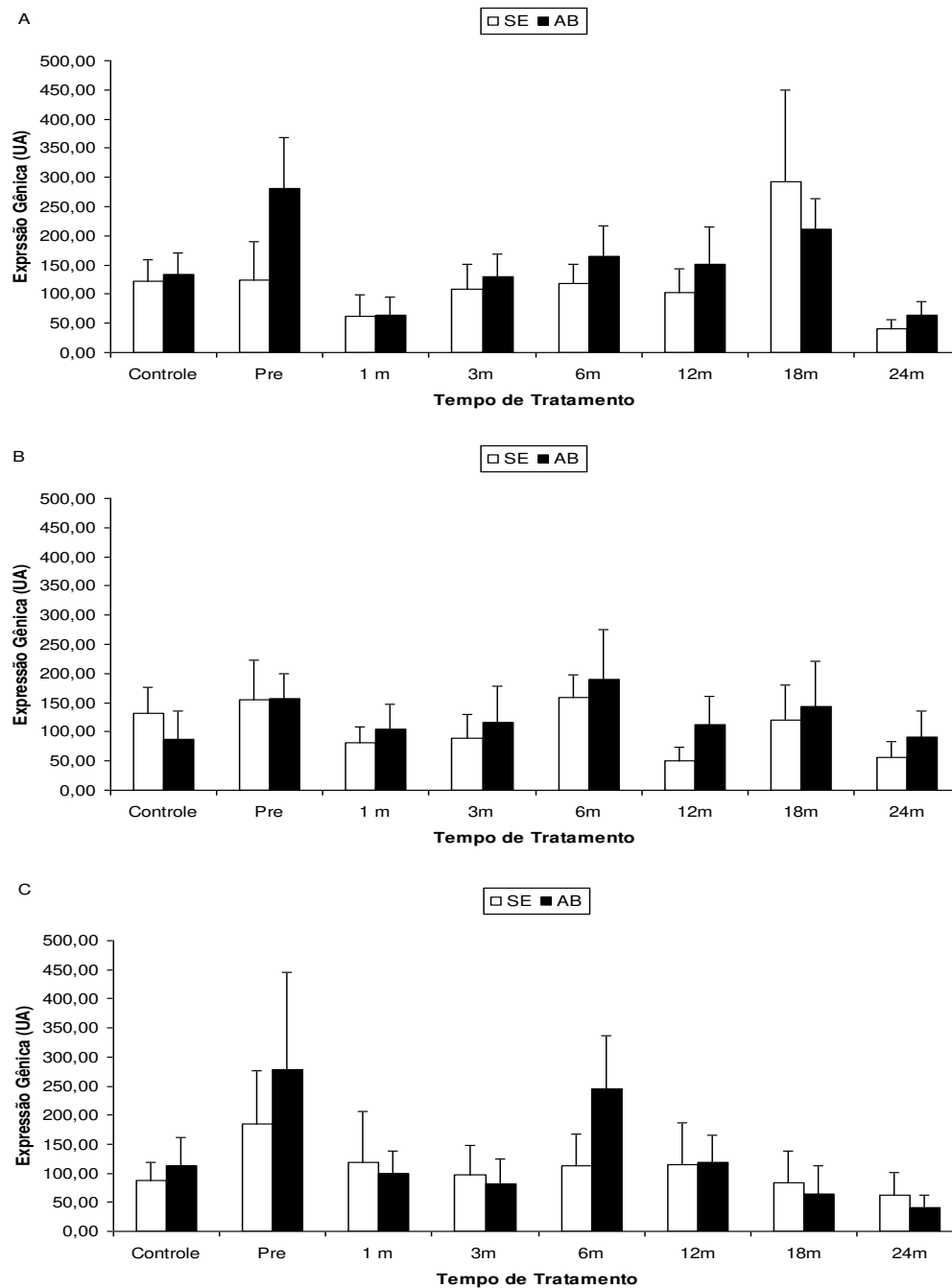


Figura 8: Expressão gênica do receptor 4 de histamina (HR4) em Unidades Arbitrárias (UA), em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, após 24 (A), 48 (B) e 72 horas de cultura (C). Dados expressos em função da média e desvio padrão.

4.8 – Expressão gênica do Receptor 4 de Histamina:

A expressão gênica total do HR4 observada durante as 72 horas de cultura encontra-se representada na figura 9 (página 68). Células não estimuladas de pacientes após 24 meses de imunoterapia (47,56) apresentaram expressão de HR4 significativamente menor ($p < 0,05$) que indivíduos não alérgicos (107,61), pacientes pré-tratamento (135, 65), e pacientes com seis meses (122,28) e 18 meses de imunoterapia (115,45). Pacientes pré-tratamento apresentaram também expressão significativamente maior (135,65) que pacientes submetidos a um mês (77,85), a três (99,28) e 12 meses de tratamento (85,16).

A expressão observada em células estimuladas com veneno de abelha provenientes de pacientes pré-imunoterapia (202,03) e pacientes após seis meses de tratamento (188,87) foram significativamente maiores que aquelas observadas em indivíduos controle (110,42), pacientes após um mês (91,53) e após três meses de imunoterapia (103,73). Células estimuladas com veneno de abelha de pacientes pré-tratamento apresentaram ainda expressão significativamente maior que pacientes após 12 (113,31), 18 (111,30) e 24 meses de imunoterapia (58,76). Pacientes com 24 meses de tratamento apresentaram, ainda, redução significativa nos níveis de RNAm em células estimuladas com veneno de abelha (58,76), quando comparados a pacientes após seis (188,87), 12 (113,31) e 18 meses de tratamento (111, 30). Comparando-se, então, células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha, foi observado aumento significativo na expressão de HR4 em células estimuladas com veneno de abelha de pacientes pré-imunoterapia (133,65; 202,03) e de pacientes após seis (122,28; 188,87) e 12 meses de tratamento (85,16; 113,31).

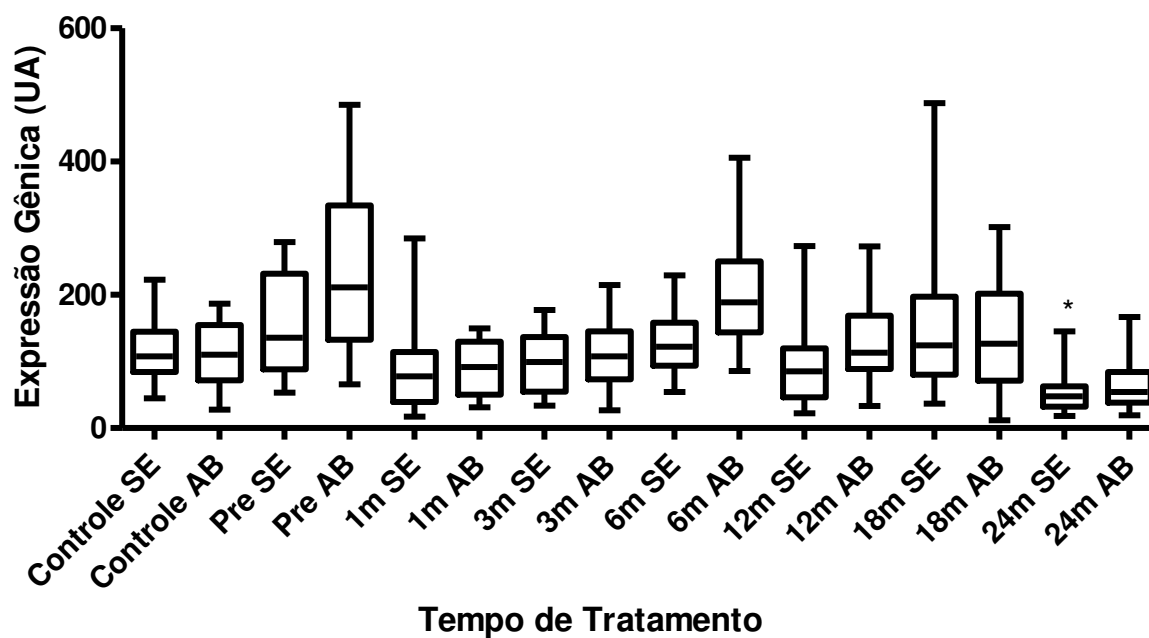


Figura 9: Representação gráfica da expressão gênica do receptor 4 de histamina (HR4) durante as 72 horas em cultura, em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica. Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com diferença significativa considerada para valores de $p < 0,05$ (*).

4.9 - Cinética da Expressão Gênica dos Fatores de Liberação de Histamina (HRF):

Com exceção das células provenientes dos pacientes pré-imunoterapia que mostraram dois picos de expressão de HRF (em 24 e 72 horas), não foram observadas alterações relevantes na cinética de expressão para os outros períodos de tratamento. Dados representados na Figura 10 (pagina 70).

4.10 – Expressão gênica dos Fatores de Liberação de Histamina (HRF):

A expressão gênica observada durante as 72 horas de cultura encontra-se graficamente representada na figura 11 (página 71).

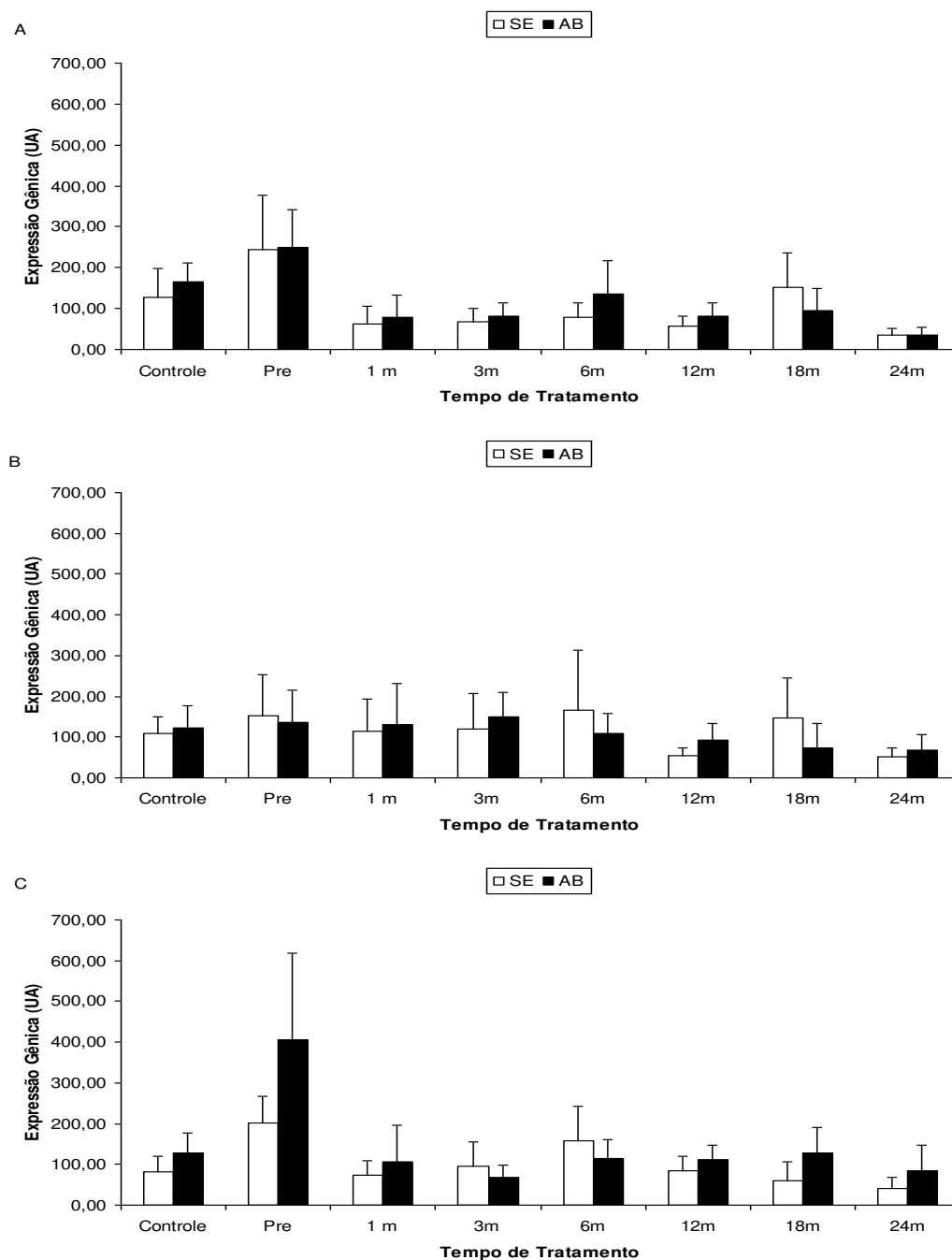


Figura 10: Expressão gênica dos fatores de liberação de histamina (HRF) em Unidades Arbitrárias (UA), em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, após 24 (A), 48 (B) e 72 horas de cultura (C). Dados expressos em função da média e desvio padrão.

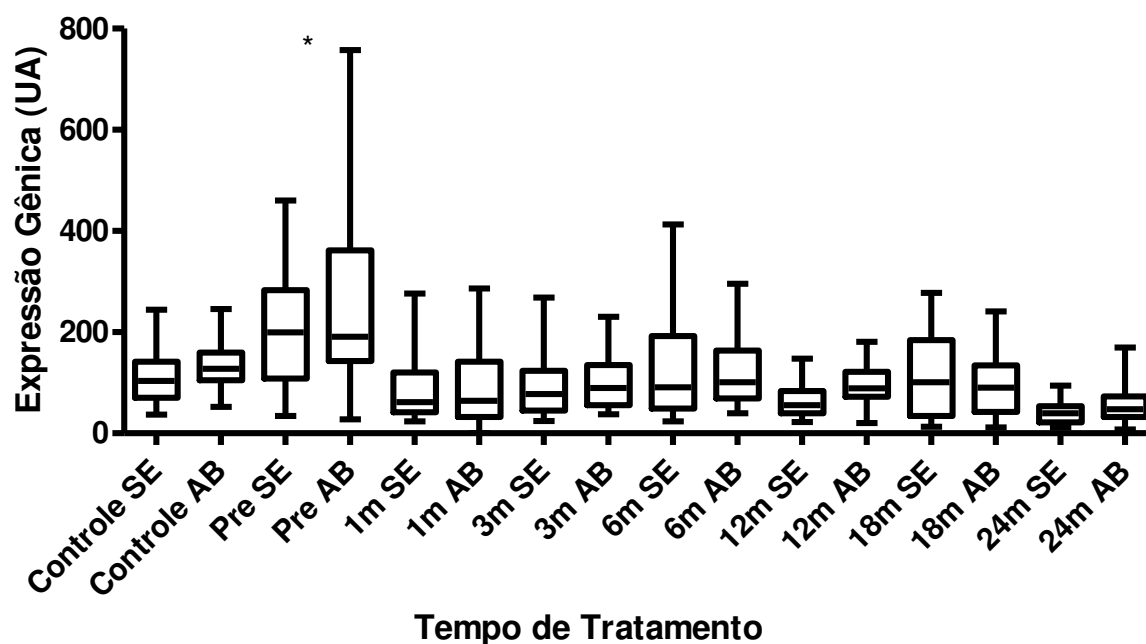


Figura 11: Representação gráfica da expressão gênica dos fatores de liberação de histamina (HRF) durante as 72 horas em cultura, em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica. Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com diferença significativa considerada para valores de $p < 0,05$ (*).

A expressão gênica do HRF em células não estimuladas de pacientes submetidos a 24 meses de tratamento (39,95) foi significativamente menor ($p < 0,05$) que aquelas observadas para indivíduos controle, não alérgicos, (103,35), pacientes pré-imunoterapia (199,83), pacientes após seis (91,26) e 18 meses de tratamento (101,20). Os níveis de RNAm obtidos em células de pacientes pré-imunoterapia (199,83) também foi significativamente maior quando comparados aos níveis observados em indivíduos não alérgicos (103,35), pacientes após um mês (61,94) e pacientes após três (77,78), seis (91,26), 12 meses (55,48), 18 de tratamento (101,20).

Com relação às células estimuladas com veneno de abelha, novamente a expressão de HRF em pacientes após 24 meses de tratamento (47,64) foi significativamente menor que as expressões observadas em indivíduos controle (127,55), pacientes pré-imunoterapia (191,09) e pacientes após seis meses de tratamento (101,11). Pacientes pré-imunoterapia (191,09) apresentaram, ainda, expressão significativamente maior em relação a indivíduos controle (127,55), pacientes após um mês (64,33) e pacientes submetidos a três (89,50), seis (101,11), 12 (80,24) e 18 meses de tratamento (90,57).

Na análise entre células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha observou-se aumento significativo da expressão de HRF em células estimuladas de indivíduos controle (103,35; 127,55) e de pacientes após 12 meses de imunoterapia (55,48; 89,24).

4.11 – Cinética da Expressão Gênica da Cadeia γ do Receptor de Alta

Afinidade de IgE (Fc ϵ RI γ):

A expressão gênica de cadeia γ nos diferentes tempos de cultura foi analisada para verificar possíveis variações na cinética da expressão gênica. Os dados encontram-se representados graficamente na figura 12 (página 74).

Não foram observadas grandes flutuações durante a expressão gênica desta cadeia durante a cultura.

4.12 – Expressão gênica da Cadeia γ do Receptor de Alta Afinidade de IgE

(Fc ϵ RI γ):

A expressão gênica observada para a cadeia gama durante as 72 horas de cultura encontra-se representada graficamente na figura 13 (página 75).

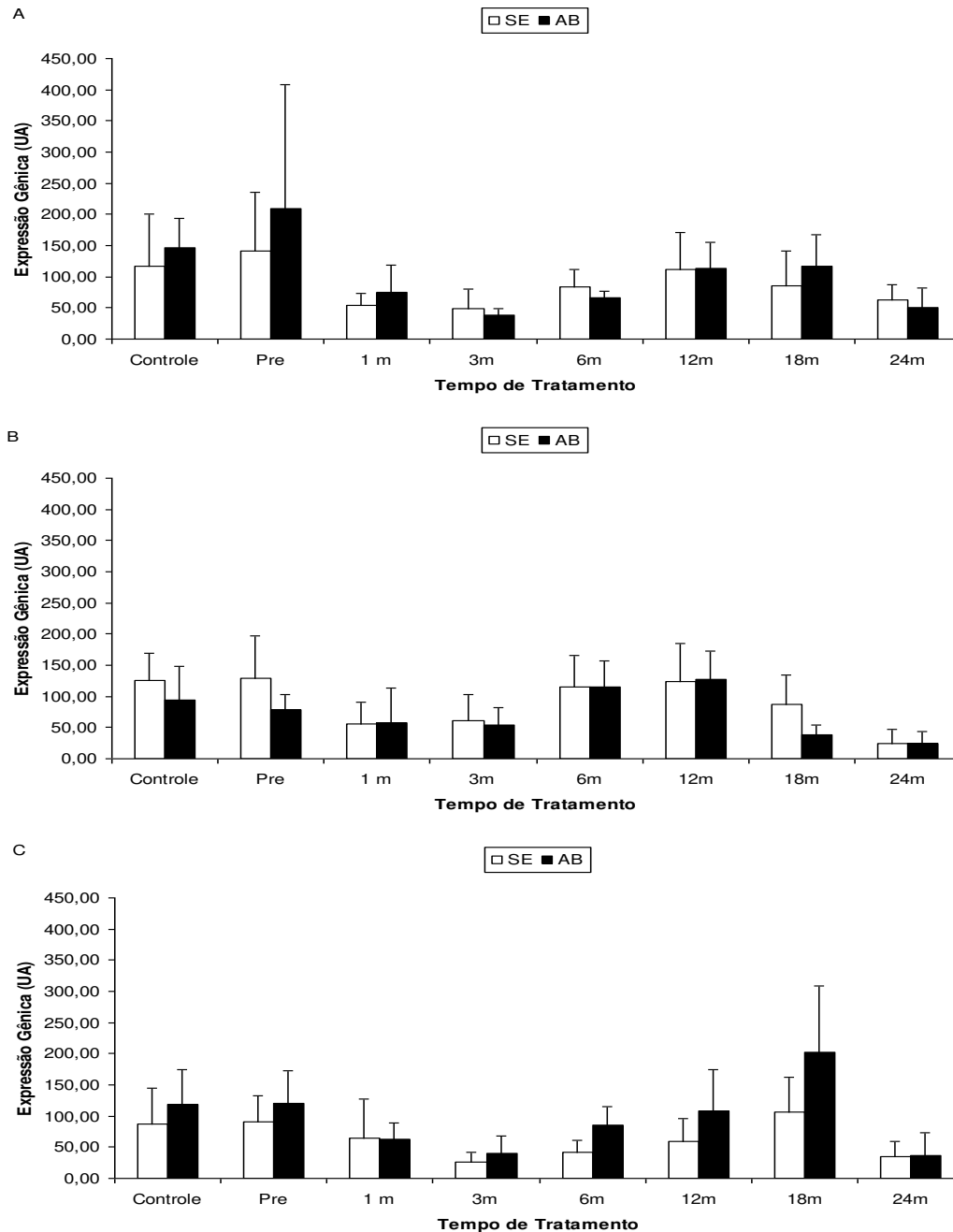


Figura 12: Expressão gênica da cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}\gamma$) em Unidades Arbitrárias (UA), em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica, após 24 (A), 48 (B) e 72 horas de cultura (C). Dados expressos em função da média e desvio padrão.

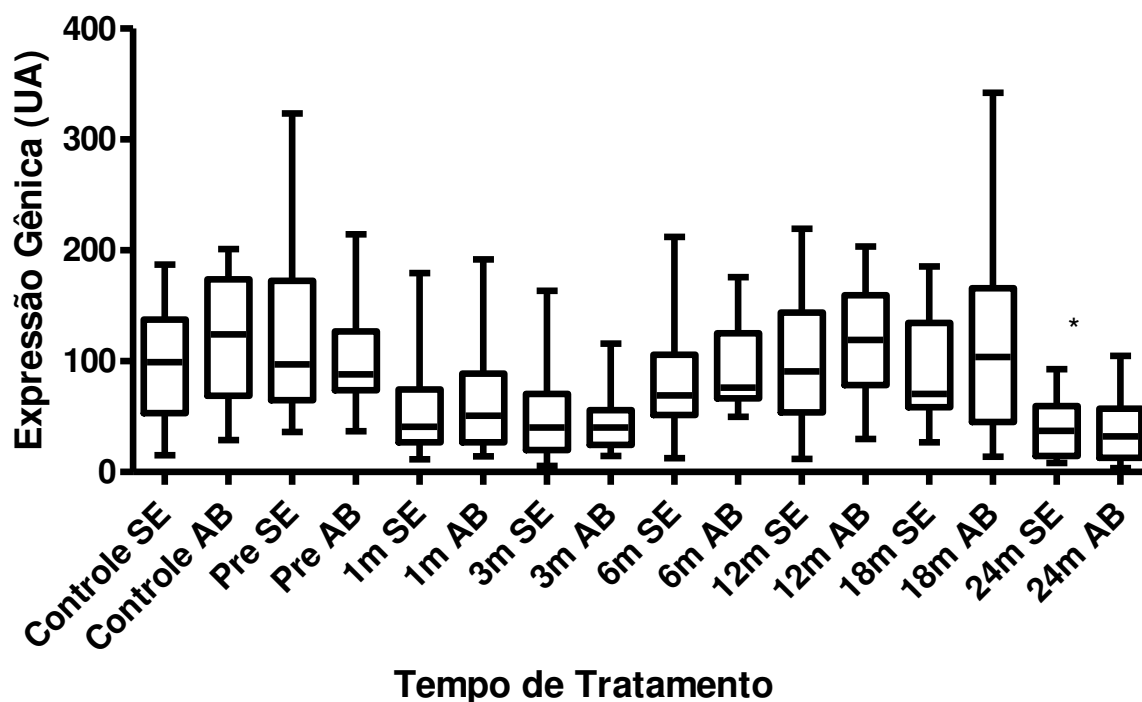


Figura 13: Representação gráfica da expressão gênica da cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE ($Fc\epsilon R1\gamma$) durante as 72 horas em cultura, em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica. Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com diferença significativa considerada para valores de $p < 0,05$ (*).

A análise da expressão gênica da cadeia gama após as 72 horas de cultura mostrou que, em células não estimuladas com veneno de abelha provenientes de pacientes após 24 meses de tratamento (37,20) foi significativamente menor ($p < 0,05$) que as observadas em indivíduos controle (99,18), pacientes pré-imunoterapia (97,24) e pacientes após 12 meses de tratamento (90,82). Ainda com relação a células não estimuladas, pacientes pré-imunoterapia apresentaram expressão de cadeia γ (97,24) significativamente maior que pacientes após um mês (40,73) e pacientes com três (40,32), seis meses de tratamento (69,07).

Células estimuladas com veneno de abelha provenientes de pacientes após 24 meses de tratamento apresentaram redução significativa nos níveis de RNAm (32,06) em relação a indivíduos controle (124,00), pacientes pré-imunoterapia (90,85) e pacientes submetidos a seis (76,17), 12 (119,00) e 18 meses de tratamento (103,90). Após três meses de imunoterapia, as células estimuladas apresentaram expressão significativamente menor (40,09) que células de pacientes pré-imunoterapia (90,85) e células de pacientes após seis (76,17), 12 (119,00) e 18 meses de tratamento (103,90). A expressão da cadeia gama observada em células estimuladas com veneno de abelha provenientes de pacientes com 12 meses de imunoterapia (119,00) também foi significativamente maior que aquela observada em pacientes submetidos a um mês de tratamento (50,70).

Não houve diferença significativa entre células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha dentro dos tempos de tratamento analisados.

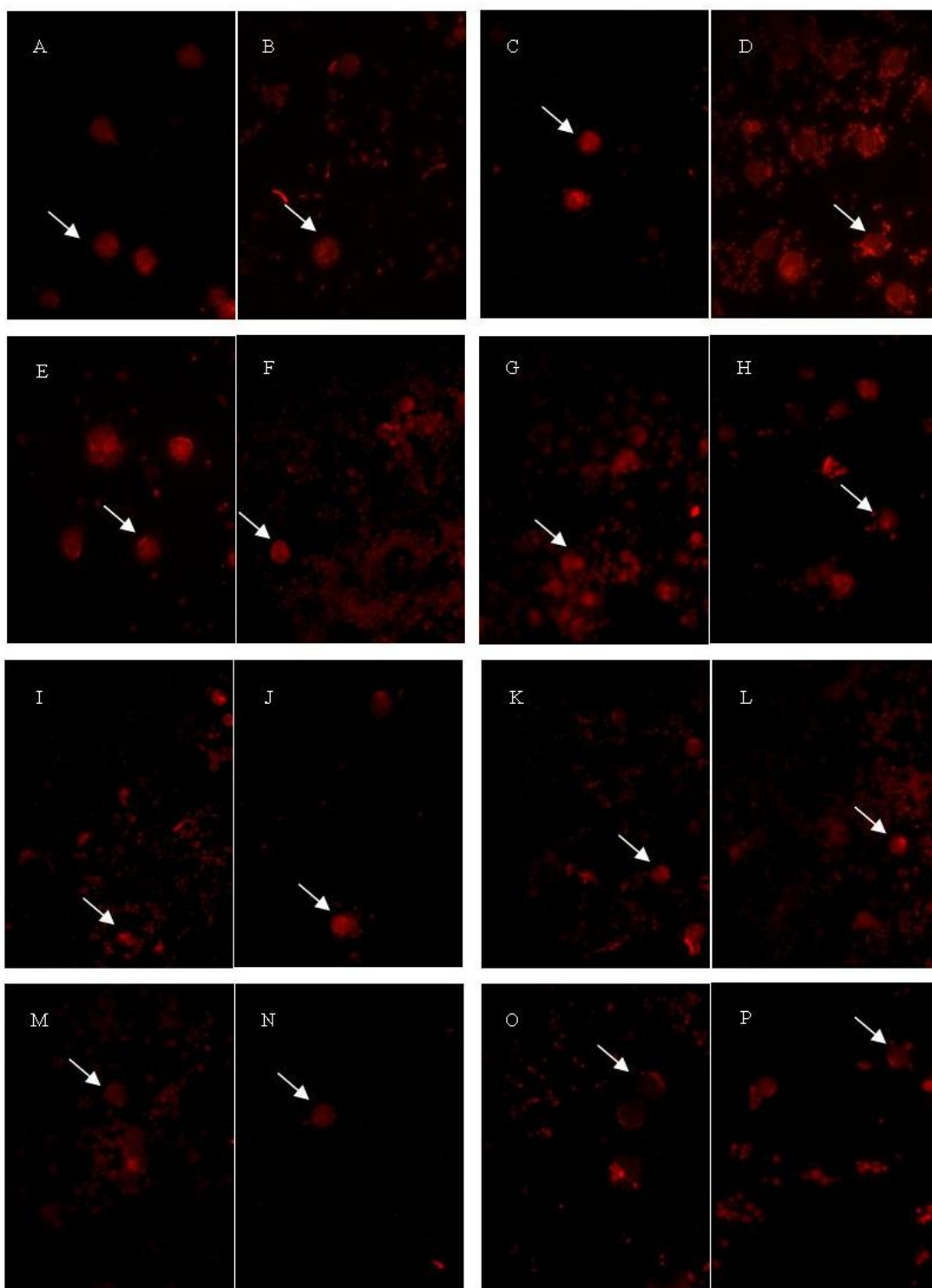
4.13 – Expressão do Fator de Transcrição GATA-3:

A presença da proteína do fator de transcrição GATA-3 foi averiguada com marcação por fluorescência.

Prancha I: Fotomicrografia representativa da microscopia por Imunofluorescência de células linfomononucleares provenientes de cultura de 24 horas para detecção do fator de transcrição GATA-3 (página 78).

- Indivíduos controle, não alérgicos: sem estímulo (A) e com estímulo do veneno de abelha (B).
- Pacientes pré-imunoterapia: sem estímulo (C) e com estímulo do veneno de abelha (D).
- Pacientes após 1 mês de imunoterapia: sem estímulo (E) e com estímulo do veneno de abelha (F).
- Pacientes após 3 meses de imunoterapia: sem estímulo (G) e com estímulo do veneno de abelha (H).
- Pacientes após 6 meses de imunoterapia: sem estímulo (I) e com estímulo do veneno de abelha (J).
- Pacientes após 12 meses de imunoterapia: sem estímulo (K) e com estímulo do veneno de abelha (L).
- Pacientes após 18 meses de imunoterapia: sem estímulo (M) e com estímulo do veneno de abelha (N).
- Pacientes após 24 meses de imunoterapia: sem estímulo (O) e com estímulo do veneno de abelha (P).

Aumento 1000X.



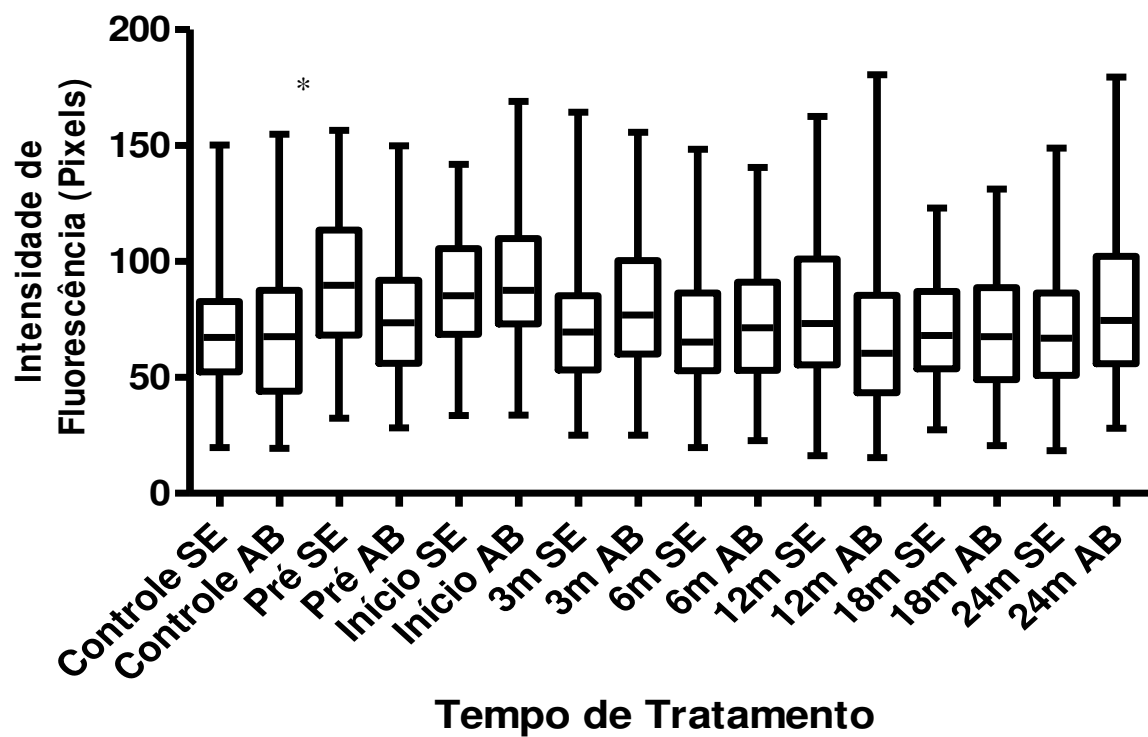


Figura 14: Representação gráfica da intensidade de fluorescência, correspondente à expressão protéica do fator de transcrição Gata-3 em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos à imunoterapia específica. Análise estatística baseada nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com diferença significativa considerada para valores de $p < 0,05$ (*).

Após a captação, as imagens foram analisadas com auxílio do software ImageJ, permitindo verificar diferenças na expressão protéica do fator de transcrição GATA-3, isto é, diferenças na intensidade de fluorescência, em função da quantidade de pixels. Os resultados estão representados graficamente na figura 14 (página 79). Células não estimuladas de pacientes pré-imunoterapia apresentaram expressão do fator de transcrição GATA-3 (89,73) significativamente maior que indivíduos controle, não alérgicos (67,24), pacientes após três (69,56), seis (65,28), 12 (73,18), 18 (68,07) e 24 meses de tratamento (66,99). Pacientes submetidos a um mês de imunoterapia (85,28) também apresentaram intensidade de fluorescência significativamente maior que indivíduos controle (67,24) e pacientes após três (69,59), seis (65,28), 18 (68,07) e 24 meses de tratamento (66,99).

Com relação a células estimuladas com veneno de abelha pacientes com um mês de imunoterapia mostraram expressão protéica de GATA-3 significativamente maior (87,58) que as observadas em indivíduos não alérgicos (67,66), pacientes pré-imunoterapia (73,63) e pacientes submetidos a seis (71,49), 12 (60,42), 18 (67,58) e 24 meses de tratamento (74,60). Pacientes com 12 meses de imunoterapia apresentaram ainda redução significativa na expressão de Gata-3 (60,42), quando comparados a pacientes pré-imunoterapia (73,63) com três (76,98) e 24 meses de tratamento (74,60).

Comparando-se células não estimuladas e células estimuladas com veneno de abelha, diferença significativa foi observada em pacientes pré-imunoterapia (89,73; 73,63), pacientes com três meses de tratamento (69,59; 78,98), com 12 meses (73,18; 60,42) e pacientes após 24 meses de imunoterapia (66,99; 74,60).

5 – Discussão

Reações sistêmicas à ferroada de insetos afligem aproximadamente 0,3 a 7,5% da população da Europa e Estados Unidos, acredita-se que pelo menos um quinto desses indivíduos irá desenvolver reações graves, com a necessidade de atendimento emergencial [35]. A imunoterapia específica ao veneno é considerada o único tratamento pelo qual a tolerância de longo prazo pode ser conseguida [43]. O sucesso na imunoterapia está classicamente associado a alterações na resposta imune, como aumento de anticorpos IgG, sobretudo, IgG4, mudanças no padrão de citocinas de Th2 para Th1, diminuição da responsividade de linfócitos T ao alérgeno e aumento nos níveis de IL-10 [53].

Durante a reação alérgica ocorre a liberação de mediadores inflamatórios dos mastócitos e basófilos, sendo a histamina o principal deles. A histamina influencia o balanço da resposta Th1/Th2 através da ligação com seus receptores; o receptor HR1 estimula as respostas Th1, enquanto o receptor HR2 inibe, principalmente, as respostas Th2 [54].

Nossos resultados sugerem que indivíduos alérgicos ao veneno de abelha, sem tratamento (pacientes pré-imunoterapia), apresentam expressão gênica mais elevada do HR1 do que indivíduos não alérgicos, em células linfomononucleares, tanto sem estímulo como nas estimuladas com veneno de abelha. Os níveis de RNAm encontrados nos pacientes pré-imunoterapia foram também significativamente maiores que os valores obtidos em células de pacientes submetidos a 24 meses de tratamento. Isto demonstra que a imunoterapia é eficaz em reduzir a expressão gênica do HR1. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, onde há evidências de redução na expressão de HR1 durante a imunoterapia com o protocolo ultra-rápido [13, 48]. Além disso,

Horio e colaboradores mostraram que a expressão do HR1 pode ser aumentada pelo próprio HR1 via mecanismo de retro-alimentação, em resposta ao estímulo com histamina, ou via estimulação com IL-4, com ativação da via Jak 3 - STAT 6 [55].

Adicionalmente, nossos resultados sugerem padrão diferencial de expressão deste receptor em indivíduos alérgicos e indivíduos não alérgicos, aqueles apresentando expressão gênica mais elevada.

Com relação ao HR2, nossos resultados mostraram algumas mudanças no padrão de expressão durante o tratamento, porém, não foram observadas alterações bem definidas comparando-se a expressão gênica antes e depois da imunoterapia. Não foi estudada, entretanto, a expressão protéica dos receptores, de forma que, possíveis alterações na expressão do HR2 na superfície das células poderiam ser consequência de controle pós transcricional, ou seja, mecanismos regulatórios acionados após a expressão gênica. O aumento dos níveis de RNAm observado em células estimuladas com veneno de abelha de pacientes com 24 meses de tratamento sugere que a resposta inibitória dos linfócitos à ligação com a histamina prevalece no final do tratamento frente à nova estimulação com apitoxina. Não foram encontrados dados na literatura que demonstrem o comportamento deste receptor durante a imunoterapia específica.

O HR4 apresenta maior afinidade de ligação com a histamina que o HR1 e sua ativação promove a quimiotaxia de leucócitos para o sítio de inflamação. Em linfócitos T, mediante ligação com a histamina, o HR4 leva à inibição da formação de STAT-1 α em indivíduos não atópicos [23]. O STAT-1 regula o recrutamento de

células inflamatórias, especialmente para vias aéreas, induzindo a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas [56]. Além disso, Gutzmer e colaboradores mostraram que o HR4 é mais expresso em células Th2 ou em células CD4⁺ estimuladas com IL-4 [57].

Nossos resultados mostraram redução nos níveis de HR4 em pacientes após 24 meses, em comparação a indivíduos controle e pacientes pré-imunoterapia, mais evidente em células não estimuladas. Células estimuladas com veneno de abelha provenientes de pacientes submetidos a 24 meses de tratamento também apresentaram redução significativa na expressão de HR4 em relação a células de pacientes pré-imunoterapia. Michel e colaboradores mostraram que a inibição de HR4 utilizando-se antagonista específico inibe a ligação de STAT-6 ao DNA, este fator de transcrição está envolvido na sinalização celular ativada em resposta a citocinas, promovendo a resposta com padrão Th2 [58]. Estes resultados reforçam os por nós encontrados. Em nosso trabalho, não foi verificada a ativação de vias de sinalização celular, porém, os resultados sugerem caminhos que possam explicar a tolerância desenvolvida em resposta à imunoterapia. Não encontramos indícios na literatura demonstrando quaisquer alterações na expressão de HR4, tanto a nível gênico, como protéico, relacionada à imunoterapia específica.

Quanto às diferenças no padrão de expressão gênica entre indivíduos não alérgicos e indivíduos alérgicos ao veneno de abelha, verificamos que nestes os níveis de HR4 são mais elevados. Estes resultados estão de acordo com os achados de Gutzmer e colaboradores [57], uma vez que indivíduos alérgicos apresentam predominância de resposta Th2.

Os resultados encontrados na expressão gênica dos receptores de histamina em células linfomononucleares dos pacientes alérgicos ao veneno de abelha, 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 [14]. O fator de liberação de histamina avaliados neste estudo é dependentes de IgE (HRF-IgE) e foi identificado e caracterizado por MacDonald e colaboradores [15, 59]. 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 para pacientes em todos os outros períodos de imunoterapia analisados. Observou-se também que pacientes com 24 meses de tratamento apresentaram redução nos níveis de RNAm. Ou seja, nossos resultados indicam que a imunoterapia reduz significativamente os níveis de

RNA dos fatores de liberação de histamina. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório [49] mostraram 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 receptor de alta afinidade de IgE (FcεRI) é componente fundamental na resposta alérgica, sendo responsável pela degranulação de mastócitos e liberação de mediadores quando ligado ao complexo IgE-alérgeno [60]. Em humanos, o FcεRI pode ser encontrado na forma de tetrâmero, formado pela junção das cadeias $\alpha\beta\gamma_2$, ou trímero, composto apenas pela combinação $\alpha\gamma_2$ [28]. A cadeia γ , cuja expressão gênica foi analisada neste estudo, está relacionada à ativação das vias de sinalização celular e transdução de sinal, em resposta à ligação do receptor com a IgE. Além disso, sua presença é fundamental para garantir que a cadeia α , responsável pela ligação com a imunoglobulina, atinja a superfície celular, isto é, a cadeia gama é indispensável para a expressão do receptor de alta afinidade de IgE, como um todo [30].

Os níveis de RNA encontrados em células linfomononucleares de pacientes alérgicos ao veneno de abelha e submetidos a 24 meses de imunoterapia específica foram menores que aqueles observados em indivíduos não alérgicos e pacientes pré-imunoterapia. Esta redução foi observada em células não estimuladas e também em células estimuladas com veneno de abelha. Adicionalmente, observou-se diminuição significativa em pacientes após três

meses de imunoterapia, sugerindo ser este um período crítico na modulação deste receptor.

A expressão protéica do FcεRI na superfície da célula não foi estudada em nosso trabalho, porém, sabe-se que a mesma é regulada pela disponibilidade de IgE, uma vez que sua ligação estabiliza a presença do receptor na superfície impedindo que o mesmo seja internalizado no *turn over*, ou seja, durante a renovação natural que ocorre na célula [30]. Dessa forma, a redução nos níveis de RNAm observada após o tratamento pode estar relacionada, assim como para o HRF, à diminuição dos níveis de IgE específica ao longo da imunoterapia.

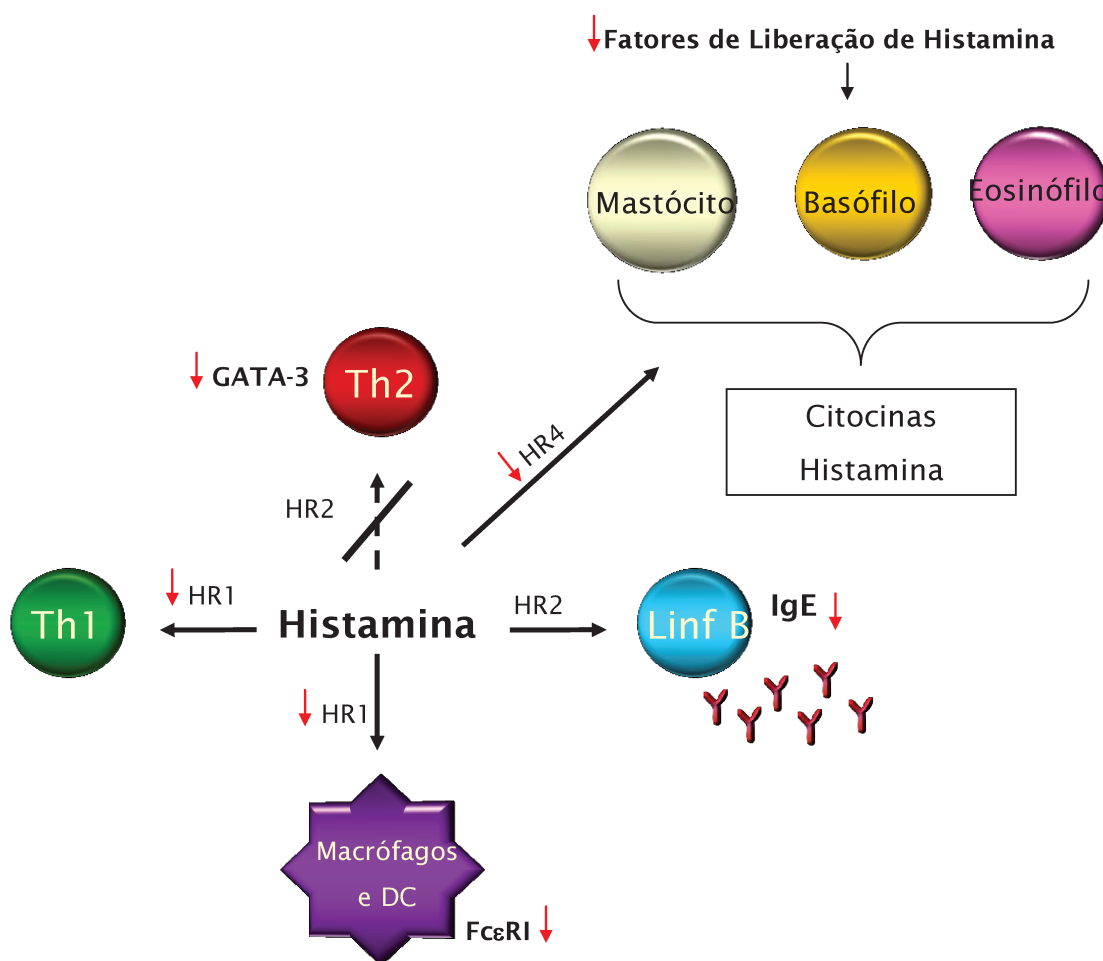
Linfócitos Th2 desempenham papel relevante na modulação da inflamação que pode levar ao desenvolvimento dos sintomas alérgicos, por meio da liberação de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. A própria IL-4 é necessária para o desenvolvimento destas células e sua expressão é regulada pelo fator de transcrição GATA-3. Portanto, o GATA-3 é fundamental para a diferenciação dos linfócitos Th2, contrapondo-se ao fator de transcrição Tbet que, por sua vez, é responsável pela diferenciação de linfócitos Th1 [61].

A expressão protéica de GATA-3 foi analisada por meio de marcação por imunofluorescência, seguida de análise de intensidade de fluorescência (quantidade de pixels). A intensidade de fluorescência obtida para células não estimuladas com veneno de abelha provenientes de pacientes pré-imunoterapia foi mais elevada que a expressão observada em células de indivíduos não alérgicos, sugerindo diferença no padrão de expressão, o que é coerente com o fato de indivíduos alérgicos apresentarem maior ativação de linfócitos Th2. Nossos

resultados mostram que a imunoterapia específica ao veneno de abelha reduz os níveis de GATA-3 ao final de 24 meses de tratamento. Os únicos dados disponíveis em literatura indexada relacionando este fator de transcrição são de Savolainen e colaboradores [62], estudando pacientes com alergia ao pólen em seguimento de imunoterapia sublingual, os quais não encontraram modificações na expressão gênica de GATA-3 durante o período de até dois anos acompanhamento. A divergência nos resultados obtidos por estes autores com relação aos nossos pode ser reflexo das diferenças entre os protocolos de imunoterapia e de estudo, além das vias de sensibilização.

Os nossos resultados para as células não estimuladas (SE) mostram o comportamento basal dos pacientes alérgicos após a aplicação da correspondente dose de imunoterapia. Dessa forma, fornecem dados para a compreensão mais adequada das vias de sinalização e dos mecanismos ativados após o estímulo com o veneno durante o tratamento.

A partir de nossos resultados, sugerimos um modelo dos efeitos da imunoterapia específica ao veneno de abelha, promovendo a imunomodulação dos elementos analisados (Figura 15, página 89).



LIAE – Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental

Figura 15: Ativação das células do sistema imune após encontro com alérgeno. A produção de histamina e outros mediadores pelos mastócitos e basófilos é controlada por um conjunto de fatores chamados de fatores de liberação de histamina. Uma vez liberada a histamina ativa principalmente os linfócitos Th1 e células apresentadoras de antígeno via HR1, inibe os linfócitos Th2, via HR2, e estimula a quimiotaxia das células efectoras via HR4. Os efeitos da imunoterapia específica encontram-se indicados em vermelho. Após 24 meses de tratamento, ocorre a diminuição na expressão dos fatores de liberação de histamina, HR1, HR4, FcεRI γ e GATA-3, e também dos níveis séricos de IgE específica, auxiliando no desenvolvimento de tolerância ao veneno de abelha.

6 – Conclusões

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

1 – Redução dos níveis de RNAm de HR1, HR4 e HRF após 24 meses de tratamento.

2 – Redução da expressão gênica da cadeia γ do receptor de alta afinidade de IgE (Fc ϵ RI) .

3 – Diminuição na detecção protéica do fator de transcrição GATA-3.

4 – Indivíduos alérgicos ao veneno de abelha apresentam expressão gênica de HR1, HR4 e HRF, e níveis protéicos de GATA-3, 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

Nossos resultados são inéditos e sugerem possíveis caminhos que podem estar envolvidos no desenvolvimento da tolerância, como a inibição da ativação de STAT-6 (envolvido na sinalização dos receptores de histamina e na resposta Th2), diminuição da apresentação antigênica (como consequência da redução dos níveis de IgE específica e da menor expressão do receptor de alta afinidade de IgE em monócitos) e restauração do equilíbrio das respostas Th1/Th2 (em função da diminuição do fator de transcrição GATA-3 e, conseqüentemente, da ativação de linfócitos Th2).

Estas hipóteses podem servir como base para estudos futuros, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos durante a imunoterapia específica ao veneno de abelha e que levam à diminuição na resposta inflamatória alérgica.

8 – Referências Bibliográficas

- [1] Schmidt-Weber CB, Blaser K. New insights into the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005 Dec;5(6):525-30.
- [2] Bilo BM, Bonifazi F. Epidemiology of insect-venom anaphylaxis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2008 Aug;8(4):330-7.
- [3] Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, et al. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol*. 2001 Mar;59(3):434-41.
- [4] Barnes PJ. Role of GATA-3 in allergic diseases. *Current molecular medicine*. 2008 Aug;8(5):330-4.
- [5] Ho IC, Vorhees P, Marin N, Oakley BK, Tsai SF, Orkin SH, et al. Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *The EMBO journal*. 1991 May;10(5):1187-92.
- [6] Ho IC, Pai SY. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cellular & molecular immunology*. 2007 Feb;4(1):15-29.
- [7] Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, Sun K, Bouwman RD, Young RA, et al. The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Oct 20;106(42):17876-81.
- [8] Chatila TA, Li N, Garcia-Lloret M, Kim HJ, Nel AE. T-cell effector pathways in allergic diseases: transcriptional mechanisms and therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Apr;121(4):812-23; quiz 24-5.
- [9] Liberman AC, Druker J, Refojo D, Holsboer F, Arzt E. Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells. *Faseb J*. 2009 Jan 5.
- [10] Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research*. 2006 Jan;16(1):3-10.

- [11] 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.
- [12] Jutel M, Blaser K, Akdis CA. The role of histamine in regulation of immune responses. *Chem Immunol Allergy.* 2006;91:174-87.
- [13] 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.
- [14] Budde IK, Aalberse RC. Histamine-releasing factors, a heterogeneous group of different activities. *Clin Exp Allergy.* 2003 Sep;33(9):1175-82.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Jutel M, Klunker S, Akdis M, Malolepszy J, Thomet OA, Zak-Nejmark T, et al. Histamine upregulates Th1 and downregulates Th2 responses due to different patterns of surface histamine 1 and 2 receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001 Jan-Mar;124(1-3):190-2.
- [19] Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol.* 2002 Dec;14(6):735-40.
- [20] 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.
- [21] 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. *The Journal of biological chemistry.* 2000 Nov 24;275(47):36781-6.

- [22] 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. *International immunopharmacology*. 2006 Oct;6(10):1577-85.
- [23] Zampeli E, Tiligada E. The role of histamine H(4) receptor in immune and inflammatory disorders. *British journal of pharmacology*. 2009 Mar 20.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Rosenwasser LJ, Meng J. Anti-CD23. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2005 Aug;29(1):61-72.
- [27] von Bubnoff D, Matz H, Frahnert C, Rao ML, Hanau D, de la Salle H, et al. FcepsilonRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J Immunol*. 2002 Aug 15;169(4):1810-6.
- [28] Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews*. 2008 Mar;8(3):205-17.
- [29] Zhang M, Murphy RF, Agrawal DK. Decoding IgE Fc receptors. *Immunol Res*. 2007;37(1):1-16.
- [30] Kraft S, Kinet JP. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nature reviews*. 2007 May;7(5):365-78.
- [31] Kraft S, Novak N. Fc receptors as determinants of allergic reactions. *Trends in immunology*. 2006 Feb;27(2):88-95.
- [32] Bieber T. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI). *Immunobiology*. 2007;212(6):499-503.
- [33] Lang R, Hawranek T. Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006;16(4):224-31.

- [34] Rueff F, Bilo MB, Jutel M, Mosbech H, Muller U, Przybilla B. Sublingual immunotherapy with venom is not recommended for patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):272-3; author reply 3.
- [35] Rueff F, Przybilla B, Bilo MB, Muller U, Scheipl F, Aberer W, et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase-a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124(5):1047-54.
- [36] Ulrich Müller GH, Arthur Helbling. Allergic reactions to stinging and biting insects. Third Edition ed. Elsevier 2008.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005 Nov;60(11):1339-49.
- [41] Mueller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res*. 1966 Jun;3(4):331-3.
- [42] Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*. 1977 Feb 26;1(8009):466-9.
- [43] Allergen immunotherapy: a practice parameter second update. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3 Suppl):S25-85.
- [44] Muller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespa* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy*. 2008 Dec 18.

- [45] Bilo BM, Bonifazi F. Advances in hymenoptera venom immunotherapy. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2007 Dec;7(6):567-73.
- [46] Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Nature reviews. 2006 Oct;6(10):761-71.
- [47] Jayasekera NP, Toma TP, Williams A, Rajakulasingam K. Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2007 Jan;61(1):29-33.
- [48] Jutel M, Zak-Nejmark T, Wrzyszc M, Malolepszy J. Histamine receptor expression on peripheral blood CD4+ lymphocytes is influenced by ultra-rush bee venom immunotherapy. Allergy. 1997;52(Suppl. 37):88.
- [49] Zollner RL, Trevizan, G., Vieira, K.P., Vilella, C.A. In vivo study of basal transcription factor GATA3, histamine receptors 1 and 2, IgE-dependent histamine-releasing factor mRNA expression changes in peripheral mononuclear blood cells during bee venom immunotherapy. Allergy. 2008;63:12.
- [50] Prince HE, Jensen ER. Modulatory effects of plasma and serum on T lymphocyte activation: distinctive patterns for different mitogens. Immunological investigations. 1993 Mar;22(2):105-16.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A, Alves RR, Soares RS, Pedro E, et al. Expansion of circulating Foxp3+ D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. Clin Exp Allergy. 2008 Feb;38(2):291-7.
- [54] Kharmate G, Liu Z, Patterson E, Khan MM. Histamine affects STAT6 phosphorylation via its effects on IL-4 secretion: role of H1 receptors in the regulation of IL-4 production. International immunopharmacology. 2007 Mar;7(3):277-86.

- [55] Horio S, Fujimoto K, Mizuguchi H, Fukui H. Interleukin-4 up-regulates histamine H1 receptors by activation of H1 receptor gene transcription. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. Jan 30.
- [56] Sakhalkar SP, Patterson EB, Khan MM. Involvement of histamine H1 and H2 receptors in the regulation of STAT-1 phosphorylation: inverse agonism exhibited by the receptor antagonists. *International immunopharmacology*. 2005 Jul;5(7-8):1299-309.
- [57] Gutzmer R, Mommert S, Gschwandtner M, Zwingmann K, Stark H, Werfel T. The histamine H4 receptor is functionally expressed on T(H)2 cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Mar;123(3):619-25.
- [58] Michel I, Borck H, McElligott S, Krieg C, Diel F. Histamine receptor H4R-selective ligands influence the STAT6 Transcription Activation Domain (TAD) and the DNA-binding. *Inflamm Res*. 2008;57 Suppl 1:S47-8.
- [59] MacDonald SM, Paznekas WA, Jabs EW. Chromosomal localization of tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1) encoding the human histamine releasing factor (HRF) to 13q12-->q14. *Cytogenetics and cell genetics*. 1999;84(1-2):128-9.
- [60] Hartman ML, Lin SY, Jouvin MH, Kinet JP. Role of the extracellular domain of Fc epsilon RI alpha in intracellular processing and surface expression of the high affinity receptor for IgE Fc epsilon RI. *Molecular immunology*. 2008 Apr;45(8):2307-11.
- [61] Yu Q, Sharma A, Oh SY, Moon HG, Hossain MZ, Salay TM, et al. T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma. *Nat Immunol*. 2009 Sep;10(9):992-9.
- [62] Savolainen J, Nieminen K, Laaksonen K, Laiho T, Jacobsen L, Lahesmaa R, et al. Allergen-induced in vitro expression of IL-18, SLAM and GATA-3 mRNA in PBMC during sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2007 Aug;62(8):949-53.