

Alergia ao veneno de himenópteros: Mecanismos envolvidos na resposta à imunoterapia específica

*Hymenoptera venom allergy: Mechanisms involved
in the response to specific immunotherapy*

Rev Port Imunoalergologia 2008; 16 (6): 535-552

Rodrigo Rodrigues Alves^{1,2}, António Baptista¹, Alcinda Melo¹, Rui Soares¹, Elisa Pedro², Manuel Pereira Barbosa², Rui Victorino¹, Ana Espada Sousa¹, Maria Conceição Pereira Santos¹.

¹ Unidade de Imunologia Clínica, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa. / *Clinical Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Lisbon.*

² Serviço de Imunoalergologia/Immunoallergy Department. Centro Hospitalar de Lisboa Norte, Lisboa.

Nota: Prémio SPAIC-Stallergènes 2006 / Award SPAIC-Stallergènes 2006.

RESUMO

Introdução: Embora a imunoterapia específica com veneno de himenópteros (VIT) seja a única terapêutica capaz de induzir tolerância a estes alérgenos, os seus mecanismos subjacentes ainda estão por clarificar. Foi já proposto que as células T reguladoras possam estar envolvidas nesta indução de tolerância, desempenhando um papel importante nas doenças alérgicas. **Objectivo:** Avaliar longitudinalmente os efeitos da VIT sobre evolução de IgE e IgG₄ específicas, triptase, activação de basófilos, incluindo as células T reguladoras circulantes, e correlação destes parâmetros com os dados clínicos. **Métodos:** Foram estudados (antes do início da VIT, 6 meses e 12 meses após o mesmo) 12 doentes com reacções graves (grau III-IV) após picada de himenópteros. Foram realizados doseamentos séricos dos níveis de triptase, IgE e IgG₄ específica. Foram isoladas e analisadas por citometria de fluxo células mononucleadas do sangue periférico marcadas à superfície com um painel de anticorpos de diferenciação celular T, e, intracelularmente, para Foxp3. Foi ainda realizada quantificação do mRNA do Foxp3 por PCR em tempo real, teste de activação de basófilos e avaliação da resposta proliferativa ao veneno de himenópteros. Foi analisada a correlação destes parâmetros com os dados clínicos.

Foram incluídos como controlos 11 indivíduos sem história de alergia ao veneno de himenópteros. **Resultados:** Verificou-se um aumento dos níveis de IgG₄ específica e redução dos níveis de IgE específica e de activação de basófilos. A VIT induziu um aumento progressivo e significativo na proporção e no número absoluto de células T reguladoras definidas como CD25^{bright} e/ou células T CD4⁺ Foxp3⁺ e dos níveis de mRNA do Foxp3, não se devendo estes aumentos a alterações na expressão de marcadores de activação ou a desequilíbrios nos compartimentos celulares *naïve*/memória. De salientar ainda que o aumento das células T reguladoras circulantes se correlacionou, de forma significativa, com as alterações na expressão de CD63 e na razão IgG₄/IgE específica. **Conclusões:** Os resultados deste estudo suportam um papel das células T reguladoras circulantes na indução de tolerância associada à VIT.

Palavras-chave: Alergia ao veneno de himenópteros, células T reguladoras, Foxp3, imunoterapia.

ABSTRACT

Background: Although venom-immunotherapy (VIT) is the only treatment that induces long-lasting immune tolerance to hymenoptera venom antigens, the underlying mechanisms remain unclear. Regulatory T cells (Treg) are thought to be involved in this tolerance induction, playing an important role in allergic diseases. **Aim:** To evaluate longitudinally the effects of VIT on specific IgE and IgG₄, tryptase, CD63 basophilic expression and circulating regulatory T cells. **Methods:** Twelve hymenoptera venom-allergic patients with severe reactions (grades III-IV) were studied before, 6 and 12 months after starting VIT. We performed basophil activation tests, Foxp3 mRNA quantification by real-time PCR, tryptase, specific IgG₄ and IgE measurements and proliferative responses against venom extracts. Additionally, freshly isolated peripheral blood mononuclear cells were analysed by flow-cytometry using a surface staining panel of T cell differentiation markers and intracellular Foxp3. Eleven subjects with no history of insect venom allergy were studied as controls. **Results:** Increase in specific IgG₄ levels and decrease in specific IgE levels and CD63 basophilic expression during VIT were documented. Additionally, VIT induced a significant progressive increase in both the proportion and absolute numbers of regulatory T cells defined as CD25^{bright} and/or Foxp3⁺ CD4⁺ T cells and in Foxp3 mRNA levels. These increases were not related to changes in the expression of activation markers or imbalances in the naïve/memory cell compartments. Furthermore, the increase in circulating regulatory T cell counts was significantly correlated with the CD63 expression and venom-specific IgG₄/IgE ratio shift. **Conclusion:** These results support a role for circulating regulatory T cells in tolerance induction associated with VIT.

Key-words: Hymenoptera venom allergy, regulatory T cells, Foxp3, immunotherapy.

INTRODUÇÃO

A primeira descrição de uma reacção alérgica fatal provocada pela picada de uma vespa está registada numa placa de ébano descoberta no túmulo do faraó Menés do Egipto no ano 2641 a.C., havendo também referência a uma picada fatal de vespa no Talmud da Babilónia, no século II a.C.¹

Embora não existam dados epidemiológicos referentes ao nosso país, a prevalência de indivíduos alérgicos ao veneno de himenópteros documentada nos estudos internacionais foi de cerca de 20%, sendo na população adulta a prevalência de reacções locais exuberantes de cerca de 2 a 26% e de reacções generalizadas graves aproximadamente de 0,3 a 7,5%². A incidência de casos fatais varia de 0,03 a 0,5 por milhão de habitantes por ano³, o que, extrapolado para o nosso país, corresponde a 5 casos fatais por ano. No entanto, estes números estão provavelmente subestimados, tendo já sido reportada a presença de IgE específica para o veneno de himenópteros em 23% das amostras de sangue *post-mortem* colhidas de indivíduos que faleceram súbita e inexplicavelmente ao ar livre entre os meses de Maio e Novembro⁴.

A primeira referência médica ao uso de veneno de insecto para diagnóstico e tratamento é de Braun em 1925⁵ e é em 1930 que Benson e Semenov⁶ ensaiam pela primeira vez a imunoterapia específica com extracto de corpo total de abelha num apicultor. Vinte anos depois, Mary Loveless⁷ descreve a eficácia da utilização de extractos de veneno de vespa no diagnóstico e terapêutica mas, lamentavelmente, os seus estudos não foram valorizados pelos seus pares e a imunoterapia com extractos de corpo total foi utilizada durante várias décadas⁸. Apenas no final da década de 70 estudos controlados demonstraram claramente a superioridade da imunoterapia com extractos de veneno, em relação aos extractos de corpo total⁹. Desde então foram já publicados inúmeros estudos demonstrando a eficácia da imunoterapia com veneno de himenópteros traduzida, quer por redução do número de reacções sistémicas após prova de provocação com picada de himenóptero (*sting challenge*), quer por aumento significativo na quali-

INTRODUCTION

The first ever description of a fatal allergic reaction to a wasp sting is that on an ebony tablet found in the tomb of Menes, pharaoh of Egypt, in 2641 BC. There is also reference to a fatal wasp sting in the Babylonian Talmud in the second century BC¹.

There are no epidemiological data for Portugal, but there is an internationally documented prevalence of hymenoptera venom-allergic patients of approximately 20%. Adults have an approximate 2 – 26% prevalence of exuberant local reactions and an approximate 0.3–7.5% prevalence of generalised severe reactions². The incidence of fatalities varies from 0.03–0.5 per million people per year³, which extrapolated for Portugal corresponds to five fatalities per year. These numbers are most likely underestimated, however; hymenoptera venom specific IgE was present in 23% of *post-mortem* blood samples taken from individuals who died suddenly and inexplicably in the open air, between the months of May and November⁴.

The first physician to use insect venom in diagnosis and treatment was Braun, in 1925⁵ and, in 1930, Benson and Semenov⁶ first used specific immunotherapy, with whole-body extract of bee, in a bee keeper. Twenty years later, Mary Loveless⁷ described the efficacy of the use of wasp venom extract in diagnosis and treatment but, regretfully, her work was disregarded by her peers and immunotherapy with whole-body extract was in use for several decades⁸. It wasn't until the end of the 1970s that controlled studies clearly demonstrated the superiority of immunotherapy with venom extract over immunotherapy with whole-body extracts⁹. Several studies showing the efficacy of immunotherapy with hymenoptera venom, both in terms of the lesser number of systemic reactions after the hymenoptera sting challenge, and the significant increase in quality of life, measured by standardised question-

dade de vida quantificada por questionários estandardizados¹⁰. Na realidade, a imunoterapia específica com veneno de himenópteros (VIT) é considerada a única abordagem terapêutica pela qual se pode atingir tolerância a longo prazo, sendo, desta forma, uma das imunoterapias específicas mais eficazes¹¹.

Os mecanismos imunopatológicos responsáveis pela indução de tolerância neste tipo de imunoterapia não estão cabalmente explanados. No entanto, foram já reportadas múltiplas alterações imunológicas durante este processo, designadamente: aumento dos níveis de IgG específicas, particularmente da classe IgG₄, os quais se pensa poderem funcionar como anticorpos bloqueantes¹²; redução no número e estado de activação dos basófilos e mastócitos¹³; alteração da actividade das células T específicas de tipo Th2 para Th1, seja por deleção, anergia ou inibição da sua função^{12,14}; aumento dos níveis de IL-10, citocina reguladora das respostas inflamatórias e inibidora da proliferação, no sobrenadante de culturas de linfócitos estimuladas com extractos de veneno de himenópteros¹⁴; expansão de células T CD4⁺ produtoras de IL-10¹⁵.

Por outro lado, células T CD4⁺ circulantes expressando níveis elevados de CD25, a cadeia alfa do receptor da IL-2, e o factor de transcrição *forkhead winged-helix transcription factor* – Foxp3 foram já claramente identificadas como uma população de células T reguladoras potente e bem definida¹⁶⁻¹⁸. Estas células, que totalizam 5 a 10% das células T CD4⁺, foram descritas inicialmente como originárias do timo¹⁹, mas descrições recentes sugerem que podem também ser produzidas na periferia, durante as respostas imunitárias²⁰. Os mecanismos de acção desta população não estão completamente caracterizados, mas pensa-se que assentam em processos dependentes de contacto celular e não através de factores solúveis^{17,18}, tendo já sido demonstrado que o Foxp3 é essencial para o seu desenvolvimento e função^{16,21}.

O objectivo deste estudo consistiu em avaliar longitudinalmente a evolução de IgE e IgG₄ específicas, triptase e activação de basófilos durante a imunoterapia específica com veneno de himenópteros, incluindo a possibilidade de esta terapêutica influenciar o número de células T regula-

naires¹⁰, have been published since then. In reality, hymenoptera venom-immunotherapy (VIT) is considered the only treatment modality that induces long-lasting immune tolerance to hymenoptera venom antigens, making it one of the most efficacious specific immunotherapies¹¹.

The immunopathological mechanisms responsible for inducing tolerance in this type of immunotherapy remain unclear. However, multiple immunological changes have been reported during this process, namely increasing levels of specific IgG, particularly of the IgG₄ class, which are believed to function as blocking antibodies¹²; decreased number and activation state of basophil and mast cells¹³; a Th2-to-Th1 T cell shift, whether caused by depletion, anergy or inhibition of their function^{12,14}; increased levels of IL-10, the regulatory cytokine of inflammatory responses and proliferation inhibitor, in the supernatant of lymphocyte cultures stimulated with hymenoptera venom extracts¹⁴; and expansion of CD4⁺ T cells, producers of IL-10¹⁵.

On the other hand, circulating CD4⁺ T cells expressing high levels of CD25, the alpha chain of the IL-2 receptor, and the forkhead winged-helix transcription factor (Foxp3) have already been clearly identified as a population of potent and well defined regulatory T cells¹⁶⁻¹⁸. These cells, which total 5 – 10% of CD4⁺ T cells, were initially described as having their origin in the thymus¹⁹, but recent studies suggest that they could be produced in the periphery during immune responses²⁰. The action mechanisms of this population are not fully characterised but it is believed that they arise from processes dependent on cellular contact and not from soluble factors^{17,18}. It has already been demonstrated that Foxp3 is essential for its development and function^{16,21}.

This study aimed to evaluate longitudinally the evolution of specific IgE and IgG₄, triptase and basophilic activation during specific VIT including the possibility of this therapy influencing the number of circulating regulatory T cells, defined as CD4⁺ T cells expressing high levels of

doras circulantes, definidas como células T CD4⁺ expressando níveis elevados de CD25 e/ou Foxp3, e correlação destes parâmetros com os dados clínicos.

Os resultados nucleares deste trabalho previamente apresentados²² demonstraram pela primeira vez uma expansão desta população celular durante a imunoterapia com veneno de himenópteros. Nesta publicação, estes resultados são apresentados com mais detalhe, sendo incluídos os aspectos clínicos e estendidas as correlações à evolução das IgE e IgG₄ específicas, triptase e activação de basófilos.

MÉTODOS

População

No Quadro I estão descritas as principais características clínicas, demográficas e laboratoriais da população es-

CD25 and/or Foxp3, and correlate these parameters with the clinical data.

The nuclear results of this study already presented²² demonstrated for the first time an expansion of this cellular population during hymenoptera venom-immunotherapy. The results are given here in greater detail, and include the clinical aspects and extended correlations with specific IgE and IgG₄, tryptase, and basophilic activation.

METHODS

Population

Table I gives the main clinical, demographic and laboratory data of the study population. It was composed of 12 patients (nine male, three female; age 49

Quadro I. Dados clínicos, demográficos e laboratoriais dos doentes incluídos

Table I. Patients' clinical, demographic and laboratory data

Doente/ Patient	Sexo/ Gender	Idade (anos)/ Age (years)	Triptase (µg/l)/ Tryptase (µg/l)	IgE específica (kU _A /l)/ Specific IgE (kU _A /l)	IgG ₄ específica (ug/ml)/ Specific IgG ₄ (ug/ml)	Veneno/ Venom	Gravidade da reacção (classificação de Müller)/ Severity of reaction (Müller classification)	Reacção sistémica durante a imunoterapia Systemic reaction during immunotherapy
1	M	37	2,72	9,28	350	Vespa/Wasp	Grau 4/Grade 4	Não/No
2	M	57	6,68	16,90	3594	Abelha/Bee	Grau 4/Grade 4	Sim/Yes
3	F	54	3,93	1,39	1406	Vespa/Wasp	Grau 4/Grade 4	Não/No
4	M	58	5,43	8,54	439	Abelha/Bee	Grau 4/Grade 4	Não/No
5	M	52	3,48	3,58	155	Abelha/Bee	Grau 3/Grade 3	Sim/Yes
6	M	56	3,21	11,60	5749	Abelha/Bee	Grau 4/Grade 4	Não/No
7	M	34	9,19	2,83	1131	Abelha/Bee	Grau 4/Grade 4	Sim/Yes
8	M	44	2,01	4,69	9145	Abelha/Bee	Grau 4/Grade 4	Não/No
9	M	52	5,30	27,20	7427	Vespa/Wasp	Grau 4/Grade 4	Não/No
10	M	51	4,09	0,59	12122	Abelha/Bee	Grau 3/Grade 3	Não/No
11	F	65	11,90	8,03	2288	Abelha/Bee	Grau 3/Grade 3	Não/No
12	F	29	5,83	9,42	870	Abelha/Bee	Grau 3/Grade 3	Não/No

tudada. Foram incluídos 12 doentes (9 homens, 3 mulheres; idade 49 ± 11 anos) com história de reacção sistémica grave à picada de himenópteros (grau III ou IV da classificação de Müller)²³ com indicação para realização de imunoterapia específica com veneno de himenópteros segundo os critérios da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI)¹⁰. Este grupo incluía 9 doentes com alergia ao veneno de abelha e 3 ao veneno de vespa, tendo sido a sensibilização confirmada por testes cutâneos (*prick* e intradérmicos) e detecção de IgE específicas no soro, realizados segundo os critérios da EAACI². Foram colhidas amostras sanguíneas antes do início da imunoterapia (T_0), após 6 meses (T_6) e após 12 meses (T_{12}). A imunoterapia foi efectuada com extracto estandardizado de veneno de himenópteros (Stallergènes, Antony, França), segundo o protocolo *ultra-rush* descrito por Birnbaum e colaboradores²⁴. Foram ainda estudados 11 controlos (idade 51 ± 12 anos) sem história de alergia ao veneno de himenópteros. Todos os doentes deram consentimento informado a este estudo e o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Doseamento de triptase, IgE específica e IgG₄ específica

As concentrações séricas de triptase, IgE e IgG₄ específicas foram determinadas por UniCAP (Phadia, Uppsala, Suécia), segundo as instruções do fabricante.

Teste de activação de basófilos

Foram utilizados 2 ml de sangue total em tubo heparinizado. As células foram incubadas com o factor de estimulação (IL-3) durante 10 minutos a 37°C e posteriormente com o controlo negativo (solução tampão), controlo positivo (fMLP) e com o extracto estandardizado de veneno de himenópteros (Stallergènes, Antony, França) nas concentrações de 5, 1 e 0,2 mg/ml (20 minutos a 37°C). Foi depois efectuada dupla marcação das células com os anticorpos monoclonais (anti-IgE/CD63) marcados com flurocromos para possibilitar a leitura por citometria de

± 11 years old) with a history of severe systemic reaction to hymenoptera stings (grades III or IV of the Müller classification)²³ who were eligible for specific hymenoptera venom-immunotherapy according to the criteria of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)¹⁰. This group included nine patients allergic to bee venom and three allergic to wasp venom, with sensitivity confirmed via skin tests (*prick* and intradermal) and detected by specific serum IgE, performed according to EAACI criteria². Blood samples were taken pre-immunotherapy (T_0), after six months (T_6) and after 12 months (T_{12}). Immunotherapy was performed using standardised extract of hymenoptera venom (Stallergènes, Antony, France), following the ultra-rush protocol described by Birnbaum *et al*²⁴. Eleven controls were also studied (age 51 ± 12 years old) who had no history of hymenoptera venom allergy. All patients gave their informed written consent to the study and it was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine at Lisbon University.

Tryptase and specific IgE and IgG₄ dosage

The serum concentrations of tryptase and specific IgE and IgG₄ were determined using UniCAP (Phadia, Uppsala, Sweden), according to the manufacturer's instructions.

Basophil activation test

We used 2 ml of whole blood in heparinised tubes. The cells were incubated with the stimulating factor IL-3, for 10 minutes, at 37°C and, subsequently, with the negative control (buffer solution), positive control (fMLP) and with the standardised extract of hymenoptera venom (Stallergènes, Antony, France) in 5, 1 and 0.2 mg/ml concentrations (20 minutes at 37°C). Double cell marking with the monoclonal antibodies anti-IgE/CD63 stained with flurochromes was then performed to allow flow-cytometry reading (BD-Biosciences, San

fluxo (BD-Biosciences, São José, EUA). Os eritrócitos foram eliminados por adição de solução de lise, sendo posteriormente efectuada a lavagem celular e a adição de 200µl de solução tampão. A aquisição foi realizada num citómetro FACSCalibur (BD-Biosciences, São José, EUA) nas duas horas após a preparação da amostra. Os resultados foram considerados positivos quando se verificou uma percentagem de activação superior a 10% com índice de estimulação igual ou superior a dois.

Análise de citometria de fluxo

Foram isoladas e marcadas células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) frescas, conforme metodologia descrita previamente²⁵. Sucintamente, células suspensas em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e 0,1% de azida de sódio (Sigma-Aldrich) foram marcadas com anticorpos monoclonais, durante 20 minutos, em câmara escura e à temperatura ambiente. Foram usados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD25, anti-CD3, anti-CD38, anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD62L, anti-CD8, anti-CCR7 e anti-HLA-DR (BD-Biosciences, São José, EUA).

A marcação intracelular do Foxp3 (Clone PCHI01, eBiosciences, San Diego, CA, EUA) foi efectuada segundo as indicações do fabricante. Foram incluídos os respectivos controlos isotípicos. Foi utilizado um citómetro FACSCalibur (BD-Biosciences, São José, EUA) e a análise foi efectuada com FlowJo *software* (Tree Star, Ashland, EUA).

Quantificação do mRNA do Foxp3

O RNA foi extraído de 10⁶ PBMC usando um extracto de ácidos nucleicos AbiPrism 6100 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e quantificado utilizando um espectrofotómetro NanoDrop ND-10 (nanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). A transcrição reversa de 400ng de RNA total foi efectuada utilizando um *kit* de transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Foram quantificadas amostras em duplicado, por PCR em tempo real, em 150ng de cDNA e 50µl de mistura de PCR contendo

Jose, USA). The erythrocytes were eliminated by adding lysis solution, with a cellular lavage performed and 200µl of buffer solution added after. The acquisition was performed in a FACSCalibur flow cytometer (BD-Biosciences, San Jose, USA) in the two hours following preparation of the sample. The results were considered positive when a percentage of activation higher than 10% was seen with a stimulation index equal to or higher than two.

Flow-cytometry analysis

Fresh peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were isolated and stained according to the methodology previously described²⁵. Succinctly, cells suspended in PBS containing 1% of bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) were stained with monoclonal antibodies for 20 minutes in the dark and at room temperature. We used anti-CD25, anti-CD3, anti-CD38, anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-CD62L, anti-CD8, anti-CCR7 and anti-HLA-DR monoclonal antibodies (BD-Biosciences, San Jose, USA).

Foxp3 intracellular staining (Clone PCHI01 and Biosciences, San Diego, CA, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. The respective isotypic controls were included. A FACSCalibur flow cytometer (BD-Biosciences, San Jose, USA) was used and the analysis carried out using FlowJo *software* (Tree Star, Ashland, USA).

Foxp3 mRNA quantification

RNA was extracted from 10⁶ PBMC using an AbiPrism 6100 nucleic acid extract (Applied Biosystems, Foster City, USA) and quantified using a NanoDrop ND-10 spectrophotometer (nanoDrop Technologies, Wilmington, USA). The reverse transcription of 400ng of total RNA was performed using a Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Duplicate samples were quantified by real-time PCR in 150 ng of

25µl de platinum. Um plasmídeo contendo a sequência do *Foxp3* foi sucessivamente diluído e usado para gerar a curva *standard*. Foi utilizado GAPDH como controlo interno, sendo os resultados normalizados para os controlos internos do GAPDH e expressos em unidades arbitrárias.

Respostas proliferativas de células mononucleadas do sangue periférico aos alergénios do veneno de himenóptero

PBMC (1×10^5 /alvéolo) foram estimuladas em quadruplicado com extracto de veneno de abelha (0,01-2 µg/ml), durante 6 dias. Nas últimas 18 horas de cultura, foi adicionada 1 µCi/alvéolo de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) (Amersham Pharmacia Biotech, RU). A resposta proliferativa foi avaliada através da incorporação de ($^3\text{H-TdR}$) num contador gasoso de cintilação beta (Packard, Meriden, Connecticut, EUA) e os resultados expressos em cpm. O índice de estimulação (SI) foi calculado dividindo o valor médio de cpm da cultura estimulada pelo valor médio da cultura sem estímulo. Como controlos adicionais usaram-se estímulos mitogénicos [anticorpo monoclonal anti-CD3 imobilizado (clone HIT3a, BD Biosciences) e PHA] e antigénicos (PPD e *Candida albicans*).

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, EUA). Os dados foram testados para existência de distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk com $p > 0,05$ em todas as variáveis numéricas). Na comparação entre dois grupos foi usado o teste *t* de Student emparelhado ou não emparelhado, conforme a situação. Para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre três grupos foi utilizado o teste ANOVA de observações repetidas complementado pelo método de Bonferroni. A análise de correlação de Pearson foi utilizada para determinar a significância da correlação entre duas variáveis. Foram considerados como significativos valores de $p < 0,05$.

cDNA and 50µl of PCR mixture containing 25µl of platinum. A plasmide containing the *Foxp3* sequence was successively diluted and used to run the standard curve. GAPDH was used as an internal control and the results were normalised for the internal GAPDH controls and expressed in arbitrary units.

Proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to hymenoptera venom allergens

PBMC (1×10^5 /alveolo) were stimulated in quadruplicate with extract of bee venom (0.01-2 µg/ml) for six days. One µCi/alveolus of tritiated thymidine ($^3\text{H-TdR}$) (Amersham Pharmacia Biotech, UK) was added in the last 18 hours of culture. The proliferative response was measured by incorporating $^3\text{H-TdR}$ in a gaseous scintillation beta-counter (Packard, Meriden, Connecticut, USA) and the results were expressed in cpm. The stimulation index (SI) was calculated by dividing the mean cpm value of the stimulated culture by the mean value of the unstimulated culture. Mythogenic stimuli [immobilised anti-CD3 monoclonal antibody (clone HIT3a, BD Biosciences) and PHA] and antigens (PPD and *Candida albicans*) were used as additional controls.

Statistical analysis

We used the GraphPad Prism version 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, USA) for the statistical analysis. The data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test with $p > 0.05$ in all numerical variables. The paired or unpaired – depending on the situation – Student's *t* test was used to compare the two groups. We used the ANOVA repeated observations test complemented by the Bonferroni method to measure any statistically significant differences between the three groups. The Pearson correlation analysis was used to determine the significance of the correlation between two variables, with $p < 0.05$ values taken as significant.

RESULTADOS

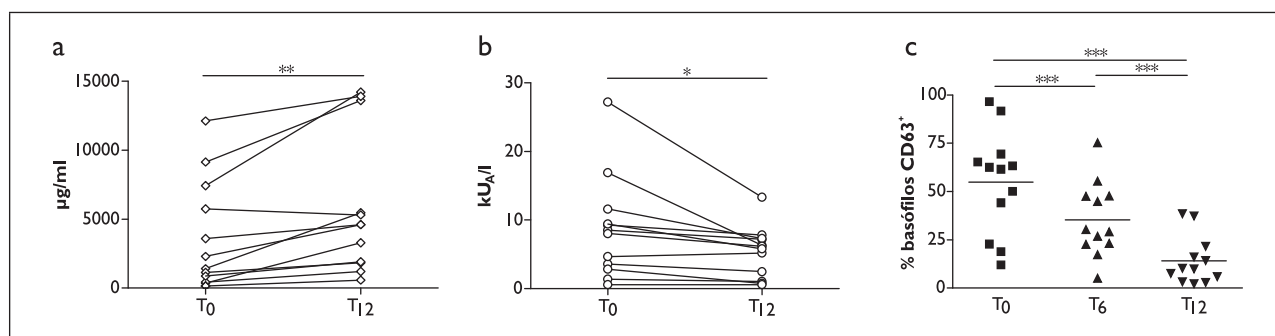
Na população estudada, ao longo dos 12 meses de imunoterapia com veneno de himenópteros, foi observado um aumento significativo da IgG₄ específica (Figura 1a) e uma diminuição, também significativa, dos níveis de IgE específica (Figura 1b) e da expressão de CD63 em basófilos (Figura 1c).

Relativamente à correlação clínico-laboratorial das variáveis estudadas, não se documentou associação entre os níveis de expressão de CD63 em basófilos e a gravidade da reacção à picada de himenóptero ($56,9 \pm 28,6\%$ para os doentes com reacção grau III e $55,4 \pm 35,3\%$ para os doentes com reacção grau IV, respectivamente; não estatisticamente significativo) ou a existência de reacções sistémicas durante a imunoterapia ($58,7 \pm 30,2\%$ para os doentes sem reacção sistémica durante a imunoterapia e $46,2 \pm 33,9\%$ para os doentes com reacção sistémica durante a imunoterapia, respectivamente; não estatisticamente significativo).

RESULTS

A significant increase in specific IgG₄ was seen (Figure 1a) as well as an equally significant decrease in the levels of specific IgE (Figure 1b) and in the basophilic expression of CD63 (Figure 1c) in the study population, over the course of 12 months of hymenoptera venom-immunotherapy.

In terms of the clinical-laboratory correlation of the variables under study, no association was detected between the levels of basophilic CD63 expression and the severity of the reaction to the hymenoptera sting ($56.9 \pm 28.6\%$ for patients with grade III reaction and $55.4 \pm 35.3\%$ for patients with grade IV reaction, respectively; not statistically significant), or the existence of systemic reactions during immunotherapy ($58.7 \pm 30.2\%$ for patients with no systemic reaction during immunotherapy and $46.2 \pm 33.9\%$ for those with systemic reaction during immunotherapy, respectively; not statistically significant).



a. Níveis de IgG₄ específica para veneno (n=12). **b.** Níveis de IgE específica para veneno (n=12). **c.** Percentagem de basófilos que expressam CD63 (n=12). As diferenças entre os pontos temporais foram comparadas usando o teste t de Student emparelhado em a e b e o teste ANOVA de observações repetidas complementado pelo método de Bonferroni em c; T₀: antes do início da imunoterapia; T₆: 6 meses após o início da imunoterapia; T₁₂: 12 meses após o início da imunoterapia; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

a. Venom specific IgG₄ levels (n = 12). **b.** Venom specific IgE levels (n = 12). **c.** Percentage of basophils expressing CD63 (n = 12). The differences between the time points were compared using the paired Student's t test in a and b and the repeated measures ANOVA complemented by the Bonferroni method in c; T₀: pre immunotherapy; T₆: six months after beginning immunotherapy; T₁₂: 12 months after beginning immunotherapy; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Figura 1. Aumento da IgG₄ específica e diminuição dos níveis de IgE específica e da expressão de CD63 em basófilos durante a imunoterapia específica com veneno de himenópteros

Figure 1. Increase in specific IgG₄ and decrease in levels of specific IgE and basophilic expression of CD63 during hymenoptera venom-immunotherapy

Adicionalmente, nenhum dos doentes apresentava valores de triptase sérica elevados ($>13,5\mu\text{g/l}$), nem se observou associação deste parâmetro com a gravidade da reacção à picada de himenóptero ($4,69 \pm 0,9\mu\text{g/l}$ para os doentes com reacção grau III e $5,26 \pm 1,2\mu\text{g/l}$ para os doentes com reacção grau IV, respectivamente; não estatisticamente significativo) ou a existência de reacções sistémicas durante a imunoterapia ($5,97 \pm 1,0\mu\text{g/l}$ para os doentes sem reacção sistémica durante a imunoterapia e $3,34 \pm 0,4\mu\text{g/l}$ para os doentes com reacção sistémica durante a imunoterapia, respectivamente; não estatisticamente significativo).

Não foi também observada qualquer associação significativa entre as outras variáveis laboratoriais estudadas (IgE específica; IgG₄ específica; razão IgG₄/IgE; células T CD4⁺CD25^{bright}, células T CD4⁺Foxp3⁺ e células T CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺) e a gravidade da reacção à picada de himenópteros (grau III ou grau IV da classificação de Müller) ou a existência de reacções sistémicas durante a imunoterapia.

Quanto à cinética das células T reguladoras, ao longo dos 12 meses de imunoterapia com veneno de himenópteros, documentou-se um progressivo aumento no sangue periférico, quer da proporção de células T CD4⁺CD25^{bright} ($0,46 \pm 0,24\%$; $0,70 \pm 0,38\%$ e $0,91 \pm 0,45\%$ em T₀, T₆ e T₁₂, respectivamente; $p < 0,01$, teste ANOVA de observações repetidas), quer do seu número absoluto ($8,23 \pm 5,68$ células/ μl ; $12,58 \pm 7,98$ células/ μl e $16,49 \pm 7,69$ células/ μl em T₀, T₆ e T₁₂, respectivamente; $p < 0,05$, teste ANOVA de observações repetidas) (Quadro 2). A maioria destas células exibiu um fenótipo de memória e a proporção de células CD45RA⁻ não se alterou ao longo do tempo ($92,49 \pm 1,8\%$; $90,82 \pm 1,2\%$ e $89,19 \pm 2,4\%$ em T₀, T₆ e T₁₂, respectivamente; não estatisticamente significativo). Adicionalmente, os doentes apresentavam uma redução significativa da frequência de células T CD4⁺CD25^{bright} antes do início da imunoterapia (T₀), quando comparados com a população de controlos não alérgicos, estudados em paralelo ($0,46 \pm 0,08\%$ vs $0,80 \pm 0,14\%$, respectivamente; $p = 0,0374$, teste *t* de Student não emparelhado), tendo a frequência destas células aumentado para níveis semelhantes aos observados nos controlos não alérgicos após 6 meses de imunoterapia (T₆).

In addition, no patient had raised serum tryptase levels ($>13.5\mu\text{g/l}$), and we found no association between this parameter and the severity of the reaction to the hymenoptera sting ($4.69 \pm 0.9\mu\text{g/l}$ for patients with grade III reaction and $5.26 \pm 1.2\mu\text{g/l}$ for patients with grade IV reaction, respectively; not statistically significant), or the existence of systemic reactions during immunotherapy ($5.97 \pm 1.0\mu\text{g/l}$ for patients with no systemic reaction during immunotherapy and $3.34 \pm 0.4\mu\text{g/l}$ for patients with systemic reaction during immunotherapy, respectively; not statistically significant).

There was also no significant association seen between the other laboratory variables studied (specific IgE; specific IgG₄; IgG₄/IgE ratio; CD4⁺CD25^{bright}T cells; CD4⁺Foxp3⁺T cells and CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺T cells) and the severity of the reaction to the hymenoptera sting (grades III or IV of the Müller classification) or the existence of systemic reactions during immunotherapy.

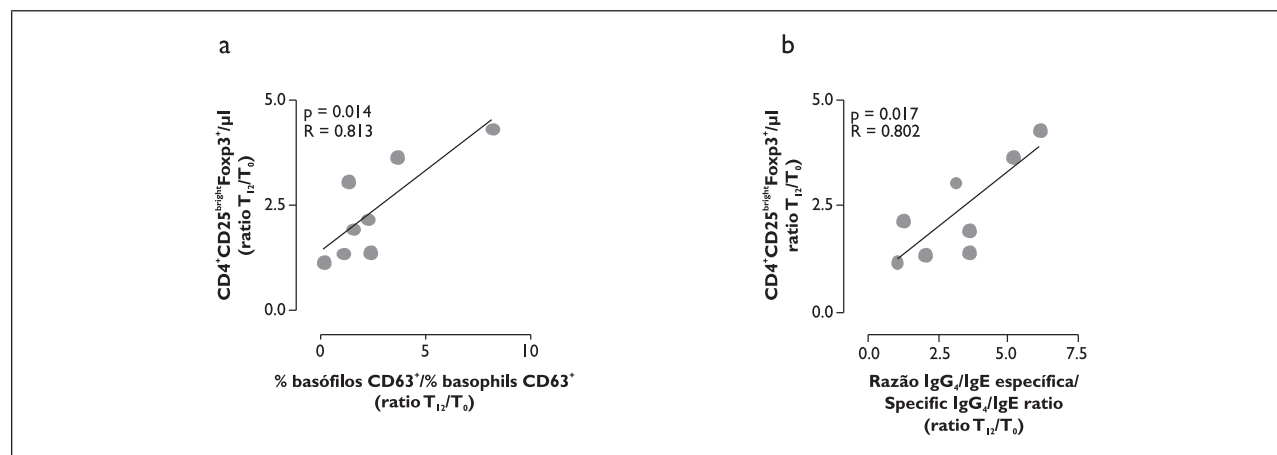
Concerning the kinetics of the regulatory T cells, over the 12 months of hymenoptera venom-immunotherapy there was a progressive increase in the peripheral blood of both the proportion of CD4⁺CD25^{bright} T cells ($0.46 \pm 0.24\%$; $0.70 \pm 0.38\%$ and $0.91 \pm 0.45\%$ at T₀, T₆ and T₁₂, respectively; $p < 0.01$, repeated measures ANOVA), and its absolute number (8.23 ± 5.68 cells/ μl ; 12.58 ± 7.98 cells/ μl and 16.49 ± 7.69 cells/ μl at T₀, T₆ and T₁₂, respectively; $p < 0.05$, repeated measures ANOVA) (Table II). The majority of these cells exhibited a memory phenotype and the proportion of CD45RA⁻ cells did not change over time ($92.49 \pm 1.8\%$; $90.82 \pm 1.2\%$ and $89.19 \pm 2.4\%$ at T₀, T₆ and T₁₂, respectively; not statistically significant). In addition, patients presented a significantly reduced CD4⁺CD25^{bright} T cell frequency before beginning immunotherapy (T₀), as compared to the non-allergic control population studied in parallel ($0.46 \pm 0.08\%$ vs $0.80 \pm 0.14\%$, respectively; $p = 0.0374$, unpaired Student's *t* test), the frequency of these cells having increased to reach similar levels to those observed in the non-allergic controls after six months of immunotherapy (T₆).

Para corroborar a hipótese de que o desenvolvimento de respostas supressoras mediadas por células T $CD4^+CD25^{bright}Foxp3^+$ sejam relevantes para o desenvolvimento de tolerância aos alérgenos dos venenos de himenópteros durante o tratamento com imunoterapia específica, foram igualmente avaliadas as respostas proliferativas de células mononucleadas do sangue periférico a estes alérgenos no decurso desta terapêutica, assim como na presença e na ausência de células T reguladoras $CD4^+CD25^{bright}$.

As respostas proliferativas ao veneno de himenópteros foram avaliadas, antes de iniciar a imunoterapia, em sete doentes, mas apenas em dois foi possível revelar respostas positivas (índice de estimulação > 2). Nestes dois doentes, documentou-se uma redução das respostas proliferativas ao fim de 12 meses de imunoterapia, parcialmente reversível com a depleção dos linfócitos T $CD4^+CD25^{bright}$ (Figura 3).

To corroborate the hypothesis that $CD4^+CD25^{bright}$ T cells-mediated suppressor responses are relevant for the development of tolerance to hymenoptera venom allergens during specific immunotherapy, the proliferative responses of PBMC to these allergens during immunotherapy and in the presence and absence of regulatory $CD4^+CD25^{bright}$ T cells were also assessed. The proliferative responses to hymenoptera venom were evaluated before immunotherapy in seven patients, but it was only possible to reveal positive responses in two (stimulation index > 2). In these two patients reduced proliferative responses were documented after 12 months of immunotherapy, partially reversible with the depletion of the $CD4^+CD25^{bright}$ T lymphocytes (Figure 3).

As Foxp3 has been shown to be essential for the development and function of regulatory T cells²¹, we



2-a. Correlação entre as alterações na expressão de CD63 em basófilos e o aumento documentado no número de células T $CD4^+CD25^{bright}Foxp3^+$ circulantes (n=8). **2-b.** Correlação entre as alterações na razão IgG_4/IgE específica e o aumento documentado no número de células T $CD4^+CD25^{bright}Foxp3^+$ circulantes (n=8). T_0 : antes do início da imunoterapia; T_{12} : 12 meses após o início da imunoterapia; **R**: coeficiente de correlação de Pearson.

2-a. Correlation between the changes in basophilic CD63 expression and the documented increase in number of circulating $CD4^+CD25^{bright}Foxp3^+$ T cells (n = 8). **2-b.** Correlation between the specific IgG_4/IgE ratio shift and the documented increase in the number of circulating T $CD4^+CD25^{bright}Foxp3^+$ T cells (n = 8). T_0 : pre immunotherapy; T_{12} : 12 months after beginning immunotherapy; **R**: Pearson correlation coefficient.

Figura 2. Correlação entre as alterações nas células T reguladoras circulantes, expressão de CD63 e a razão IgG_4/IgE específica durante a imunoterapia específica com veneno de himenópteros

Figure 2. Correlation between the changes in the circulating regulatory T cells, CD63 expression and specific IgG_4/IgE ratio during hymenoptera venom-immunotherapy

Uma vez que o Foxp3 tem demonstrado ser essencial para o desenvolvimento e função das células T reguladoras²¹, comparámos a actividade transcricional de Foxp3 em PBMC antes do início da imunoterapia com veneno de himenópteros (T₀) e 12 meses após o seu começo (T₁₂). O mRNA do Foxp3 foi quantificado por PCR em tempo real, verificando-se um aumento significativo durante a imunoterapia específica com veneno de himenópteros (26,82 ± 15,8 e 39,73 ± 23,4 em T₀ e T₁₂, respectivamente; p<0,05, teste t de Student emparelhado). Adicionalmente, foi quantificada por citometria de fluxo a expressão proteica de Foxp3, tendo-se documentado,

compared the transcriptional activity of Foxp3 in PBMC before beginning hymenoptera venom-immunotherapy (T₀) and after 12 months (T₁₂). Foxp3 mRNA was quantified by real-time PCR, with a significant increase found during venom-immunotherapy (26.82 ± 15.8 and 39.73 ± 23.4 at T₀ and T₁₂, respectively; p < 0.05, paired Student's t test). In addition, the protein expression of Foxp3 was measured by flow-cytometry and showed a progressive increase throughout immunotherapy, both in the proportion and the absolute number of CD4⁺Foxp3⁺ T cells (Table 2).

Quadro 2. Cinética das células T reguladoras durante a imunoterapia específica com veneno de himenópteros
Table 2. Kinetics of the regulatory T cells during venom immunotherapy

	T ₀	T ₆	T ₁₂	
% células CD4 ⁺ CD25 ^{bright} (média ± desvio-padrão) % CD4 ⁺ CD25 ^{bright} cells (mean ± SD)	0.46 ± 0.24	0.70 ± 0.38	0.91 ± 0.45	p<0.01*
Células CD4 ⁺ CD25 ^{bright} /μl (média ± desvio-padrão) CD4 ⁺ CD25 ^{bright} /μl cells (mean ± SD)	8.23 ± 5.68	12.58 ± 7.98	16.49 ± 7.69	p <0.05*
% células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (média ± desvio-padrão) % CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ cells (mean ± SD)	2.68 ± 0.63	3.09 ± 0.35	3.82 ± 1.11	NS
Células CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /μl (média ± desvio-padrão) CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /μl cells (mean ± SD)	35.64 ± 9.20	50.86 ± 20.48	57.61 ± 24.63	p <0.05*
% células CD4 ⁺ CD25 ^{bright} Foxp3 ⁺ (média ± desvio-padrão) % CD4 ⁺ CD25 ^{bright} Foxp3 ⁺ cells (mean ± SD)	0.31 ± 0.16	0.75 ± 0.36	1.12 ± 0.32	p <0.001*
Células CD4 ⁺ CD25 ^{bright} Foxp3 ⁺ /μl (média ± desvio-padrão) CD4 ⁺ CD25 ^{bright} Foxp3 ⁺ /μl cells (mean ± SD)	4.62 ± 1.32	13.43 ± 8.85	16.96 ± 6.47	p <0.05*

T₀: antes do início da imunoterapia; T₆: seis meses após o início da imunoterapia; T₁₂: doze meses após o início da imunoterapia; * teste ANOVA de observações repetidas; NS: não estatisticamente significativo

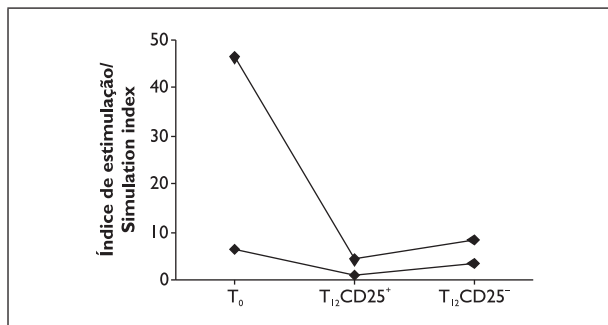
T₀: pre-immunotherapy; T₆: six months after beginning immunotherapy; T₁₂: twelve months after beginning immunotherapy; * repeated measures ANOVA; SD: standard deviation; NS: not statistically significant

ao longo da imunoterapia, um aumento progressivo, quer da proporção quer do número absoluto de células T CD4⁺Foxp3⁺ (Quadro 2).

Constatou-se ainda uma forte correlação entre a frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ e de células CD4⁺CD25^{bright} ($p=0,0005$; $R=0,84$), tendo a análise do comportamento das células T que expressavam simultaneamente ambos os marcadores (CD25^{bright} e Foxp3) também revelado um aumento significativo, quer da proporção, quer do número absoluto destas células durante a imunoterapia específica com veneno de himenópteros (Quadro 2). De salientar que estes aumentos foram muito mais pronunciados do que os observados quando a análise se restringiu à expressão de apenas um destes marcadores.

Por outro lado, ainda que não tenha sido observada uma correlação significativa entre a frequência de células T reguladoras no sangue periférico (CD25^{bright}Foxp3⁺) e os níveis de expressão de CD63 pelos basófilos, de IgG₄ específicas ou de IgE específicas, foi encontrada uma correlação significativa entre o aumento de células T CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺ durante a imunoterapia e as alterações observadas na expressão de CD63 (Figura 2a) e na razão IgG₄/IgE específica (Figura 2b).

De forma a excluir que as expansões descritas anteriormente se devessem à presença de activação celular ou a desequilíbrios na proporção relativa das populações *naïve* ou de memória das células CD4⁺, foi avaliada a expressão de HLA-DR⁺, CR45RA⁺CD62L⁺ e CD45RO⁺ nas células T, que se mantiveram estáveis ao longo de todo o período de *follow-up*: HLA-DR⁺ ($4,43 \pm 1,6\%$; $4,62 \pm 1,6\%$ e $4,57 \pm 1,0\%$ para as células T CD4⁺ e $7,68 \pm 2,9\%$; $9,14 \pm 3,4\%$ e $7,00 \pm 1,7\%$ para as células T CD8⁺ em T₀, T₆ e T₁₂, respectivamente; não estatisticamente significativo); CR45RA⁺CD62L⁺ ($41,10 \pm 2,9\%$; $44,94 \pm 5,8\%$ e $46,53 \pm 4,9\%$ em T₀, T₆ e T₁₂, respectivamente; não estatisticamente significativo); CD45RO⁺ ($52,27 \pm 5,2\%$; $46,80 \pm 7,5\%$ e $50,54 \pm 5,7\%$, em T₀, T₆ e T₁₂, respectivamente; não estatisticamente significativo).



Respostas proliferativas de linfócitos T CD4⁺ após incubação com veneno de himenópteros ($n=2$); T₁₂ CD25⁺: doze meses após o início da IE, sem depleção das células CD4⁺CD25⁺; T₁₂ CD25⁻: doze meses após o início da IE, com depleção das células CD4⁺CD25⁺. Proliferative responses of the CD4⁺ T lymphocytes after incubation with hymenoptera venom ($n = 2$); T₁₂ CD25⁺: 12 months after beginning immunotherapy, with no depletion of CD4⁺CD25⁺ cells; T₁₂ CD25⁻: 12 months after beginning immunotherapy, with depletion of CD4⁺CD25⁺ cells

Figura 3. Redução das respostas proliferativas ao veneno de himenópteros, parcialmente reversível com a depleção dos linfócitos T CD4⁺CD25^{bright}

Figure 3. Reduction in the proliferative responses to hymenoptera venom, partially reversible with the depletion of CD4⁺CD25^{bright} T lymphocytes

Moreover, there was a strong correlation between the frequency of CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25^{bright} T cells ($p = 0.0005$; $R = 0.84$). Analysis of the behaviour of T cells which simultaneously expressed both markers (CD25^{bright} and Foxp3) also revealed a significant increase in both proportion and absolute number of these cells during hymenoptera venom-immunotherapy (Table 2). It is underlined that these increases were much more pronounced than those seen when the analysis was restricted to the expression of only one of these markers. On the other hand, while there was no significant correlation between the frequency of the regulatory T cells in peripheral blood (CD25^{bright}Foxp3⁺) and the basophilic levels of CD63 expression, of specific IgG₄ or specific IgE, a significant correlation was observed between the increase in CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺ T cells during immunotherapy and the changes seen in CD63 expression (Figure 2a) and the venom-specific IgG₄/IgE ratio shift (Figure 2b).

In order to rule out that the expansions previously described were due to the presence of cellular activation or

DISCUSSÃO

A utilidade do teste de activação de basófilos no diagnóstico da alergia ao veneno de himenópteros foi já reportada por vários autores, com valores de sensibilidade entre 85 e 92% e de especificidade de 80 a 83%²⁶. Por outro lado, embora alguns estudos mais antigos não tenham documentado supressão da expressão de CD63 pelos basófilos ao longo da imunoterapia específica com veneno de himenópteros²⁶, estudos recentes comprovaram uma diminuição na activação destas células, avaliada por citometria de fluxo, após 6 meses de imunoterapia específica com veneno de himenópteros²⁷. Da mesma forma, vários estudos têm demonstrado que a imunoterapia com veneno de himenópteros induz um aumento dos níveis de IgG₄ específica e, em paralelo, uma diminuição das IgE específicas¹², levando a um aumento da razão IgG₄/IgE, embora, segundo alguns autores, sem correlação significativa com a resposta clínica à imunoterapia²⁸. No presente estudo foi observado um aumento significativo dos níveis de IgG₄ específica e uma redução, também significativa, dos níveis de IgE específica e da expressão de CD63 em basófilos ao longo dos 12 meses de imunoterapia. Verificou-se também correlações significativas, quer entre a redução da activação de basófilos e o aumento das células T CD4⁺CD25^{bright}, quer entre o aumento da razão IgG₄/IgE e o aumento das células T CD4⁺CD25^{bright}, apontando para um papel das células T reguladoras na indução de tolerância nesta situação clínica.

As células T reguladoras são peças importantes na tolerância imunitária periférica^{16, 18, 29}. Foi já demonstrado que a imunoterapia específica induz células T reguladoras produtoras de IL-10, capazes de suprimir respostas celulares T específicas de alérgeno e de regular a síntese de IgG₄ e IgE específicas^{12, 14}. Recentemente, num estudo de Mamessier e colaboradores, foi demonstrado o aumento simultâneo de células T produtoras de IL-10 e de células T CD4⁺CD25⁺ durante a imunoterapia com veneno de himenópteros¹⁵. Esse estudo foi limitado aos primeiros 45 dias pós imunoterapia, sendo constatada uma expansão de células T CD4⁺CD25⁺ muito menos marcada nos doentes com reacções mais gra-

imbalances in the relative proportion of the naïve or memory populations of CD4⁺ cells, the T cell expression of HLA-DR⁺, CR45RA⁺CD62L⁺ and CD45RO⁺ was evaluated. These remained stable throughout the follow-up period: HLA-DR⁺ (4.43 ± 1.6%; 4.62 ± 1.6% and 4.57 ± 1.0% for the CD4⁺ T cells and 7.68 ± 2.9%; 9.14 ± 3.0% and 7.00 ± 1.7% for the CD8⁺ T cells at T₀, T₆ and T₁₂, respectively; not statistically significant); CR45RA⁺CD62L⁺ (41.10 ± 2.9%; 44.94 ± 5.8% and 46.53 ± 4.9% at T₀, T₆ and T₁₂, respectively; not statistically significant); CD45RO⁺ (52.27 ± 5.2%; 46.80 ± 7.5% and 50.54 ± 5.7% at T₀, T₆ e T₁₂, respectively; not statistically significant).

DISCUSSION

Several authors have attested to the usefulness of the basophil activation test in diagnosing hymenoptera venom allergy, reporting sensitivity values of 85 – 92% and specificity values of 80 – 83%²⁶. On the other hand, while some earlier studies did not document suppression of basophilic CD63 expression throughout hymenoptera venom-immunotherapy²⁶, more recent studies have demonstrated a decreased activation in these cells, measured by flow-cytometry, after six months of hymenoptera venom-immunotherapy²⁷. In the same manner, several studies have shown that hymenoptera venom-immunotherapy induces an increase in specific IgG₄ levels and, in parallel, a decrease in specific IgE¹², leading to an increase in the IgG₄/IgE ratio, although, according to some authors, without significant correlation with the clinical response to immunotherapy²⁸. In our study, we found a significant increase in specific IgG₄ levels and an equally significant reduction in specific IgE levels and basophilic CD63 expression throughout the 12 months of immunotherapy. We also found significant correlations between both the reduced basophil activation and the increase in CD4⁺CD25^{bright} T cells, and the increase of the IgG₄/IgE ratio and the number of CD4⁺CD25^{bright} T cells, supporting a role for circulating regulatory T cells in tolerance induction in this clinical situation.

ves, quando comparados com os que apresentavam reacções ligeiras¹⁵. Esses dados levantaram dúvidas acerca do impacto da imunoterapia com veneno de himenópteros no *pool* de células T reguladoras destes doentes, que apresentavam indicação para a realização deste tipo de terapêutica. Os resultados nucleares deste trabalho previamente apresentados²² vão para além desses achados, uma vez que demonstram que em indivíduos com reacções alérgicas graves à picada de himenópteros se verifica uma expansão de células T CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺ progressiva e mantida, durante pelo menos um ano após o início da imunoterapia específica. Adicionalmente, os nossos resultados excluem a possibilidade das alterações encontradas estarem relacionadas com a activação celular ou com desequilíbrios nos compartimentos celulares T *naïve*/memória, que reconhecidamente podem ser responsáveis por uma *up-regulation* transitória do CD25 e da expressão de Foxp3 nas células T humanas³⁰.

Mamessier e colaboradores demonstraram ainda que uma fracção celular enriquecida com células T CD4⁺CD25⁺ era capaz de suprimir a proliferação específica ao veneno¹⁵. Da mesma forma, nos dois doentes em que foi possível, antes de iniciar a imunoterapia, revelar respostas proliferativas *in vitro* com o alergénio, foi observada uma redução da proliferação durante o *follow-up* parcialmente revertida com a depleção dos linfócitos T CD4⁺CD25⁺. Estes resultados são compatíveis com a existência de uma supressão das respostas proliferativas pela expansão da população de linfócitos T CD4⁺CD25⁺; no entanto, o facto de a reversão da redução das respostas proliferativas ser apenas parcial e de ter sido documentada em apenas dois doentes impede-nos de confirmar com segurança esta hipótese.

Foi ainda por nós documentada uma frequência basal diminuída de células T reguladoras CD4⁺CD25^{bright} e CD4⁺CD25^{bright} Foxp3⁺ no sangue periférico dos doentes com reacções alérgicas graves à picada de himenópteros quando comparados com indivíduos sem história de doença alérgica, que normalizaram ao fim de seis meses de imunoterapia. Estudos prévios já demonstraram que a capacidade das células T CD4⁺CD25⁺ de indivíduos alérgicos em supri-

Circulating regulatory T cells are key players in peripheral immune tolerance^{16,18,29}. It has already been demonstrated that specific immunotherapy induces circulating regulatory T cells producers of IL-10, capable of suppressing allergen-specific T cell responses and regulating specific IgG₄ and IgE synthesis^{12,14}. The recent Mamessier *et al* study showed a simultaneous increase in IL-10 producing T cells and in CD4⁺CD25⁺ T cells during hymenoptera venom-immunotherapy¹⁵. This study was limited to the first 45 days post-immunotherapy, showing a much less marked CD4⁺CD25⁺ T cell expansion in patients with more severe reactions than in those with less severe reactions¹⁵. These data casted some doubts on the impact of hymenoptera venom-immunotherapy in the pool of regulatory T cells of these patients, who have an indication for venom immunotherapy. The preliminary version of our results which was previously presented²², go beyond those findings in that they show that, in patients with severe allergic reactions to hymenoptera stings, there is a progressive and sustained expansion of CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺ T cells for at least a year after beginning VIT. Further, our results rule out the possibility of these changes being related to cellular activation or to imbalances in the *naïve*/memory T cell compartments, which are known to perhaps be responsible for a transitory up-regulation of CD25 and expression of Foxp3 in human T cells³⁰. Mamessier *et al.* further showed that a cellular fraction enriched with CD4⁺CD25⁺ T cells was able to suppress specific proliferation to venom¹⁵. In the same manner, in the two patients in whom it was possible to reveal *in vitro* proliferative responses to the allergen pre-immunotherapy, a reduced proliferation during follow-up was observed, which was partially reversed with the depletion of the CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes. While these results are in agreement with the existence of a suppression of the proliferative responses by the expansion of the CD4⁺CD25⁺ T lymphocyte population, the fact that the reversal of the reduced proliferative responses was only partial and was only seen in two patients did not allow to confirm this hypothesis.

mir respostas celulares T específicas de alérgeno é reduzida ou mesmo ausente²⁹. Em conjunto, estes dados reforçam a importância das células T reguladoras na manutenção da tolerância imunológica, suportando a necessidade de explorar abordagens terapêuticas dirigidas ao aumento desta população como uma estratégia para controlar a alergia^{11,29}.

Segundo vários autores, as células Foxp3⁺ periféricas podem surgir da expansão de células T reguladoras derivadas do timo e/ou serem geradas, durante as respostas imunitárias, concomitantemente com células T efectoras ou de memória^{19,20,31}. Ambas estas vias podem contribuir para a expansão, por nós documentada, durante a imunoterapia com veneno de himenópteros. Relativamente à especificidade das células T reguladoras expandidas, duas hipóteses podem ser colocadas: estas células podem ser específicas de alérgeno ou, pelo contrário, esta expansão pode resultar de um processo de amplificação não específico. A segunda hipótese pareceria mais provável, dada a magnitude da expansão aliada à evidência de que a imunoterapia específica apresenta um efeito protector contra o aparecimento de novas sensibilizações e alergias³².

Outro aspecto analisado neste estudo foi a existência de correlação entre as várias variáveis laboratoriais estudadas e a gravidade da reacção à picada de himenóptero ou a existência de reacções sistémicas durante a imunoterapia. Em trabalhos anteriores foi documentado que 7,3 a 10,5% dos doentes com alergia ao veneno de himenópteros apresentam níveis elevados de triptase sérica, sendo este valor inferior nos doentes com alergia ao veneno de abelha em relação aos alérgicos ao veneno de vespa³³. Desta forma, a ausência de correlação encontrada nos nossos doentes poderá, pelo menos em parte, dever-se à pequena dimensão da amostra estudada e ao facto de a maioria dos doentes apresentar alergia ao veneno de abelha.

Foi também já sugerido por alguns estudos que o teste de activação de basófilos poderá ter alguma utilidade na identificação de indivíduos com maior risco de reacções sistémicas durante a imunoterapia³⁴; no entanto, estes resultados não foram replicados por outros grupos²⁶, não tendo ainda sido demonstrada até hoje a existência de correlação entre

We also found a decreased basal frequency of regulatory CD4⁺CD25^{bright} and CD4⁺CD25^{bright}Foxp3⁺ T cells in the peripheral blood of patients with severe allergic reactions to hymenoptera sting than in those with no history of allergic disease, which normalised after six months of immunotherapy. Previous studies have already shown that the capacity of CD4⁺CD25⁺ T cells of allergic individuals to suppress specific T cell responses to the allergen is low or even absent²⁹. Taken together, these data reinforce the role of regulatory T cells in maintaining immune tolerance, supporting the need to explore treatment options aimed at increasing this population as a strategy to control allergy^{11,29}.

Several authors have noted that peripheral Foxp3⁺ cells may arise from the expansion of regulatory T cells deriving from the thymus and/or be produced during immune responses, concomitantly with effector or memory T cells^{19,20,31}. Both these routes could contribute to the expansion, documented by us, during VIT. In terms of the specificity of the expanded regulatory T cells, two hypotheses may be advanced: these cells could be allergen specific or, conversely, this expansion could result from a non-specific amplification process. The second hypothesis seems more likely given the magnitude of the expansion allied to the evidence that specific immunotherapy confers a protector effect against the appearance of new sensitisations and allergies³².

Another aspect analysed in this study was the correlation between the several laboratory variables studied and the severity of the reaction to hymenoptera stings or any systemic reactions during immunotherapy. Earlier studies documented that 7.3 – 10.5% of patients with hymenoptera venom-allergy had high serum tryptase levels, these values being lower in patients allergic to bee venom than those with allergy to wasp venom³³. Accordingly, the lack of correlation found in our patients could, at least in part, be due to the small size of the our study sample and the fact that the majority of our patients were allergic to bee venom.

a expressão de CD63 e a gravidade da reacção à picada de himenóptero³⁵. Da mesma forma, nos nossos doentes, não se documentou associação entre os níveis de expressão de CD63 e a gravidade da reacção à picada de himenóptero ou a existência de reacções sistémicas durante a imunoterapia, tendo esta ausência de associação sido também verificada em relação às restantes variáveis laboratoriais estudadas.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo suportam um papel das células T CD4⁺CD25^{bright} e/ou Foxp3⁺ na indução de tolerância durante a imunoterapia com veneno de himenópteros. Estão actualmente a decorrer estudos que poderão vir a permitir avaliar a cinética desta população ao longo da duração total da imunoterapia e, talvez ainda mais importante, determinar se esta expansão se mantém após a sua descontinuação.

Contacto/Correspondence to:

Rodrigo Rodrigues Alves
Unidade de Imunoalergologia
Hospital do Divino Espírito Santo
Av. D. Manuel I
9500-370 Ponta Delgada
São Miguel – Açores
rodrigosalves@gmail.com

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Krombach JW, Kampe S, Keller CA, Wright PM. Pharaoh Menes' death after an anaphylactic reaction--the end of a myth. *Allergy* 2004; 59:1234-5.
2. Bilò BM, Rueff F, Mosbeck H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2005; 60:1339-49.
3. Antonicelli L, Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:341-6.
4. Schwartz HJ, Squillace DL, Sher TH, Teigland JD, Yunginger JW. Studies in stinging insect hypersensitivity: postmortem demonstration of antivenom IgE antibody in possible sting-related sudden death. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:607-10.
5. Braun LIB. Notes on desensitization of a patient hypersensitive to bee stings. *S Afr Med Rec* 1925; 23:408.
6. Benson RL, Semenov H. Allergy in its relation to bee sting. *J Allergy* 1930; 1:105-16.
7. Loveness MH. Wasp venom allergy and immunity. *Ann Allergy* 1956; 14:347-66.
8. Pedro E. Alergia a insectos. *Rev Port Imunoalergologia* 2003; 11:175-9.

While several studies have suggested that the basophil activation test can be of use in identifying individuals at a higher risk of systemic reactions during immunotherapy³⁴, these results have not been replicated by other groups²⁶ and, so far, no correlation between CD63 expression and the severity of the reaction to the hymenoptera sting has been demonstrated³⁵. Our patients also showed no association between levels of CD63 expression and the severity of the reaction to the hymenoptera sting or the existence of systemic reactions during immunotherapy. This absence of association was also verified in relation to the remaining laboratory variables studied.

CONCLUSIONS

The results of this study support a role for the CD4⁺CD25^{bright} and/or Foxp3⁺ T cells in tolerance induction during VIT.

Studies which may allow us to evaluate the kinetics of this population over the entire duration of immunotherapy are currently underway and, perhaps more importantly, may allow us to determine if this expansion is maintained after immunotherapy is discontinued.

9. Müller U, Thurnheer U, Patrizzi R, Spiess J, Hoigne R. Immunotherapy in bee sting hypersensitivity. Bee venom versus wholebody extract. *Allergy* 1979; 34:369-78.
10. Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, Birnbaum J, Müller U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. *Allergy* 2005; 60:1459-70.
11. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Are regulatory T cells the target of venom immunotherapy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:365-9.
12. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.
13. Pierkes M, Bellinghausen I, Hultsch T, Metz G, Knop J, Saloga J. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:326-32.
14. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 1997; 27:1131-9.
15. Mamessier E, Birnbaum J, Dupuy P, Vervloet D, Magnan A. Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:704-13.
16. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006; 116:1713-22.
17. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193:1285-94.
18. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184:387-96.
19. Liston A, Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:176-85.
20. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116:2423-33.
21. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007; 8:277-84.
22. Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A, Alves RR, Soares RS, Pedro E, et al. Expansion of circulating Foxp3+CD25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:291-7.
23. Müller HL. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* 1966; 3:331-3.
24. Birnbaum J, Charpin D, Vervloet D. Rapid Hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:226-30.
25. Albuquerque AS, Cortesao CS, Foxall RB, Soares RS, Victorino RM, Sousa AE. Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7Ralpha expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J Immunol* 2007; 178:3252-9.
26. Erdmann SM, Sachs B, Kwicien R, Moll-Slodowy S, Sauer I, Merk HF. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 2004; 59:1102-9.
27. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, et al. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72:196-203.
28. Müller U, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy* 1989; 44:412-8.
29. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608-15.
30. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37:129-38.
31. Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:231-7.
32. Eng PA, Borer-Reinhold M, Heijnen IA, Gnehm HP. Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood. *Allergy* 2006; 61:198-201.
33. Haeberli G, Bronnimann M, Hunziker T, Müller U. Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1216-20.
34. Kosnik M, Silar M, Bajrovic N, Music E, Korosec P. High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy* 2005; 60:1401-6.
35. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; 61:1028-39.