

# Respostas celulares T aos alérgenos do látex

## *T-cell responses of latex allergens*

Rev Port Imunoalergologia 2007; 15 (1): 7-17

Stephanie Santos<sup>1</sup>, Paulo Tavares<sup>2</sup>, Olga Lourenço<sup>3</sup>, Ana Mafalda Fonseca<sup>4</sup>, Luís Taborda-Barata<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Estagiária de Bioquímica.

<sup>2</sup> Assistente Convidado; Responsável pelo Sector de Imunologia.

<sup>3</sup> Aluna de doutoramento; bolsista da FCT; Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Sousa Martins, Guarda.

<sup>4</sup> Professora Auxiliar Convidada.

<sup>5</sup> Professor Auxiliar; Assistente Hospitalar de Imunoalergologia; Serviço de Imunoalergologia, Centro Hospitalar da Cova da Beira, Covilhã.

CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

### RESUMO

A hipersensibilidade causada por alérgenos do látex tem surgido como um grave problema de saúde em indivíduos expostos a diversos artigos de borracha. Já foram identificadas e caracterizadas 13 proteínas alérgicas do látex. Uma vez que todos os fenómenos responsáveis pela resposta alérgica ao látex são coordenados por células T, é importante o conhecimento do padrão de imunoreactividade de células T específicas, em relação aos diferentes alérgenos do látex, para a compreensão do mecanismo de sensibilização e para o desenvolvimento de uma imunoterapia específica segura e eficaz. Esta revisão tem então como objectivo fazer uma análise dos conhecimentos adquiridos nesta área, através de estudos *in vitro* realizados em células T quando em contacto com diferentes alérgenos derivados do látex (extractos, alérgenos naturais ou recombinantes e também peptídeos sobrepostos). Foi possível verificar que a alergia ao látex está associada a uma exposição a este produto, mas não implica obrigatoriamente uma resposta proliferativa T aos diferentes alérgenos estudados. Observou-se, de maneira geral, uma grande variabilidade interindividual de respostas das células T a nível de proliferação, síntese de citocinas e fenótipo HLA classe II. Uma vez que escassos estudos foram efectuados, é importante a elaboração de mais trabalhos de investigação para uma mais aprofundada caracterização fisiológica linfocitária T na alergia ao látex.

**Palavras chave:** Hipersensibilidade ao látex, alérgenos, células T humanas, proliferação, citocinas, HLA classe II.

## ABSTRACT

*Hypersensitivity caused by latex allergens has become a serious health problem in individuals exposed to rubber articles. Thirteen allergenic latex proteins have been identified and characterized. Since the events responsible for the allergic response to latex are coordinated by T cells, it is important to know the immunoreactivity of specific T cells to the different latex allergens for the understanding of the sensitization mechanism as well as for the development of a secure and efficacious type of allergen-specific immunotherapy. The objective of this review is to analyse current knowledge in this field, obtained using in vitro studies in T cells in contact with different latex-derived allergens (extracts, natural or recombinant allergens and also overlapping peptides). It is clear that latex allergy is associated with an exposure to this product but does not necessarily imply detectable proliferative T cell responses to the different latex allergens studied. In general, there is great interindividual variability of responses at the level of T cell proliferation, cytokine synthesis and HLA class II phenotype. Since there are few studies in this field, it is important to carry out further research for a better characterisation of the physiological role of T lymphocyte responses in latex allergy.*

**Keywords:** Latex hypersensitivity, allergens, human T cells, proliferation, cytokine, HLA class II.

## INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade ao látex, mediada por IgE, é reconhecida como um problema de saúde internacional cuja prevalência tem aumentado, particularmente nos grupos de risco, que incluem trabalhadores na área de saúde (TAS), doentes com espinha bífida (DEB), indivíduos atópicos e indivíduos com manipulação frequente de artigos de borracha (que não sejam TAS). A reacção alérgica ao látex está associada a uma resposta imunitária desequilibrada às proteínas alergénicas contidas em vários produtos de látex<sup>1,2</sup>. Estão, até à data, identificadas e caracterizadas 13 proteínas alergénicas do látex<sup>3</sup>. Vários estudos demonstraram existirem padrões diferenciais de reconhecimento antigénico entre os vários grupos de risco. Por exemplo, o padrão de sensibilização em DEB frequentemente compreende como alergénios principais o *Hev b 1* e o *Hev b 3*, enquanto nos TAS estão envolvidos o *Hev b 5* e o *Hev b 6*<sup>4</sup>, e, mais recentemente, o *Hev b 13*<sup>3</sup>. De facto, os níveis de *Hev b 5* e de *Hev b 13* em luvas de látex cirúrgicas podem servir como indicador da potência alergénica das luvas<sup>5</sup>. Curiosamente, demonstrou-

-se recentemente a presença de diferenças, tanto qualitativas como quantitativas, no perfil de proteínas entre as superfícies interna e externa de luvas cirúrgicas de látex, o que poderá justificar os diferentes padrões de sensibilização entre TAS e DEB<sup>6</sup>.

Por outro lado, os indivíduos com alergia ao látex reagem frequentemente a alergénios de determinados frutos com os quais o látex têm grande homologia. Vários estudos demonstraram que esta reactividade cruzada entre alguns dos alergénios do látex e alguns frutos se devia ao facto de as IgE séricas dos doentes com alergia ao látex reconhecerem epítopos estruturalmente semelhantes em diferentes proteínas que se apresentam com estruturas filogeneticamente conservadas, tanto no látex como em vegetais e frutos<sup>4,7</sup>.

A produção de IgE específica ao látex pelas células B e a libertação de mediadores de inflamação, por mastócitos e eosinófilos, são consequência de uma resposta efectora na doença alérgica. Todos estes eventos estão controlados por células T CD4+ específicas a alergénios com um padrão de citocinas Th2 (elevados níveis de IL-4 e IL-5 e baixos de IFN- $\gamma$ ) (Figura 1). Um pré-requisito para a com-

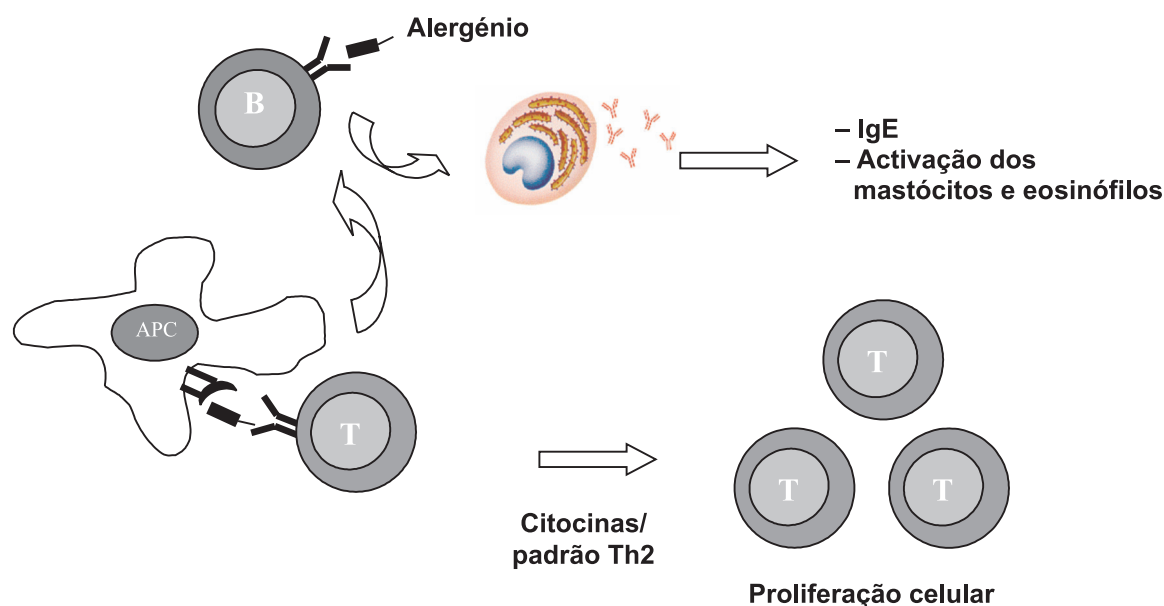
preensão do processo de sensibilização ou para a concepção de uma imunoterapia específica segura e eficaz para a alergia ao látex é o conhecimento do padrão de imunoreactividade dos alergénios do látex a nível de células T específicas<sup>8</sup>. Torna-se então fundamental a elaboração de estudos exaustivos, orientados para a localização de epítopos de células T, a avaliação da proliferação celular, a secreção de citocinas e a restrição pelo HLA classe II, em resposta a proteínas e peptídeos do látex nos indivíduos alérgicos a este produto. Diversos estudos com diferentes extractos ou alergénios do látex têm sido efectuados com este objectivo (Quadro I).

## PROLIFERAÇÃO CELULAR

A capacidade de resposta de células T a alergénios deve ser conceptualizada como um parâmetro que pode estar associado, por um lado, a respostas efectoras, mas também, por outro lado, a respostas preventivas do desenvol-

vimento da alergia ao látex. Assim, a avaliação das respostas proliferativas celulares T a proteínas do látex, geralmente efectuada por ensaios *in vitro*, é um passo essencial para se compreender o mecanismo de hipersensibilidade a este composto. O reconhecimento correcto do alergénio pela célula T vai estimular a sua activação e desencadear os fenómenos que ocorrem na alergia ao látex, nomeadamente a produção de IgE e de outros mediadores de inflamação, bem como o recrutamento de outras células inflamatórias<sup>9,10</sup>.

Vários estudos de caracterização de respostas proliferativas de células T têm sido efectuados com diferentes extractos de látex, alergénios purificados (*Hev b 1, 2, 3, 4*) ou recombinantes (*rHev b 5, 6, 7*) bem como com peptídeos (*Hev b 1, 3, 5 e 6*), em diversos grupos populacionais. A maioria destes estudos foi efectuada com linfócitos T de TAS e DEB, uma vez que estes são dois grupos de risco. A alergia dos voluntários recrutados é, na maioria dos casos, confirmada pela história clínica, testes cutâneos e/ou presença de IgE específica a alergénios do látex no soro.



**Figura 1.** Esquema do mecanismo da resposta alérgica. O alergénio é apresentado à célula T auxiliar (Th) induzindo uma resposta proliferativa de células Th específicas ao alergénio, com um padrão de citocinas Th2, estimulando a produção de IgE e resultando na resposta alérgica.

**Quadro 1.** Estudos *in vitro*, envolvendo respostas de células T humanas a alergénios do látex

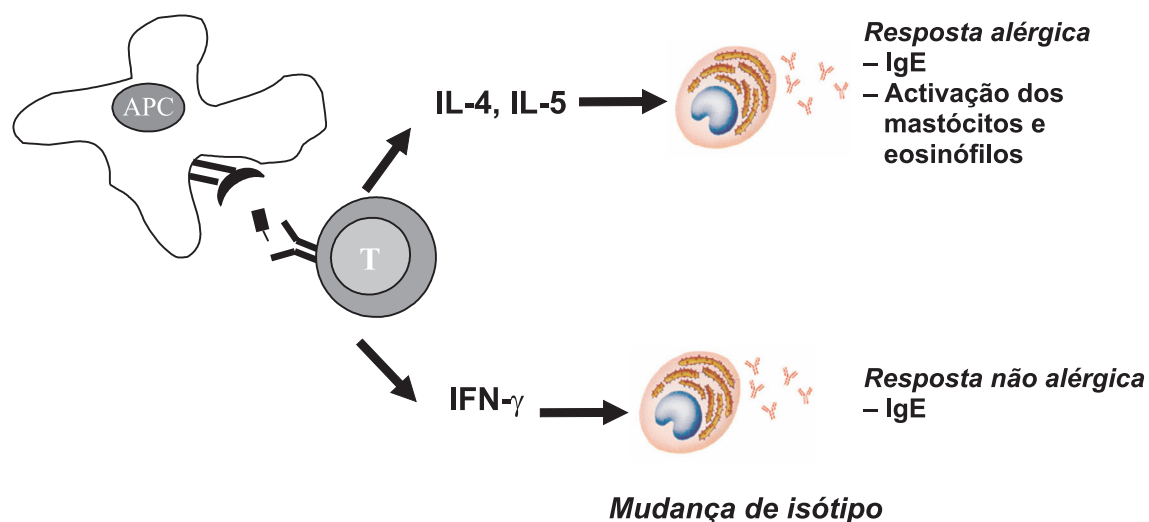
Referência	Extractos / alergénio(s)	Estudo(s)	População-alvo	Células
[11]	Diversos extractos preparados de luvas cirúrgicas	Proliferação	TAS alérgicos e não alérgicos	PBMC
[13]	Amostra bruta e alergénios purificados	Proliferação	Voluntários alérgicos e não alérgicos	PBMC
[9]	<i>Hev b 1</i> purificado, extractos de látex fluido e extractos de luvas	Proliferação	TAS alérgicos, não alérgicos e voluntários não alérgicos sem exposição	PBMC
[14]	Extractos de látex não amoniados	Proliferação	TAS alérgicos e não alérgicos	PBMC
[15]	<i>Hev b 1</i> purificado e peptídeos sobrepostos do <i>Hev b 1</i>	Proliferação, mapeamento de epítopos, análise HLA classe II	TAS alérgicos, não alérgicos e voluntários não alérgicos e sem exposição	PBMC
[16]	<i>rHev b 3</i> purificado e peptídeos sobrepostos do <i>Hev b 3</i> e <i>Hev b 1</i>	Proliferação, mapeamento de epítopos, secreção de citocinas e análise de HLA	DEB alérgicos	PBMC; TCL; TCC
[17]	<i>nHev b 1, 2, 3, rHev b 6, rHev b 7</i> purificados, três extractos de látex diferentes	Proliferação	TAS alérgicos e não alérgicos	PBMC
[8]	<i>rHev b 5</i> purificado, peptídeos sobrepostos do <i>Hev b 5</i> , extractos de látex pouco amoniados	Proliferação, mapeamento de epítopos, secreção de citocinas	TAS alérgicos	PBMC; TCL
[10]	Extractos de luvas, <i>rHev v 6.01</i> , peptídeos sobrepostos do <i>Hev b 6.01</i>	Proliferação, mapeamento de epítopos, secreção de citocinas	TAS alérgicos e voluntários não alérgicos	PBMC; TCL
[18]	<i>rHev b 6.01, rHev b 6.02, rHev b 6.03, nHev b 6.02</i> e peptídeos do <i>Hev b 6.02</i> mutantes	Proliferação, análise HLA classe II	TAS alérgicos e voluntários não alérgicos	PBMC
[19]	Extractos de luvas, <i>rHev b 6.01</i> , 4 proteínas <i>Hev b 6.01</i> mutantes, peptídeos sobrepostos do <i>Hev b 6.02</i> e 2 peptídeos do <i>Hev b 6.02</i> mutantes	Proliferação	TAS alérgicos e não alérgicos	PBMC; TCL

**TAS** – Trabalhadores na área de saúde; **DEB** – Doentes com espinha bífida; **PBMC** – Células mononucleares do sangue periférico humano; **TCL** – linhas de células T específicas ao alergénio; **TCC** – clones de células T específicas ao alergénio; **nHev b** – *Hev b* natural; **rHev b** – *Hev b* recombinante.

O primeiro estudo a demonstrar uma resposta imunitária mediada por células T na alergia ao látex foi elaborado usando preparações de alergénios do látex a partir de luvas cirúrgicas. Os investigadores demonstraram que 20% dos TAS alérgicos apresentavam resultados positivos em termos de proliferação de linfócitos T aos extractos usados nas culturas celulares<sup>11</sup>. Para além disso, vários estudos posteriores demonstraram que os linfócitos T de voluntários com alergia ao látex apresentam sempre maiores níveis de proliferação quando comparados com os linfócitos T de voluntários sem alergia, para todas as amostras antigénicas utilizadas (extractos, antigénios purificados ou recombinantes e peptídeos). Curiosamente, nem todos os voluntários com alergia ao látex apresentam resposta proliferativa às amostras alergénicas, observando-se, em vários estudos, a existência consistente de uma percentagem de indivíduos alérgicos sem respostas proliferativas, que pode chegar a atingir os 93%. Nestes estudos, verificou-se também que os índices de proliferação obtidos eram muito diversos, com grandes variações interindividuais.

As células T são cruciais para a mudança de isótipo para IgE em células B (Figura 2)<sup>12</sup>. Contudo, os estudos que se debruçaram sobre este aspecto não encontraram nenhuma correlação entre os níveis de IgE específica e respostas proliferativas de células T induzidas pelos diferentes alergénios do látex.

Um aspecto crucial a analisar diz respeito à possibilidade de uma exposição regular ao látex poder induzir proliferação de células T, mesmo em indivíduos sem alergia detectável a este produto. Como se esperaria, estudos anteriores mostraram que os linfócitos T de voluntários sem alergia e sem exposição ao látex não proliferavam com extractos, alergénios recombinantes ou peptídeos do látex<sup>8,9,10,11,13,14,15,16,17,18</sup>. Em contraste, os linfócitos T de indivíduos não alérgicos mas com exposição frequente ao látex, já demonstravam capacidade proliferativa específica a estes alergénios. Por exemplo, Raulf-Heimsoth e colaboradores observaram que 65% dos TAS alérgicos e 38% dos TAS não alérgicos tinham respostas proliferativas celulares T a extractos de látex amoniado. Resultados semelhantes foram encontrados quando utilizaram extractos



**Figura 2.** Mudança de isótipo em células B comandado pelas células T. A produção de IL-4 e IL-5, pelas células T auxiliares (Th), quando em contacto com o alergénio, irá estimular a produção de IgE por células B, desencadeando uma resposta alérgica. Se se verificar a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T auxiliares, uma mudança de isótipo das células B vai ocorrer, resultando na produção de IgG e numa resposta não alérgica

de luvas de látex como fonte alergénica, observando-se que 48% dos alérgicos e 25% dos não alérgicos demonstravam respostas celulares T positivas<sup>9</sup>. Foi também verificado que 25% dos voluntários expostos ao látex, mas não alérgicos a este, apresentavam respostas proliferativas de células T ao extracto purificado de *Hev b 1*, enquanto 50% respondia a peptídeos do látex<sup>15</sup>. Estes resultados sugerem que a proliferação específica ao látex está associada à exposição frequente aos alergénios, e não é um factor preditivo da alergia a este produto, embora as percentagens obtidas em voluntários não alérgicos, mas expostos frequentemente ao látex, sejam inferiores quando comparadas com as dos voluntários com alergia<sup>9,15</sup>. Assim, os dados sugerem que outros aspectos ligados à fisiologia das células T, como a produção de citocinas, poderão ser melhores discriminadores entre voluntários com e sem alergia ao látex.

Quando se analisam com maior detalhe os estudos de proliferação de linfócitos T no contexto da alergia ao látex, podemos observar uma grande variedade de percentagens de respostas proliferativas em voluntários alérgicos, dependendo da amostra alergénica utilizada (extractos amoniados, pouco amoniados, não amoniados ou extractos de luvas), bem como das concentrações usadas ou de outras condições de cultura linfocitária<sup>8,9,14,17</sup>.

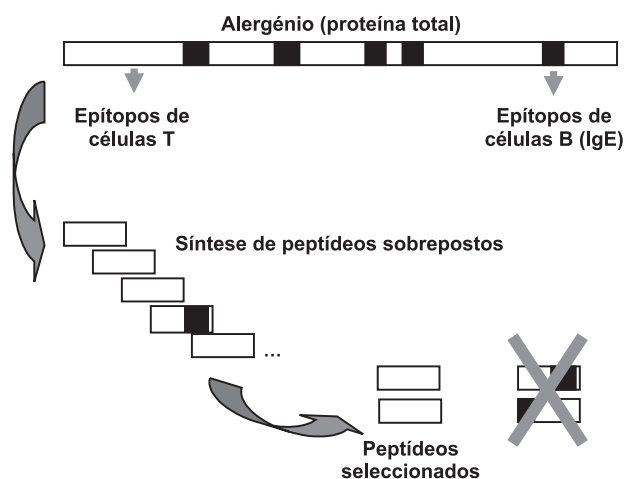
Em relação a *extractos de látex amoniados*, observou-se uma percentagem de 65% de respostas proliferativas em TAS<sup>9</sup>. Para *extractos de látex pouco amoniados*, foi possível observar, num estudo realizado em PBMC e linhas celulares de 6 TAS, que todas as amostras proliferaram<sup>8</sup>. Estudos realizados em TAS com *extractos de látex não amoniados* mostraram uma proliferação mais baixa de linfócitos T (7% e 39%)<sup>14,17</sup>. Finalmente, usando *extractos de luvas de látex*, observou-se uma resposta proliferativa em 48% e 32% dos TAS alérgicos estudados<sup>9,17</sup>. Estas diferenças nas percentagens de doentes cujos linfócitos T proliferam ao látex podem ser influenciadas pelo facto de o tratamento do látex natural com agentes químicos, como a amónia, aumentar a formação de fragmentos proteicos, uma vez que acelera a hidrólise das proteínas<sup>20</sup>. Por outro

lado, é de referir que estes tipos de extractos de látex também demonstraram ser tóxicos para linfócitos, o que aumenta a variabilidade de respostas<sup>17</sup>.

Estudos com alergénios naturais purificados revelaram-se de grande interesse, uma vez que se verificou terem uma baixa toxicidade para linfócitos T em cultura, quando comparados com extractos totais de látex<sup>17</sup>. Como já foi referido, dois trabalhos foram realizados com o *Hev b 1 natural (nHev b 1)*, verificando-se uma proliferação em 52% e 64% de TAS<sup>9,15</sup>. Mais tarde, Johnson e colaboradores efectuaram um estudo com um vasto painel de alergénios purificados, naturais (*nHev b 1, 2, 3 e 4*) e recombinantes (*rHev b 6 e rHev b 7*), em TAS. Foi observada uma resposta proliferativa em 57% das amostras a pelo menos um dos alergénios utilizados. Todos estes voluntários demonstraram uma resposta positiva ao *nHev b 2*, e 75% ao *rHev b 6*<sup>17</sup>.

A manipulação de proteínas recombinantes tem sido extensamente utilizada, uma vez que permite obter uma grande quantidade de proteína purificada por métodos estandardizados, específicos e sensíveis. Numerosas proteínas alergénicas foram produzidas por clonagem molecular, sequenciadas e expressas num vector apropriado, para a elaboração de estudos de caracterização e proliferação celular<sup>20</sup>. O primeiro estudo com o uso de um alergénio recombinante foi elaborado por Bohle e colaboradores, relativamente ao *rHev b 3*. Neste trabalho, os autores observaram uma resposta proliferativa positiva de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em todos os DEB recrutados<sup>16</sup>. Mais tarde, foi realizado um estudo com o *rHev b 5/MBP*, tendo-se observado uma resposta positiva das linhas de células T (TCL) específicas do *Hev b 5*, obtidas a partir de dois TAS<sup>8</sup>. Outros estudos, envolvendo o uso de proteínas recombinantes, foram efectuados para o *Hev b 6*. No primeiro trabalho, todas as TCL específicas, obtidas de TAS, tiveram respostas positivas quando estimuladas com o *rHev b 6.01*<sup>10</sup>. Um estudo posterior demonstrou que 78%, 22% e 67% dos TAS estudados tinham linhas celulares com resposta proliferativa para o *rHev b 6.01/MBP*, *rHev b 6.02/MBP* e *rHev b 6.03/MBP*, respectivamente<sup>18</sup>.

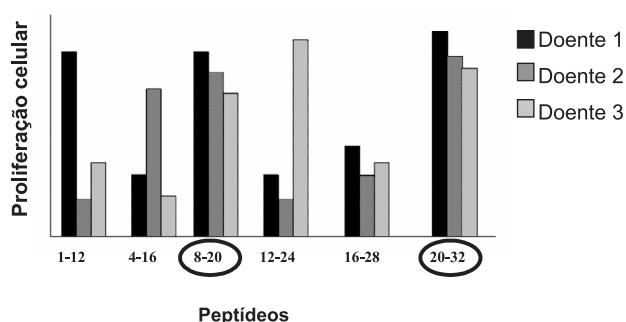
Alguns trabalhos recorreram a uma técnica diferente, utilizando peptídeos sobrepostos correspondendo a toda a extensão de diferentes alergénios (Figura 3). Estes estudos permitiram averiguar a presença de epítipo(s) dominante(s) de células T para vários alergénios (*Hev b 1, 3, 5 e 6.01*) (Figura 4). Observou-se uma grande percentagem de proliferação, usando PBMC, TCL ou clones de células T (TCC) específicos, quando estimulados com estes diferentes peptídeos, em voluntários alérgicos. Em todos estes estudos observou-se que os peptídeos não se ligavam à IgE dos soros dos voluntários, isto é, não continham epítopos de células B<sup>8,10,15,16</sup>. Como já foi referido, no caso do *Hev b 1*, observou-se uma proliferação em 71% dos TAS a um ou mais peptídeos sobrepostos, tendo a maioria respondido aos peptídeos do *Hev b 1 31-49 e 91-109*<sup>15</sup>. Para os peptídeos do *Hev b 3*, verificou-se uma resposta positiva em 81% dos TCC específicos de DEB testados, a um ou mais peptídeos do *Hev b 3*. O peptídeo com maior reactividade foi o *Hev b 3 103-114*<sup>16</sup>. Relativamente aos



**Figura 3.** Técnica de síntese e selecção de peptídeos sobrepostos obtidos a partir de alergénios. Peptídeos sequenciais, com uma sobreposição de cerca de 4 aminoácidos, são sintetizados, de forma a cobrirem toda a extensão da proteína alergénica. Eliminam-se seguidamente os peptídeos que se ligam à IgE (que contêm epítopos de células B). Os peptídeos restantes são utilizados para estudos em culturas de células T

peptídeos do *Hev b 5*, 83% das TCL específicas derivadas de TAS apresentaram resposta positiva a um ou mais peptídeos, verificando-se que os peptídeos 46-65 e 109-128 foram os que induziram maior proliferação<sup>8</sup>. Em relação aos peptídeos do *Hev b 6.01*, todas as TCL específicas de TAS testadas responderam a um ou mais peptídeos sobrepostos, tendo-se observado as maiores respostas proliferativas com os peptídeos *Hev b 6.01 19-38 e 10-29*<sup>10</sup>.

Os estudos com peptídeos e com alergénios recombinantes aumentaram o interesse em formas modificadas destas moléculas, de forma a averiguar se seria possível manter as respostas celulares T mas eliminar os epítopos de células B, o que permitiria o desenvolvimento de uma imunoterapia mais segura, baseada neste tipo de abordagem. Neste contexto, foi recentemente estudada a capacidade de proliferação de *proteínas mutantes do Hev b 6.01 e peptídeos mutantes do Hev b 6.02*. Assim, foram sintetizadas proteínas e peptídeos mutantes, através da substituição de resíduos de cisteína (responsáveis pela conformação da molécula) por resíduos de alanina ou serina. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que se verificou a retenção da capacidade de prolifera-



**Figura 4.** Exemplo da selecção de peptídeos sobrepostos dependendo da sua capacidade de estimulação proliferativa de células T. Nesta figura estão representadas as respostas proliferativas de 3 doentes diferentes aos peptídeos sequenciais 1-12, 4-16, etc. Os peptídeos 8-20 e 20-32, ao induzirem proliferação celular T elevada nos 3 doentes testados, deverão conter epítopos dominantes para células T e são seleccionados para os estudos celulares



ração celular T mas deixou de se observar ligação à IgE sérica, tanto para as proteínas como para os peptídeos mutados<sup>10,19</sup>.

É possível que haja peptídeos com epítomos que induzam, não a proliferação celular, mas o desenvolvimento de células T “reguladoras”. Actualmente, na Universidade da Beira Interior, está precisamente a estudar-se o papel de determinados peptídeos do látex no desenvolvimento de células T CD4+ com capacidade “reguladora”.

### **ESTUDO DA RESTRIÇÃO DE HLA, FENOTIPAGEM DE HLA CLASSE II E PREVISÃO E ANÁLISE DE ZONAS DE LIGAÇÃO AO HLA**

A proliferação de células T, assim como a produção de citocinas, em resposta a alergénios, depende de uma apresentação correcta dos peptídeos alergénicos no contexto de moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) / antígenos leucocitários humanos (HLA) da classe II, em células apresentadoras de antígenos. De facto, as interacções moleculares entre o MHC classe II, o peptídeo e o receptor de células T (TCR), providenciam a base estrutural para a especificidade das respostas ao alergénio em células T CD4<sup>+</sup><sup>15</sup>.

Estudos de fenotipagem celular quanto à expressão de moléculas do HLA, como a HLA-D, podem ser úteis para averiguar o potencial genético de predisposição para o desenvolvimento de uma resposta imunitária de tipo imediata em grupos de risco<sup>21</sup>. Neste campo, dados analíticos da ligação de peptídeos ao HLA classe II, assim como a cristalografia do HLA, conduziram ao desenvolvimento de programas computacionais (*computer-assisted algorithms*), através dos quais sequências de grandes proteínas podem ser analisadas para a previsão das sequências peptídicas que se poderão ligar a diferentes moléculas do MHC / HLA<sup>18</sup>.

Diversos estudos foram elaborados com o objectivo de estudar o HLA-D de TAS e DEB alérgicos a di-

ferentes alergénios. Raulf-Heimsoth e colaboradores analisaram regiões reactivas e regiões do *Hev b 1* com capacidade de ligação ao HLA-DR4 em TAS. Para avaliar a especificidade da activação linfocitária, os autores estudaram a expressão de CD25 e HLA-DR em PBMC de alguns voluntários com respostas proliferativas positivas ao *Hev b 1* e aos respectivos peptídeos dominantes, verificando-se o aumento da expressão de CD25 e HLA-DR, quando comparados com TAS não alérgicos. Foi também elaborada a fenotipagem HLA de voluntários alérgicos ao látex. Após verificar que 60% dos voluntários alérgicos que respondiam a um ou mais peptídeos de *Hev b 1* expressavam HLA-DR4, os autores determinaram as possíveis regiões de ligação a HLA-DR4Dw4 no alergénio (PROTSHELL). Usando esta técnica, foram detectadas cinco sequências de aminoácidos que poderão constituir prováveis epítomos de células T para o *Hev b 1*. Apenas uma região de ligação ao HLA-DR4Dw4 (DRB1\*0401) foi encontrada na região 102-110, e verificou-se que parte desta sequência peptídica induzia uma proliferação em 66% dos TAS que apresentavam respostas proliferativas T. Os autores também encontraram zonas de ligação ao HLA-DR4Dw4 nas regiões 19-27, 77-85, 37-45 e 51-60 do *Hev b 1*, sendo estas regiões capazes de induzir proliferação em 50% dos voluntários com respostas celulares T proliferativas positivas<sup>15</sup>. Efectuou-se, posteriormente, um estudo de restrição de HLA relativo ao alergénio *rHev b 3* em DEB alérgicos. Obtiveram-se resultados de fenotipagem de HLA-DRB e HLA-DQB dos alérgicos e de restrição de MHC de reconhecimento das células T com peptídeos do *Hev b 3*. Observou-se uma apresentação restrita ao HLA-DR do peptídeo dominante e o envolvimento de uma sequência de 4 aminoácidos (YSTS) na posição 10-13<sup>16</sup>. A última análise de zonas de ligação ao HLA-DR4 envolveu o alergénio *rHev b 6.01* e seus domínios *rHev b 6.02* e *rHev b 6.03*, em TAS. Este estudo sugeriu que os fenótipos HLA-DR e HLA-DP são mais importantes do que o HLA-DQ na resposta proliferativa induzida pelo *rHev b 6.01* e que o HLA-DR parece não ser suficiente



para a resposta proliferativa ao *Hev b 6.02*. A fenotipagem HLA dos TAS alérgicos revelou uma frequência elevada de HLA-DR4 (em 57% dos voluntários alérgicos) e HLA-DQ8 (em 48% dos voluntários alérgicos). A previsão de zonas de ligação ao HLA-DR4Dw4 foi efectuada usando dois programas computacionais diferentes (PROTSHELL e TEPITOPE). Estes programas revelaram que o domínio *Hev b 6.02* não apresentava zonas de ligação ao HLA-DR4Dw4, o que poderá explicar o seu baixo potencial estimulador de células T em indivíduos alérgicos ao látex. Embora ambos os programas utilizados tenham fornecido resultados semelhantes, mas não idênticos, estes previram potenciais zonas de ligação ao HLA-DR4Dw4 (DRB1\*0401) na sequência inteira que compreendia o *Hev b 6.03*, justificando a sua grande capacidade de estimulação proliferativa de células T. Foram também previstas zonas de ligação ao HLA-DR4Dw4 nas regiões 130-138, 146-154, 163-171 e 174-182 do *Hev b 6.03* com ambos os programas<sup>18</sup>. Desta forma, aspectos genéticos podem influenciar as respostas celulares T a alérgenos do látex, nomeadamente no que diz respeito às diferenças no grau e frequência de proliferação celular T a diferentes alérgenos do látex em diferentes doentes com alergia a este produto. Finalmente, os aspectos genéticos poderão influenciar decisivamente aspectos da fisiologia celular T que poderão contribuir ou não para o desenvolvimento da própria sensibilização inicial ao látex.

## SECREÇÃO DE CITOCINAS

Para além da proliferação, também a síntese de citocinas é um marcador muito importante da activação de células T. De facto, é de grande importância o estudo do padrão de citocinas secretadas por linfócitos T específicos de alérgenos em resposta a um estímulo específico, uma vez que esse padrão permite determinar a qualidade dessa resposta de anticorpos, bem como a maior ou menor probabilidade de desenvolvimento de hipersensi-

bilidade a substâncias alérgicas, como o látex<sup>16</sup>. É provável que a produção de citocinas pelas células T tenha o papel mais importante no desencadeamento da inflamação alérgica específica. O padrão de citocinas Th2 caracteriza uma resposta alérgica humana e está presente após a estimulação de linfócitos T específicos com os alérgenos respectivos<sup>22</sup>.

Para além desses aspectos, vários estudos têm demonstrado, em alergias a pólenes e a alérgenos perenes, que uma imunoterapia eficaz está geralmente associada a uma modificação nos perfis de secreção de citocinas em células T, deixando de se observar um desvio tão marcado nas respostas Th2, para passar a haver um maior equilíbrio Th1/Th2, por diminuição das respostas Th2, aumento das respostas Th1, ou por ambos os mecanismos<sup>22</sup>.

Contudo, no que diz respeito à alergia ao látex, escassos estudos avaliaram a produção de citocinas de células T quando em contacto com alérgenos deste produto. A primeira abordagem foi realizada com o alérgeno *rHev b 3* e a avaliação da secreção de citocinas feita por *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Verificou-se que, de acordo com o padrão de produção de citocinas, em resposta à estimulação com o *rHev b 3*, 57% dos TCC específicos tinham um perfil tipo Th2 (altos níveis de IL-4 e baixos de IFN- $\gamma$ ), 10% eram do tipo Th1 (baixos níveis de IL-4 e altos de IFN- $\gamma$ ) e 33% produziam níveis semelhantes de IL-4 e IFN- $\gamma$ , sendo classificadas como Th0<sup>16</sup>. No caso do *rHev b 5/MBP*, observou-se a secreção, por *ELISA*, de níveis elevados de IL-5 e baixos de IFN- $\gamma$  em todas as TCL específicas testadas de TAS alérgicos, quando estimuladas pelos respectivos peptídeos estimuladores do *Hev b 5*, confirmando-se o padrão de citocinas Th2<sup>9</sup>. Em relação ao *rHev b 6.01*, foi testada a secreção de citocinas em TCL específicas de TAS alérgicos quando em contacto com extractos de luva, *rHev b 6.01*, peptídeos da heveína ou com o péptido imunodominante do *Hev b 6*. A análise foi elaborada por citometria de fluxo, verificando-se que ambas as citocinas, IL-4 e IFN- $\gamma$ , foram produzidas pelas linhas celulares T

CD4+ específicas do alergénio. A proporção obtida de citocinas era muito variável em cada voluntário, verificando-se a produção predominante de IFN- $\gamma$  e menor de IL-4 em 57% das TCL específicas, em resposta a todas as amostras. Apenas 14% das TCL específicas estudadas demonstraram maiores níveis de IL-4 e menores de IFN- $\gamma$  para todas as amostras<sup>10</sup>. Estes estudos mostram que os perfis definidos como Th1 e Th2 representam apenas os aspectos mais superficiais de uma realidade que é muito mais complexa e que envolve vários outros padrões de citocinas, para além dos referidos.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos efectuados sobre a fisiologia de células T em resposta a alergénios do látex são ainda escassos, particularmente no que diz respeito à síntese de citocinas. De uma forma resumida, podemos dizer que a proliferação de células T perante alergénios do látex parece ter uma associação positiva com a exposição a este produto. Por outro lado, a alergia ao látex não implica necessariamente uma proliferação celular T detectável aos seus principais alergénios. Finalmente, embora pareça haver um desequilíbrio no sentido Th2, no que diz respeito às respostas celulares T a alergénios do látex, há uma forte variabilidade individual nos padrões de resposta citocínica dentro do grupo de doentes com alergia manifesta. Restrições ao reconhecimento de alergénios do látex por células T, impostos por factores genéticos como o haplotipo HLA, são cruciais para a compreensão do desenvolvimento e manutenção da sensibilização ao látex. Estudos mais alargados no que diz respeito a painéis de citocinas, ao desenvolvimento de anergia e de células T “reguladoras”, ou à interacção entre células T e células apresentadoras de antigénios (particularmente células dendríticas) poderão ajudar a caracterizar melhor os aspectos linfocitários T da alergia ao látex e contribuir para um desenho mais eficaz e seguro de abordagens de imunoterapia específica.

## REFERÊNCIAS

1. Levy DA, Charpin D, Pecquet C, Leynadier F, Vervolet D. Allergy to Latex. *Allergy* 1992; 47:579-87.
2. Zucker-Pinchoff B, Stadtmayer GJ. Latex Allergy. *Mt Sinai J Med* 2002; 69(1&2):88-94.
3. Wagner S, Breiteneder H. Hevea Brasiliensis Latex Allergens: Current Panel and Clinical Relevance. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:90-7.
4. Kurup VP, Fink JN. The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy* 2001; 56:2-12.
5. Yeang HY, Arif SA, Raulf-Heimsoth M, Loke YH, Sander I, Sulong SH, Lau CH, Hamilton RG. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:593-8.
6. Tavares-Ratado PM, Peixinho, CMA, Tomáz MRT, Taborda-Barata LM, Tomáz CA. Expression of latex allergens on inner and outer surfaces of latex surgical gloves. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:S25 (Abstr).
7. Marin FA, Peres SPBA, Venturini MC, Francisco RMC, Zuliani A. Alergia ao látex e a frutas em profissionais de área da saúde. *Revista de Nutrição* 2003; 16:415-21.
8. De Silva HD, Surtherland MF, Suphioglu MF, McLellan, SC, Slater JE, Rolland JM, O'Hehir RE. Human T-cell epitopes of the latex allergen Hev b 5 in health care workers. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1017-24.
9. Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Liebers V, Allmers H, Baur X. Lymphocyte proliferation response to extracts from different latex materials and to the purified latex allergen Hev b 1 (rubber elongation factor). *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:640-51.
10. De Silva HD, Gardner LM, Drew AC, Beezhold DH, Rolland JM, O'Hehir RE. The hevein domain of the major latex-glove allergen Hev b 6.01 contains dominant T cell reactive sites. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:611-8.
11. Turjanmaa K, Rasanen L, Lehto M, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T. Basophil histamine release and lymphocyte proliferation tests in latex contact urticaria. In vitro tests in latex contact urticaria. *Allergy* 1989; 44(3):181-6.
12. Gascan H, Gauchat JF, Malefyt RW, Schneider P, Yssel H, de Vries JE. Regulation of human IgE synthesis. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:Suppl. 1:162-6.
13. Murali PS, Kelly KJ, Fink JN, Kurup VP. Investigations into the cellular immune responses in the latex allergy. *J Lab Clin Med* 1994; 124:638-43.
14. Ebo DG, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Latex-specific IgE, skin testing, and lymphocyte transformation to latex in latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:618-23.
15. Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Rihs HP, Kalbacher H, Liebers V, Baur X. Analysis of T-cell reactive regions and HLA-DR4 binding motifs on

- the latex allergen Hev b I (rubber elongation factor). *Clin Exp Allergy* 1998; 28:339-48.
16. Bohle B, Wagner B, Vollmann U, Buck D, Niggemann B, Szépfalusi Z, Fischer G, Scheiner O, Breiteneder H, Ebner C. Characterization of T Cell Responses to Hev b 3, an Allergen Associated with Latex Allergy in Spina Bifida Patients. *J Immunol* 2000; 164:4393-8.
  17. Johnson BD, Kurup VP, Sussman GL, Arif SA, Kelly KJ, Beezhold DH, Fink JN. Purified and Recombinant Latex Proteins Stimulate Peripheral Blood Lymphocytes of Latex Allergic Patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120:270-9.
  18. Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Brüning T, Rihs HP. Characterization of B- and T-cell responses and HLA-DR4 binding motifs of the latex allergen Hev b 6.01 (prohevein) and its post-transcriptionally formed proteins Hev b 6.02 and Hev b 6.03. *Allergy* 2004; 59:724-33.
  19. Drew AC, Eusebius NP, Kenins L, De Silva HD, Suphioglu C, Jennifer MR, O'Hehir RE. Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity. *J Immunol* 2004; 173:5872-9.
  20. Sussman GL, Beezhold DH, Kurup VP. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:S33-S39.
  21. Chen Z, Cremer R, Posch A, Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Baur X. On the allergenicity of the Hev b I among health care workers and patient with spina bifida allergic to natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(5):684-93.
  22. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Stephen R. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-34.