FRANCINELSON DUARTE LOURENÇO

**Perfil de ativação de basófilos e evidência de fatores
liberadores de histamina na Urticária Crônica
Idiopática**

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

Área de Concentração: Dermatologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lourenço, Francinelson Duarte

Perfil de ativação de basófilos e evidência de fatores liberadores de histamina na urticária crônica idiopática / Francinelson Duarte Lourenço. -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Urticária 2.Urticária crônica

idiopática/imunologia 3.Basófilos 4.CD203c 5.Testes

sorológicos 6.Histamina 7.Auto-anticorpos 8.Receptores

Dedicatória

**Dedico esse trabalho à minha
família e especialmente aos
meus pais Francisco Ramos
Lourenço e Neuza Duarte
Lourenço.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus, inteligência suprema, causa primaria de todas as coisas, pela oportunidade de crescimento, amadurecimento e aprendizado.

Aos meus pais, Francisco Ramos Lourenço e Neuza Duarte Lourenço por todo amor, apoio e formação que me deram.

À Prof. Dra. Maria Notomi Sato pela dedicação, compreensão, paciência e excelente orientação ao longo desses anos e pela oportunidade de ter desenvolvido esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte pela a oportunidade de ingressar no LIM 56.

Aos Profs. Drs. Evandro A. Rivitti, Celina Wakisaka Maruta e Érika Prearo do Ambulatório de Urticária do Departamento de Dermatologia de HC-FMUSP pela contribuição na realização desse trabalho.

A Profs. Drs. Miriam Nacagomi Soto e Valéria Aoki pelo grande incentivo e apoio durante a realização desse trabalho.

As minhas colegas do grupo Urticária, as “Urticats” Viviane Nojima, Mayce Azor, Juliana dos Santos, Eliana Futata e ao Chang Dong Kim, pelo companheirismo, amizade e imprescindível auxílio nos experimentos, relatórios e discussões de artigos.

Aos amigos do grupo Experimental Cyro Brito, Jeferson Russo, Ana Elisa, Célia Regina, Raquel Quedes, Paula Rigato, Adriana Goldoni, Elaine Cardoso, Bruno Pacola, Orlando Piubelli e Isabela Fernandes pela amizade, auxílio e todo o convívio ao longo desses anos.

A Noêmia Orii pela paciência e ensinamentos com o citômetro de fluxo que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

A minha comadre Soraya Ogusuku pela amizade e confiança e pelo seu eterno bom humor.

A todos os amigos do LIM 56 que conviveram comigo nesses últimos anos e de uma forma ou de outra contribuíram com a realização desse trabalho.

A CAPES, FAPESP e ao LIM-56 pelo auxílio técnico e financeiro.

A todos que trabalham no Laboratório, técnicos, secretaria, informática, almoxarifado, limpeza.

Aos doentes de Urticária Crônica Idiopática do ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, que voluntariamente dedicaram seu tempo e aceitaram participar desse estudo.

Normalização

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Receptores de alta afinidade para IgE e a molécula IgE.....	2
1.2 Mastócitos.....	8
1.3 Basófilos.....	9
1.4 Urticária Crônica Idiopática.....	12
2 OBJETIVOS.....	24
3 CASUÍSTICA.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Teste de soro autólogo.....	29
4.2 Análise do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) e marcadores de ativação (CD63, CD123 e CD203c) em basófilos de sangue periférico.....	29
4.3 Purificação de leucócitos por Dextran.....	30
4.4. Ensaio <i>in vitro</i> de ativação de basófilos induzido por anticorpo anti-IgE.....	31
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> de liberação de histamina mediado por soro.....	31
4.6. Dosagem de Histamina por ELISA.....	32
4.7 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS	
5.1 Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	35

5.2 Característica dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática submetidos ao teste de soro autólogo.....	36
5.3 Quantificação e análise da expressão do FcεRI em basófilos de pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	38
5.4 Expressão das moléculas CD203c, CD63 e CD123 em basófilos de sangue periférico de pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	45
5.5 Análise <i>in vitro</i> da expressão do marcador de ativação de basófilos CD203c após pré-incubação com IL-3 e estímulo com anticorpos anti-IgE.....	48
5.6 Análise <i>in vitro</i> da expressão de CD63 em basófilos após incubação com IL-3 e anticorpos anti-IgE.....	51
5.7 Análise <i>in vitro</i> da liberação de histamina de basófilos após estímulo com IL-3 e anticorpos anti-IgE.....	52
5.8 Ensaio <i>in vitro</i> de liberação de histamina por basófilos de doadores sadios com soros de pacientes com UCI.....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÕES.....	68
8 ANEXOS	
Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	71
Anexo B - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	75
Anexo C - Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática.....	76
Anexo D – Manuscrito publicado.....	78
9 REFERÊNCIAS.....	86

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
ASST	Teste intradérmico de soro autólogo (<i>Autologous serum skin test</i>)
APST	Teste intradérmico de plasma autólogo (<i>Autologous plasma skin test</i>)
CMN	Células mononucleares do sangue periférico
D.P	Desvio padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
et al.	E outros
FcεRI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NC	Não consta
Th	Células T auxiliares
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UCI	Urticária Crônica Idiopática
TPO	Tireoperoxidase
TG	Tireoglobulina
FAN	Fator anti-nuclear
MFI	Intensidade média de fluorescência

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μM	Micromolar
mL	Mililitro
n	Tamanho da amostra
ng	Nanograma
rpm	Rotações por minuto
$\pm$	Mais ou menos
Δ	Delta
$<$	Menor
$=$	Igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
UI	Unidade Internacional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência de autoanticorpos em pacientes com UC.....	14
Figura 2 - Marcadores de ativação de basófilos	22.
Figura 3 - Seleção de basófilos de sangue periférico por citometria de fluxo.....	39
Figura 4 - Quantificação de basófilos em sangue periférico dos pacientes com UCI.....	40
Figura 5 - Determinação dos níveis de histamina nos soros de pacientes com UCI.....	41
Figura 6 - Expressão da cadeia alfa do FcεRI em basófilos de pacientes com UCI.....	43
Figura 7 - Correlação entre a IgE sérica e a expressão de FcεRIα em basófilos de pacientes com UCI.....	44
Figura 8 - Análise de marcadores de ativação CD203c, CD63 e CD123 em basófilos no sangue periférico de pacientes com UCI.....	47
Figura 9 - Cinética da expressão de CD203c em basófilos incubados com a interleucina 3 (IL-3) após estímulo com anti-IgE.....	50
Figura 10 - Cinética da expressão de CD63 em basófilos incubados com IL-3 após estímulo com anti-IgE.....	51
Figura 11 - Liberação de histamina de basófilos de pacientes com UCI induzidos por IL-3 e anti-IgE.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Característica demográfica dos pacientes com Urticária	
Crônica Idiopática.....	35
Tabela 2 - Características individuais dos pacientes com	
Urticária Crônica Idiopática.....	76
Tabela 3 - Pacientes com Urticária Crônica Idiopática submetidos	
ao teste de soro autólogo.....	37
Tabela 4 - Liberação de histamina por basófilos de doadores sadios	
mediados por soros de pacientes com UCL.....	55
Tabela 5 - Relação do teste de soro autólogo e do fator <i>in vitro</i>	
liberador de histamina em pacientes com UCL.....	63

Resumo

Lourenço FD. Perfil de ativação de basófilos e evidência de fatores liberadores de histamina na Urticária Crônica Idiopática [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

INTRODUÇÃO: A Urticária Crônica é caracterizada pelo aparecimento de pápulas eritematosas, pruriginosas recorrentes e transitórias que duram por mais de seis semanas. Na maioria dos pacientes a causa é indeterminada, definida como idiopática (UCI), entretanto, um sub-grupo apresentam autoanticorpos contra a cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI), que são expressos na superfície de mastócitos e basófilos, tornando-os células alvo nesta doença. **OBJETIVOS:** Avaliar em pacientes com UCI, submetidos ao teste intradérmico de soro autólogo (ASST), o perfil de ativação dos basófilos, pela intensidade de expressão de marcadores de ativação/desgranulação e pela capacidade dos basófilos em responder aos estímulo com a IL-3 e anticorpo anti-IgE. Além disto, a presença de fator liberador de histamina foi avaliado nos soros dos pacientes. **METODOLOGIA:** Pacientes com UCI (n= 37) foram selecionados no Ambulatório de Urticária do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e submetidos ao ASST. O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis (n=38). A análise da expressão de FcεRI, CD63, CD123 e CD203c em basófilos de sangue periférico foi realizada por citometria de fluxo. No ensaio *in vitro* de estimulação dos basófilos com anti-IgE, as células foram previamente incubadas com IL-3. O ensaio de liberação de histamina mediada por soros de pacientes com UCI foi realizado com três diferentes doadores de leucócitos e a histamina liberada dosada por ELISA de competição. **RESULTADOS:** Há um baixo número de basófilos no sangue periférico nos pacientes com UCI, coincidente com o baixo nível sérico de histamina. Os escassos basófilos no sangue periférico mostram elevada expressão de FcεRI e uma regulação positiva da expressão de CD203c e CD63, independentemente do ASST. A análise funcional dos basófilos, mostra que somente a incubação com IL-3 recombinante já induz aumento significativo da expressão de CD203c e da liberação de histamina dos basófilos de pacientes com UCI, que são intensificados com o estímulo por anticorpos anti-IgE após 15 e 40 minutos em relação ao grupo controle. Já a expressão de CD63 em basófilos após estímulo com anti-IgE, aumentou somente nos basófilos de indivíduos saudáveis, uma vez que os níveis de expressão basal estavam previamente aumentados. A presença de autoanticorpos liberadores de histamina foi analisada nos soros de pacientes com UCI. Três experimentos independentes foram realizados, evidenciando a ocorrência de 17% de positividade. **CONCLUSÕES:** Os resultados mostram que na UCI, os basófilos são sensibilizados *in vivo*, por fatores além dos autoanticorpos anti-FcεRI e que funcionalmente, estão hiper-reativos a estímulos imunológicos. A presença de fatores séricos liberadores de histamina, independente do ASST, enfatiza que o teste intradérmico é sugestivo de autorreatividade e não de autoimunidade na UC.

Descritores: 1.URTICARIA CRONICA IDIOPÁTICA/imunologia 2. BASÓFILOS 3. CD203c 4. TESTE INTRADÉRMICO DE SORO AUTÓLOGO 5. HISTAMINA 6. AUTOANTICORPOS ANTI-RECEPTOR DE IgE.

Summary

Lourenço FD. Basophils activation profile and evidence of histamine release factor in Chronic Idiopathic Urticaria [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009.

INTRODUCTION: Chronic Urticaria is characterized by recurrent, transitory, pruritic and erythematous wheals present for at least six weeks. In most patients the cause is unknown, defined as idiopathic (CIU), however, a sub-group has autoantibodies against the alfa chain of the high affinity IgE receptor (FcεRIα) expressed on mast cells and basophils surface making it the target cells in this disease. **OBJECTIVES:** To evaluate in CIU patients, undergone autologous serum skin test (ASST), the activation profile of the basophils assessed by the expression of activation/degranulation markers and by the ability to release histamine in response to IL-3 priming and cross-linking with anti-IgE antibodies. Furthermore, the presence of histamine releasing factor in sera of patients was evaluated. **METHODS:** CIU patients (n = 37) were selected from the Dermatological Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) and submitted to the ASST. The control group consisted of healthy subjects (n=38). The analysis of the expression of FcεRI, CD63, CD123 and CD203c on basophils from peripheral blood was assessed by flow cytometry. For the *in vitro* stimulation with anti-IgE antibodies, the cells were previously primed with human recombinant IL-3. The histamine release assay mediated by sera from patients with CIU was performed with three different donors of leukocytes and released histamine measured by competition ELISA. **RESULTS:** There is a low number of basophils in peripheral blood of patients with CIU, reflecting a low serum levels of histamine. The scarce basophils in peripheral blood show high expression of FcεRI and an up-regulation of CD203c and CD63 marker expression, independently of the ASST. The functional analysis of basophils, revealed that recombinant IL-3 *per se* induces a significant increase in CD203c expression and the histamine release from basophils of patients with CIU, which are enhanced followed for 15 and 40 minutes of anti-IgE stimulation. The expression of CD63 in basophils upon anti-IgE stimulation, increased only in basophils of healthy individuals, since the baseline levels of CD63 expression on basophils of patients was already up-regulated. The presence of histamine release factors was examined in sera from CIU patients. Three independent experiments were performed, showing the occurrence of 17% of positivity. **CONCLUSION:** The results show that in CIU, the basophils are primed *in vivo* due to factor other than autoantibodies anti-FcεRI and they have an hyperactive status to the immunological stimuli. The presence of serum histamine releasing factors, independent of the ASST, emphasizes that the intradermal test is suggestive of autorreactivity and not for autoimmunity in UC.

Descritores: 1.CHRONIC IDIOPATHIC URTICARIA/immunology 2. BASOPHILS 3. CD203c 4. AUTOLOGOUS SERUM SKIN TEST 5. HISTAMINE 6. AUTOANTIBODY ANTI-IgE RECEPTOR.

1 Introdução

1.1 Receptores de alta afinidade para IgE e a molécula IgE

O receptor de alta afinidade para IgE, FcεRI, expresso em células inflamatórias como basófilos e mastócitos e a molécula IgE são elementos essenciais na resposta de hipersensibilidade tipo I. A ativação dessas células pode ser desencadeada não só pela ligação cruzada de antígenos multivalentes com as moléculas de IgE associadas ao FcεRI, mas também por autoanticorpo que reagem contra a IgE e/ou ao receptor FcεRI, culminando na liberação de mediadores e na geração de resposta inflamatória. Esses autoanticorpos podem estar associados à patogênese de algumas doenças, como ocorre na urticária crônica (UC).

A imunoglobulina IgE identificada em 1966 por Ishizaka et al. nos soros de pacientes alérgicos, possui um peso molecular de aproximadamente 190 kd e meia vida de 1 a 5 dias no sangue. A IgE não é transferida pela via placentária e também não ativa os componentes do sistema complemento pela via clássica. A concentração da IgE no soro de indivíduos normais é a menor dos cinco isotipos de imunoglobulinas (0-0,0001 g/L, constituindo 0,004% do total das imunoglobulinas séricas) e geralmente encontra-se associada aos seus receptores FcεRI. Os níveis de IgE sérica podem oscilar de acordo com a idade, predisposição genética, estado imunológico e freqüentemente são detectados em níveis elevados nas doenças alérgicas e infecções parasitárias.

A síntese de anticorpos IgE é dependente de linfócitos T CD4+ especialmente das citocinas secretadas pelo subtipo Th2. Os linfócitos T CD4+ são subdivididos em Th1 e Th2 de acordo com o padrão de secreção de citocinas

(Mosmann e Coffman, 1989). A diferenciação desses padrões é dependente de uma sequência de eventos intracelulares, onde a ativação celular leva à síntese de citocinas. Nessa sequência participam as proteínas que atuam como moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição celular (STAT). A IL-12 ativa a STAT 4 que é necessária para o desenvolvimento de células Th1 (Kaplan et al., 1998., Zhang et al., 2000), que são responsáveis pela secreção de citocinas como IL-2 e IFN- γ , as quais, favorecem a indução da imunidade mediada por células promovendo a produção de anticorpos IgG. A expressão de *T-bet* se correlaciona fortemente com a transcrição de IFN- γ e é regulada positivamente em respostas do padrão Th1. A indução de expressão de *T-bet* ativa a expressão de IFN- γ em linhagens celulares ou linfócito T ativados, e suprime a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para o padrão Th2, direcionando a resposta para Th1 (Szabo et al., 2000). O fator de transcrição de células Th2 é a GATA – 3 e a IL-4 ativa a STAT 6 que é essencial para a ativação de linfócitos de padrão Th2, os quais, secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associados com altas e persistentes respostas de anticorpos favorecendo a mudança de isótipos para IgG1 e IgE. Além disso, estas citocinas promovem a diferenciação e ativação de eosinófilos e linfócitos T que são células que amplificam a reação alérgica em uma fase tardia (Romagnani, 1992; Del Prete, 1992).

O subtipo de células T CD4⁺ descrito como células Th3 são potencialmente secretoras de TGF- β e IL-10 (Weiner, 1997), citocinas que controlam a proliferação, diferenciação e outras funções celulares. A partir de estudos em modelos animais e humanos foi mostrado que a citocina IL-9 está associado a asma e ativação contra infecção por nematóides. É uma citocina multifuncional secretada por vários tipos celulares, incluindo linfócitos T, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (Hultner et al.,

1990; Renauld, 1995). Recentemente uma nova sub-população denominada Th9, previamente associada com as Th2, que está envolvida na regulação da inflamação crônica alérgica (Soroosh e Doherty, 2009).

O subtipo celular Th17 é caracterizado pela produção de citocinas como IL-17A, IL-6, IL-22, IL-17F e CCL20, e expressa o fator de transcrição *orphan nuclear hormone receptor* (ROR γ t). Funcionalmente, as células TH17 contribuem para a defesa do hospedeiro contra bactérias extracelulares, mas também são importantes no desenvolvimento de doenças autoimune e estão começando a ser associadas com o desenvolvimento e patofisiologia de doenças alérgicas, como dermatite alérgica de contato, dermatite atópica e asma (Manel et al., 2008).

As citocinas também são capazes de exercer função regulatória, o IFN- γ é capaz de inibir a secreção das citocinas Th2 e por sua vez, a IL-10 inibe a produção de citocinas Th1, enquanto que o TGF- β e a IL-10 suprimem as ações das citocinas Th1 e Th2 (Mosmann e Moore, 1991).

A síntese de IgE requer sinais gerados pelas células Th2. O processo se inicia quando um alérgeno processado e apresentado pela célula dendrítica no contexto de moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) às células Th2, que rapidamente expressam o ligante de CD40 (CD40L) e secretam IL-4. Essa interação resulta no aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 (B7.1/B7.2) nas células B com receptores alérgeno-específico, que interage com o ligante CD28 expresso pelas células T. Esta interação regula positivamente a expressão do receptor para IL-4 em células B, dando início à transcrição do gene para a cadeia ϵ . Além disto, a interação das moléculas CD40-CD40L ativa a recombinação do DNA na região alvo de mudança de isótipos para

IgE, seguindo-se a secreção de anticorpos IgE alérgeno-específico (Oettgen e Gera, 2001).

Interações adicionais de moléculas co-estimulatórias como ICOS e seu ligante ICOSL, expressas nas células T e células B, respectivamente, desempenha um importante papel na mudança de classe de isótipos de imunoglobulina através da regulação via CD40-CD40L (Sharpe e Freeman, 2002). Em associação com as células Th2, a resposta IgE pode ser amplificada pelos basófilos e mastócitos, que também expressam a molécula CD40L e quando ativadas secretam IL-4 e IL-13 (Prussin e Metcalfe, 2003).

Há duas classes de FcεRs expressos em células do sistema imune: o receptor de alta afinidade para IgE, FcεRI, capaz de ligar-se com a IgE monomérica e o receptor de baixa afinidade para IgE, FcεRII ou CD23, que interage preferencialmente com complexos de IgE (Von Bubnoff et al., 2003).

O FcεRI possui duas isoformas, a forma tetramérica, composta por uma cadeia alfa, uma beta e duas gamas ($\alpha\beta\gamma_2$) e a forma trimérica composta por uma cadeia alfa e duas gamas ($\alpha\gamma_2$). Em humanos, a forma tetramérica do FcεRI ($\alpha\beta\gamma_2$) é expressa constitutivamente em células efectoras de anafilaxia (mastócitos e basófilos), enquanto que a forma trimérica de FcεRI ($\alpha\gamma_2$) é variavelmente expressa por células apresentadoras de antígenos (APCs) como monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, eosinófilos e plaquetas (Kinet, 1999). Os receptores FcεRI na forma trimérica desempenham integralmente sua função nessas células, apesar da cadeia β estar ausente (Von Bubnoff et al., 2003). A função do FcεRI nas APCs é internalizar o antígeno ligado à molécula de IgE, para que este possa ser processado e apresentado às células T.

Estudos recentes mostram de forma convincente que os basófilos podem funcionar como APCs profissionais e iniciar a diferenciação *in vitro* e *in vivo* de células Th2 (Wynn, 2009).

Presume-se que os eosinófilos e as plaquetas também expressem o complexo $\alpha\beta\gamma_2$ do Fc ϵ RI, embora a existência da cadeia β (FcR β) nessas células seja baseada apenas em dados de reação em cadeia de polimerase (Kinet, 1999). Ainda não está bem determinado se os mastócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas expressam apenas a isoforma $\alpha\beta\gamma_2$ ou uma proporção variável das duas isoformas.

A cadeia α do Fc ϵ RI é um membro da superfamília das imunoglobulinas com peso molecular de 45 kDa e possui alta afinidade de ligação ao domínio C ϵ 3 da molécula de IgE ($K_d=10^{-9}-10^{-10}$ M) (Turner e Kinet, 1999). A cadeia β possui quatro domínios transmembrânicos entre as cadeias citoplasmáticas amino e carboxiterminal, e é capaz de amplificar a função biológica do Fc ϵ RI, mas não é necessária para a expressão do receptor na superfície celular. O FcR β amplifica a ativação celular mediada através da subunidade FcR γ não apenas nos eventos iniciais de sinalização, mas também nas respostas tardias como na desgranulação celular e liberação de mediadores (Kinet, 1999).

Em camundongos, a IL-4 e a IL-10 podem desempenhar um papel na regulação da homeostase de mastócitos, estimulando e inibindo a expressão do Fc ϵ RI (Gillespie et al., 2004).

A cadeia γ é um homodímero de duas cadeias ligadas por pontes dissulfídicas, é responsável pela transdução do sinal inicial após interação do antígeno ou autoanticorpo com o receptor Fc ϵ RI na célula (Turner e Kinet, 1999).

A ativação de eosinófilos por receptores $\alpha\beta\gamma 2$ gera mecanismos de defesa contra infecções parasitárias, enquanto que os receptores $\alpha\beta\gamma 2$ em APC apresentam o complexo antígeno-IgE para as células T. Os anticorpos IgE também interagem com os receptores Fc ϵ RII, que está envolvido na apresentação de antígeno, citotoxicidade celular e regulação de síntese de IgE (Novak et al., 2001).

A ligação cruzada de antígenos multivalentes com duas moléculas de IgE adjacentes ligadas ao Fc ϵ RI de mastócitos e basófilos inicia a sinalização intracelular. Cada subunidade β e γ contém motivos ativadores baseados nos imunoreceptores de tirosina (ITAM) conservados em suas cadeias citoplasmáticas, cujas tirosinas são rapidamente fosforiladas após agregação dos Fc ϵ RI. Essa fosforilação é mediada por *Lyn*, que é constitutivamente associada com a subunidade β e ativada após a agregação, levando ao recrutamento e ativação da tirosina kinase Syk, que se liga à tirosina fosforilada γ das ITAMs através de seu domínio SH2 (Ott e Cambier, 2000). Essa interação resulta na mudança conformacional de Syk, seguida de sua ativação, autofosforilação e fosforilação de outras proteínas. A agregação do receptor catalisa a formação de fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), atraindo a fosfolipase C- γ (PLC- γ). Quando fosforilada, a PLC- γ hidrolisa o fosfatidil inositol bifosfato (PIP-2) formando dois mensageiros liberadores de Ca^{2+} , o inositol trifosfato (IP3) e o 1,2 diacilglicerol. O IP3 causa a liberação de Ca^{2+} no meio intracelular, que ativa outras enzimas estimulando pequenas GTPases (Siraganian, 2003). A ativação das células inflamatórias leva a liberação de histamina (desgranulação), fosforilação de fatores de transcrição que induzem a síntese de novas citocinas e quimiocinas e ativação de fosfolipase A2 citoplasmática (cPLA2) para liberação de ácido araquidônico e neuromediadores de terminações nervosas cutâneas.

1.2 Mastócitos

Os mediadores pré-formados estão estocados em grânulos de secreção de basófilos e mastócitos e são principalmente constituídos de histamina, proteases séricas (carboxipeptidase A) e proteoglicanos (heparina e condroitina sulfato E). A histamina tem efeito na musculatura lisa (contração), células endoteliais, terminações nervosas e secreção de mucosa. A heparina tem um efeito anticoagulante através da ligação com a antitrombina. Esta reação é refletida imediatamente na pele como eritema, edema e prurido; nas vias aéreas superiores como espirros, rinorréia e no trato gastrointestinal como náuseas, vômitos, diarreia e cólicas. Estes sintomas coincidem com a liberação de histamina e produção de prostaglandina D2 (PGD2) e leucotrieno C4 (LTC4).

Os principais mediadores lipídicos sintetizados por mastócitos incluem PGD2, principal produto da ciclooxigenase, e o LTC4 produto da lipooxigenase. O processamento peptidolítico extracelular de LTC4, produz os metabólitos ativos LTD4 e LTE4. Todos esses mediadores lipídicos são broncoconstritores, aumentam a permeabilidade vascular ou são quimiotáticos para neutrófilos.

As proteínas presentes nos grânulos de mastócitos são compostas por quatro proteases neutras: triptase, quimase, carboxipeptidase e catepsina G. Os mastócitos teciduais humanos são divididos em dois subtipos de acordo com o conteúdo de secreção de proteases, designado como MCt ou MCtc, de acordo com a presença de triptase seja com ou sem quimase. Célula MCtc contém triptase e quimase, bem como carboxipeptidase e catepsina G e são predominantes na pele e

na submucosa do intestino delgado, enquanto MCt contém apenas triptase e predominam nas vias aéreas normais e mucosa do intestino delgado (Schwartz, 2002). Os mastócitos são capazes de sintetizar diversos tipos de citocinas, entre elas o TNF- α parece exercer importante função inflamatória atuando no aumento da expressão de moléculas de adesão endoteliais e epiteliais. Os mastócitos também produzem outras citocinas como IL-4, IL-3, GM-CSF, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 e IL-16 (Prussin e Metcalfe, 2003).

1.3 Basófilos

Os basófilos compartilham muitas características em comum aos mastócitos como a expressão do Fc ϵ RI, marcação metacromática, produção de citocinas Th2 e liberação de histamina. Os basófilos representam menos que 1% dos leucócitos do sangue periférico, apresentam núcleo segmentado com cromatina altamente condensada e são comumente identificados por sua coloração metacromática com corantes como o azul de toluidina. Os basófilos desenvolvem-se a partir de células tronco pluripotentes CD34+, diferenciam com influência de IL-3, maturam na medula óssea e então circulam pela periferia (Kepley et al., 1998).

Os basófilos também produzem muitos mediadores similares aos mastócitos, como histamina, leucotrienos, IL-4 e IL-13, mas não sintetizam PGD-2 e IL-5. Entre os mediadores eicosanóides recém-sintetizados, os basófilos primeiramente geram LTC-4. Juntamente com a histamina, os basófilos possuem

outros mediadores pré-formados, como sulfato de condroitina, proteína básica principal e proteína cristal Charcot-Leyden (Schoeder et al., 2001).

Basófilos humanos expressam o receptor Toll-Like 2 (TLR2) e TLR4, a ativação pelo ligante de TLR2 leva a ativação de NFκB e também de citocinas (Sabroe, 2002; Biebuman, 2005). Os basófilos também expressam marcadores de superfície como o CD11, CD18, CD31, CDW32 (FcγRII), CD33, CD40, CD45, CD49d/CD29, CD54 e CD123, quando ativados expressam o CD63 e o CD203c (Erdmann et al., 2003).

Tem sido demonstrado que os basófilos após a ligação cruzada com anti-IgE secreta IL-25 (IL-17E), uma citocina da família IL-17 identificada recentemente, importante na inflamação alérgica. (Booki Mim, 2008; Wang et al., 2007). A injeção de IL-25 induz produção considerável de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e eosinofilia em fluido de lavagem broncocardiovascular e tecido estomacal (Tomachi et al., 2006).

Basófilos de indivíduos atópicos secretam mais IL-25 após ativação, indicando que os basófilos podem regular positivamente a ativação de células Th2 de memória uma vez que essas células expressam grande quantidade do receptor para IL-25 (Booki Mim, 2008; Wang et al., 2007).

Os basófilos têm um papel importante na regulação da resposta de linfócito B, influenciam a secreção de citocinas e também estimula a proliferação dessas células através da expressão de CD40L (Booki Min, 2008). Em humanos, através da via CD40L e secreção das citocinas IL-4, IL-6 e IL-13, os basófilos induzem o direcionamento para a resposta imune Th2 e a mudança de classe para a produção de IgE e IgG4 (Gauchat et al., 1993; Yanagihara et al., 1998). Recentemente, tem sido

relatado um importante papel dos basófilos na manutenção e regulação da resposta imune humoral, através da capacidade de captura de moléculas de imunoglobulina e resposta à ligação cruzada dessas imunoglobulinas de superfície (Mack et al., 2005).

Os basófilos têm sido relacionados com o desenvolvimento da UC, mas o papel dessas células na patogênese da doença ainda não é muito claro, mas sob condições de inflamação os basófilos podem ser recrutados para os sítios inflamatórios (Wedemeyer et al., 2000). Os basófilos humanos expressam altos níveis dos receptores de citocinas CCR3 e CCR2, e apresentam baixa expressão de CCR1 e CCR5 (Likura et al., 2001).

A ligação de várias moléculas de IgE nos receptores expressos em mastócitos, gera uma série de eventos de ativação que resultam na agregação do FcεRI, sinalização intracelular, aumento de sobrevivência, internalização do receptor e finalmente na liberação de mediadores e/ou citocinas (Kitaura et al., 2003).

Na ausência de um antígeno específico, a interação da IgE monomérica com o FcεRI, aumenta a expressão do receptor na superfície de mastócitos de camundongo por promover a secreção de uma variedade de citocinas que aumentam a sobrevivência da célula por um mecanismo autócrino (Yamaguchi et al., 1997; Kalesnikoff et al., 2001). Além dos antígenos multivalentes, autoanticorpos que reconheçam epítomos da cadeia α do FcεRI ou moléculas de IgE ligadas ao receptor ou o complexo IgG-IgE ligado ao FcεRI podem desencadear a desgranulação das células inflamatórias e a liberação de mediadores pró-inflamatórios e imunomoduladores (Marone et al., 1999).

1.4 Urticária Crônica Idiopática

A urticária é uma das afecções dermatológicas mais comuns que acomete a população, caracterizada pelo aparecimento de pápulas eritemato-edematosas, evanescentes, que cursam com ou sem angioedema. Estes sinais clínicos são acompanhados de prurido que piora à noite e costumam desaparecer em 24 horas. A urticária é classificada de acordo com a duração do quadro, considerada aguda quando os sintomas perduram menos que 6 semanas, crônica quando a duração dos sintomas é maior que 6 semanas e episódica quando a afecção acomete intermitentemente.

Outra forma de classificação da urticária é de acordo com a etiologia: alérgica; infecciosa; contato com substâncias tóxicas/irritantes; física (colinérgica, pressão, frio, calor); pseudoalérgica; psicossomática; vasculite (deposição de imunocomplexo); defeito enzimático e idiopática quando não é possível determinar a etiologia.

A urticária é gerada pela desgranulação cutânea de mastócitos e/ou basófilos que liberam potentes mediadores vasoativos que causam aumento da permeabilidade capilar de pequenas veias resultando na formação de pápulas (Ring et al., 1999). O prurido e dor são conseqüências da estimulação dos nervos sensoriais. A desgranulação das células inflamatórias é atribuída à causa imunológica (autoimune, IgE, imunocomplexo, complemento), não imunológica (pseudoalérgenos como medicamentos) ou idiopática (Hein, 2002).

A urticária crônica (UC) acomete aproximadamente 0,1% da população, é capaz de reduzir significativamente a qualidade de vida dos pacientes (O'donnell et al., 1997, Sabroe et al., 1999). Os casos mais graves de UC são de difícil tratamento, e a gravidade dos sintomas parece depender do grau de ativação das células inflamatórias, da liberação de histamina e da ativação do sistema complemento (Sabroe et al., 1999; Fiebiger et al., 1998).

Aproximadamente 70 a 80% dos casos de UC são considerados idiopáticos. Contudo, um grande avanço na compreensão da urticária crônica idiopática (UCI) foi a evidência de que 35 a 40% dos pacientes apresentam origem autoimune sendo, portanto, não estritamente idiopática. Rorsman, em 1962, baseado na baixa contagem de basófilos no sangue periférico de pacientes com UCI comparados ao grupo controle sugeriu que a manifestação clínica da urticária poderia estar relacionada aos autoanticorpos. Posteriormente, foi observado que autoanticorpos IgG ou IgM anti-IgE estão presentes em 5 a 10% dos soros de pacientes com urticária crônica, os quais, eram capazes de promover a liberação de histamina de basófilos (Gruber et al., 1988). Além dos autoanticorpos anti-IgE, verificou-se que 26% dos pacientes com UCI apresentam autoanticorpos IgG reativos contra a cadeia alfa do receptor FcεRI (**Figura 1**) (Greaves, 2003; Sabroe, 2006).

Figura 1 – Prevalência de autoanticorpos em 78 pacientes com UCI.

Acs: autoanticorpos

Fonte: Sabroe et al., 2002.

Os autoanticorpos anti-IgE são encontrados em pacientes com urticária crônica, dermatite atópica e doenças autoimunes como artrite reumatóide, vasculite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica (Marone et al., 1999).

As subclasses predominantes dos autoanticorpos IgG anti-IgE são IgG1 e IgG4. Os autoanticorpos IgG anti-IgE também são encontrados em soros de indivíduos saudáveis, podendo modular uma variedade de funções imune e inflamatória,

como inibir a ligação da IgE com o seu receptor de baixa afinidade, remover IgE ligada à superfície ou mesmo prevenir a associação da IgE com os FcεRI em mastócitos e basófilos, tornando-se evidente que os autoanticorpos anti-IgE são heterogêneos, tanto em função biológica quanto em constituição, provavelmente em decorrência das diferentes afinidades para IgE, especificidade e composição das subclasses. Os autoanticorpos anti-FcεRI também são detectados no soro de indivíduos normais, porém não são capazes de desgranular as células inflamatórias. São detectáveis em algumas patologias como lúpus sistêmico eritematoso, dermatomiosite e pênfigo vulgar, mas aparentemente, não induzem a liberação de histamina de basófilos e pertencem às subclasses IgG2 e IgG4. Na urticária crônica estes autoanticorpos pertencem às subclasses IgG1 e IgG3 e são capazes de causar a desgranulação de basófilos, estando envolvidos na patogênese da doença (Fiebiger et al., 1998).

Geralmente, a urticária não está associada com aumento do nível de IgE ou a quadros de atopia (Zuberbier, 2000). Além disto, os pacientes com UCI que apresentam autoanticorpos anti-FcεRI possuem níveis séricos mais baixos de IgE (Sabroe et al., 1999).

Sabroe et al. em 2002 classificaram subgrupos de pacientes com UCI baseados na bioatividade/reatividade do soro e gravidade da doença. Evidenciaram que pacientes com evidência de autoanticorpos IgG anti-FcεRI e anti-IgE, apresentavam quadro clínico mais grave de urticária do que aqueles que não apresentavam atividade sérica de liberação de histamina de basófilos.

Além disto, o número de basófilos está significativamente reduzido na UC, sendo que a basopenia é mais acentuada ou total no grupo de pacientes que

apresentam autoanticorpos com atividade sérica de liberação de histamina (Grattan et al., 1997).

O teste de injeção intradérmica de soro autólogo, obtido na vigência da crise de urticária de pacientes com UCI, é capaz de provocar a formação de pápulas salientando a origem autoimune da doença (Grattan et al., 1986). Esse teste cutâneo realizado com o soro autólogo, denominado teste intradérmico de soro autólogo ASST (*autologous intradermal serum test*) evidencia a presença de autoanticorpos anti-FcεRI e/ou anti-IgE através da desgranulação de mastócitos da pele e formação de pápulas e tem sido recomendado como teste de triagem nos casos suspeitos de UCI (Sabroe et al., 1999). A sensibilidade e especificidade do teste são de 65 a 81% e 71 a 78%, respectivamente (Greaves, 2003).

O ensaio de liberação de histamina é considerado como teste padrão ouro de laboratório para o diagnóstico e avaliação de UCI. Há uma correlação positiva dos pacientes com ASST positivo que apresentam o teste de liberação de histamina positivo, enquanto que não ocorre liberação de histamina em pacientes com ASST negativo (Niimi et al., 1996). O ASST pode causar alguns resultados falsos positivos provavelmente pela liberação excessiva de bradicinina na pele durante a injeção.

Recentemente, diversos estudos sobre UC têm chamado atenção para a cascata de coagulação e fibrinólise e o papel desses componentes na patogênese da doença. O soro autólogo de alguns pacientes com UC mantém a capacidade de induzir a formação de pápulas quando injetado intradermicamente mesmo após a depleção da IgG, sugerindo que os autoanticorpos contra o FcεRIα ou contra a molécula de IgE não sejam os únicos fatores circulantes ativadores de mastócitos envolvidos na patogênese da UC auto-imune (Asero et al., 2006). Comparações entre

as respostas do ASST e o teste intradérmico de plasma autólogo (APST) em pacientes com UCI, mostram que a proporção de pacientes que apresentam reatividade ao teste aumenta acima de 95% quando utiliza-se plasma autólogo com anticoagulante citrato de sódio, sugerindo que o processo de coagulação inative um fator plasmático que de alguma forma está envolvido na reação da pele (Asero et al., 2007).

Aproximadamente 25% dos soros ou da fração IgG de pacientes com UCI são capazes de induzir liberação de histamina de basófilos (Hide et al., 1993) ou de mastócitos cutâneos (Niimi et al., 1996). A existência de autoanticorpos anti-FcεRI foi demonstrada pela inibição da desgranulação destas células com a cadeia α recombinante do FcεRI. Além disso, a molécula IgE, mas não a fração FcεRIα recombinante é capaz de inibir a liberação de histamina em 5% dos pacientes, evidenciando a presença de autoanticorpos contra a molécula de IgE (Hide et al., 1993).

O ensaio de liberação de histamina apresenta a vantagem de avaliar a atividade funcional do autoanticorpo, apesar de ser uma técnica de difícil padronização, pois requer a separação de basófilos frescos de doadores saudáveis (Pachlounik et al., 2004). Contudo, este método tem sido realizado com leucócitos totais, facilitando a execução do ensaio biológico (Saini et al., 2000).

Outros métodos, como o *immunoblot* realizado com a fração IgG purificada de pacientes com UCI contra o FcεRIα (Fiebiger et al., 1995), não tem demonstrado correlação positiva com o ensaio de liberação de histamina (Kikuchi e Kaplan, 2001). O ensaio de ELISA contra a fração recombinante FcεRIα permite uma análise qualitativa e quantitativa de autoanticorpos IgG anti-FcεRI, possui baixa especificidade, considerando que também os autoanticorpos são detectados em outras

patologias como pênfigo vulgar (39%), dermatomiosite (36%) e lúpus eritematoso sistêmico (20%) (Fiebiger et al., 1998). Os títulos de autoanticorpos dessas patologias são similares aos detectados nos soros de pacientes com UCI, mas somente os autoanticorpos anti-FcεRI dos pacientes com UCI são capazes de induzir significativa liberação de histamina. Portanto, o teste funcional de liberação de histamina é considerado teste padrão para identificar autoanticorpos anti-FcεRI no soro de pacientes com UCI.

A gravidade dos sintomas dos pacientes com UCI parece depender do grau de ativação das células inflamatórias, da liberação de histamina (Sabroe et al., 1999), e da ativação do sistema complemento (Fiebiger et al., 1998). O bloqueio do receptor C5a em basófilos e a descomplementação são capazes de reduzir drasticamente a capacidade de liberação de histamina de soros de pacientes com UCI com autoanticorpos anti-FcεRI. A ativação de basófilos e mastócitos pelos autoanticorpos anti-FcεRI aumenta com a fixação de C5a (Kikuchi e Kaplan, 2001).

A UCI também tem sido relacionada com o aumento da incidência de tireopatia autoimune, aumento dos níveis de anticorpos antimicrosossomais tireoideanos (Leznoff, 1983; Leznoff, 1989) e função tireoideana alterada (O'donnel et al., 1995). Entretanto, não há nenhuma evidência de que o tratamento da disfunção tireoideana influencie na evolução da urticária, como ainda não se demonstrou que os autoanticorpos anti-tireoideanos sejam patogênicos na UC (Greaves, 2003).

O aumento crônico da produção de citocinas pró-inflamatórias, imunomodulatórias e da expressão de moléculas de adesão e de classe II do MHC pode favorecer o desenvolvimento do fenômeno autoimune nos pacientes com urticária (Kano et al., 1998, Haas et al., 1996; Hermes et al., 1999). Estudos *in situ*

das pápulas de pacientes com UCI evidenciaram um aumento da expressão de E-selectina e de ICAM-1, associado à elevados níveis de TNF- α , IL-4 e LTC₄ (Walsh et al., 1991) e de quimiocinas como RANTES e proteína inflamatória de macrófago α 1 (MIP- α) (Bressler, 1995). A IL-6 é detectada em elevados níveis nas lesões bolhosas da urticária provocada por pressão (Czarnetzki et al., 1989) ou nas lesões de urticária aguda (Fujii et al., 2001). Os níveis cutâneos de TNF- α e de IL-3 estão elevados em todos os tipos de urticária (Hermes et al., 1999).

As citocinas Th2, como a IL-4 e a IL-5 estão aumentadas nas lesões de pele de pacientes com UCI (Caproni et al., 2003), com discreto ou elevado nível de citocinas Th1, como o IFN- γ (Ying et al., 2002). Da mesma forma, um aumento dos níveis intracelulares de IL-4 e IFN- γ é detectado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com UC (Ferrer et al., 2002). Contudo, quando os pacientes com UC são discriminados com base na presença de autoanticorpos pelo teste ASST, observa-se um aumento da produção dos níveis de TNF- α e significativa diminuição de IFN- γ , MIP- α e RANTES nos pacientes com ASST positivo (Piconi et al., 2002). Confino-Cohen et al. 2004, evidenciaram que pacientes com UC, independente do teste ASST, apresentavam secreção reduzida de IL-4 e de citocinas Th1 como IFN- γ e IL-2.

As evidências sobre o perfil de produção de citocinas na UC, em pacientes com ou sem autoanticorpos anti-Fc ϵ RI, ainda não são conclusivas, indicando entre outras variações, um desequilíbrio na produção de citocinas. As alterações na produção de citocinas, sejam pró ou anti-inflamatórias, é um importante fator na instalação e desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e/ou autoimunes.

Nossos resultados prévios mostram que na UCI, há um aumento de citocinas

pró-inflamatórias no soro, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IL-6 na maioria dos pacientes (Dos Santos et al., 2008). Além disto, os dados de produção de citocinas, enfatizam a ocorrência de distúrbio imunológico na UCI, como aumento de produção de IL-17a e da produção e expressão de mRNA de IL-10.

Os marcadores de ativação de basófilos têm sido utilizados para avaliar o grau de ativação de basófilos na UC e nas doenças atópicas, através da técnica de citometria de fluxo. O marcador mais utilizado em estudos de ativação de basófilos é a molécula CD63, um membro da superfamília transmembrana-4, expresso por diferentes tipos celulares como basófilos, mastócitos, macrófagos e plaquetas. Em basófilos não ativados, o CD63 está ancorado nos grânulos intracitoplasmáticos e é fracamente expresso na membrana, em aproximadamente 5% dos basófilos, tanto de indivíduos normais ou atópicos (Ebo et al., 2004). A expressão de CD63 aumenta nos basófilos ativados após a fusão desses grânulos com a membrana citoplasmática, podendo ser utilizado como marcador de ativação e representativo da liberação de histamina (**Figura 2**) (Knol et al., 1991; Abuaf et al., 1999; Wedi et al., 2000). Por outro lado, o marcador CD203c, uma proteína transmembrânica tipo II, apresenta 100% de especificidade para basófilos e mastócitos (Boumiza et al., 2003). A expressão do CD203c é regulada positivamente em resposta à alérgenos específicos e a estímulos com anticorpos anti-IgE similarmente ao CD63. Para facilitar a identificação e a avaliação do grau de ativação dos basófilos, a IL-3, um fator de crescimento hematopoiético de 15 kD, tem sido utilizado nos ensaios (Ferrer et al., 2003).

A avaliação da expressão de CD63 em basófilos tem sido realizada para investigar a reatividade de indivíduos atópicos à alérgenos, tais como para látex,

drogas, veneno de abelha e alérgenos alimentares (Monneret et al., 1999; Erdmann et al., 2004). O teste de ativação de basófilo e avaliação da expressão de CD63 parece ser similarmente eficiente quanto ao ensaio de liberação de histamina, podendo complementar o diagnóstico de alergias juntamente com os resultados de dosagem de anticorpos IgE alérgeno-específicos e testes cutâneos. A análise da expressão de CD63 possui algumas desvantagens, por essa molécula ser expressa em outras populações de células sanguíneas além dos basófilos e também o anticorpo anti-IgE utilizado para a detecção de basófilos na citometria de fluxo o fato de poder influenciar no estado de ativação e interferir no resultado do teste. Entretanto, o marcador de ativação CD203c não parece ter essas desvantagens. Hauswirth et al. (2002) investigaram o efeito de cinco tipos diferentes de alérgenos recombinantes na expressão de CD203c em basófilos obtidos de indivíduos sensibilizados e evidenciaram que os alérgenos promovem regulação positiva do CD203c em células de indivíduos sensibilizados, mas não em células de indivíduos normais (**Figura 2**). Da mesma forma, a expressão de CD203c tem sido analisada na identificação de indivíduos sensibilizados para veneno de himenópteros (Kahlert et al., 2003).

Figura 2 – Marcadores de ativação de basófilos. Os marcadores de ativação CD63 e CD203c aumentam sua expressão após a ligação cruzada de duas moléculas de IgE ligadas ao receptor FcεRI.

Fonte: Adaptado de Boumiza et al., 2005.

Vários parâmetros na UCI, precisam de maiores informações para melhor compreensão da disfunção imunológica. O envolvimento da resposta imune inata e sua influência no desenvolvimento da resposta adaptativa, a capacidade de produção de citocinas, a atuação de mecanismos regulatórios podem contribuir para o estudo da imunopatogênese da UCI. Neste contexto, há poucas evidências descritas até o momento sobre a condição *ex vivo* das células alvo na UCI, como os basófilos e os mastócitos, e seu perfil funcional e de sinalização quando sensibilizadas à IL-3 e aos estímulos imunológicos. Considerando a dificuldade de purificar os mastócitos da pele, os basófilos de sangue periférico são parâmetros ideais de estudo sobre os aspectos moleculares e funcionais. A análise de marcadores de superfície de basófilos de sangue periférico, como as moléculas CD63 e CD203c, têm sido utilizadas como diagnóstico na resposta a alérgenos e drogas, entretanto, são moléculas que podem monitorar a atividade da UCI e da presença *in vivo* de fatores ativadores. Além disto, pela falta de modelos experimentais para evidenciar o quadro autoimune, são importantes os métodos laboratoriais que possibilitem a identificação dos fatores liberadores de histamina, que até o momento são realizados com o ASST e o ensaio de liberação de histamina com basófilos de indivíduos saudáveis. Entretanto, é possível que além dos autoanticorpos reativos à cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IgE, existam outros fatores capazes de induzir liberação de histamina, que ainda necessitem ser definidos.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Analisar fenotípica e funcionalmente os basófilos em sangue periférico de pacientes com Urticária Crônica idiopática (UCI) e avaliar *in vitro* a capacidade de liberação de histamina de soros de pacientes, utilizando leucócitos de indivíduos saudáveis.

Objetivos Específicos

Avaliar em pacientes com UCI sub-divididos de acordo com o teste de soro autólogo e grupo de indivíduos saudáveis os seguintes parâmetros:

- Perfil de ativação de basófilos de sangue periférico pela intensidade de expressão da cadeia alfa do receptor de alta afinidade de IgE (FcεRI) e de marcadores de ativação CD63, CD123 e CD203c e os níveis séricos de histamina,
- Efeito da IL-3 e estímulo com o anticorpo anti-IgE, na expressão de marcadores de CD63 e CD203c em basófilos e na liberação de histamina,
- Estabelecer *in vitro* o ensaio para avaliar fatores séricos liberadores de histamina de pacientes com UCI utilizando basófilos de indivíduos saudáveis.

3 Casuística

Pacientes com quadro de UCI foram selecionados com sintomas recorrentes acima de seis semanas de duração no Ambulatório de Urticária do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Foram incluídos 37 pacientes com UCI, sendo 34 mulheres e 5 homens, idade $48,89 \text{ anos} \pm 12,23$, com variação de 22 a 68 anos. Os pacientes foram submetidos ao termo de consentimento livre e esclarecido para posteriormente serem incluídos no estudo (**Anexo A**). Os doentes foram submetidos à exames laboratoriais gerais de acordo com a rotina de atendimento do Ambulatório. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (CAPPesp n° 739/04) (**Anexo B**).

O grupo controle foi composto por 38 indivíduos sadios, sendo 31 mulheres e 7 homens, idade de $43 \text{ anos} \pm 9,3$, com variação de 21 a 65 anos, sem história de urticária crônica.

Critérios de exclusão

Pacientes com evidência clínica de urticária-vasculite e urticária física, constituíram critérios de exclusão. O uso de anti-histamínicos foi suspenso por pelo menos 48 horas antes da coleta da amostra para a realização do teste ASST. Nenhum paciente fazia uso de medicação imunossupressora.

4 Materiais e Métodos

4.1 Teste de soro autólogo

Sangue periférico foi coletado em tubo sem anticoagulante e após 30 minutos da retração do coágulo, o soro foi obtido por centrifugação. Parte do soro foi utilizado para a realização do teste ASST e o restante congelado a -70°C. O teste intradérmico foi realizado no antebraço dos pacientes, e considerado positivo quando o diâmetro foi maior que 1,5 mm comparado ao controle negativo (solução salina). A leitura foi realizada após 30 minutos com a utilização de um paquímetro.

4.2 Análise do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) e marcadores de ativação (CD63, CD123 e CD203c) em basófilos de sangue periférico

Para a avaliação de marcadores em basófilos por citometria de fluxo, 100 µl de sangue periférico coletado com EDTA foram incubados por 30 min a 4° C com anticorpo monoclonal anti-cadeia alfa humana FcεRI conjugada a ficoeritrina (PE, anticorpo monoclonal AER-37, CRA1, que não bloqueia a IgE (eBioscience San Diego, CA, EUA) e anti-IgE conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Caltag, CA, EUA). Para avaliar o marcador de ativação de basófilos, além da anti-IgE, foram utilizados os anticorpos anti-CD63 conjugado com PE (Immunotech Marseille, França), anti-CD123 conjugado com ficoeritrina (PC-5) (BD Pharmingen San Jose, CA, EUA), anti-CD203c PE (Immunotech), utilizando seus respectivos controles isotípicos. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo Coulter- Epics XL (Coulter, Miami, Florida).

Para selecionar a população de basófilos primeiramente foi definida uma região baseada no tamanho e granulosidade (FSC x SSC) pela marcação com anticorpo anti-IgE e de um histograma bi-paramétrico caracterizado por alta expressão de células positivas ($\log 10^2 - 10^3$). A avaliação da expressão do receptor de IgE, CD63, CD123 e CD203c foi realizada com cerca de 500 basófilos. Os eritrócitos foram lisados utilizando a plataforma Q-prep, e posteriormente tratados com solução de ácido fórmico, seguido pela adição de salina a 1,8%.

A população de basófilos na marcação para CD203c foi definida em um histograma de granulosidade e células CD203c positivas, e a avaliação foi realizada no mínimo com 80.000 eventos totais.

4.3 Purificação de leucócitos por Dextran

Em um volume de 4 mL de sangue periférico coletado em EDTA foi acrescentado 1,2 mL de solução de NaCl 0.15 M contendo 6% de dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 6% de glicose (Sigma). A suspensão celular foi sedimentada por 40 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido, lavado por duas vezes em tampão PBS/ 0,3% soro albumina bovina (SAB) (Calbiochem, CA, USA), Hepes 10mM, pH 7.4. As células foram colocadas em tampão PBS-SAB contendo 2mM CaCl_2 e 1mM MgCl_2 . As células foram quantificadas e a viabilidade foi avaliada com corante vital azul de tripan.

4.4. Ensaio *in vitro* de ativação de basófilos induzido por anticorpo anti-IgE

A capacidade funcional dos basófilos foi avaliada pela liberação de histamina em resposta a anticorpos anti-IgE e pela expressão de marcadores de ativação de basófilos. Para isso, 100 µl de sangue periférico foi incubado com IL-3 recombinante humana (4 ng/mL, Pharmingen, San Diego, CA, EUA) por 10 minutos à 37°C, e posteriormente incubadas na presença ou não de anticorpo de cabra anti-IgE humano na concentração de 12,5 µg/mL (Calbiochem, CA, EUA) em solução de PBS/ 0,3% SAB com 2µM de CaCl₂ e 1µM de MgCl₂ por 15 ou 40 minutos. A reação foi neutralizada com 100 µl de EDTA 20µM em tampão PBS/SAB a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi coletado e estocado a -70° C, até o momento da utilização. A determinação de histamina foi analisada por ELISA reversa e os basófilos foram avaliados quanto à expressão de marcadores por citometria de fluxo.

4.5 Ensaio *in vitro* de liberação de histamina mediado por soro

O ensaio *in vitro* de liberação de histamina induzida por soro de pacientes com UCI foi procedido de acordo com o descrito por Luquin et al., 2005 e Asero et al., 2004. Os leucócitos de doadores saudáveis utilizados no ensaio foram obtidos a partir de 40 mL de sangue periférico coletado em EDTA. Resumidamente, os leucócitos foram enriquecidos a partir da precipitação com solução de dextran a 6% e a concentração foi ajustada para 20x10⁶ células/mL. Posteriormente, 50 µL de soros de controles e pacientes foram incubados com 50 µL da suspensão de leucócitos diluídos em solução de PBS-SAB com 2mM CaCl₂ e 1mM MgCl₂, em microplaca

de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, EUA) por um período de 40 minutos a 37° C. Como controle negativo da reação, a suspensão de leucócitos foi incubada com 50 µL de PBS-SAB e como controle positivo foi utilizado 50 µL de solução contendo anti-IgE humana na concentração de 12,5 µL/mL. A liberação total do conteúdo de histamina presente nos grânulos dos basófilos do doador foi obtida através da fervura de uma amostra com 50 µL da suspensão de leucócitos por um período de 5 minutos, centrifugado e o sobrenadante utilizado. Após o período de incubação das amostras, a reação foi neutralizada com 25 µL de solução de 20 mM/mL de EDTA a 4°C e em seguida a placa foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, foi coletado uma amostra de 60 µL do sobrenadante e estocado a -20°C até o momento da dosagem de histamina por ELISA. Os resultados foram expressos como % de liberação de histamina: $(\text{nível de histamina da amostra} - \text{basal} / \text{total} - \text{basal}) \times 100$. O cutoff de cada ensaio foi definido como a média da liberação de histamina obtida com os soros de indivíduos sadios + 2 desvio padrão.

4.6. Dosagem de Histamina por ELISA

A dosagem de histamina dos soros de pacientes e controles e dos sobrenadantes de células de pacientes estimuladas com anti-IgE, foi realizada por método imunoenzimático (ELISA) de competição seguindo as instruções do fabricante (IBL, Immuno-Biological Lab, Flughafenstrasse, Hamburgo). Inicialmente, as amostras dos sobrenadantes, controle e da curva padrão foram tratadas para acilação da histamina para N-acylhistamina. Para tal, em 50 µL da amostra, foi acrescentado 50 µL de tampão indicador e 10 µL do reagente de

acilação e incubados por 30 min à temperatura ambiente, em seguida, 2mL de tampão de diluição foi acrescentado por amostra. Posteriormente, os orifícios da microplaca previamente sensibilizados com anticorpo de cabra anti-coelho foram incubados com 50 µL das amostras aciladas por 3 horas à temperatura ambiente em um agitador orbital. A microplaca foi lavada por quatro vezes em tampão de lavagem, 100 µl de tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado. A seguir, a microplaca foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente em um agitador orbital. A reação foi neutralizada pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M) e logo após, a leitura foi realizada em leitor de microplaca de Elisa (Molecular Devices, CA, EUA) em 450nm. O limite de detecção do ensaio foi de 0,1 ng/mL.

4.7. Análise estatística:

A comparação entre dois grupos foi realizada utilizando o teste estatístico não paramétrico, *Man-Whitney*. O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's foi utilizado para comparar dados de três grupos. O nível de significância foi considerado quando $P \leq 0,05$.

5 Resultados

5.1 Características demográficas dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Para o estudo foram selecionados 37 pacientes com UCI do Ambulatório de Dermatologia HC-FMUSP (Tabela 1). A distribuição dos pacientes por sexo, foi predominante de mulheres (33) em relação aos homens (4), com idade média de 48,89 anos $\pm$ 12,23. A duração das lesões dos pacientes foi de 11,10 anos $\pm$ 12,37. As características individuais dos pacientes com UCI encontram-se na Tabela 2 (Anexo C).

Tabela 1. Característica demográfica dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Nº Pacientes	37
Mulheres/Homens	33/4
Idade (variação)	48,89 anos $\pm$ 12,23* (22-68 anos)
Duração da doença	11,10 $\pm$ 12,37 anos *

* média $\pm$ D.P.

5.2 Característica dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática submetidos ao teste de soro autólogo

Os pacientes com UCI foram submetidos ao teste ASST para detecção de autoanticorpos reativos ao receptor de alta afinidade para IgE como descrito por Sabroe RA et al., 1999. O resultado obtido está descrito na Tabela 3.

O teste de soro autólogo apresentou resultado positivo em 17 (47,4% ASST+) pacientes e a distribuição de sexo foi semelhante para o grupo ASST+ e ASST-. Da mesma forma, a duração das lesões características da UC foram semelhantes independentes do ASST. A ocorrência de angioedema foi verificada em percentagem similar nos pacientes de acordo com o ASST.

A presença de fator anti-nuclear (FAN) e autoanticorpos anti-tireoglobulina (anti-TG) e anti-tiroperoxidase (anti-TPO) foi avaliada como exame de rotina nos pacientes com UCI (Tabela 2). Uma elevada frequência de FAN foi detectada nos pacientes, atingindo 41,75% (7/35) dos pacientes com UCI, correspondendo a 31,25% de ASST+. Quanto aos autoanticorpos anti-TPO foi evidenciado em similar frequência nos sub-grupos de pacientes, 11,8% para os ASST+ e 11,11% para os ASST- e para os autoanticorpos anti-TG foram detectáveis em 11,8% ASST+ e 5,55% ASST-. Os resultados mostram que os pacientes com UCI exibem alta frequência de FAN e autoanticorpos tireoidianos.

Tabela 3. Pacientes com Urticária Crônica Idiopática submetidos ao teste de soro autólogo

	ASST+	ASST-
Nº Pacientes	17 46%	20 54%
Mulheres/homens	15/02	18/02
Duração da doença*	8,53 ± 8,97 anos	13,5 ± 14,77 anos
Angioedema	10/16-62,5%	11/16-68,75%
FAN	5/16- 31,25%	2/19- 10,5%
anti-TPO	2/17- 11,8%	2/18- 11,11%
anti-TG	2/17- 11,8%	1/18-5,55%

* média ± D.P.

5.3 Quantificação e análise da expressão do FcεRI em basófilos de pacientes com Urticária Crônica Idiopática.

O número de basófilos no sangue periférico foi quantificado e avaliado quanto a intensidade de expressão do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) nos pacientes com UCI e grupo controle por citometria de fluxo. A quantidade de basófilos em sangue periférico foi definido como a população de células entre a região de linfócitos e monócitos, como pode se observar no histograma composto por tamanho e granulosidade das células (**Figura 3**). Dessa forma, foi delimitada uma região entre os linfócitos e monócitos e à partir disto, as células foram selecionadas quanto à alta intensidade de marcação com o anticorpo anti-IgE humano marcado com FITC e consideradas como basófilos (**Figura 3**). Para obter o número absoluto de basófilos circulantes no sangue periférico, o percentual de basófilos foi multiplicado pelo número de leucócitos do sangue periférico obtido. Os resultados relativos aos basófilos na UCI foram publicados e encontra-se na seção **Anexo D**.

Figura 3. Seleção de basófilos de sangue periférico por citometria de fluxo. (a) Região entre linfócitos e monócitos onde estão localizados os basófilos. (b) Basófilos marcados com anticorpo anti-IgE humano conjugado com FITC.

A **Figura 4** mostra que o número absoluto de basófilos no sangue periférico dos pacientes com UCI (média $\pm$ desvio padrão: $19,68 \pm 13,72 \text{ mm}^3$) é significativamente menor em relação ao grupo controle ($43,06 \pm 18,67 \text{ mm}^3$). A basopenia foi observada em pacientes, ASST+ ou ASST-.

A histamina é um dos principais mediadores liberados pelos basófilos. E para averiguarmos se a diminuição numérica dos basófilos na circulação coincide com os níveis séricos de histamina nos pacientes com UCI, foi realizada uma dosagem deste fator. A **Figura 5** mostra que há uma importante diminuição dos níveis de histamina nos soros dos pacientes com UCI, independente do ASST, coincidente com a queda numérica de basófilos.

Figura 4. Quantificação de basófilos em sangue periférico dos pacientes com UCI. Os basófilos do sangue periférico do grupo controle (n= 21) e de pacientes com UCI (n=23) foram quantificados por citometria de fluxo. Os pacientes foram classificados de acordo com o teste de soro autólogo, em negativos (ASST-, n=13) e positivos (ASST+, n=10). O traço horizontal representa a mediana dos valores. *** $P \leq 0.001$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 5. Determinação dos níveis de histamina nos soros de pacientes com UCI. Os níveis séricos de histamina do grupo controle (n= 42) e pacientes com UCI (n=33) foram avaliados por ELISA de competição. Os pacientes foram classificados de acordo com o teste de soro autólogo, em pacientes negativos (ASST-, n=14) e positivos (ASST+, n=19). O traço horizontal representa a mediana dos valores. * $P \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle.

Prosseguindo a avaliação dos basófilos, foi analisada a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão da cadeia alfa do receptor FcεRI. A **Figura 6** mostra que os basófilos dos pacientes com UCI, independente de ASST, apresentam uma expressão significativamente maior do FcεRI comparados com basófilos do grupo controle.

Como a molécula IgE pode modular o receptor de alta afinidade nas células, avaliamos a correlação entre os níveis séricos de IgE. A **Figura 7** mostra uma correlação positiva ($r=0,567$, $p=0,011$) entre os valores de IgE e os valores de MFI da expressão do FcεRI em basófilos. Nos indivíduos saudáveis não foi avaliado o nível de IgE sérica, portanto não foi determinado se há correlação com o número de basófilos no sangue periférico.

Os resultados mostram que a ocorrência de basopenia nos pacientes com UCI, é coincidente com os baixos níveis séricos de histamina, e que os basófilos mostram elevada expressão de FcεRI, achados independentes do ASST.

Figura 6. Expressão da cadeia alfa do FcεRI em basófilos de pacientes com Urticária Crônica Idiopática. As células foram marcadas com anticorpo anti-IgE FITC e anti-FcεRIα PE e analisadas por citometria de fluxo quanto a intensidade média de fluorescência (MFI) do FcεRIα de indivíduos controles (n= 21) e pacientes com UCI ASST- (n= 7) e ASST+ (n=12). O traço horizontal representa a mediana dos valores. ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ comparado com o grupo controle.

Figura 7. Correlação entre a IgE sérica e a expressão de FcεRIα em basófilos de pacientes com Urticária Crônica Idiopática. A análise foi realizada entre os níveis de IgE total (UI/mL) e a intensidade média de fluorescência (MFI) do FcεRIα de basófilos de pacientes com UCI.

5.4 Expressão das moléculas CD203c, CD63 e CD123 em basófilos de sangue periférico de pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Como foi verificado uma elevada expressão de FcεRI nos basófilos de pacientes com UCI, passamos a investigar o grau de ativação dos basófilos, pela expressão de marcadores de superfície relacionados com ativação/desgranulação. Marcadores como o CD203c, molécula glicosilada tipo II transmembrana, o CD63, glicoproteína de membrana lisossomal e o CD123, cadeia α do receptor de IL-3 foram avaliados na superfície de basófilos por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em intensidade média de fluorescência (MFI).

A **Figura 8** mostra que os basófilos de pacientes com UCI possuem um aumento significativo da expressão de CD203c (média ± desvio padrão: MFI 57,48 ± 23,82) comparado com o grupo controle (22,8 ± 14,51). O aumento da expressão de CD203c foi observado em níveis similares nos pacientes ASST+ e ASST- quando comparado ao grupo controle.

Além disto, há aumento de expressão da molécula CD63 nos basófilos de pacientes com UCI (24,37 ± 19,34) em relação ao grupo controle (14,60 ± 11,63). Apesar do aumento da expressão do CD63 ter sido observado em ambos os sub-grupos ASST+ e ASST-, foi significativamente mais acentuado nos basófilos de pacientes ASST+ (**Figura 8**).

Já a intensidade de expressão do CD123 foi similar entre o grupo paciente e controle, mas significativamente aumentada nos pacientes ASST+ comparados com o grupo ASST- (**Figura 8**).

Os resultados mostram que apesar de haver poucos basófilos circulantes no sangue periférico de pacientes com UCI, essas células possuem intensa expressão de marcadores de ativação na superfície, CD203c e CD63.

Figura 8. Análise de marcadores de ativação CD203c, CD63 e CD123 em basófilos no sangue periférico de pacientes com UCI. As amostras de sangue periférico foram marcadas com anti-IgE FITC para seleção dos basófilos e com os anticorpos anti-CD203c, CD63 ou CD123 e analisadas por citometria de fluxo. (a) Intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão do marcador CD203c; (b) MFI do marcador CD63; (c) MFI do marcador CD123. O traço horizontal representa a mediana dos valores. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ quando comparado ao grupo controle, # $P \leq 0.05$ quando comparado com ASST-.

5.5 Análise *in vitro* da expressão do marcador de ativação de basófilos CD203c após pré-incubação com IL-3 e estímulo com anticorpos anti-IgE

É relatado na literatura que basófilos de sangue periférico de pacientes com UCI são hiporrespondedores à estímulos imunológicos, como anticorpo anti-IgE (Sabroe RA *et al.*, 1998; Greaves MW *et al.*, 2003). Além disto, a IL-3 é capaz de favorecer a liberação de histamina de basófilos que não desgranulam em resposta a anti-IgE tornando-os em desgranuladores (Ferrer M *et al.*, 2003). Dessa forma, investigamos o efeito da sensibilização com rIL-3 na resposta ao estímulo com anticorpo anti-IgE, um potente indutor na ativação e desgranulação de basófilos, pela expressão de CD203c e CD63 e capacidade de liberação de histamina.

Para avaliarmos a capacidade de ativação dos basófilos de pacientes com UCI e indivíduos controle, foi realizado ensaio *in vitro* com células de sangue periférico pré-incubadas com IL-3 recombinante humana por 10 minutos à 37°C, e posteriormente incubadas com anti-IgE por 15 e 40 minutos. Os basófilos foram avaliados quanto à expressão dos marcadores CD63 e CD203c por citometria de fluxo e expressos como MFI e Δ MFI, ou seja, a diferença de MFI do marcador das células estimuladas com anticorpo anti-IgE com o MFI das células não estimuladas (MFI da expressão basal).

A sensibilização apenas com IL-3 na ausência de anti-IgE, já induziu um aumento significativo da expressão de CD203c nos basófilos de pacientes com UCI, após 15 minutos (Figura 7a). Efeito similar, porém de maior intensidade da expressão de CD203c foi observado após o estímulo com anti-IgE, onde ocorreu aumento nos basófilos de pacientes com UCI.

Uma vez que foi verificado um aumento constitutivo da expressão de CD203c nos basófilos de pacientes com UCI (**Figura 9a**), também foi avaliado o Δ MFI, após estímulo com anti-IgE. Um aumento da expressão de CD203c em basófilos de pacientes com UCI foi verificado mesmo com a subtração do MFI das células estimuladas pelo MFI da expressão basal em relação ao controle (figura 7b).

Verificou-se que o estímulo com anti-IgE de 15min para 40 min, induz aumento da expressão de superfície do CD203c apenas nos basófilos do grupo controle, considerando que os basófilos de pacientes com UCI já mostravam aumento constitutivo (**Figura 9a e Figura 9b**).

As Figuras **9c** e **9d** ilustram um histograma representativo da expressão de CD203c em basófilos de um indivíduo controle e paciente, respectivamente, após estímulo com anti-IgE.

Figura 9. Cinética da expressão de CD203c em basófilos incubados com a interleucina 3 (IL-3) após estímulo com anti-IgE. Células de sangue periférico foram incubadas com IL-3, seguido de anticorpos anti-IgE humano por 15 e 40 minutos. (a) as células foram analisadas por citometria de fluxo pela intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão do CD203c em basófilos de indivíduos controles (símbolo aberto) e pacientes com UCI (símbolo fechado), e (b) Δ MFI (diferença de expressão entre MFI de células estimuladas com anti-IgE em relação ao MFI basal) da expressão do CD203c. Histograma representativo da expressão do CD203c de (c) indivíduo controle e (d) paciente com UCI após 15 minutos sem estímulo (área branca) e com anti-IgE (área preenchida). ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ quando comparado ao grupo controle

5.6 Análise *in vitro* da expressão de CD63 em basófilos após incubação com IL-3 e anticorpos anti-IgE

A análise da expressão da molécula CD63 na superfície dos basófilos mostrou um perfil semelhante entre pacientes com UCI e grupo controle, sendo que apenas alguns indivíduos mostraram um aumento de expressão do CD63 após estímulo (**Figura 10a**). Similarmente ao observado com a molécula CD203c, o aumento do Δ MFI do CD63 após estímulo com anti-IgE, foi observado apenas em basófilos de indivíduos do grupo controle (**Figura 10b**).

Figura 10. Cinética da expressão de CD63 em basófilos incubados com IL-3 após estímulo com anti-IgE. Células de sangue periférico foram incubadas com IL-3, seguido de anticorpos anti-IgE humano por 15 e 40 minutos (a) células foram analisadas em citometria de fluxo pela intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão do CD63 em basófilos de indivíduos controles (símbolo aberto) e pacientes com UCI (símbolo fechado) e (b) Δ MFI (diferença de expressão entre MFI de células estimuladas com anti-IgE em relação ao MFI basal) da expressão do CD63. *** $P \leq 0.001$ quando comparado ao grupo controle

5.7 Análise *in vitro* da liberação de histamina de basófilos após estímulo com IL-3 e anticorpos anti-IgE.

Como foi observado que a IL-3 na resposta anti-IgE potencializa a expressão de marcadores de desgranulação de basófilos, como CD203c e CD63, passamos a averiguar o efeito da IL-3 na liberação de histamina de basófilos após estímulo com anticorpos anti-IgE (15 e 40 minutos).

Somente a presença de IL-3, sem estímulo com anti-IgE, já induz aumento da liberação de histamina em basófilos de pacientes com UCI (**Figura 11a**). Esse aumento nos pacientes foi amplificado após 15 minutos de estímulo com anti-IgE, quando comparado com a liberação de histamina de basófilos de indivíduos controles (**Figura 9b**). É interessante notar que 75% dos pacientes com UCI que obtiveram liberação de histamina acima do valor da mediana da histamina liberada (41,67 ng/mL) é constituído por indivíduos com ASST positivo.

Após 40 minutos, as células de pacientes com UCI, apenas na presença de IL-3, mantiveram os níveis elevados de liberação de histamina, no entanto, após o estímulo com anti-IgE, o nível de liberação de histamina foi similar entre os basófilos de indivíduos controles e pacientes com UCI (**Figura 11c**).

Esses resultados indicam que a IL-3 induz a regulação positiva da expressão de CD203c na superfície dos basófilos de pacientes com UCI, como também potencializa a liberação de histamina.

Figura 11. Liberação de histamina de basófilos de pacientes com UCI induzidos por IL-3 e anti-IgE. Células de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis (símbolo aberto) e pacientes com UCI (símbolo fechado), foram incubados com IL-3 antes da estimulação com anticorpos anti IgE por 15 e 40 minutos. (a) incubação sem anti-IgE, (b) 15 minutos de estímulo com anti-IgE e (c) 40 minutos de estímulo. Os sobrenadantes foram analisados por ELISA de competição para medir a quantidade de histamina liberada. A linha horizontal representa a mediana.* $P \leq 0.05$ quando comparado com o grupo controle.

5.8 Ensaio *in vitro* de liberação de histamina por basófilos de doadores sadios com soros de pacientes com UCI

O ensaio de liberação de histamina por soro de paciente com UCI tem sido aceito como o teste mais adequado para detecção de autoanticorpos anti-FcεRI no soro de pacientes com UCI (Hide et al., 1993; Greaves e Tan, 2007).

Para avaliar a presença dos autoanticorpos anti-FcεRI nos pacientes com UCI foram realizados três experimentos individuais de liberação de histamina de basófilos de indivíduos sadios com soros de pacientes com UCI e soros de indivíduos saudáveis (**Tabela 4**). O cutoff da reação foi definido pela média + 2 SD da liberação de histamina de soros de indivíduos saudáveis.

No primeiro experimento, foram testados 41 soros de pacientes com UCI, dos quais 24 soros eram ASST+ (58,54%) e 17 eram ASST- (41,46%). Do total analisado, apenas sete (17,1%) apresentaram atividade liberadora de histamina, sendo seis destes pertencentes ao grupo ASST+ e um ao grupo ASST-.

O segundo experimento, também realizado com um total de 41 soros de pacientes com UCI, onde 20 soros eram ASST+ (48,78%) e 21 eram ASST- (51,21%). Do total analisado, apenas sete (17,1%) demonstraram atividade liberadora de histamina, sendo três soros pertencentes ao grupo ASST+ e quatro soros do grupo ASST-.

O terceiro experimento foi realizado com 38 soros de pacientes com UCI, dos quais 21 soros eram ASST+ (55,3%) e 17 eram ASST- (44,74%). Do total analisado, 10 (26,3%) apresentaram atividade liberadora de histamina, sendo seis desses soros pertencentes ao grupo ASST+ e quatro ao grupo ASST-.

Entre os sete a dez soros de pacientes com UCI que apresentaram atividade liberadora de histamina, seis foram comuns em pelo menos dois experimentos, dessa forma, a concordância entre os resultados positivos foi de 71,43% (**Tabela 4**). Os resultados mostram que não há relação entre a positividade do ASST e o teste *in vitro* de liberação de histamina. Entretanto, nos experimentos de desgranulação os soros de pacientes avaliados (38-41) houve 17 a 26,3% de soros com presença de fator liberador de histamina com alta concordância entre os testes.

Tabela 4 - Liberação de histamina por basófilos de doadores sadios mediados por soros de pacientes com UCI

Expto*	Nº soros UCI	ASST+ %	ASST- %	HR+ %	ASST+ HR+ %	ASST+ HR- %	ASST- HR+ %	ASST- HR- %
1	41	58,54 (24)	41,46 (17)	17,1 (7)	25 (6)	75 (18)	5,9 (1)	94,1 (16)
2	41	48,78 (20)	51,21 (21)	17,1 (7)	15 (3)	85 (17)	19 (4)	81 (17)
3	38	55,3 (21)	44,74 (17)	26,3 (10)	28,6 (6)	71,4 (15)	23,5 (4)	76,5 (13)

*Experimentos de liberação de histamina (% HR) de leucócitos de indivíduos sadios com soros de pacientes com UCI e de indivíduos normais (N= 16-27). Entre parênteses representa o número de amostras
O *cutoff* de cada ensaio foi estabelecido pela média + 2SD de liberação de histamina obtido com os soros de indivíduos sadios; ASST: teste de soro autólogo

6 Discussão

Os resultados mostram que na UCI, há alterações imunológicas, evidenciadas pelo desequilíbrio da produção de citocinas pelos linfócitos (Dos Santos et al., 2008) e por uma acentuada alteração funcional dos basófilos no sangue periférico (Lourenço et al., 2008). Na UCI, os basófilos se encontram em escasso número no sangue periférico, com perfil ativado e funcionalmente hiperreativos à estímulos como a IL-3 e anticorpos anti-IgE. Além disto, na análise *in vitro* de autoanticorpos liberadores de histamina de basófilos de doadores sadios, foi encontrado uma percentagem de 17-26% de soros positivos dos pacientes com UCI, principalmente nos ASST positivo. O estado de ativação e a alteração funcional dos basófilos foi detectado na maioria dos pacientes com UCI, portanto, é provável que os basófilos possuam algum defeito intrínseco e/ou indicação de outros fatores com potencial desgranulador além dos autoanticorpos liberadores de histamina.

Os pacientes com UCI, avaliados neste estudo, na sua maioria foram constituídos por mulheres, com uma taxa de 8,2 mulheres para cada homem, e mostraram uma duração da doença por um período maior do que 10 anos ($11,10 \pm 12,37$). A duração da doença foi similar ao encontrado na literatura (O'Donnell et al., 1997) e mais prevalente em mulheres, com uma taxa de quatro indivíduos do sexo feminino para cada homem, principalmente em mulheres de meia-idade (Najib e Sheikh, 2009).

Na urticária crônica, um sub-grupo de pacientes tem sido classificado como autoimune por desenvolverem autoanticorpos IgG com capacidade de desgranular basófilos e mastócitos por reconhecerem a cadeia alfa do receptor de alta afinidade de IgE (Greaves, 2008). Estudos recentes têm abordado que a UC, com autoanticorpos funcionais anti-FcεRI e anti-IgE, é uma doença autoimune distinta

(Sabroe e Graves, 2006). Além disto, há uma forte associação de subtipos de alelos HLA-B44, HLA-DRB1*01 e HLA-DRB*15 com UCI, sugerindo que há um componente genético na patogênese da UC (Çoban et al., 2008). Entretanto, para determinar o caráter autoimune da UC até o momento, existe somente a evidência de que autoanticorpos funcionais liberadores de histamina sejam patogênicos, por enquanto, não há um modelo animal para urticária autoimune.

Os resultados referentes às avaliações dos basófilos de sangue periférico, mostraram que na UCI há uma importante basopenia em paralelo com uma diminuição dos níveis séricos de histamina. A queda do número de basófilos foi detectável tanto nos pacientes com ASST+ e ASST-. A basopenia na UCI tem sido descrita, seja por métodos de quantificação manual ou por citometria de fluxo (Rorsman et al., 1962; Grattan et al., 1997). A queda dos basófilos no sangue periférico ocorre durante a atividade da doença urticária e a presença de fator sérico com atividade liberadora de histamina (Agnieszka et al., 2008).

Alguns mecanismos podem estar envolvidos na basopenia da UC, como a ação de fatores quimiotáticos nas lesões de pele, que podem recrutar os basófilos para a derme (Caproni et al., 2005). Nas biópsias de lesões de pele na UCI, pode ser verificado a presença de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (Sabroe et al., 1999). Evidência de basófilos foi observado no teste intradérmico de soro autólogo após 30 minutos da reação (Caproni et al., 2005). O provável recrutamento de basófilos para as lesões de pele, não poderia ser um evento único, considerando que os níveis séricos de histamina estão significativamente reduzidos nos pacientes com UCI. Este fato salienta que outras alterações na UC podem estar relacionadas com a produção

de fatores tais como a IL-3, GM-CSF, ou IL-18, que regulam a demanda de basófilos para a periferia ou para diferenciação destas células.

Além disto, é possível que na UCI ocorram alterações intrínsecas do basófilo, como suscetibilidade à apoptose, contudo, não observamos alteração na expressão de CD95 (Fas) nos basófilos de pacientes após estímulo com anti-IgE (dados não mostrados). Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que a diminuição da histamina sérica nos pacientes com UCI seja em decorrência ao uso prolongado de anti-histamínicos, que foi interrompido por apenas 48 horas, para execução do ASST. Geralmente, a meia-vida dos anti-histamínicos varia em torno de 36 horas, e é possível que a redução sérica da histamina seja decorrente da farmacocinética da droga.

Apesar dos poucos basófilos circulantes na UC, estes mostram alta intensidade de expressão da cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI), quando comparado com os basófilos do grupo controle. A correlação positiva da expressão do FcεRI em basófilos com os níveis séricos de IgE sugere que o aumento da expressão do FcεRI na superfície dos basófilos seja regulado pela molécula de IgE. A síntese e expressão do FcεRI é ocorre de forma constitutiva, contudo, a ligação da molécula de IgE ao receptor estabiliza a sua permanência na superfície celular, aumentando o tempo de expressão do FcεRI nos basófilos, modulando a intensidade das respostas efectoras (MacGlashan et al., 2007). Entretanto, não há correlação da UCI com incidência de doenças atópicas, e consequentemente com os níveis séricos de IgE, que encontram-se elevados na atopia (MacGlashan et al., 1999).

Os basófilos em uma minoria de indivíduos não secretam histamina (Nguyen et al., 1990) e são denominados de basófilos não liberadores, os quais podem estar associados com a degradação proteossômica de Syk, uma tirosina quinase essencial na cascata de sinalização de FcεRI (Yamaguchi et al., 1996). O tratamento prolongado com IL-3, pode recuperar os basófilos não liberadores, sugerindo que alteração na transcrição pode definir as diferenças entre basófilos liberadores de não liberadores. Diversos autores têm relatado que os basófilos de pacientes com UC são hiporeativos a estímulos como anticorpos anti-IgE e C5a, mas que respondem normalmente para MCP-1 ou bradicinina (Kern e Lichtenstein, 1976; Sabroe et al., 1998; Luquin et al., 2005). Além disto, os basófilos e os mastócitos na UCI parecem possuir uma regulação anormal da via de sinalização e são hiperreativos à componentes do soro, que ainda não foram identificados até o momento (Luquin et al., 2005). Os basófilos na UCI mostram uma resposta bimodal na ativação anti-IgE, sendo que os não respondedores possuem um aumento de proteínas SHIP-1 e SHIP-2 [(Src-homology 2-containing-5'-inositol phosphatase (SHIP)] e redução da expressão da tirosina quinase, Syk. Esta molécula é crítica na sinalização pelo receptor de IgE associada com a liberação de histamina, após estímulo com anti-IgE (Vonakis et al., 2007).

Além da análise da expressão do FcεRI nos basófilos é importante avaliar os marcadores envolvidos na ativação ou desgranulação, para melhor compreensão da atividade funcional destas células. Nos basófilos de sangue periférico dos pacientes com UCI, foi evidenciado um aumento significativo da expressão de CD203c e CD63, independentemente do ASST. A expressão do receptor para a IL-3, o marcador CD123 nos basófilos não diferiu em relação ao grupo controle, mas a

expressão foi mais intensa no grupo de ASST+ comparado ao ASST-. Além disto, a expressão de CD63 foi significativamente mais acentuada nos basófilos do grupo ASST+. Desta forma, os resultados mostram que apesar dos pacientes com UCI mostrarem diminuição dos níveis séricos de histamina e do número de basófilos, estas células encontram-se espontaneamente ativadas, possivelmente devido à ação de fatores de ativação presentes na circulação.

Em contraste, não foi observada diferença na expressão de CD203c nos basófilos de pacientes com UCI e de indivíduos atópicos quando comparados com indivíduos não atópicos, apesar de observarem aumento da expressão de CD63 (Vasagar et al., 2006). Neste estudo foi avaliado uma baixa amostragem de pacientes com UCI, um total de nove. Além disto, os controles foram avaliados separadamente em alérgicos e não alérgicos, mas não os pacientes, estes fatos podem explicar a diferença de dados com o nosso estudo.

A capacidade funcional dos basófilos sensibilizados pela IL-3, ao anticorpo anti-IgE, foi analisada pela expressão das moléculas de ativação CD203c e CD63 e pela liberação de histamina. O resultado chamou atenção pelo fato de que apenas o estímulo com IL-3 foi capaz de induzir aumento da expressão de CD203c em basófilos de pacientes com UCI, permanecendo elevado mesmo após estímulo com anti-IgE. Da mesma forma, os níveis basais de histamina aumentaram com a IL-3 e foram potencializados com o estímulo com anti-IgE nos pacientes com UCI. Em contraste, a expressão de CD63 não alterou após estímulo com anti-IgE. Estes dados sugerem que o aumento da expressão *ex vivo* de CD203c nos basófilos, é um indicador mais adequado para indicar o estado de ativação, desde que apenas a IL-3 já potencializou a expressão do marcador, o mesmo não ocorrendo com a molécula

CD63. De fato, a ativação prévia de basófilos com IL-3 não aumenta a expressão de CD63 (Valent et al., 1989).

A IL-3 facilita a desgranulação *in vitro* de basófilos, uma vez que é capaz, por um mecanismo ainda desconhecido, de converter basófilos não desgranuladores em liberadores de histamina (Ferrer et al., 2003). O seu uso não afeta a porcentagem de positividade de soros de pacientes com UCI, avaliados nos ensaios para detecção de anticorpos com atividade liberadora de histamina (Ferrer et al., 2003).

Com o propósito de averiguarmos a presença de anticorpos liberadores de histamina no soro de pacientes com UCI, padronizamos o teste de desgranulação de basófilos, utilizando leucócitos de doadores atópicos saudáveis. O teste foi realizado com soros de indivíduos saudáveis (n=36) e soros de pacientes com UCI (n=41) utilizando três diferentes doadores de leucócitos. O *cutoff* de cada ensaio foi estabelecido pela média aritmética da liberação de histamina de soros de indivíduos saudáveis somado dois desvio padrão (Asero et al., 2004). Os resultados mostraram um percentual de 17% (mediana dos três ensaios) de soros positivos com atividade liberadora de histamina (HR+). Similarmente, a presença de anticorpos HR+ no soro de pacientes com UCI tem sido evidenciada em 16,5% (Asero et al, 2001) ou 26,4% (Caproni et al., 2004). Os variados estudos que mostram a relação de anticorpos HR+ e ASST estão ilustrados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Relação do teste de soro autólogo e do fator *in vitro* liberador de histamina em pacientes com UCL.

Número de pacientes	ASST+ (%)	ASST- (%)	HR	HR+/ASST+	HR+/ASST-	Autor
68	-	-	31/68 (48%)	-	-	Ferrer et al., 1998
86	-	-	39/86 (45%)	-	-	Fiebiger et al., 1998
155	-	-	28/87 (32%)	38/69 (55%)	16/86 (16,6%)	Sabroe et al., 1999
260	-	-	43%	-	-	Kikuchi et al., 2001
306	67	33	20/121 (16,5%)	19/87 (21,8%)	1/31 (3,22%)	Asero et al., 2001
78	34,6	65,4	27/78 (35%)	-	-	Sabroe et al., 2002
68	33	67	18/68 (26,4%)	18/23 (100%)	0%	Caproni et al., 2004
49*	44,9	55,1	16/31 (51,6%)	-	-	Brunetti et al., 2004
28	57	43	35%	12/16 (75%)	4/12 (33%)	Platzer et al., 2005

ASST: Teste intradérmico de soro autólogo, HR: Anticorpo liberador de histamina, - Não realizado.

* Estudo realizado com crianças

Nos pacientes com UCI, com ASST+, observamos uma maior incidência de soros HR+, de 15-28,6% (25%), contudo, anticorpos HR+ também foram detectáveis, em incidência mais baixa, no grupo de pacientes ASST-, 5,9-23,5% (19%). Os grupos de pesquisadores em UCI, Greaves e Kaplan, têm evidenciado presença de fatores liberadores de histamina em aproximadamente 50% dos pacientes com UCI, os quais foram caracterizados como autoanticorpos IgG funcionalmente ativos específicos para o receptor de IgE ou para a IgE (Hide et al., 1993, Tong L J et al., 1997). Assim, o ASST tem sido utilizado como um indicador rápido para detectar autorreatividade *in vivo*, sendo insuficiente para definir autoimunidade na UCI (Caproni et al., 2005). Várias discrepâncias são relatadas sobre a positividade do ASST na população saudável, que variam de 2,5% (Sabroe et al., 1999) até 40,5% de positividade (Guttman-Yassky et al., 2007). Alta prevalência de ASST positivo, de 45%, foi identificada em indivíduos saudáveis (Mari, 2003) ou em 29,8% de pacientes com rinite alérgica sazonal sem indicação de UC (Guttman-Yassky et al., 2007). Em contraste, outros estudos constataam nenhuma positividade em indivíduos saudáveis (Asero et al., 2001).

O fato de que somente uma pequena proporção de pacientes ASST+ mostre autoanticorpos HR+ ativos, sugere a existência de fatores capazes de gerar resposta positiva no teste de soro autólogo. Neste sentido, há um aumento na proporção de pacientes autorreativos quando o teste é realizado com plasma autólogo (Asero et al., 2006). Os plasmas de pacientes com UCI mostram sinais de geração de trombina, que resultam na ativação da via extrínseca de coagulação, mostrando maior positividade do que quando o teste é realizado com soro autólogo (Asero et al., 2006). É possível que a geração de trombina possa contribuir para o processo

inflamatório, por atuar sinergisticamente com a histamina liberada pelos autoanticorpos.

De fato, a evidência de que encontramos presença de anticorpos liberadores de histamina HR+ nos pacientes com ASST – (19%), corrobora com a hipótese de que o ASST merece ser avaliado cuidadosamente. É possível que fatores séricos possam interferir nos resultados, dando origem a falso-positivo e/ou falso-negativo, pela geração de trombina. Esta variabilidade do ASST pode se verificar nos pacientes com UCI, que mostraram um percentual de apenas 4 % (5/121) de positividade ao ASST (Guerra et al., 2007). Além disto, observamos que não há relação da presença de soros HR+ com autoanticorpos anti-TPO ou TG, ou mesmo FAN.

A frequência de autoanticorpos anti-TG e anti-TPO foi de 8,6% e 11,4%, respectivamente, nos pacientes com UCI. A distribuição dos autoanticorpos foi similar entre os pacientes de acordo com ASST e somente em 3/37 pacientes foi observado tireoidopatia, dos quais em apenas um foi detectado autoanticorpo anti-tireoide. Na UC, a ocorrência de doença tireóide sintomática tem sido relatada em 12,1% (Leznoff et al., 1983), com maior frequência de tireoidite de Hashimoto e em menor frequência a doença de Graves (Kaplan e Finn, 1999). Similarmente, Verneuil et al. (2004) relatam a presença de 26,7% de autoanticorpos anti-TG e anti-TPO em 99 pacientes com UC comparados a 3,3% na população saudável. A ocorrência de autoanticorpos anti-tireóide varia de 3-6% em uma população saudável, o que salienta que a autoimunidade tireoidiana seja um tipo mais comum de processo autoimune órgão-específico (Monge et al., 2007). Em outro estudo, anticorpos anti-TG foram detectados em 22,2% e anticorpos anti-TPO em 26,8% de um total de 56 pacientes com UC (Palma-Carlos e Palma-Carlos, 2005).

Além disto, observamos uma percentagem de 19% de fator anti-nuclear (FAN) nos pacientes com UCI, sendo na maioria de padrão pontilhado fino. Este percentual de FAN é semelhante aos 20% de positividade encontrada em pacientes com UC (Verneuil et al., 2004), embora a detecção de FAN possa variar de 5,3% (Turktas et al., 1997) a 15% nos pacientes com UCI (Sibbald et al., 1991).

Em conjunto, os resultados mostram que na UCI, há importante alteração funcional dos basófilos de sangue periférico, enfatizando que além de uma possível alteração intrínseca, existem fatores circulantes capazes sensibilizar *in vivo* os basófilos. Marcadores de desgranulação CD203c e CD63 em basófilos mostraram ser bons indicadores do grau de ativação *ex vivo* dos basófilos na UCI, e a IL-3 *in vitro* propiciou a hiperreatividade dos basófilos na liberação de histamina e no aumento da expressão de marcadores de ativação. Com a padronização do ensaio *in vitro* para evidenciar fatores liberadores de histamina, um teste denominado padrão ouro, identificou 17% de HR+ nos pacientes com UCI, dos quais uma proporção foi ASST positivo (25%, 6/24), mas também ASST negativo (5,9%, 1/17). Nossos resultados, sugerem que somente o ASST não é recomendável para definir a UC autoimune, sendo necessário realizar o ensaio *in vitro* de liberação de histamina utilizando doadores saudáveis.

Os resultados sugerem que na UCI, há ocorrência de uma alteração imunológica, que acomete os componentes de resposta imunológica inata, como os basófilos e os fatores indutores de liberação de histamina. Os basófilos, um importante integrante da resposta imune, têm se destacado como células apresentadoras de antígeno e na geração de células Th2. Na UCI, apesar dos basófilos serem encontrados em escasso número no sangue periférico, encontram-se

em estado de ativação e uma vez, sensibilizados, tornam-se hiperreativos a estímulos imunológicos. Esta alteração dos basófilos ocorre na grande maioria dos pacientes com UCI e deve contribuir para a patogênese da doença, o que sugere a existência de fatores ativadores/desgranuladores de basófilos, outros que os autoanticorpos reativos ao receptor de alta afinidade para IgE.

Conclusões

Os basófilos dos pacientes com UCI, são detectados em escasso número no sangue periférico e encontram-se com perfil de ativação, seja baseado pelo aumento da expressão de CD203c, CD63 e FcεRI na superfície e pela hiperreatividade na liberação de histamina em resposta à IL-3 e anti-IgE; este estado *ex vivo* ativado no sangue periférico, pode ser devido à um defeito intrínseco dos basófilos ou pela ação de fatores estimuladores de basófilos presentes na circulação,

A análise da molécula CD203c, um marcador específico para basófilos, revelou ser um parâmetro adequado para avaliar o grau de ativação dessas células, correlacionando com o estado de aspecto funcional,

A padronização do ensaio *in vitro* de liberação de histamina por soro de pacientes com UCI utilizando doadores de leucócitos saudáveis, mostrou que 17% dos pacientes possuem fator liberador de histamina, independente da positividade ao teste intradérmico de soro autólogo e do estado *ex vivo* de ativação de basófilos.

Anexos

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE :.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... . TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....).....
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Identificação de autoanticorpos anti-IgE e anti-receptor de alta afinidade para IgE na urticária crônica autoimune: análise da expressão do receptor e de marcadores de ativação em basófilos e monócitos"

PESQUISADOR: Maria Notomi Sato

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBM 1690

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

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

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais
3. desconfortos e riscos esperados
4. benefícios que poderão ser obtidos
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

O Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56) da Faculdade de Medicina da USP está desenvolvendo um estudo para melhor compreender a doença urticária crônica autoimune com o objetivo de desenvolver novos tipos de exames e tratamentos. Você está sendo convidado a participar voluntariamente (sem remuneração e de modo não obrigatório) neste estudo. Para isto é preciso coletar 20 ml de sangue de seu braço. Você sentirá a picada da agulha e pode sentir uma leve tontura, que passará em poucos minutos. Um dia após pode aparecer em volta do local da picada uma mancha roxa que desaparece em poucos dias sem maiores problemas. Esta amostra de sangue tem objetivo de auxiliar no diagnóstico e no tratamento da doença. No entanto, se você sentir qualquer tipo de desconforto depois dos procedimentos, o médico estará a sua inteira disposição para solucionar o problema ou tirar as dúvidas.

Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este estudo e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico dentro do HC.

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

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

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

Dra. Maria Notomi Sato e Dra. Celina Wakisaka Maruta

End.: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 3º Andar, Dermatologia

Tel.: (11) 3061-7499

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2005.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo B – Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa**APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1159/05**, intitulado: "Identificação de autoanticorpos anti-IgE e anti-receptor de alta afinidade para IgE na urticária crônica autoimune: análise da expressão do receptor e de marcadores de ativação em basófilos e monócitos." apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

Pesquisador (a) Executante: Sr. Francinelson Duarte Lourenço

CAPPesq, 08 de fevereiro de 2006.

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br
VCN

Anexo C
Tabela 2: Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Paciente	Sexo	Idade	Duração da Doença (anos)	ASST	Angioedema	FAN	Anti-TPO	Anti-TG	Tireopatia
UCI 1	F	53	4	-	+	-	-	-	-
UCI 2	F	30	7	-	-	-	-	-	-
UCI 3	M	59	7	-	-	NC	-	-	-
UCI 4	F	40	NC	-	NC	-	-	-	-
UCI 5	F	54	19	-	+	-	-	-	+
UCI 6	F	40	2	+	-	-	-	-	-
UCI 7	M	61	4	-	+	-	-	-	+
UCI 8	F	55	4	+	+	-	-	-	-
UCI 9	F	45	7	+	+	-	-	+	-
UCI 10	F	50	11	-	-	1:40	-	-	-
UCI 11	F	61	11	+	-	+	-	-	-
UCI 12	F	42	NC	-	NC	-	-	-	-
UCI 13	F	55	31	+	+	-	-	-	-
UCI 14	F	42	10	-	-	-	289	1696	-
UCI 15	M	67	2	+	-	+	-	-	-
UCI 16	F	43	7	-	+	-	-	-	-
UCI 17	M	22	1,5	+	+	-	-	-	-
UCI 18	F	57	57	-	+	+	-	-	-

UCI :Urticária Crônica Idiopática, FAN: Fator anti-nuclear, Anticorpo anti- TPO: tireoperoxidase, anti-TG : tireoglobulina
NC: não consta

Tabela 2 (continuação): Características individuais dos pacientes com Urticária Crônica Idiopática

Paciente	Sexo	Idade	Duração da doença (anos)	ASST	Angioedema	FAN	Anti-TPO	Anti-TG	Tireopatia
UCI19	F	47	24	+	+	-	-	-	-
UCI20	F	68	11	+	+	-	-	+	-
UCI21	F	30	1	-	+	-	+	-	-
UCI22	F	52	6	+	+	-	-	-	-
UCI23	F	38	3	+	+	-	-	-	-
UCI24	F	50	1	-	+	-	-	-	-
UCI25	F	39	16	-	-	-	-	-	-
UCI26	F	62	9	-	+	-	-	-	-
UCI27	F	41	3	-	-	-	-	-	-
UCI28	F	61	8	+	-	+	1079	-	-
UCI29	F	65	34	-	+	-	NC	NC	-
UCI30	F	42	NC	+	-	-	-	-	-
UCI31	F	40	26	-	+	-	-	-	-
UCI32	F	45	1	+	+	-	-	-	-
UCI33	F	43	0,5	+	+	+	+	-	+
UCI34	F	66	16	+	+	+	-	-	-
UCI35	F	22	NC	+	NC	NC	-	-	-
UCI36	F	58	NC	-	NC	-	-	-	-
UCI37	F	64	NC	-	NC	NC	NC	NC	-

UCI :Urticária Crônica Idiopática, FAN: Fator anti-nuclear, Anticorpo anti- TPO: tireoperoxidase, anti-TG : tireoglobulina
NC: não consta

Anexo D – Manuscrito Publicado

CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATIONS

DOI 10.1111/J.1365-2133.2008.08499.x

Activated status of basophils in chronic urticaria leads to interleukin-3 hyper-responsiveness and enhancement of histamine release induced by anti-IgE stimulus

F.D. Lourenço, M.H. Azor, J.C. Santos, E. Prearo,* C.W. Maruta,* E.A. Rivitti,* A.J.S. Duarte and M.N. Sato

Laboratory of Investigation in Dermatology and Immunodeficiencies (LIM-56), Department of Dermatology, School of Medicine, University of São Paulo, 05403-000 São Paulo, Brazil

*Dermatological Outpatient Clinic, Hospital das Clínicas, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Summary

Correspondence

Maria Notomi Sato.

E-mail: marisato@usp.br

Accepted for publication

11 December 2007

Key words

basophil, CD203c, CD63, chronic urticaria, releasability

Conflicts of interest

None declared.

Background Basophils and mast cells are the main target cells in chronic idiopathic urticaria (CIU). Besides the basopenia, intrinsic defects of the anti-IgE cross-linking signalling pathway of basophils have been described in CIU.

Objectives We sought to investigate the profile of expression of activation markers on basophils of patients with CIU and to explore the effect of interleukin (IL)-3 priming upon anti-IgE cross-linking stimuli through expression of activation markers and basophil histamine releasability.

Methods Evaluation of the surface expression of FcεRIα, CD63, CD203c and CD123 on whole blood basophils of patients with CIU undergoing autologous serum skin test (ASST) was performed by flow cytometry. The effect of pre-treatment with IL-3 in the anti-IgE response was analysed by the expression of basophil activation markers and histamine release using enzyme-linked immunosorbent assay.

Results Blood basophils of patients with CIU were reduced in number and displayed increased surface expression of FcεRIα, which was positively correlated with the IgE serum levels. Upregulation of expression of both surface markers CD203c and CD63 was verified on basophils of patients with CIU, regardless of ASST response. High expression of IL-3 receptor on basophils was detected only in ASST+ patients with CIU. Pretreatment with IL-3 upregulated CD203c expression concomitantly with the excreting function of blood basophils and induced a quick hyper-responsiveness to anti-IgE cross-linking on basophils of patients with CIU compared with healthy controls.

Conclusions Basophils of patients with CIU showed an activated profile, possibly due to an *in vivo* priming. Functionally, basophils have high responsiveness to IL-3 stimulation, thereby suggesting that defects in the signal transduction pathway after IgE cross-linking stimuli are recoverable in subjects with chronic urticaria.

Chronic urticaria is a common skin disorder characterized by recurrent and transitory itchy wheals occurring regularly for more than 6 weeks.¹ In most patients the cause remains unknown, in which case it is defined as chronic idiopathic urticaria (CIU). CIU appears to be of autoimmune origin in a substantial percentage of cases, as approximately 35–40% of patients have circulating IgG antibodies directed against the α-subunit of the high-affinity IgE receptor,² and an additional 5–10% have antibodies against the IgE molecule.³ The auto-

immune subgroup represents the most severe form of chronic urticaria.^{1,4} Patients with chronic urticaria without autoantibodies still have no clear cause for their urticaria, but it has been suggested that a population of patients has intrinsic basophil or mast cell defects, which may be the underlying cause of hives in these patients. However, some caution is required in extrapolating the results from circulating basophils to those sequestered in the affected urticarial tissues, an issue that requires further investigation.

Basophils represent <0.5% of total leucocytes in peripheral blood; they are generated and mature in the bone marrow and circulate in the periphery as fully differentiated forms. Stimulated basophils release preformed histamine, the major mediator of urticaria, and newly synthesized factors, such as leukotriene C₄ and interleukin (IL)-4 and IL-13. In CIU, the occurrence of basopenia has been well described, which has been correlated with urticarial activity.^{5,6} One possible reason for the reduced number of basophils in CIU is that these cells are actively recruited into lesional skin.⁷

The activation markers on basophils have been parameters for evaluating the degree of cellular activation in atopic disease as well as in CIU, based on the allergens or serum-inducing activity of basophils, respectively. In resting basophils, CD63 is anchored in the basophilic granule membrane that contains histamine, and its exposure to the outside of the cells reflects cell degranulation due to fusion between granules and plasma membranes.⁸ CD63 is expressed by different cell types, such as basophils, tissue mast cells, macrophages and platelets.⁹ CD203c appears to be selectively expressed on the basophil/mastocyte lineage.¹⁰ CD203c is a multifunctional ectoenzyme called ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 3 (E-NPP3).¹⁰ Both activation markers, CD63 and CD203c, under different kinetics, are rapidly upregulated on basophils after stimulation with allergens or cross-linking with anti-IgE or anti-FcεRI.^{11,12} Sera from patients with CIU with positive autologous serum skin tests (ASSTs) significantly upregulate basophil CD63 as well as CD203c and correlate with basophil histamine release, particularly if highly sensitive donor basophils are used.^{13–15} Most investigation has been focused on the CIU serum activity in the activation of donor basophils as a screening tool. However, direct evidence of basophil activation in the peripheral blood could also possibly be used to monitor urticarial activity. An enhanced expression of CD63 in basophils *in vivo* that is not associated with serum factors has been shown for patients with CIU.¹⁶

IL-3 has been shown to improve basophil histamine release upon stimulation with sera from patients with CIU, partially converting nonreleaser basophils into cells that respond to sera if they are unresponsive to anti-IgE but respond normally to other secretory stimuli.¹⁷ Basophils in patients with CIU are considered to have possible specific intrinsic defects, such as being hyporesponsive to anti-IgE,^{5,18–20} but hyper-responsive to healthy or patient serum. However, if there are some intrinsic basophil defects in CIU, the effectiveness of IL-3 stimulation in anti-IgE cross-linking histamine release is unknown.

In the current study, we sought to investigate the intensity of FcεRIα receptor expression as well as expression of the activation/degranulation markers CD203c, CD63 and CD123 on blood basophils from ASST+ and ASST– patients with CIU. In addition, we sought to explore the efficacy of IL-3 priming upon anti-IgE stimulus through expression of basophil activation markers and basophil histamine releasability.

Patients and methods

Study subjects

All patients with continuous CIU were selected from the Dermatological Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP). They had had weals at least four times a week for 6 weeks or longer. Patients with physical urticaria, urticarial vasculitis and food allergy were excluded. Antihistamines were withdrawn 48 h before the study, and none of the patients was taking corticosteroids or immunosuppressive drugs at the time of venipuncture. Samples from 29 patients with CIU (five men and 24 women; median age 42.5 years, range 20–66) and 26 healthy control (HC) individuals (eight men and 18 women; median age 37 years, range 22–65) were collected and stored at –70°C. All subjects gave written informed consent, and the study protocol was approved by the institutional ethics committee of the HC-FMUSP.

Autologous serum skin test

All patients underwent skin testing with autologous serum (ASST) performed following standard methods²¹ with fresh autologous serum injected intradermally into the volar forearm skin. A positive skin test was defined as when the serum-induced weal was red and had a diameter ≥1.5 mm than that of the saline-induced response at 30 min.

Flow cytometry analysis

To analyse the expression of FcεRI or activation surface markers on basophils, cells were stained with a combination of labelled monoclonal antibodies (mAbs) and measured by means of flow cytometry. In brief, 100 µL of whole blood was incubated for 30 min on ice with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat antihuman IgE (Caltag, Carlsbad, CA, U.S.A.), phycoerythrin (PE)-labelled FcεRI α-chain mAb AER-37 (CRA1; Immunotech International, Marseille, France), or their isotype-matched controls. Cells were initially gated based on the histogram defined by forward scatter and side scatter, and then a second gate of high-density FITC-IgE+ cells was defined to select the basophil population. To evaluate the specific activation markers, the follow mAbs were used: R-PE-labelled CD203c; PE-labelled CD63 (Immunotech International); and PE-Cy5 (cyanin 5)-labelled CD123 [IL-3 receptor α (IL-3Rα), 9F5], from BD Pharmingen (San Jose, CA, U.S.A.). After incubation, the cells were washed once in phosphate-buffered saline (PBS)/0.5% bovine serum albumin (BSA), processed with a Coulter EPICS XL-ML flow cytometer (Miami, FL, U.S.A.), and analysed with System II software. At least 500 basophils were assessed. The absolute number of basophils in the peripheral blood was determined as the percentage of positive cells multiplied by the total leucocyte count performed using the Cell-Dyn 1400 (Abbott, Chicago, IL, U.S.A.). Data were expressed as net median fluorescence intensity (MFI) (actual MFI – MFI of the irrelevant IgG

control). All incubation steps were performed at 4°C. For anti-IgE stimulation assays, the gate on side scatter with PE-CD203c+ cells or the gate with PE-CD63+ and high-density FITC-IgE+ cells was defined to select the basophil population, analysing at least 500 cells.

Basophil activation and histamine-release reaction

Whole blood (100 µL) was incubated with human recombinant IL-3 (4 ng mL⁻¹; BD Pharmingen) for 10 min at 37°C. After incubation, the cells were incubated with 12.5 µg mL⁻¹ of anti-IgE (Calbiochem, Darmstadt, Germany) in PBS containing 0.3% BSA, 2 µmol L⁻¹ CaCl₂ and 1 µmol L⁻¹ MgCl₂, for 15 and 40 min at 37°C. After incubation, the reaction was stopped with 100 µL of cold PBS/0.3% BSA solution containing 20 µmol L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid. The supernatants were separated by means of centrifugation for histamine measurement and the cells for flow cytometry analysis. Spontaneous histamine release (basal) was evaluated by measuring histamine concentration in the supernatant of unstimulated cells. Aliquots of cells underwent four freeze-thaw cycles to determine total basophil histamine content. The results were expressed as percentage of total histamine content calculated by using the following formula: (sample – basal)/(total – basal) × 100.

Histamine assay

Basophil histamine release as well as plasma histamine levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions

(Immuno-Biological Lab, Hamburg, Germany). The optical density reading was performed at 450 nm in an ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) with a SOFT max PRO program.

Statistical analysis

Data are presented as means. The Mann–Whitney U-test was used to compare variables between patients with CIU and HC subjects. Correlations of data were analyzed by the non-parametric Spearman test. The Kruskal–Wallis test with Dunn's post-test was used to compare nonpaired data between three sets of data. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Basopenia and FcεRI surface expression on basophils of patients with chronic idiopathic urticaria

To verify the expression of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on basophils from peripheral blood, patients with CIU underwent skin testing with autologous serum (ASST).

Initial experiments were designed to quantify basophils in peripheral blood and to ascertain the plasma histamine levels of patients with CIU. To determine the absolute number of blood basophils, the percentage of basophils stained for anti-IgE by flow cytometry as shown in Figure 1 was multiplied by the leucocyte number. The enumeration of basophils showed marked basopenia in patients with CIU, independent of a positive or negative ASST (Fig. 1). The occurrence of basopenia in patients with CIU is well known through the use

Fig 1. Peripheral blood basophil enumeration and plasma histamine levels. (a) Cell scatter and gate-contained basophils located between the monocytes and lymphocytes. (b) Cells were selected by high IgE intensity of labelling with fluorescein isothiocyanate (FITC)-antihuman IgE. (c) Absolute number of basophils (percentage of basophils stained for anti-IgE multiplied by leucocyte number) of peripheral blood from healthy control (HC) individuals, patients with chronic idiopathic urticaria (CIU), and autologous serum skin test (ASST)– or ASST+ patients. (d) Determination of plasma histamine levels by enzyme-linked immunosorbent assay. Horizontal lines represent means. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ compared with the HC group.

Fig 2. Increased FcεRIα expression on basophils from patients with chronic idiopathic urticaria (CIU). (a) Cells selected for high IgE intensity were evaluated by median fluorescence intensity (MFI) for FcεRIα expression on basophils from healthy control (HC) individuals, patients with CIU, and autologous serum skin test (ASST)– or ASST+ patients. (b) Correlation of FcεRIα expression with serum IgE levels. Horizontal lines represent means. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with the HC group.

of metachromatic stain on peripheral blood⁵ as well as through flow cytometry.⁶ The reduced percentage and absolute number of blood basophils in patients with CIU was comparable with the small amount of plasma histamine, that was 14-fold lower than in HC individuals. For evaluation of FcεRIα expression, the AER-37 (CRA1) mAb was used, which reacts with the α-chain of FcεRI and does not block IgE binding.²² Figure 2(a) shows that basophils from patients with CIU had a significantly higher expression of FcεRIα compared with basophils of the HC group; this was verified in both ASST+ and ASST– patients with CIU. Total serum IgE levels were found to be heterogeneous in patients with CIU (median 312.5 UI mL^{-1} , range $12\text{--}588.5$), which were positively correlated ($r = 0.567$, $P = 0.011$) with MFI values of FcεRIα expression on basophils (Fig. 2b).

Upregulation of basophil activation markers in patients with chronic idiopathic urticaria

To evaluate the basophil activation profile in the peripheral blood of patients with CIU, we analysed CD203c, CD63 and

Fig 3. Upregulation of marker activation/degranulation on blood basophils from patients with chronic idiopathic urticaria (CIU). Cells selected for high IgE intensity were evaluated by median fluorescence intensity (MFI) for (a) CD203c, (b) CD63 or (c) CD123 (interleukin-3 receptor α) expression on basophils from healthy control (HC) individuals, patients with CIU, and autologous serum skin test (ASST)– or ASST+ patients. Horizontal lines represent means. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ compared with the HC group.

CD123 markers. As shown in Figure 3, blood basophils from patients with CIU showed a significant increase of CD203c expression (mean $\pm$ SD MFI 57.48 ± 23.82) compared with the HC group (mean $\pm$ SD MFI 22.8 ± 14.51). This finding was detected in both ASST+ and ASST– patients with CIU. In parallel, basophils from patients with CIU showed an enhanced CD63 expression. Although expression of both activation molecules was upregulated on basophils from patients with CIU, the intensity of CD123 expression was significantly

Fig 4. Kinetics of expression of CD203c and CD63 markers on interleukin (IL)-3-primed basophils upon anti-IgE stimulation. Whole blood cells were stimulated with IL-3 followed by incubation with antihuman IgE antibodies for 15 and 40 min. (a) Cells analysed by flow cytometry for median fluorescence intensity (MFI) of CD203c expression on basophils from healthy control (HC) individuals (open symbols) and patients with chronic idiopathic urticaria (CIU) (closed symbols), and (b) Δ MFI (MFI from anti-IgE-stimulated cells minus MFI from baseline expression) of CD203c expression. (c) CD63 expression after 15 and 40 min of anti-IgE stimulation and (d) Δ MFI of CD63 expression. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with the HC group. Horizontal lines represent means, and thick horizontal lines show the comparison between the incubation times. Representative histogram of CD203c expression on IL-3-primed basophils from (e) a healthy individual and (f) a patient with CIU after 15 min of anti-IgE stimulation (shaded area). PE, phycoerythrin.

increased only in ASST+ patients compared with the HC group (Fig. 3). This finding showed that the few basophils circulating in peripheral blood of patients with CIU showed an intense occurrence of activation markers in the peripheral blood, as confirmed by CD203c and CD63 surface markers.

Basophil reactivity to anti-IgE stimulus

It has been reported that basophils from patients with CIU are hyporesponsive to anti-IgE stimulus,^{5,18,19} and that priming with IL-3 may improve the testing of anti-IgE cross-linking with sera from patients with CIU on healthy donor basophils.¹⁷ Therefore, we examined the effectiveness of IL-3 priming on anti-IgE stimulus of basophil expression of CD203c and CD63 and histamine release.

Preincubation with IL-3 induced significant high expression of CD203c on basophils from peripheral blood of patients with CIU in the absence of anti-IgE antibodies (Fig. 4). Upon anti-IgE cross-linking, expression of CD203c on the basophils of patients with CIU was enhanced compared with the basophils of HC individuals. This finding was similar in both ASST+ and ASST- subjects. As an *in vivo* enhancement of the constitutive CD203c expression on basophils from patients with CIU was verified, it was evaluated using Δ MFI (MFI from anti-IgE-stimulated cells minus MFI from baseline expression). Even with subtracting the CD203c baseline expression, a notable increase of CD203c expression on basophils was detected.

It was noticed that throughout the time of anti-IgE stimulation, increasing CD203c surface expression occurred only on basophils of the HC group, as basophils of patients with CIU had already been upregulated at 15 min of stimulation. A similar profile of CD63 expression on basophils upon anti-IgE stimulation was detectable between patients with CIU and HC individuals, with both groups having increased CD63 expression with anti-IgE cross-linking (Fig. 4). As noticed for CD203c, increasing CD63 Δ MFI during anti-IgE stimulation was verified only on basophils from the control group.

The effect of preincubation with IL-3 upon anti-IgE stimulation of basophil histamine release was evaluated. As shown in Figure 5, IL-3 treatment by itself induced an increased histamine release by basophils from patients, which was markedly enhanced after 15 min of anti-IgE stimulation compared with basophil histamine release from control subjects. Interestingly, the patients whose histamine release upon anti-IgE stimulation was above the median value (41.67 ng mL^{-1}) belonged to the ASST+ subgroup (75%). After 40 min, unstimulated cells from patients with CIU primed with IL-3 maintained an increased basophil histamine release, whereas after anti-IgE stimulation a similar level of histamine release was observed between basophils from control individuals and patients. These results indicate that IL-3 induces both the functional ability to release histamine and upregulation of expression of CD203c molecules on basophils of patients with CIU. Moreover, in CIU, IL-3 priming induced a faster responsiveness to

Fig 5. Histamine release from interleukin (IL)-3-primed basophils upon anti-IgE stimulation. Whole blood cells from healthy control (HC) individuals (open symbols) and patients with chronic idiopathic urticaria (closed symbols) were stimulated with IL-3 followed by incubation with antihuman IgE antibodies for 15 and 40 min. Supernatants were harvested for histamine determination by enzyme-linked immunosorbent assay. Horizontal lines represent means. * $P < 0.05$ compared with the HC group.

anti-IgE stimuli for release of histamine at high levels, than for basophils of healthy individuals.

Discussion

The findings of this study demonstrated that basophils in peripheral blood of patients with CIU have an activated profile, displaying increased FcεRIα expression simultaneously with upregulation of CD203c and CD63 expression. Treatment with IL-3 by itself induced an enhancement of CD203c molecule expression and basophil histamine release in patients with CIU. Functionally, the basophils in CIU are prone to IL-3 responsiveness, leading to an increased release of histamine upon anti-IgE cross-linking.

We verified that the few basophils circulating in the peripheral blood of patients with CIU exhibited a high intensity of FcεRIα expression compared with the basophils from HC individuals. Basopenia has been well documented in CIU, which could be associated with urticarial activity, mainly in patients with functional autoantibodies able to induce histamine-releasing activity *in vitro*.⁵ In our findings, the marked reduction of blood basophils was verified in both ASST+ and ASST- patients with CIU. A positive correlation of FcεRIα expression on basophils with IgE serum levels in CIU suggests that enhancement of FcεRIα expression on the basophil surface is regulated by IgE. Therefore, variable IgE serum level was found in patients with CIU. There is no relationship between increased incidence of either atopic status or elevated total serum IgE in patients with CIU.²³ It is known that the synthesis of FcεRI is constitutive, and that IgE stabilizes its presence on the cell surface,²⁴ modulating the intensity of

effector responses.²⁵ Indeed, other factors, such as IL-4, may synergize with IgE in increasing the percentage of FcεRI+ cells²⁶ and the IgE-mediated FcεRI expression on cord blood-derived mast cells.²⁷ Whether the upregulation of FcεRIα on basophils of patients with CIU is due to IgE, in synergy or not with other serum factors, remains to be explored.

The activated status of basophils in CIU was verified by the upregulation of expression of both CD203c and CD63, again, regardless of *in vivo* serum reactivity. Peripheral blood CD203c is exclusively and constitutively expressed on the outer basophil membrane.⁹ The biological significance of CD203c (E-NPP3) expression on basophils remains unknown, but this marker is upregulated very quickly in response to specific allergens, anti-IgE, and anti-FcεRI stimulation.^{10,12,28} Heightened expression of CD63 on basophils from patients with CIU has been reported for enriched basophil preparations compared with those from nonallergic individuals, whereas no difference was found in CD203c expression.¹⁶ One reason for the high CD203c expression found in our study is probably the use of whole blood evaluation instead of an enriched cell preparation. We evaluated basophil activation markers in whole blood to avoid any interference on their constitutive CD203c expression, as this molecule could be quickly upregulated in response to some stimuli.

The reduced number of blood basophils in CIU has been suggested to occur by an active recruitment of these cells from the circulation into weals by expression of endothelial adhesion molecules in response to local chemokine and cytokine production.^{7,19} Migration of basophils through the endothelium is promoted by endogenous cytokines, such as IL-1β, IL-3, and several chemokines. In the presence of IL-3, chemotaxis is selectively enhanced in basophils by transendothelial migration.²⁹ IL-3 exhibits diverse effects on human basophils, including development,³⁰ growth and differentiation factor,³¹ migration,²⁹ histamine release, and augmentation of cytokine generation as well as inhibition of apoptosis.³² Moreover, IL-3 stimulation is able to convert anti-IgE nonreleasing basophils into releasing basophils, showing recoverable defect(s) in the signal transduction pathway after IgE cross-linking.¹⁷

The findings showed that IL-3 stimulation is able to induce upregulation of CD203c expression on basophils from patients with CIU, concomitantly with the release of histamine. If CD203c upregulation represents a distinct point in the signaling pathway or a different functional endpoint, it seems likely that CD203c upregulation, degranulation, and histamine release occur simultaneously in response to IL-3 priming. Differently from *in vivo* CD63 upregulation in patients with CIU, IL-3 stimulation upon anti-IgE stimuli was detected similarly on basophils of patients and controls. Only some of them had an increased CD63 expression upon anti-IgE stimuli. In fact, preactivation of the basophils with IL-3 does not upregulate CD63 expression, whereas it has been observed to increase assay sensitivity.³³ The mechanism for the improved assay sensitivity is unknown, but early events of upregulation were found at the level of Raf-1-Mek-Erk.³⁴

In general, basophils from patients with CIU have been considered to be hyporesponsive to anti-IgE stimulus,^{4,5,18} suggesting an abnormal regulation of the signalling pathway.^{19,20} We observed for the first time that preincubation with IL-3 induced a hyper-responsiveness for anti-IgE stimulus in the CIU group compared with the control group. Kinetics of anti-IgE cross-linking demonstrated that IL-3 induced a faster histamine release from basophils of patients with CIU than from those of HC individuals, probably due to their *in vivo* activated phenotype. Curiously, the basophils of some ASST+ patients with CIU released more histamine upon anti-IgE stimulus. Also, these patients showed high expression of IL-3R α on basophils, which may explain their hyperactivity to IL-3 priming for degranulation. Although basophils from CIU are less responsive to some stimuli, they are hyper-responsive to serum either from healthy individuals or from patients with CIU.²⁰ The serum factor responsible for the increased responsiveness of basophils of patients with CIU has not yet been identified, but it is not clearly related to the presence of serological factors such as histamine release activity and/or Fc ϵ RI α autoantibodies.³⁵ Although it is hard to interpret findings with surviving peripheral blood basophils in patients with CIU, our finding suggests possible intrinsic basophil defect(s) that renders them susceptible to circulating mediator(s), as verified by the hyper-responsiveness following pretreatment with IL-3. Furthermore, the peculiar activated profile of basophils in patients with CIU may possibly contribute to their migration into lesional skin.

In summary, our data show an activated profile of blood basophils in patients with CIU, possibly due to an *in vivo* priming. Upregulation of marker activation/degranulation was coincident with the high intensity of Fc ϵ RI α on basophils from patients with CIU. Furthermore, in CIU, IL-3 treatment by itself as well as upon IgE cross-linking induced the histamine-excreting function of basophils, suggesting a recoverable defect in the signalling transduction pathway on basophils of patients with CIU.

Acknowledgments

This research was supported by FAPESP (no. 2004/06937-5), CAPES and LIM 56-HC/FMUSP.

References

- Kaplan AP. Chronic urticaria: pathogenesis and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **114**:465–74.
- Grattan CE, Francis DM, Hide M, Greaves MW. Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 1991; **21**:695–704.
- Hide M, Francis DM, Grattan CE *et al.* Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 1993; **328**:1599–604.
- Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM *et al.* Classification of anti-Fc ϵ RI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **110**:492–9.
- Sabroe RA, Francis DM, Barr RM *et al.* Anti-Fc(epsilon)RI autoantibodies and basophil histamine releasability in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **102**:651–8.
- Grattan CEH, Walpole D, Francis DM *et al.* Flow cytometric analysis of basophil numbers in chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. *Clin Exp Allergy* 1997; **27**:1417–24.
- Grattan CE, Dawn G, Gibbs S, Francis DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**:337–41.
- Knol EF, Mul FP, Jansen H *et al.* Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; **88**:328–38.
- Buhring HJ, Simmons PJ, Pudney M *et al.* The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; **94**:2343–56.
- Buhring HJ, Streble A, Valent P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; **133**:317–29.
- Binder M, Fierlbeck G, King T *et al.* Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; **129**:160–8.
- Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH *et al.* Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 2006; **61**:1028–39.
- Boumiza R, Monneret G, Forissier MF *et al.* Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**:259–65.
- Yasnowsky KM, Dreskin SC, Efav B *et al.* Chronic urticaria sera increase basophil CD203c expression. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:1430–4.
- Gyimesi E, Sipka S, Dankó K *et al.* Basophil CD63 expression assay on highly sensitized atopic donor leucocytes—a useful method in chronic autoimmune urticaria. *Br J Dermatol* 2004; **151**:388–96.
- Vasagar K, Vonakis BM, Gober LM *et al.* Evidence of *in vivo* basophil activation in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2006; **36**:770–6.
- Ferrer M, Luquin E, Kaplan AP. IL-3 effect on basophils histamine release upon stimulation with chronic urticaria sera. *Allergy* 2003; **58**:802–7.
- Kern F, Lichtenstein LM. Defective histamine release in chronic urticaria. *J Clin Invest* 1976; **57**:1369–77.
- Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; **3**:363–8.
- Luquin E, Kaplan AP, Ferrer M. Increased responsiveness of basophils of patients with chronic urticaria to sera but hyporesponsiveness to other stimuli. *Clin Exp Allergy* 2005; **35**:456–60.
- Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM *et al.* The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 1999; **140**:446–52.
- Hakimi J, Seals C, Kondas JA *et al.* The α subunit of the human IgG receptor (Fc ϵ RI) is sufficient for high-affinity IgE binding. *J Biol Chem* 1990; **265**:22079–81.
- MacGlashan DJ Jr, Lichtenstein LM, McKenzie-White J *et al.* Upregulation of Fc ϵ RI on human basophils by IgE antibody is

986 Activation profile of basophils in chronic urticaria, F.D. Lourenço *et al.*

- mediated by interaction of IgE with FcεpsilonRI. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **104**:492–8.
- 24 MacGlashan D Jr, Schroeder JT. Functional consequences of FcεpsilonRIα up-regulation by IgE in human basophils. *J Leukoc Biol* 2000; **68**:479–86.
 - 25 MacGlashan DW Jr. Relationship between spleen tyrosine kinase and phosphatidylinositol 5' phosphatase expression and secretion from human basophils in the general population. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**:626–33.
 - 26 Xia HZ, Zweiman B, Schwartz LB. Levels of tryptase, chymase, and Fc εpsilon RI α messenger RNA in human skin are unchanged after IgE-dependent stimulation of cutaneous mast cells *in vivo*. *J Allergy Clin Immunol* 1997; **99**:224–6.
 - 27 Yamaguchi M, Sayama K, Yano K *et al.* IgE enhances Fc εpsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc εpsilon receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 1999; **162**:5455–65.
 - 28 Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypo-allergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**:1266–72.
 - 29 Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M *et al.* Transendothelial migration of human basophils. *J Immunol* 2004; **173**:5189–95.
 - 30 Cozon G, Ferrandiz J, Peyramond D, Brunet J. Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients. *Allergol Immunopathol* 1999; **27**:182–7.
 - 31 Vilarinho N, Miura K, MacGlashan DW Jr. Acute IL-3 priming up-regulates the stimulus-induced Raf-1-Mek-Erk cascade independently of IL-3-induced activation of Erk. *J Immunol* 2005; **175**:3006–14.
 - 32 Lantz CS, Boesiger J, Song CH *et al.* Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 1998; **392**:90–3.
 - 33 Valent P, Schmidt G, Besemer J *et al.* Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood* 1989; **73**:1763–79.
 - 34 Zheng X, Karsan A, Duronio V *et al.* Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-κB-dependent and -independent pathways. *Immunology* 2002; **107**:306–15.
 - 35 Vonakis BM, Vasagar K, Gibbons SP Jr *et al.* Basophil FcεpsilonRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**:441–8.

Referências

Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, Levy DA, Pecquet C, Chabane H, et al. Validation of a flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(2 Pt 1):411-8.

Asero R, Tedeschi A, Lorini M, Salimbeni R, Zanoletti T, Miadonna A. Chronic urticaria: novel clinical and serological aspects. *Clin Exp Allergy* 2001;31(7):1105-10.

Asero R, Lorini M, Chong SU, Zuberbier T, Tedeschi A. Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test on human basophils and mast cells. *Clin Exp Allergy* 2004;34(7):1111-4.

Asero R, Tedeschi A, Riboldi P, Cugno M. Plasma of patients with chronic urticaria shows signs of thrombin generation, and its intradermal injection causes wheal-and-flare reactions much more frequently than autologous serum. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(5):1113-7.

Asero R, Riboldi P, Tedeschi A, Cugno M, Meroni P. Chronic urticaria: a disease at a crossroad between autoimmunity and coagulation. *Autoimmun Rev* 2007;7(1):71-6.

Asero R, Cugno M, Tedeschi A. Chronic idiopathic urticaria: what is the meaning of skin reactivity to autologous serum? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22(1):135-6; author reply 136.

Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, et al. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 2003;33(2):259-65.

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

Caproni M, Volpi W, Giomi B, Cardinali C, Antiga E, Melani L, et al. Chronic idiopathic and chronic autoimmune urticaria: clinical and immunopathological features of 68 subjects. *Acta Derm Venereol* 2004;84(4):288-90.

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

Czarnetzki BM, Zwadlo-Klarwasser G, Brocker EB, Sorg C. Immunohistochemical demonstration of migration inhibitory factor in different types of urticaria. *J Invest Dermatol* 1989;93(4):471-4.

Confino-Cohen R, Goldberg A, Aharoni D, Naiman L, Buchs A, Weiss M, et al. Low stimulated IL-4 secretion in PBMC from patients with chronic idiopathic urticaria. *Cytokine* 2004;27(2-3):74-80.

Dos Santos JC, Azor MH, Nojima VY, Lourenco FD, Prearo E, Maruta CW, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *Int Immunopharmacol* 2008;8(10):1433-40.

Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004;34(3):332-9.

Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B. CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy* 2003;33(5):607-14.

Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien 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(10):1102-9.

Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(3):254-60.

Ferrer M, Luquin E, Kaplan AP. IL3 effect on basophils histamine release upon stimulation with chronic urticaria sera. *Allergy* 2003;58(8):802-7.

Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 1998;101(1):243-51.

Fujii K, Konishi K, Kanno Y, Ohgou N. Acute urticaria with elevated circulating interleukin-6 is resistant to anti-histamine treatment. *J Dermatol* 2001;28(5):248-50.

Gillespie SR, DeMartino RR, Zhu J, Chong HJ, Ramirez C, Shelburne CP, et al. IL-10 inhibits Fc epsilon RI expression in mouse mast cells. *J Immunol* 2004;172(5):3181-8.

Grattan CE, Wallington TB, Warin RP, Kennedy CT, Bradfield JW. A serological mediator in chronic idiopathic urticaria--a clinical, immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol* 1986;114(5):583-90.

Grattan CE, Walpole D, Francis DM, Niimi N, Dootson G, Edler S, et al. Flow cytometric analysis of basophil numbers in chronic urticaria: basopenia is related to serum histamine releasing activity. *Clin Exp Allergy* 1997;27(12):1417-24.

Greaves M. Chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(4):664-72.

Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3(5):363-8.

Gruber BL, Baeza ML, Marchese MJ, Agnello V, Kaplan AP. Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 1988;90(2):213-7.

Guerra L, Rogkakou A, Massacane P, Gamalero C, Compalati E, Zanella C, et al. Role of contact sensitization in chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 2007;56(1):88-90.

Guttman-Yassky E, Bergman R, Maor C, Mamorsky M, Pollack S, Shahar E. The autologous serum skin test in a cohort of chronic idiopathic urticaria patients compared to respiratory allergy patients and healthy individuals. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21(1):35-9.

Haas N, Iwen W, Grabbe J, Uchanska-Ziegler B, Czarnetzki BM. MHC class II antigen expression is increased in different forms of urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109(2):177-82.

Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Schernthaner GH, Sperr WR, et al. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(1):102-9.

Hein R. Chronic urticaria: impact of allergic inflammation. *Allergy* 2002;57 Suppl 75:19-24.

Hermes B, Prochazka AK, Haas N, Jurgovsky K, Sticherling M, Henz BM. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(2 Pt 1):307-14.

Hide M, Francis DM, Grattan CE, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 1993;328(22):1599-604.

Hultner L, Moeller J. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 production in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline. *Exp Hematol* 1990;18(8):873-7.

Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol* 1966;97(6):840-53.

Kahlert H, Cromwell O, Fiebig H. Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *Clin Exp Allergy* 2003;33(9):1266-72.

Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen JE, Zhang J, Siraganian RP, et al. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 2001;14(6):801-11.

Kano Y, Orihara M, Shiohara T. Cellular and molecular dynamics in exercise-induced urticarial vasculitis lesions. *Arch Dermatol* 1998;134(1):62-7.

Kaplan MH, Wurster AL, Grusby MJ. A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 1998;188(6):1191-6.

Kepley CL, Pfeiffer JR, Schwartz LB, Wilson BS, Oliver JM. The identification and characterization of umbilical cord blood-derived human basophils. *J Leukoc Biol* 1998;64(4):474-83.

Kern F, Lichtenstein LM. Defective histamine release in chronic urticaria. *J Clin Invest* 1976;57(5):1369-77.

Kikuchi Y, Kaplan AP. Mechanisms of autoimmune activation of basophils in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(6):1056-62.

Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931-72.

Kitaura J, Song J, Tsai M, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Mocsai A, et al. Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcepsilonRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(22):12911-6.

Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88(3 Pt 1):328-38.

Knol EF, Koenderman L, Mul FP, Verhoeven AJ, Roos D. Differential activation of human basophils by anti-IgE and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Indications for protein kinase C-dependent and -independent activation pathways. *Eur J Immunol* 1991;21(4):881-5.

Leznoff A, Josse RG, Denburg J, Dolovich J. Association of chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity. *Arch Dermatol* 1983;119(8):636-40.

Leznoff A, Sussman GL. Syndrome of idiopathic chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity: a study of 90 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84(1):66-71.

Luquin E, Kaplan AP, Ferrer M. Increased responsiveness of basophils of patients with chronic urticaria to sera but hypo-responsiveness to other stimuli. *Clin Exp Allergy* 2005;35(4):456-60.

MacGlashan D, Jr., Lichtenstein LM, McKenzie-White J, Chichester K, Henry AJ, Sutton BJ, et al. Upregulation of FcepsilonRI on human basophils by IgE antibody is mediated by interaction of IgE with FcepsilonRI. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(2 Pt 1):492-8.

MacGlashan DW, Jr. Endocytosis, recycling, and degradation of unoccupied FcepsilonRI in human basophils. *J Leukoc Biol* 2007;82(4):1003-10.

Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 2008;9(6):641-9.

Marone G, Spadaro G, Palumbo C, Condorelli G. The anti-IgE/anti-FcepsilonRIalpha autoantibody network in allergic and autoimmune diseases. *Clin Exp Allergy* 1999;29(1):17-27.

Monge C, Demarco P, Burman KD, Wartofsky L. Autoimmune thyroid disease and chronic urticaria. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67(3):473-5.

Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clin Exp Immunol* 1999;115(3):393-6.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.

Najib U, Sheikh J. The spectrum of chronic urticaria. *Allergy Asthma Proc* 2009;30(1):1-10.

Nguyen KL, Gillis S, MacGlashan DW, Jr. A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE cross-linking. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85(6):102

Niimi N, Francis DM, Kermani F, O'Donnell BF, Hide M, Kobza-Black A, et al. Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):1001-6.

Novak N, Kraft S, Bieber T. IgE receptors. *Curr Opin Immunol* 2001;13(6):721-6.

O'Donnell B, Black AK. Urticarial vasculitis. *Int Angiol* 1995;14(2):166-74.

O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M, Greaves MW. The impact of chronic urticaria on the quality of life. *Br J Dermatol* 1997;136(2):197-201.

Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(3):429-40.

Ott VL, Cambier JC. Activating and inhibitory signaling in mast cells: new opportunities for therapeutic intervention? *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(3):429-40.

Pachlopnik JM, Horn MP, Fux M, Dahinden M, Mandallaz M, Schneeberger D, et al. Natural anti-FcepsilonRIalpha autoantibodies may interfere with diagnostic tests for autoimmune urticaria. *J Autoimmun* 2004;22(1):43-51.

Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML. Chronic urticaria and thyroid autoimmunity. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2005;37(4):143-6.

Piconi S, Trabattoni D, Iemoli E, Fusi ML, Villa ML, Milazzo F, et al. Immune profiles of patients with chronic idiopathic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128(1):59-66.

Prussin C, Metcalfe DD. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2 Suppl):S486-94.

Renauld JC. Interleukin-9: structural characteristics and biologic properties. *Cancer Treat Res* 1995;80:287-303.

Ring J, Brockow K, Ollert M, Engst R. Antihistamines in urticaria. *Clin Exp Allergy* 1999;29 Suppl 1:31-7.

Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* 1992;13(10):379-81.

Rorsman H. Basophilic leucopenia in different forms of urticaria. *Acta Allergol* 1962;17:168-84.

Rottem M. [Allergy and asthma]. *Harefuah* 2002;141(10):891-2, 930.

Sabroe RA, Francis DM, Barr RM, Black AK, Greaves MW. Anti-Fc(epsilon)RI auto antibodies and basophil histamine releasability in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(4 Pt 1):651-8.

Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM, Barr RM, Kobza Black A, Greaves MW. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 1999;140(3):446-52.

Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE, et al. Classification of anti-FcepsilonRI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(3):492-9.

Sabroe RA, Greaves MW. Chronic idiopathic urticaria with functional autoantibodies: 12 years on. *Br J Dermatol* 2006;154(5):813-9.

Saini SS, Klion AD, Holland SM, Hamilton RG, Bochner BS, Macglashan DW, Jr. The relationship between serum IgE and surface levels of FcepsilonR on human leukocytes in various diseases: correlation of expression with FcepsilonRI on basophils but not on monocytes or eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(3):514-20.

Schroeder JT, MacGlashan DW, Jr., Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol* 2001;77:93-122.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2):116-26.

Sibbald RG, Cheema AS, Lozinski A, Tarlo S. Chronic urticaria. Evaluation of the role of physical, immunologic, and other contributory factors. *Int J Dermatol* 1991;30(6):381-6.

Siraganian RP. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* 2003;15(6):639-46.

Soroosh P, Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology* 2009;127(4):450-8.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100(6):655-69.

Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinet JP, Kaplan AP. Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(4):461-5.

Turktas I, Gokcora N, Demirsoy S, Cakir N, Onal E. The association of chronic urticaria and angioedema with autoimmune thyroiditis. *Int J Dermatol* 1997;36(3):187-90.

Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999;402(6760 Suppl):B24-30.

Valent P, Schmidt G, Besemer J, Mayer P, Zenke G, Liehl E, et al. Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood* 1989;73(7):1763-9.

Vasagar K, Vonakis BM, Gober LM, Viksman A, Gibbons SP, Jr., Saini SS. Evidence of in vivo basophil activation in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Allergy* 2006;36(6):770-6.

Verneuil L, Leconte C, Ballet JJ, Coffin C, Laroche D, Izard JP, et al. Association between chronic urticaria and thyroid autoimmunity: a prospective study involving 99 patients. *Dermatology* 2004;208(2):98-103.

von Bubnoff D, Novak N, Kraft S, Bieber T. The central role of Fc epsilonRI in allergy. *Clin Exp Dermatol* 2003;28(2):184-7.

Vonakis BM, Vasagar K, Gibbons SP, Jr., Gober L, Sterba PM, Chang H, et al. Basophil FcεRI histamine release parallels expression of Src-homology 2-containing inositol phosphatases in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(2):441-8.

Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(10):4220-4.

Wedi B, Novacovic V, Koerner M, Kapp A. Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression--inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(3):552-60.

Weiner HL. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 1997;48:341-51.

Wynn TA. Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses. *Nat Immunol* 2009;10(7):679-81.

Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, et al. IgE enhances mouse mast cell Fc(ε)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 1997;185(4):663-72.

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

Zhang S, Lukacs NW, Lawless VA, Kunkel SL, Kaplan MH. Cutting edge: differential expression of chemokines in Th1 and Th2 cells is dependent on Stat6 but not Stat4. *J Immunol* 2000;165(1):10-4.

Zuberbier T, Henz BM, Fiebiger E, Maurer D, Stingl G. Anti-FcepsilonRIalpha serum autoantibodies in different subtypes of urticaria. *Allergy* 2000;55(10):951-4.