

Activação Eosinofílica e Proteína Catiónica do Eosinófilo nas Doenças Pulmonares Intersticiais

LUÍS DELGADO (* #), JOÃO CARLOS WINCK (**), J.A. FLEMING TORRINHA (*)

RESUMO

Os eosinófilos (Eos) participam como células efectoras em muitas doenças inflamatórias e imunológicas dos pulmões. Trabalhos recentes demonstram também o papel da produção local de citocinas na sobrevivência e activação dos Eos no pulmão. Com o objectivo de estudar a activação eosinofílica nestas doenças medimos, em amostras de lavagem broncoalveolar (LBA), os níveis de Proteína Catiónica do Eos (ECP), por RIA, e a expressão nos Eos da sua forma excretada (EG2) e do Receptor 3 do Complemento (CD11b), por imunocitoquímica (APAAP). Seleccionámos 16 casos de alveolites eosinofílicas (+ 4% das células do LBA), a partir de 235 amostras consecutivas, em doentes com patologia do interstício pulmonar. A Fibrose Pulmonar Idiopática foi o diagnóstico mais frequente (7/16) e as contagens mais elevadas de Eos encontraram-se em dois Síndromes Pulmonares Eosinofílicas (SPE). A ECP correlacionou-se significativamente, e de forma positiva com o número de Eos da LBA, bem como com a percentagem de Eos activados (EG2+ ou CD11b+) devido aos seus níveis elevados nos 2 SPE da nossa série. Além disso a percentagem de Eos EG2+ e CD11b+, mas não a ECP, correlacionou-se com os níveis de IgG da LBA. Apesar de neste

grupo de doenças do interstício pulmonar haver uma correlação negativa entre a percentagem de Eos da LBA e a PaO₂ em repouso, não encontramos qualquer correlação entre as provas funcionais respiratórias e a ECP, a expressão EG2 ou CD11b. Concluimos que a activação eosinofílica é um dado frequente nas doenças inflamatórias do interstício que se acompanham do seu recrutamento ao pulmão, onde a presença de eosinófilos que exprimem EG2 ou CD11b se correlaciona com o grau de inflamação intersticial.

PALAVRAS-CHAVE: eosinófilo, activação celular, ECP, imunocitoquímica, doença pulmonar intersticial.

ABSTRACT

Eosinophils (Eos) are prominent cells in many inflammatory and immunologic lung diseases. Recent work underlines the role of local cytokine production in Eos survival and activation within the lung. To study Eos activation in inflammatory lung diseases we measured Eos Cationic Protein (ECP) levels (RIA) and the expression of both its secreted form (EG2) and complement receptor 3 (CD11b) by immunocytochemistry (APAAP), in bronchoalveolar lavage (BAL) samples. We selected 16 cases of eosinophilic alveolitis (+ 4% of BAL cells) from 235 consecutive samples obtained for suspected interstitial lung disease. Idiopathic Pulmonary Fibrosis was the most frequent diagnosis (7/16) and the highest Eos counts were found in two Pulmonary Eosinophilic Syndromes (PES). ECP was significantly and positively correlated with both BAL Eos counts and with the relative numbers of activated eosinophils (EG2+/CD11b+), due to the two PES of our series. Moreover activated eosinophils, but not ECP, were positively correlated with

* Serviço de Imunologia, Faculdade de Medicina e Hospital S. João, Porto. (Director: Prof. Doutor J.A. Fleming Torrinha)

Unidade de Imunoalergologia, Hospital S. João, Porto. (Director: Dr.ª Mariana Vaz)

** Serviço de Pneumologia 1 (Director: Dr. Fernando Filipe Rodrigues), Departamento de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia (Director: Dr. Ramalho de Almeida)

O trabalho de investigação apresentado neste artigo foi galardoado com o Prémio Bayer/Dhome Hollister Stier 1991, da Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica e com o prémio do melhor trabalho apresentado nas 2.ªs Jornadas Pneumológicas do Porto de 1992, encontrando-se publicado em resumo no Allergy, 47, 12 suppl: 5; 1992.

IgG levels. Although in this group of interstitial lung diseases there was a negative correlation between BAL Eos counts (%) and resting PaO₂, no correlation was seen between pulmonary function data and ECP, EG2, or CD11b expression. In conclusion, eosinophil activation is a prominent feature in the eosinophilic alveolitis of some interstitial lung diseases, where EG2 and CD11b expression in BAL eosinophils seems to be related to interstitial lung inflammation.

KEY-WORDS: eosinophils, cellular activation, ECP, immunocytochemistry, interstitial lung diseases.

INTRODUÇÃO

Desde a sua descrição por Paul Erlich, nos finais do séc. XIX, o eosinófilo é considerado uma das células mais características da resposta inflamatória que acompanha as doenças alérgicas e parasitárias, situações que têm servido de base para a caracterização da sua actividade citotóxica e pró-inflamatória.^{1,3} A actividade biológica do eosinófilo depende essencialmente do seu conteúdo em mediadores específicos⁴ - a proteína básica major (MBP), a proteína catiónica (ECP), a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e uma peroxidase (EPO) - todos eles potencialmente lesivos para o tecido pulmonar.^{5,6}

Os mecanismos de activação do eosinófilo têm sido essencialmente estudados nas doenças alérgicas^{4,6,7} e, frequentemente, a partir de células do sangue periférico.⁸⁻¹³ No entanto, o destino e funcionamento dos eosinófilos, após a sua migração tecidual, é menos conhecido.¹⁴⁻¹⁸

Este trabalho foi realizado com objectivo de estudar sinais de activação eosinofílica em células obtidas por lavagem broncoalveolar (LBA), em diversas situações inflamatórias que se acompanham do seu recrutamento preferencial ao pulmão.¹⁹⁻²³ A lavagem broncoalveolar tem sido largamente usada na avaliação da infiltração inflamatória do interstício pulmonar onde, habitualmente, estas células não constituem, mais de 1% do total.²³⁻²⁶

Assim, de 235 doentes estudados por suspeita de doença pulmonar intersticial, seleccionamos 16 casos com valores de eosinófilos superiores ou iguais a 4% na LBA, valor que ultrapassa os limites de confiança de 95% da população normal em séries de referência publicadas.^{24,26} Para além da contagem total e diferencial das células inflamatórias da LBA, medimos os níveis de IgG e Albumina, como marcadores da inflamação intersticial²⁴ e também de ECP, uma das proteínas da matriz dos grânulos dos eosinófilos²⁸ e cuja presença em líquidos biológicos tem

sido correlacionada com a activação local destas células.^{17,21}

Estudámos também, por imunocitoquímica, a expressão de dois antigénios de activação eosinofílica: a forma excretada de ECP, pela reactividade com o anticorpo (atc) monoclonal EG2²⁹ e o Receptor 3 do Complemento - CR3, pela reactividade com o atc monoclonal para a sua cadeia alfa - CD11b³⁰. O atc EG2 não reage com eosinófilos normais mas apenas com células activadas "in vitro" ou "in vivo", reconhecendo uma sequência comum nas formas excretadas de ECP e EDN.²⁹⁻³¹ O CD11b, uma molécula da família das proteínas de adesão leucocitária, tem uma baixa expressão em eosinófilos normais aumentando em células hipodensas e activadas³⁰ e está envolvida nos mecanismos de citotoxicidade e de adesão endotelial dos eosinófilos activados.^{30,32}

Os resultados permitiram-nos verificar que a activação eosinofílica é um dado frequente nas doenças inflamatórias do interstício que se acompanham do seu recrutamento ao pulmão, onde a presença de eosinófilos que exprimem EG2 ou CD11b se correlaciona com o grau de inflamação intersticial. Sugerimos, também, um papel do macrófago alveolar na captação de ECP excretada no interstício pulmonar.

DOENTES E MÉTODOS

DOENTES:

Neste estudo incluímos 16 doentes, seleccionados de um total de 235 casos estudados por suspeita de patologia pulmonar intersticial e dado apresentarem um número de eosinófilos superior a 4% das células recuperadas na LBA (Quadro 1). Seis doentes eram do sexo feminino e 10 do sexo masculino, com um média de idades de 42±16 anos e apenas 4 eram fumadores (doentes n.º 2, 8, 11 e 12). O tempo médio de evolução da doença foi de 3,4 anos, tendo 5 doentes risco ocupacional.

Todos os doentes foram enviados ao Sector de Broncologia do Departamento de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia ou ao Laboratório de Endoscopia do Serviço de Pneumologia do Hospital de S. João, após avaliação clínica que inclui telerradiografia pulmonar, exame funcional respiratório e os exames complementares de diagnóstico relevantes. Na altura da LBA, realizada na perspectiva de complementar o diagnóstico, nenhum doente estava com terapêutica imunomoduladora. Os dados da avaliação clínica e complementar de diagnóstico destes doentes estão descritos em promenor em publicação anterior.³³ Resumidamente, todos apresentavam alterações no Rx do tórax e 11 (69%) alterações nas

provas funcionais respiratórias, todos com defeito restrictivo; 10 dos 14 doentes (71%) estudados com difusão de Co tinham-na diminuída e 60% (9 em 15) hipoxemia em repouso.

Em 7 doentes foi feito o diagnóstico de Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) por apresentarem um quadro caracterizado por história clínica compatível, síndrome ventilatório restrictivo, infiltrados intersticiais difusos no Rx, na ausência de risco ocupacional e com uma biópsia pulmonar demonstrando fibrose e/ou LBA traduzindo alveolite inflamatória. Se o quadro anterior estivesse associado a algum risco ocupacional era considerado, para efeitos de diagnóstico, como Fibrose Pulmonar Difusa (em 4 doentes) dada a impossibilidade de uma caracterização etiopatogénica mais precisa pelos dados disponíveis. Os diagnósticos de Sarcoidose (1 doente), Pneumonite de Hipersensibilidade (2 doentes) e Síndrome Pulmonar Eosinofílica (2 doentes) foram baseados nos critérios habituais.²⁷

QUADRO 1

Dados clínicos e da Lavagem Broncoalveolar dos doentes estudados

Doente n.º	Idade / sexo	Diagnóstico (1)	Tipo de alveolite na LBA (2)	% Eosinófilos na LBA	Total de Eosinófilos $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ LBA
1	44/M	FPI	N + E	15,6	10,6
2	40/M	FPI	L + E	44,8	14,6
3	10/F	FPI	L + N + E	7,4	6,1
4	44/F	FPI	L + N + E	12,6	3,6
5	72/F	FPI	N + E	10,6	4,8
6	68/M	FPI	L + N + E	12,2	9,5
7	46/F	FPI	L + N + E	6,4	3,2
8	49/M	FPD	E	4,2	2,4
9	54/M	FPD	N + E	5,3	0,4
10	36/F	FPD	N + E	6,4	3,2
11	55/M	FPD	L + E	22,5	9,0
12	28/M	Sarcoidose	L + E	4,7	2,2
13	33/M	PH	L + N + E	4,4	5,0
14	37/M	PH	L + E	5	6,8
15	60/F	SPE	E	86,9	138,2
16	15/M	SPE	E	76,2	238,5

(1) FPI - Fibrose Pulmonar Idiopática; FPD - Fibrose Pulmonar Difusa; PH - Pneumonite de Hipersensibilidade; SPE - Síndrome Pulmonar Eosinofílica
(2) N - Alveolite neutrofílica (> 5% de neutrófilos), L - alveolite linfocítica (> 15% de linfócitos), E - eosinofílica (> 4% de eosinófilos)

LAVAGEM BRONCOALVEOLAR:

A LBA, bem como o seu processamento, foi realizada segundo as recomendações do European Society of Pneumology Task Group on BAL¹¹, utilizando 4 x 50 ml de soro fisiológico tamponado a 37° C, num dos subsegmentos do lobo médio ou língula. O líquido recuperado foi mantido a 4° C e transportado de imediato ao laboratório.

CÉLULAS NA LBA:

Após chegada ao laboratório, as 3 últimas amostras recuperadas foram misturadas de imediato e avaliada a sua celularidade total, em câmara de Newbauer, e viabilidade pela exclusão do azul de tripano. A contagem diferencial foi realizada em preparações de citocentrífuga, centrifugando 50 µl da amostra, contando por microscopia óptica e com grande ampliação 500 leucócitos, em lâminas coradas pelo Wright-Giemsa.

PROTEÍNAS DA LBA:

Uma amostra da LBA foi centrifugada para recuperação do sobrenadante e este congelado em partes iguais a -20° C, até à realização dos doseamentos. A IgG e Albumina foram doseadas em amostras não concentradas por imunonefelometria cinética³³, usando o nefelómetro QM 300, imunossoros e amostras padrão da Kallestad Diagnostics com um limite de doseamento de 1,1 mg/100 ml para a IgG e de 4,2 mg/100 ml para a Albumina. Os limites de confiança de 95% em séries publicadas são inferiores a 2,2 mg/100 ml para a IgG e inferiores a 9,1 mg/100 ml para a Albumina.²⁴ Em 14 casos, foi possível medir a ECP em amostras não concentradas por um método radioimunológico³⁴ (ECP Ria Pharmacia) seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, a ECP da amostra compete com ECP marcada radioativamente para um atc monoclonal anti-ECP; os complexos atg-atc assim formados são precipitados por dois atc policlonais, um dos quais ligado a Sepharose. A radioactividade no precipitado é inversamente proporcional à quantidade de ECP na amostra, sendo o limite inferior de doseamento de 2 µg/l. Os valores normais de referência publicados para este método são < 16 µg/ml no soro³⁴ e < 5 µg/ml na LBA.²¹

IMUNOCITOQUÍMICA:

A expressão de antígenos de superfície nas células da LBA foi estudada em preparações de citocentrífuga previamente congeladas, pelo método da fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina APAAP³⁵, usando os anticorpos monoclonais EG2 (Pharmacia) e anti-CD11b (Dako) em diluições apropriadas. Como controlo utilizaram-se também esfregaços de sangue de um doente com Síndrome Hipereosinofílica Idiopática, onde 65% dos eosinófilos marcaram com o anticorpo EG2 e 95% com o anti-CD11b.

CÉLULAS DA LBA:

Os dados da LBA mostraram um aumento da celularidade total em 11 casos, apresentando 9 doentes uma recuperação do volume total instilado inferior a 50%. Os 2 casos de SPE (n.ºs 14 e 15) apresentaram

as eosinoflias mais significativas (86,9 e 76,2%). Na maioria dos doentes (14 em 16) verificou-se, para além da existência de uma alveolite eosinoflica, um aumento concomitante de linfócitos e/ou neutrófilos (Quadro 1). A eosinofilia periférica ($> 500/\text{mm}^3$) estava presente em apenas 3 doentes, simultaneamente os casos com maior eosinofilia da LBA (casos 2, 15, 16).

Excluindo os 2 SPE (de evolução clínica mais rápida e com marcada eosinofilia da LBA), verificámos que os doentes com FPI apresentaram valores relativos de eosinofilia significativamente mais elevados do que os restantes doentes (média geométrica FPI = $12,9 \pm 2,2$ versus $6,1 \pm 1,8\%$, $p = 0,04$, Mann Whitney test) e que havia uma correlação significativa entre a percentagem de eosinófilos e o grau de hipoxemia em repouso ($r = -0,68$, $p = 0,02$, Spearman rank correlation).

PROTEÍNAS DA LBA:

A maior parte dos doentes (10/14; 71%) apresentaram níveis aumentados de IgG na LBA concomitantemente com aumentos da albumina (Quadro 2) com uma correlação significativa entre as duas proteínas ($r = 0,89$, $p = 0,001$).

QUADRO 2

Proteínas no líquido de Lavagem Broncoalveolar e marcadores de activação eosinoflica

Caso n.º	Diagnóstico	IgG	ALB	ECP	EG2+	CD11b+	MacEG2+	Eos%
1	FPI	1.1	5.3	2.8	9.8	2.2	0.6	15.6
2	FPI	45.3	105.0	5.2	31.2	16.6	4.6	44.8
3	FPI	4.2	5.2	6.8	3.9	1.4	0.9	7.4
4	FPI	8.5	12.0	22.0	11.0	1.8	3.1	12.6
6	FPI	10.4	8.7	10.5	11.4	4.0	7.9	12.2
7	FPI	1.6	5.7	3.6	6.9	0.3	11.6	6.4
8	FPD	1.2	5.6	6.2	1.9	0.4	0.4	4.2
9	FPD	2.2	4.7	5.0	3.6	3.3	2.9	5.3
11	FPD	15.9	13.5	5.2	18.2	1.8	0.8	22.5
12	Sarc.	20.9	48.4	<2.0	2.8	1.0	0.6	4.7
13	PH	15.3	10.5	<2.0	2.8	4.4	0.2	4.4
14	PH	3.0	7.0	5.0	3.9	0.2	0.0	5.0
15	SPE	26.3	27.9	72.0	64.0	39.7	6.3	86.9
16	SPE	21.3	19.7	30.0	35.5	16.2	17.5	76.2
\bar{x}		12.7	19.9	12.5	14.8	6.7	4.1	22.0
(EPM)		(3.4)	(7.3)	(5.0)	(4.7)	(2.9)	(1.4)	(7.4)

IgG, Alb (mg/100 ml); ECP ($\mu\text{g/l}$); EG2+, CD11b, MacEG2+ e Eos em % de células do LBA.

Um aumento da ECP ($> 5 \mu\text{g/ml}$) estava presente em 57% dos doentes. Os seus níveis correlacionaram-se directamente com o número relativo de eosinófilos na LBA (ECP/Eos % $r = 0,60$, $p = 0,03$), quando se incluiu os dois SPE, os casos que apresentaram valores mais elevados destes dois parâmetros (Quadro 2 e 3). Na restante patologia do interstício pulmonar os níveis de ECP foram mais elevados na FPI (média geométrica $6,6 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$ versus $2,4 \pm 3,4 \mu\text{g/L}$).

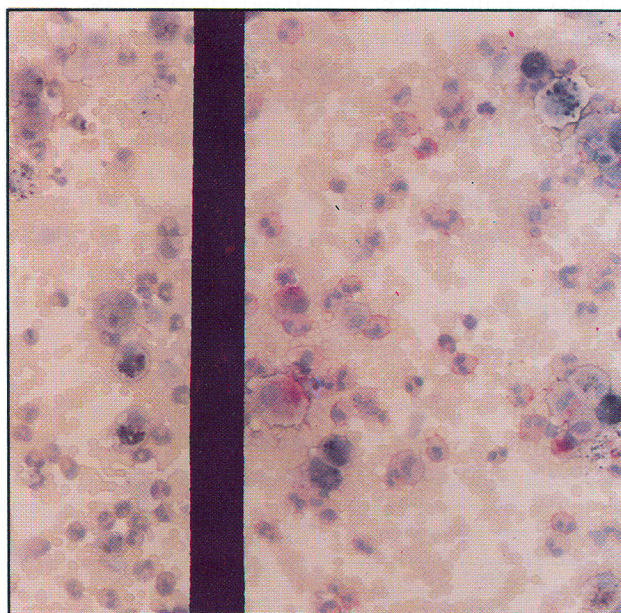


Figura 1 - Imunocitoquímica do caso n.º 15. A reactividade com o anticorpo monoclonal EG2 (à Direita) é demonstrada pela coloração vermelha dada pelo substrato, comparativamente com o de um esfregão controle (à Esquerda) sem adição desse anticorpo (APAAP, x50).

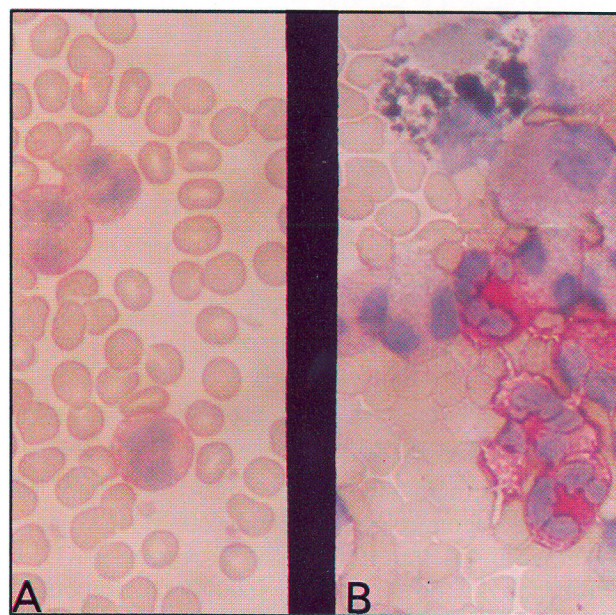


Figura 2 - Expressão do CD11b nos eosinófilos no caso n.º 15, no sangue (A) e na LBA (B) (APAAP, x200). É evidente a maior intensidade de marcação nos eosinófilos pulmonares.

IMUNOCITOQUÍMICA:

A utilização dos anticorpos monoclonais EG2 e anti-CD11b permitiu verificar sinais de activação celular numa percentagem importante dos eosinófilos recuperados na LBA: $71 \pm 18\%$ (52 a 100%) EG2+ e $28 \pm 27\%$ (4 a 37%) CD11b+ (Fig. 1 e 2). O número relativo de eosinófilos EG2+ na LBA - $8,4 \pm 1,3\%$ (média geométrica e erro padrão da média) foi significativamente maior que os CD11b+ - $2,3 \pm 1,5\%$ ($p=0,026$, Mann Whitney test) e estava particularmente elevado nos SPE (Quadro 3) e nas FPI ($10,0 \pm 2,0\%$ versus $4,0 \pm 2,2\%$ nas outras patologias do interstício, $p=0,05$). Apesar de percentualmente mais baixa que a EG2, a expressão de CD11b nos eosinófilos da LBA foi caracteristicamente mais intensa do que nos circulantes (Fig. 2). O seu número relativo na LBA correlacionou-se com o de eosinófilos EG2+ ($r=0,61$, $p=0,03$, Spearman rank correlation).

Comparando a expressão destes marcadores de activação eosinofílica com as proteínas da LBA verificamos que, quando se incluía os dois SPE, se correlacionaram significativamente com os níveis de ECP (EG2 $r=0,63$, $p=0,02$) e com os níveis de IgG (EG2/IgG $r=0,57$, $p=0,04$; CD11b/IgG $r=0,64$, $p=0,02$).

O anticorpo monoclonal EG2 marcou também alguns macrófagos alveolares (Fig. 3), praticamente em todos os casos estudados (Quadro 2). A sua presença correlacionou-se significativamente com a eosinofilia

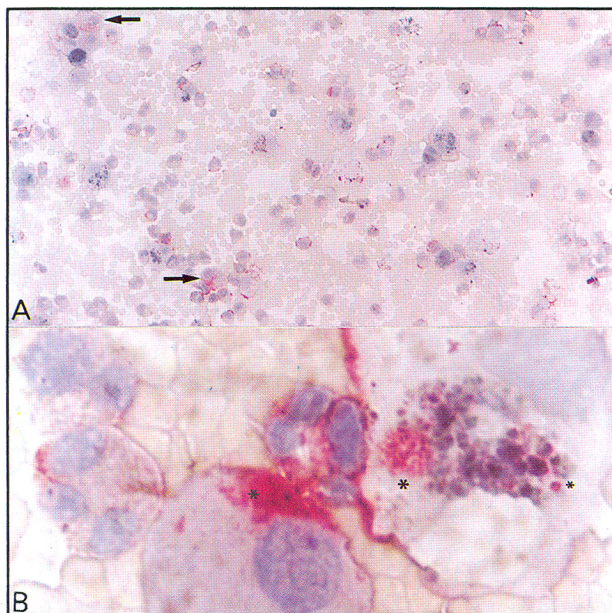


Figura 3 - Reactividade do anticorpo monoclonal EG2 com eosinófilos e macrófagos alveolares (\downarrow) na LBA do caso n.º 15. (A) Presença de intensa eosinofilia e extensa hemorragia alveolar, contendo alguns macrófagos pigmento hemossidérico (APAAP x50). (B) A marcação EG2 está presente nos eosinófilos e também no citoplasma de alguns macrófagos alveolares (*) (x200).

da LBA (eosinófilos % $r=0,65$, $p=0,02$) com a expressão percentual de EG2 nos eosinófilos pulmonares ($r=0,70$, $p=0,01$) e com os níveis de ECP na LBA ($r=0,58$, $p=0,04$).

Apesar da correlação negativa entre a percentagem de eosinófilos na LBA e a PaO_2 em repouso que referimos, não encontramos qualquer outra correlação significativa entre os marcadores de activação eosinofílica e os dados da avaliação funcional respiratória.

DISCUSSÃO

Neste estudo, em que investigamos a activação de eosinófilos pulmonares obtidos pela LBA em doenças do interstício, podemos concluir que:

1) a presença de eosinófilos activados, i.e. que exprimem as formas excretadas da ECP/EDN (EG2+) ou CR3 (CD11b+), é um dado frequente nas alveolites eosinofílicas (EG2+ 52 a 100% e CD11b+ 4 a 37%);

2) a ECP, um dos mediadores citotóxicos pré-formados nos grânulos dos eosinófilos, encontra-se muitas vezes em concentrações elevadas na LBA das patologias que se acompanham de alveolite eosinofílica, correlacionando-se os seus níveis com o número relativo de eosinófilos activados;

3) nas eosinofílias que acompanham as alveolites mistas de algumas doenças do interstício pulmonar, a presença de eosinófilos activados correlaciona-se significativamente com as concentrações de IgG no LBA, traduzindo possivelmente a sua relação com o grau de inflamação intersticial;

4) a forma excretada da ECP/EDN, estudada pela reactividade por imunocitoquímica com o anticorpo EG2, parece estar também presente nalguns macrófagos alveolares, sobretudo nos casos de maior eosinofilia e naqueles com maior expressão deste antigénio nos eosinófilos pulmonares. Assim, sugerimos que estas células poderão estar envolvidas na captção de ECP excretada no interstício e/ou espaço alveolar, possivelmente através da sua interacção com alfa2-macroglobulina³⁶ e dos receptores macrofágicos para os complexos alfa2-macroglobulina-proteinase.³⁷

No nosso estudo a Fibrose Pulmonar Idiopática foi a entidade mais representada e os Síndromes Pulmonares Eosinofílicas a patologia com eosinofilia mais significativa (Quadro 1), o que está de acordo com outras séries publicadas.^{5, 23, 38, 39}

No nosso grupo de doentes com eosinofílias mais moderadas (casos 1 a 14) o número relativo de eosinófilos correlacionou-se com a gravidade da hipoxemia o que, possivelmente, representa a sua

reconhecida patogenicidade nestas patologias.^{21, 22-40, 41} Neste estudo, à exclusão dos SPE, o subgrupo com FPI foi o que evidenciou maior activação eosinofílica na LBA (% Eos, % eos EG2+ e concentrações de ECP), o que está de acordo com dados clínicos obtidos pelo seguimento de doentes com FPI, que têm demonstrado que a eosinofilia se associa a pior evolução e à necessidade de terapêutica com ciclofosfamida.⁴¹⁻⁴⁴

Está hoje em dia bem estabelecido que os eosinófilos são células potencialmente agressoras do parênquima pulmonar,^{28, 45, 46} respondendo a um grupo de estímulos quimiotáticos que podem ser gerados no pulmão - PAF, leucotrieno B₄, C₅a e factores quimiotáticos dos mastócitos.^{4, 6, 47} Dados recentes apontam, também, para um contolo da sua diferenciação e activação por citocinas, como a IL5 e GM-CSF produzidos por linfócitos T^{30, 32, 47-50} e outras células do parênquima pulmonar.⁵¹⁻⁵³

Algumas observações do nosso estudo reforçam também a hipótese de uma interacção entre linfócitos e eosinófilos activados na inflamação do interstício pulmonar. Assim, nas formas mais habituais de alveolite eosinofílica por nós observadas - eosinofilias moderadas acompanhando alveolites mistas - foi frequente a presença simultânea de linfocitose da LBA (9 dos primeiros 14 casos, Quadro 1), sobretudo nos doentes com menor tempo de evolução. Também, a correlação directa entre eosinófilos activados e níveis de IgG da LBA sugerem que essa activação «in vivo» se relaciona com o grau de inflamação intersticial.

Apoiando a existência de uma activação «in vivo» destas células nas doenças do interstício com alveolite eosinofílica, encontramos no líquido da LBA níveis elevados de ECP em 57% dos casos e uma correlação significativa dos seus níveis com o número relativo de eosinófilos EG2+ ou CD11b+. A ECP, um dos principais mediadores citotóxicos dos eosinófilos, é uma das proteínas catiónicas pré-formadas nos seus grânulos,^{6, 8, 29} com semelhanças bioquímicas, antigénicas e funcionais com a EDN, ambas possivelmente membros da «superfamília» génica das RNases.^{8, 28, 29, 54} A sua excreção parece ocorrer selectivamente após estímulos fagocíticos e via receptores para o complemento^{29, 55} e para a IgG na membrana celular do eosinófilo.⁵⁶ A sua presença em líquidos biológicos^{21, 13, 16, 17} e nos tecidos^{29, 31} tem sido relacionada com a activação «in vivo» destas células.

O facto de não encontrarmos qualquer correlação entre os níveis de ECP na LBA e os parâmetros de deterioração funcional respiratória, já descrita por outros autores na FPI,²¹ pensamos poder ser atribuída à heterogeneidade da população por nós estudada, com um número mais limitado desta patologia.

As correlações encontradas entre os marcadores de activação - EG2/CD11b - e destes com os níveis de IgG e de ECP na LBA, sugerem que as interacções descritas «in vitro» entre os receptores celulares para o complemento, a citotoxicidade mediada pela IgG e a excreção selectiva de ECP^{3, 55, 56} podem também estar envolvidas na patogenia de algumas doenças pulmonares intersticiais.

O estudo por imunocitoquímica de antigénios preferencialmente expressos em eosinófilos activados,^{3, 9, 29-31} permitiu-nos confirmar que a sua migração para o interstício pulmonar e espaço alveolar se acompanha de activação celular e excreção de mediadores citotóxicos dos seus grânulos (Fig. 1 e 2, Quadro 2). O anticorpo EG2 não reage com eosinófilos circulantes normais, reconhecendo uma estrutura antigénica comum à ECP e EDN nas suas formas excretadas após activação celular «in vivo» ou «in vitro».^{29, 31, 57}

Excepto num caso de suberose com intensa linfocitose (n.º 13, Quadro 1), a reactividade dos eosinófilos com o anticorpo EG2 foi sempre maior que a do anti-CD11b (Quadro 3), mas com uma correlação significativa entre a percentagem de células positivas com cada um dos marcadores, o que nos parece suportar a hipótese de que a relação selectiva entre a estimulação via CR3 e a excreção de ECP nos eosinófilos⁵⁵⁻⁵⁷ possa também existir «in vivo». O CD11b, a cadeia alfa do receptor 3 do complemento (CR3), é uma proteína de adesão celular,^{30, 32} cuja expressão nos eosinófilos é heterogénea³ (Fig. 2) e que aumenta significativamente após estimulação «in vivo» ou «in vitro»,^{3, 30, 32} estando particularmente envolvido na adesão leucocitária e endotelial de eosinófilos activados nomeadamente pelo PAF e interleucina 5 e na potenciação da sua citotoxicidade.^{32, 58, 59}

No nosso estudo, nos casos em que foi efectuada simultaneamente a marcação CD11b no sangue periférico com a da LBA, esta, apesar de heterogénea, foi sempre mais intensa nos eosinófilos do pulmão (Fig. 2).

A reactividade inesperada de alguns macrófagos alveolares com o anticorpo monoclonal anti-EG2, que nos parece ser uma observação original, poderá eventualmente representar uma reacção inespecífica ou de mera localização extracelular da proteína que identifica.^{29, 56} No entanto, apesar de frequentemente aparecer em células adjacentes a eosinófilos positivos e por vezes surgir alguma reactividade extracelular, a marcação surge também em macrófagos isolados e associada aos seus vacúolos e grânulos intracitoplas-

máticos (Fig. 3) Esta localização selectiva e a correlação significativa com a eosinofilia e a expressão de EG2 nos eosinófilos da LBA, sugerem-nos um papel destas células na eventual captação e metabolismo da ECP. Também, a descrição de uma reactividade marcada com este anticorpo nos granulomas de dois doentes com Síndrome de Churg-Strauss, ³¹ favorece a verdadeira especificidade desta marcação, já que é o caso da nossa série (Quadro 3, Fig. 3) em que encontramos uma maior positividade dos macrófagos alveolares.

O mecanismo de eliminação «in vivo» da ECP não estão estabelecido ³⁴ mas a sua ligação à alfa2-macroglobulina sugere a possibilidade da sua captação celular. O facto dos macrófagos alveolares produzirem alfa2-macroglobulina ⁶⁰ e de poderem captar complexos proteinase-alfa2-macroglobulina ^{37,61} torna esta hipótese particularmente atraente. Por outro lado, foi já anteriormente descrito um aumento dos níveis de alfa2-macroglobulina do LLBA nas doenças pulmonares intersticiais em actividade, ^{62, 63} o que reforça a ideia que a produção local de alfa2-macroglobulina pelo macrófago alveolar poderá contribuir para a actividade moduladora destas células em relação à agressão pulmonar por vários estímulos ^{64, 65} e, nomeadamente, pela ECP.

Em conclusão, este estudo parece-nos confirmar a hipótese colocada de que nalgumas doenças pulmonares intersticiais o recrutamento de eosinófilos ao pulmão acompanha-se da sua activação local, mesmo na ausência de um mecanismo mediado pela IgE, envolvendo possivelmente uma agressão tecidual pela excreção da sua Proteína Catiónica. A medição desta no líquido de Lavagem Broncoalveolar relaciona-se bem como a expressão de marcadores de actividade no eosinófilo, sugerindo que os seus níveis poderão dar alguma informação clínica sobre a intensidade da agressão pulmonar pelos eosinófilos. Por outro lado, o desenvolvimento recente de fármacos com uma importante acção inibitória sobre os eosinófilos ⁶⁶ permite perspectivar, no futuro, uma intervenção terapêutica mais selectiva nas doenças que, de uma forma aguda ou crónica, envolvem o seu recrutamento e activação no interstício pulmonar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Drs. João Moura e Sá e Luís Goes Pinheiro a realização e obtenção do material da LBA, bem como a todos os Colegas que nos permitiram estudar os seus doentes. Agradecem, também, aos Drs. José Pedro Moreira da Silva e Francisco Carballada as sugestões críticas ao manuscrito. O Dr. Luís Delgado é bolseiro do INIC.

BIBLIOGRAFIA

1. Czarnetzki BM. Les polynucléaires éosinophiles. *Ann Dermatol Venerol* 1987; 114: 1147-1156.
2. Bruinjnzeel PLB. Contribution of eosinophil-derived mediation in asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90: 57-63.
3. Capron M, Kazatchine MP, Fischer E, Joseph M, Butterworth AE et al. Functional role of the alpha chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against Schistosomes. *J Immunol* 1987; 139: 2059-65.
4. Lefferman KM. A current perspective on the role of eosinophils in dermatologic diseases. *J Am Ac Dermatol* 1991; 24: 6 (pt 2), 1101-12.
5. Enright T, Chua S, Lim DT. Pulmonary Eosinophylic Syndromes. *Ann Allergy* 1989; 62: 227-83.
6. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma-current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85 (2): 422-35.
7. Carlsson M, Hakansson L, Peterson C, Stalenheim G, Venge P. Secretion of granule proteins from eosinophils and neutrophils is increased in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 27-33.
8. Venge P, Dahl K, Fredens K, Hallgren R, Peterson C. Eosinophil Cationic Proteins (ECP and EPX) in health and disease. Immunobiology of the Eosinophil. Yoshida T, Torisu M, eds. Elsevier Science Publishing Co, Inc. 1983; 163-79.
9. Hansell TT, Pound JD, Thompson RA. Isolation of eosinophils from human blood. *J Immunol Methods* 1990; 127: 153-64.
10. Dahl, Venge P, Olsson I. Variations of blood eosinophils and Eosinophil Cationic Protein in serum in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1978; 33: 211-5.
11. Venge P, Dahl R, Peterson CGB. Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effects of anti-asthmatic medication. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 87: 306-12.
12. Griffin E, Hakansson L, Formgren H, Jorgensen K, Peterson C, Venge P. Blood eosinophils number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 548-57.
13. Winqvist I, Olsson I, Werner S, Stenstam M. Variations of cationic proteins from eosinophil leukocytes in food intolerance and allergic rhinitis. *Allergy* 1981; 36: 419-23.
14. Prin L, Capron M, Gosset P, Wallaert B, Kurnier JP et al. Eosinophilic lung diseases: immunological studies of blood and alveolar eosinophils. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 249-57.
15. Ogushi F, Ozaki T, Kawaqno T, Yasuoko S. PEG2 and PGF2 alpha content in bronchoalveolar lavage fluid obtained from patients with Eosinophilic Pneumonia. *Chest* 1987; 91 (2): 204-6.
16. Friga E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ. Elevated levels of the eosinophil granule Major Basic Protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clinic Proceedings* 1981; 56: 345-53.
17. Linder A, Venge P, Deuschl H. Eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in nasal secretion as markers of inflammation in allergic rhinitis. *Allergy* 1987; 42: 583-90.
18. Zweiman B, Atkins PC, von Allmen C, Gleich GJ. Release of eosinophil granule proteins during IgE-mediated allergic skin reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 984-92.
19. Foresi A, Pesci A, Olivieri D. Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma during remission. *Chest* 1990; 98 (3): 528-35.
20. Fink JN, deShazo R. Immunologic aspects of granulomatous and interstitial lung diseases. *JAMA* 1987; 258 (20): 2938-44.
21. Hallgren R, Bjermer L, Lundgren R, Venge P. The eosinophil component of alveolitis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 373-7.

22. **Rudd RM, Haslam PL, Turner-Warwick M.** Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. Relationships of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to response to treatment and prognosis. *Am Rev Respir Dis*; 124: 1-8.
23. **Daniel C, Israel-Biet D, Costabel U, Rossi GA, Wallaert B.** The clinical role of BAL in eosinophilic lung diseases. Klech H, Hutter C eds. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990; 3: 9-50.
24. **The BAL Cooperative Group Steering Committee.** Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, Idiopathic Pulmonary Fibrosis and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141 (5 pt 2): S169-201.
25. **Daniel RP.** Bronchoalveolar lavage. Daniel RP ed. Immunology and Immunologic Diseases of the Lung. *Blackwell Scientific Publications* 1988; 14 (pt 2): 303-18.
26. **Klech H, Pohl W** eds. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2: 561-85.
27. **Daniel RP** ed. Immunology and Immunologic Diseases of the Lung. *Blackwell Scientific Publications* 1988; III: 293-678.
28. **Hamman K, Barker RL, Ten RM, Gleich GJ.** The molecular biology of Eosinophil Granule Proteins. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94: 202-9.
29. **Tai PC, Spry CJF, Peterson C, Venge P, Olsson I.** Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 1984; 309: 182-4.
30. **Thorne KJ, Richardson BA, Mazza G, Butterworth AE.** A new method for measuring eosinophil activating factors, based on the increased expression of CR3alpha chain (CD11b) on the surface of the activated eosinophils. *J Immunol Methods* 1990; 133: 47-54.
31. **Spry CJJ, Tai RC, Barkans J.** Time localization of human eosinophil cationic proteins in allergic diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77: 252-4.
32. **Walsh GM, Wardlaw AJ, Hartnell A, Sanderson CJ, Kay AB.** Interleukin 5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leukocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94: 174-8.
33. **Delgado L, Winck JC, Torres da Costa J, Goes Pinheiro L, Moura e Sá J e Fleming Torrinha JA.** O Eosinófilo na suspeita de patologia Pulmonar Intersticial. Contributo da lavagem broncoalveolar na sua caracterização. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia* 1992; 1 (2): 34-9.
34. **Peterson CGB, Enander I, Nystrand J, Anderson AS, Nilsson L, Venge P.** Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein (ECP) by an improved method. Establishment of normal levels in serum and in vivo. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 561-7.
35. **Mason DY.** Techniques in Immunocytochemistry vol. 3. **Bullock CR, Petrusz P,** eds. *Academic Press* 1985; 25-42.
36. **Peterson CGB, Venge P.** Interaction and complex-formation between the eosinophil cationic protein and alpha2-macroglobulin. *Biochem J* 1987; 245: 781-7.
37. **Debanne MT, Bell R, Dolovich J.** Uptake of proteinase-alpha2-macroglobulin complexes by macrophages. *Bioch Biophys Acta* 1976; 411: 295-304.
38. **Allen JN, Davis BW, Pacht ER.** Diagnostic significance of increased bronchoalveolar lavage fluid eosinophils. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 642-7.
39. **Haslam PL, Turton CWG, Lukoszek A, Salsbury AJ, Dewar A, Collins JV, Turner-Warwick M.** Bronchoalveolar lavage fluid cell counts in cryptogenic fibrosing alveolitis and their relation to therapy. *Thorax* 1980; 35: 328-39.
40. **Haslam PL, Poulter LW, Rossi GA, Bauer W, De Rose V, Eckert H, Olivieri D, Teschler H.** The clinical role of BAL in idiopathic pulmonary fibrosis. **Klech H, Hutter C** eds. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990; 3: 940-2.
41. **Haslam P.** Cryptogenic fibrosing alveolitis: pathogenetic mechanisms and therapeutic approaches. Bronchoalveolar lavage: New insights in research and clinical application. Workshop report. *Eur Respir J* 1990; 3: 355-7.
42. **Turner-Warwick M, Haslam PL.** The value of serial bronchoalveolar lavages in assessing the clinical progress of patients with Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 26-34.
43. **DuBois RM.** Recent advances in immunology of interstitial lung disease. *Clinical and Exp Allergy* 1991; 21: 9-16.
44. **Turner-Warwick M, Haslam PL.** The immunology of Cryptogenic Fibrosing Alveolitis (Idiopathic Pulmonary Fibrosis). **Daniel RP** ed. Immunology and Immunologic Diseases of the Lung. *Blackwell Scientific Publications* 1988; 19: 377-395.
45. **Ayars GH, Altman LC, Gleich GJ, Loegering DA, Baker CB.** Eosinophil and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 595-604.
46. **Lundgren JD, Davey RT, Lundgren B, Mullol J, Marom Z,** et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 689-98.
47. **Kay AB.** Eosinophil chemotactic factors in asthma allergy. Eosinophils, allergy and asthma. **Kay AB** ed. *Blackwell Scientific Publications* 1990; 4: 31-44.
48. **Frew AJ, Kay AB.** Eosinophils and T-lymphocytes in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85 (3): 533-90.
49. **Raghavachar A, Fleischer S, Frickhofen N, Heimpl H, Fleischer B.** T-lymphocyte control of human eosinophilic granulopoiesis. Clonal analysis in an Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. *J Immunol* 1987; 139: 3753-8.
50. **Owen WF.** Cytokine regulation of eosinophil inflammatory disease. *ACI News* 1991; 3 (3): 85-9.
51. **Weller.** Eosinophils and fibroblasts: the medium in the mesenchyme. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1: 267-8.
52. **Vancheri C, Gaudie J, Bienenstock J, Cox G, Scicchitano R** et al. Human lung fibroblast-derived Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) mediates eosinophil survival in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1: 289-95.
53. **Howell CJ, Lee TA.** Interactions between monocytes, macrophages and eosinophils. Eosinophils, Allergy and Asthma. **Kay AB** ed. *Blackwell Scientific Publications* 1990; 5: 45-9.
54. **Gleich GJ, Loegering DA, Bell PM, Checkel JL, Ackerman SJ** et al. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 3146-50.
55. **Winqvist I, Olofsson T, Olsson I.** Mechanisms for eosinophil degranulation; release of the eosinophil cationic protein. *Immunol* 1984; 51: 1-8.
56. **Capron M, Tomassini M, Torpier G, Kusmierz JP, MacDonald S, Capron A.** Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 88: 54-8.
57. **Kay AB.** Modulation of eosinophil function in vitro. *Clin Exp Allergy* 1990; 20 (suppl 4): 31-4.
58. **Koenderman L, Kuijpers TW, Blom M, Tool ATJ, Roos D, Verhoeven AJ.** Characteristics of CR3-mediator aggregation in human eosinophils: effect of priming by platelet-activating factor. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 947-54.
59. **Walsh GM, Hortnell A, Moqbell R, Kurihara K, Kay AB.** Interaction between PAF, cytokines, the CD11/18 complex and

eosinophil adherence reactions in vitro. Eosinophils, Allergy and Asthma. Kay AB ed. *Blackwell Scientific Publications* 1990; 6: 50-9.

60. Bonner JC, Hoffman M, Brody AR. Alpha-Macroglobulin Secreted by Alveolar Macrophages Serves as a Binding Protein for a Macrophage-derived Homologue of Platelet-derived Growth Factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1: 171-9.
61. Hoffman M, Feldman SR, Pizzo SV. Alpha-2-Macroglobulin «Fast» Forms inhibit Superoxide production by activated Macrophages. *Biochim Bioph Acta* 1983; 760: 421-3.
62. Martinot JB, Wallaert B, Hatron PY, Francis C, Voisin C, Sibille Y. Clinical and subclinical alveolitis in collagen vascular diseases: contribution of alpha-2-macroglobulin levels in BAL fluid. *Eur Respir J* 1989; 2: 437-43.

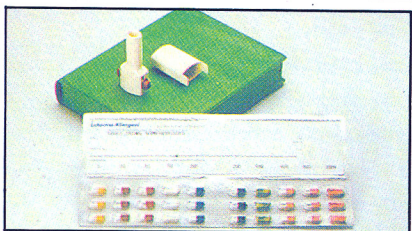
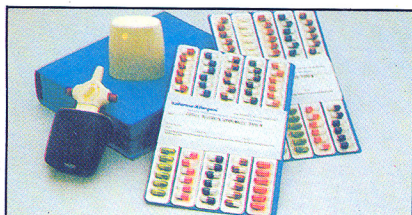
63. Delacroix DL, Marchandise FX, Francis C, Sibille Y. Alpha-2-Macroglobulin, Monomeric and Polymeric Immunoglobulin A, and Immunoglobulin M in Bronchoalveolar Lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 829-35.
64. Huang JS. Alpha-2-Macroglobulin - a modulator for growth factors? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1: 169-70.
65. James K. Interactions between cytokines and alpha 2-macroglobulin. *Immunol Today* 1990; 11 (5): 163-6.
66. Capron M, Prin L, Ameisen J-C, Capron A. Immunoglobulin receptors on eosinophil leukocytes. Eosinophils allergy and asthma. Kay AB ed. *Blackwell Scientific Publications* 1990; 2: 11-20.

Lofarma Lusitana Limitada

Av. Valbom 16, 2º esq.
2750 Cascais



Tel. 01/2846733
Telefax 01/2846788



ALLERKIN TEST
Test di provocazione nasale
per Graminacee, Parietarie
e Dermatophagoides