

Citocinas T1 e T2 na doença atópica: avaliação do contributo relativo de diferentes subpopulações celulares T periféricas

Type 1 and type 2 cytokines in atopic disease: assessment of different peripheral T cells relative contribution

Rev Port Imunoalergologia 2005; 13 (2): 141-152

Manuela Rebordão¹, Luís Delgado², Helena Pinto⁴, Augusto Remédios¹, Luís Taborda-Barata³

¹Hospital Militar, Bélem

²Hospital de S. João. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

³Hospital Pêro da Covilhã. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior

RESUMO

O equilíbrio entre a produção de citocinas do perfil T1 e T2 pelos linfócitos T tem sido considerado um dos factores que influencia a patogénese da doença alérgica, genericamente favorecida por um "ambiente" T2. **Objectivo:** Caracterizar o perfil de citocinas T1 e T2 em linfócitos periféricos de um grupo de doentes atópicos, comparativamente a um grupo-controlo, e avaliar o contributo das subpopulações CD4 e CD8 para essa produção. **População e métodos:** Estudaram-se 14 indivíduos atópicos, com sensibilização a alérgenos ambientais comuns e 7 indivíduos sem história de doença alérgica. A marcação dos linfócitos T de sangue periférico foi feita com anticorpos monoclonais CD3 e CD8. Fez-se a activação *in vitro* com PMA, ionomicina e brefeldina durante 4 horas, 37°C, 5%CO₂. A avaliação das citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ , IL-4 e IL-5 foi feita por citometria de fluxo. Na análise estatística

usaram-se testes não paramétricos *Mann-Whitney U Test* e *Wilcoxon-Signed Ranks Test*. Para o estudo das correlações usou-se o teste de *Spearman*. Considerou-se significativo o valor de $p \leq 0,05$. **Resultados:** O grupo atópico expressou nos linfócitos CD3 periféricos um significativo aumento de citocinas de perfil T2 relativamente ao grupo não atópico sendo respectivamente para a IL-4 [13,8% (3,1 - 31,8) versus 5,1% (4,1 - 6,9), $p = 0,002$] e IL-5 [6,7% (1,0 - 20,4) versus 1,0% (0,4 - 2,1), $p = 0,004$]. Só nos linfócitos T CD8 do grupo atópico se constatou também o aumento significativo destas citocinas em relação ao grupo não atópico. Observou-se apenas nos doentes atópicos uma correlação significativa entre a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+ e o número de eosinófilos circulantes ($r_s = 0,629$; $p = 0,028$) e os níveis séricos de ECP ($r_s = 0,570$; $p = 0,03$). Não se encontraram diferenças significativas na expressão de IFN- γ nas populações de linfócitos periféricos, nos dois grupos em estudo (atópicos e controlos). No grupo-controlo a produção de IFN- γ e IL-4 foi significativamente diferente entre linfócitos T CD4 e CD8, sendo maioritariamente expresso pelos CD4. **Conclusão:** Destaca-se no grupo atópico um aumento de citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5) produzidas predominantemente em linfócitos T CD8 periféricos (Tc2). No grupo-controlo (não atópico) as citocinas de perfil T2 são essencialmente produzidas pelos linfócitos T CD4.

Palavras-chave: citocinas, atopia, linfócitos Th1, Th2, Tc1, Tc2.

ABSTRACT

Background: The unbalanced of type 1 (T1) and type 2 (T2) pattern of cytokines produced by T lymphocytes has been considered the primary abnormality of atopy which is characterized by a biased T cell T2 activation. **Objective:** To characterize the T1 and T2 pattern of cytokines production by CD4+ and CD8+ T cells in whole blood in atopic and nonatopic (control) subjects. **Population and methods:** Fourteen atopic subjects, sensitised to common environmental allergens, and 7 nonatopic subjects were included in this study. In each blood sample T lymphocytes were marked with monoclonal antibodies: CD3 and CD8. Cell culture was performed at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂, in the presence of phorbol 12-myristate acetate (PMA), ionomycin and brefeldina, during 4h. Cells were then fixed and permeabilized and detection of intracytoplasmic cytokines IFN- γ , IL-4 and IL-5 was achieved. Flow cytometric analysis was performed. Statistical analysis was undertaken by using the Mann-Whitney Test, the Wilcoxon-Signed Ranks test and the Spearman test. Values of $p \leq 0,05$ were accepted as statistically significant. **Results:** The atopic group expressed a significant increase in T2 pattern of cytokines produced by peripheral CD3 lymphocytes compared with nonatopic group: IL-4 [13,8% (3,1 - 31,8) versus 5,1% (4,1 - 6,9), $p = 0,002$] and IL-5 [6,7 (1,0 - 20,4) versus 1,0% (0,4 - 2,1), $p = 0,004$] respectively. Just in CD8 T cells of the atopic group were also detected a significant correlation between the percentage of IL-5 producing CD8 T cells and the number of circulating eosinophils ($r_s = 0,629$; $p = 0,028$) and the level of ECP ($r_s = 0,570$; $p = 0,03$). No significant difference was seen in IFN- γ expression in T lymphocytes of both groups. However, IFN- γ and IL-4 expression by CD4 and CD8 T cells differ significantly in the nonatopic group (control), being expressed mainly by CD4 T cells. **Conclusion:** These data support a T2 cytokine (IL-4 and IL-5) predominance, in the peripheral blood of atopic subjects, produced mainly by CD8 T lymphocytes (Tc2). In the control group the T2 pattern of cytokines was mainly produced in CD4 T cells.

Key-words: Cytokines, atopic, lymphocytes, Th1, Th2, Tc1, Tc2.

INTRODUÇÃO

Os linfócitos T podem ser caracterizados pela sua expressão fenotípica em células CD4+ ("Helper"-Th) e CD8+ (citotóxicas-Tc) ou pelo perfil de citocinas que predominantemente sintetizam. As citocinas IFN- γ , TNF e IL-2 caracterizam o perfil T1 (quer Th1 quer Tc1), enquanto a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 estão ligadas ao perfil T2 (Th2 ou Tc2)^{1,2}. As manifestações clínicas da atopia estão, pelo menos parcialmente, associadas à produção de IgE e ao recrutamento e activação de células como sejam os mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos³. Por outro lado, estudos em doentes asmáticos têm evidenciado o papel dos linfócitos T CD4+ como orquestradores da resposta inflamatória através da produção de citocinas que caracterizam as suas diferentes funções efectoras². Por exemplo, está descrito que uma baixa produção de IFN- γ pelos linfócitos T em doentes asmáticos alérgicos se correlaciona positivamente com a gravidade da doença⁴, e que, experimentalmente, a terapêutica com IFN- γ inibe a eosinofilia alérgica e a hiperreactividade brônquica⁵. Magnan descreve na atopia um enfraquecimento da expressão de IFN- γ e uma elevada produção de IL-4 correlacionada com os níveis de IgE⁶. A IL-4 parece ser crucial no desenvolvimento do perfil Th2. Demonstrou-se já que a inalação de IL-4 por doentes asmáticos pode levar a uma hipersecreção de muco e aumento de eosinófilos na expectoração⁷. Num modelo animal, o bloqueio do receptor da IL-4 associou-se a uma diminuição da hiperreactividade brônquica específica, assim como a eosinofilia pulmonar, induzidas por alérgenos⁸. Por outro lado, a IL-4 aumenta a expressão vascular de moléculas de adesão e selectinas, responsáveis pelo recrutamento selectivo de eosinófilos⁵. A IL-5 influencia também a produção, maturação, activação e sobrevivência dos eosinófilos, assim como a hiperreactividade brônquica, tendo uma actividade essencialmente eosinopoiética^{9,10}.

Estudos mais recentes têm evidenciado o papel das células T CD8 na doença alérgica e das suas diferentes

populações, Tc1 e Tc2, definidas através do perfil de citocinas¹. Foi demonstrado que um número elevado de células T CD8+ participa na inflamação alérgica, com aumento da sua activação e diferenciação em células produtoras de IL-5^{11,12}. Magnan descreve elevados níveis de IFN- γ associados aos linfócitos T CD8 na asma⁶. Em doentes com dermatite atópica foi demonstrado aumento de frequências de linfócitos T CD4 e T CD8 produtores de citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5) em sangue periférico¹³. Por outro lado, Akdis *et al*¹² evidenciaram que linfócitos T CD4 e T CD8 de sangue periférico de doentes com dermatite atópica eram equipotentes na indução da produção de IgE pelos linfócitos B, bem como no aumento da sobrevivência do eosinófilo.

Num estudo retrospectivo¹⁴ e utilizando técnicas imuno-histoquímicas, foi possível caracterizar, em tecidos peribrônquicos de doentes falecidos por asma aguda, uma população de linfócitos T CD8 activados (CD25+) com fenótipo citotóxico (exprimindo perforina) e com elevados níveis de IL-4, comparativamente com um grupo-controlo de doentes falecidos com outra patologia.

Em estudo anterior evidenciámos, em linfócitos T periféricos de doentes atópicos (com asma e rinite) e clinicamente estáveis, a expressão intracelular de citocinas T1 e T2, sendo este último perfil particularmente evidente na subpopulação T CD8+¹⁵.

Neste estudo pretendemos avaliar se a expressão de citocinas T1 e T2 nas subpopulações CD4 e CD8 é semelhante nos indivíduos atópicos e não atópicos (controlos normais) e se algum destes perfis se correlaciona particularmente com os marcadores da atopia (IgE, eosinófilos circulantes e proteína catiónica do eosinófilo - ECP). Assim, fomos avaliar, por citometria de fluxo, a expressão de citocinas nos linfócitos de sangue periférico (estimulados policlonalmente) num grupo de doentes atópicos, comparativamente com indivíduos saudáveis não atópicos.

MATERIAL E MÉTODOS

População

Estudámos 14 indivíduos atópicos, sensíveis a ácaros do pó da casa (*Dermatophagoides pteronyssinus*), sendo 4 também sensíveis (em menor grau) a pólenes de gramíneas. Apresentavam uma média de idades de 22,3¹³⁻⁵⁸ anos, sendo 9 do sexo masculino e 5 do sexo feminino. Onze tinham asma brônquica e três rinite alérgica. Cinco destes doentes estavam a fazer corticosteróides de inalação oral, oito corticosteróides de inalação nasal, dois broncodilatadores e três anti-histamínicos. Todos estes doentes eram seguidos na consulta de Alergologia de um hospital.

O grupo não atópico era constituído por sete indivíduos, com uma média de idades 25,6 (20-38) anos, sendo cinco do sexo masculino e dois do sexo feminino. Foram recrutados no Hospital Militar de Belém com aceitação voluntária de participação no estudo e tendo como critérios de exclusão qualquer doença concomitante, local ou sistémica, que afecte o sistema imunitário (neoplasia, doença auto-imune ou inflamatória crónica, insuficiência renal crónica, diabetes *mellitus*, atopia, imunodeficiência). A todos foram feitas provas de sensibilidade cutânea, doseamentos de IgE total e específicas, avaliação da função renal, hepática e raios X de tórax.

Quadro 1. Características das duas populações estudadas: População controlo não atópica e população com doença atópica.

	Controlos n=7	Atopia n=14
Idade	25,6 (20-38)	22,3 (13-58)
Sexo M/F	5 : 2	9 : 5
IgE total KU/L	46 (7-104)	787 (100-4265)
Eosinófilos/ mm ³	266,0 (105-432)	272,3 (100-931)
ECP µg/L	11,1 (1,9-18)	14,3 (8,9-53)

Colheita de sangue

Foram colhidos 20 mL de sangue total por punção venosa, que foram distribuídos em fracções de 5 mL para tubos com dois tipos diferentes de anticoagulante: EDTA e heparina, para tubo SST® Vacutainer® e para tubo seco.

Determinações séricas

IgE total – Determinou-se no soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (*Enzyme Linked Fluorescent Assay* - ELFA), no equipamento VIDAS-bioMerieux. O limite de detecção deste método é de 0,50 kU/L e 95% da população não atópica adulta tem valores inferiores a 120 kU/L.

IgE específica – Determinaram-se no soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (*Fluoro-enzyme-immunoassay* - FEIA) no equipamento Cap-System da Pharmacia Diagnostics.

Proteína catiónica eosinofílica (ECP) – Executou-se a colheita em tubos SST® Vacutainer® (Becton Dickinson) de acordo com normas estabelecidas: punção venosa até enchimento do tubo, coagulação do sangue de 60-120 minutos à temperatura ambiente e centrifugação 1000-1300 g durante 10 minutos. A determinação foi feita em soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (FEIA) no equipamento Cap-System. O valor a partir do qual se considera o resultado positivo é de 15 µg/L.

Eosinófilos – Contagem no contador hematológico Coulter-GenS, a partir de sangue total colhido em EDTA. É considerado valor de referência para adultos normais o compreendido entre 0-400/mm³.

Estudo da expressão de citocinas nos linfócitos T

Activação

Ao sangue total colhido em heparina juntou-se, em partes iguais, RPMI 1640 (GibcoBRL) enriquecido com L-glutamina 200mM (GibcoBRL). A activação fez-se em presença de brefeldina A (Sigma) na concentração de 10µg/mL com Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-PMA

(Sigma) na concentração final de 25 ng/mL e ionomicina (Sigma) na concentração de 1 µg/mL. Utilizou-se como controlo negativo da activação uma amostra de sangue incubada com tudo o descrito anteriormente, excepto PMA e ionomicina. A activação fez-se durante 4 horas a 37°C em atmosfera húmida e com 5% CO₂.

Marcação de superfície

Os linfócitos foram estudados usando como marcadores de superfície o anticorpo monoclonal CD3 marcado com o fluorocromo PC5 – ficoeritrina-cianina 5.1 (excitação a 486-580 nm e emissão a 660-680 nm) e o anticorpo monoclonal CD8 marcado com FITC-isotiocianato de fluoresceína (excitação a 486-580 nm e emissão a 504-541 nm), ambos da Immunotech (Izasa). As células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente com 10 µL de anticorpo monoclonal CD3 e 20 µL de CD8.

Fixação e permeabilização

Efectuou-se a fixação e permeabilização dos linfócitos T de acordo com as instruções do produtor (Fix e Perm, Caltag Laboratories). Após a marcação de superfície, lavaram-se as células com um tampão fosfato salino (PBS) durante 5 minutos a 2000 rpm. Após fixação durante 15 minutos à temperatura ambiente, fez-se a permeabilização e a marcação das citocinas intracelulares.

Marcação de citocinas intracelulares

Utilizaram-se anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 (PharMingen) todas conjugadas com o fluorocromo PE – ficoeritrina (excitação a 486-575 nm e emissão a 568-590 nm). Para avaliação da activação *in vitro* estudou-se também a expressão intracitoplasmática de CD69 PE (Becton Dickinson). A quantidade de anticorpos usados foi de 3 µL para as citocinas e 20 µL para CD69. O tempo de incubação foi de 15 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se lavagens para posterior análise.

Análise por citometria de fluxo

Para a análise por citometria de fluxo utilizou-se um citómetro de fluxo Epics®Elite equipado com um *laser* de 15 mW e com filtros apropriados para leitura de FITC (525 nm), PE (575 nm) e PC-5 (675 nm). O número de células adquirido foi de 20 000 e a informação computorizada foi guardada em *listmode* para mais tarde ser avaliada de acordo com o *software* de análise do próprio equipamento. Os resultados foram expressos em % de células (linfócitos T totais ou CD4 ou CD8) que coraram de forma positiva para uma dada citocina. O *gate* de linfócitos foi feito a partir do CD3 PC-5. Os linfócitos T CD4+ foram identificados como CD3+CD8- devido à diminuição da expressão do CD4 nos linfócitos T na presença de estéres do Phorbol^{16,17}. Foram utilizados como controlos negativos os linfócitos não estimulados.

Estudo estatístico

Após análise estatística descritiva e verificação da distribuição não normal dos dados, foram utilizados testes não paramétricos para avaliação dos resultados: *Mann-Whitney U test* (comparação de uma variável entre 2 grupos) e *Wilcoxon-Signed Ranks Test* (comparação de uma variável no mesmo grupo). Para o estudo das correlações usou-se o teste de correlação de *Spearman*. O valor de p foi considerado significativo quando inferior a 0,05. Os resultados foram expressos em medianas, valor máximo e mínimo.

RESULTADOS

Expressão de interferon gama (IFN- γ)

A avaliação da expressão do IFN- γ nos dois grupos em estudo (atópicos e controlos) permitiu constatar que não existiam diferenças significativas entre estes grupos, quer para os linfócitos T CD3 quer para as subpopulações T CD4 e T CD8. Apesar disso, observou-se sempre uma menor percentagem de linfócitos T que expressavam IFN- γ no grupo atópico em relação ao grupo-con-

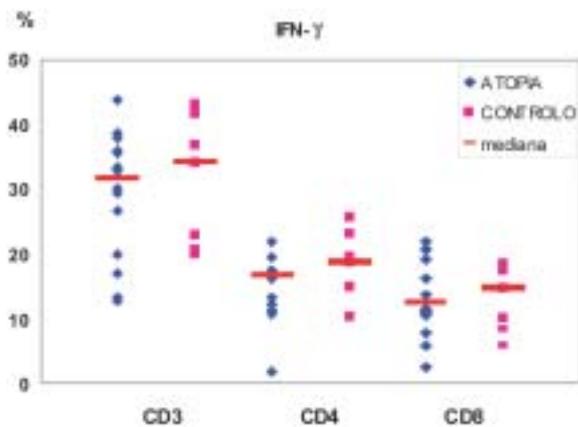


Fig. 1. A expressão de IFN- γ nos linfócitos T e subpopulações de sangue periférico foi maior no grupo-controlo relativamente ao grupo atópico, mas sem diferença significativa.

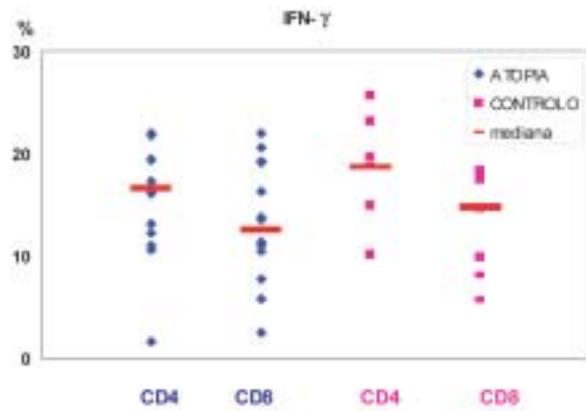


Fig. 2. Os linfócitos T CD4 do grupo-controlo não atópico expressaram de forma significativa maior quantidade de IFN- γ relativamente aos linfócitos T CD8 ($p=0,018$). No grupo atópico não existe diferença significativa na expressão desta citocina entre linfócitos T CD4 e T CD8.

trola. Na população atópica, o IFN- γ foi expresso em 31,5 % (12,7-43,9) dos linfócitos T CD3 enquanto o valor na população-controlo foi de 34,0% (20,0-43,0). Os linfócitos T CD4 expressaram 16,6% (1,7-22,0) no grupo atópico e 18,6 (10,1-23,1) no grupo controlo, sendo respectivamente para os linfócitos T CD8 o valor de 12,5 (2,6-21,9) e 14,6 (5,7-18,4) (Fig.1).

Quer em doentes atópicos quer em controlos saudáveis, a expressão de IFN- γ ocorreu maioritariamente em linfócitos T CD4 (Fig. 2), quando se comparou a expressão nas subpopulações linfocitárias. No grupo controlo, observou-se uma percentagem significativamente maior de células T CD4 IFN- γ + do que células T CD8 IFN- γ + [18,6% (10,1 - 23,1) *versus* 14,6% (5,7 - 18,4); $p = 0,018$]. No entanto, no grupo atópico não se observaram diferenças significativas entre as percentagens de células T CD4 e T CD8 que expressavam IFN- γ [16,6% (1,7 - 22,0) *versus* 12,5 (2,6 - 21,9)].

Expressão de IL-4

A percentagem de linfócitos T CD3 que expressaram IL-4 foi significativamente superior no grupo de doentes atópicos em relação ao grupo de controlos não atópicos

[13,8% (3,1-31,8) *versus* 5,1% (4,1-6,9), $p = 0,002$]. Não se observaram diferenças significativas na percentagem de células T CD4 que expressavam IL-4 entre o grupo com doença atópica e o grupo-controlo [6,0% (2,9 - 9,1) *versus* 4,2% (3,1 - 5,6)]. No entanto, a percentagem de células T CD8 IL-4+ foi significativamente superior no grupo atópico, em relação ao grupo-controlo [8,4% (0,5 - 22,7) *versus* 1,3% (0,9 - 1,8), $p=0,009$] (Fig. 3).

No grupo de doentes com doença atópica, não foram observadas diferenças significativas entre a percentagem de linfócitos T CD4 e T CD8 que expressavam IL-4, [6,0% (2,0 - 9,1) *versus* 8,4% (0,5 - 22,7)]. É de destacar, no entanto, que foram os linfócitos T CD8 que expressaram maior quantidade de IL-4. No grupo-controlo, a percentagem de linfócitos T CD4 que expressavam IL-4 foi significativamente superior à dos linfócitos T CD8 positivos para a mesma citocina [4,2% (3,1 - 5,6) *versus* 1,3% (0,9-1,8), $p= 0,018$] (Figs. 4 e 5).

Ao agruparem-se os dados dos doentes atópicos e dos controlos não atópicos, observou-se uma correlação significativa entre a percentagem de linfócitos T CD3 que expressavam IL-4 e os níveis de IgE sérica total ($r_s=0,448$ e $p=0,04$) (Fig. 6).

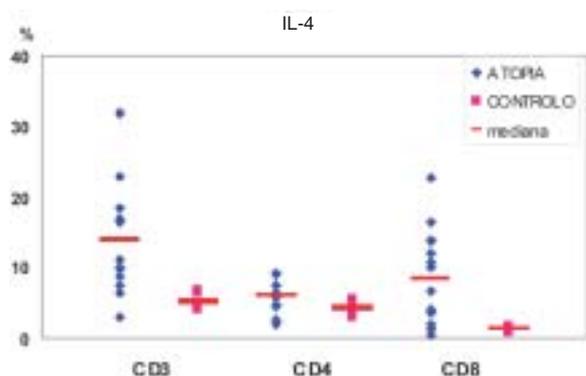


Fig. 3. A expressão de IL-4 nos linfócitos T foi manifestamente superior no grupo atópico relativamente ao grupo-controlo ($p=0,002$), contribuindo particularmente para essa diferença os linfócitos T CD8 ($p=0,009$).

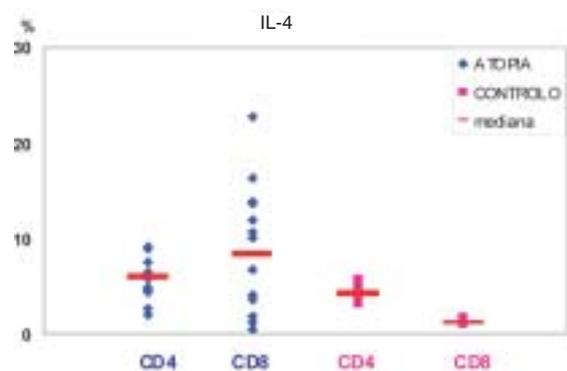


Fig. 4. No grupo-controlo, a IL-4 foi predominantemente expressa nos linfócitos T CD4 relativamente aos linfócitos T CD8 ($p=0,018$). No grupo atópico não se encontraram diferenças significativas na expressão desta citocina nas subpopulações de linfócitos T periféricas.

Expressão de IL-5

A avaliação da expressão da IL-5 pelos linfócitos T CD3 revelou uma diferença significativa entre os dois grupos estudados. No grupo atópico, a percentagem de linfócitos T que expressavam IL-5 foi de 6,7% (1,0-20,4) enquanto que no grupo controlo foi de 1,0% (0,4-2,1), $p=0,004$. Quando se avaliou o contributo das subpopu-

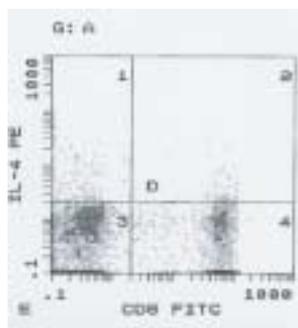


Fig. 5a

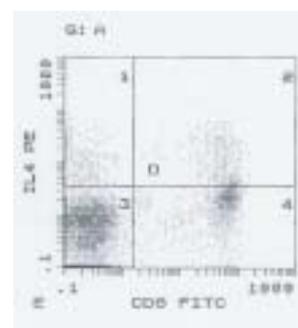


Fig. 5b

Fig. 5. Histogramas *dot-plot* obtidos por citometria de fluxo (EPICS-Elite), exemplificando a expressão de IL-4 de um indivíduo saudável (Fig. 5a) e de um doente atópico (Fig. 5b). No quadrante superior esquerdo (1) temos a percentagem de células CD3+CD8- (referidas como CD4+) que expressam IL-4 e no quadrante superior direito (2) as células CD3+CD8+ que expressam IL-4. Nos quadrantes inferiores esquerdo e direito temos respectivamente as células CD3+CD8- e CD3+CD8+ que não expressam IL-4. No controlo são os linfócitos T CD4 que produzem maior quantidade de IL-4, em contraste com o atópico, em que são os linfócitos T CD8.

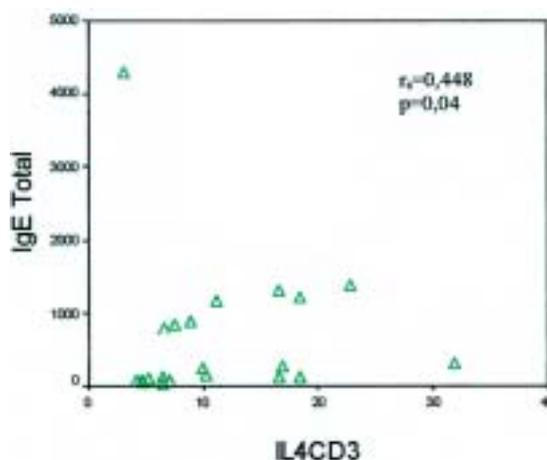


Fig. 6. Correlação da percentagem de linfócitos T CD3 que expressavam IL-4 e os níveis de IgE sérica total na população total (atópicos e não atópicos).

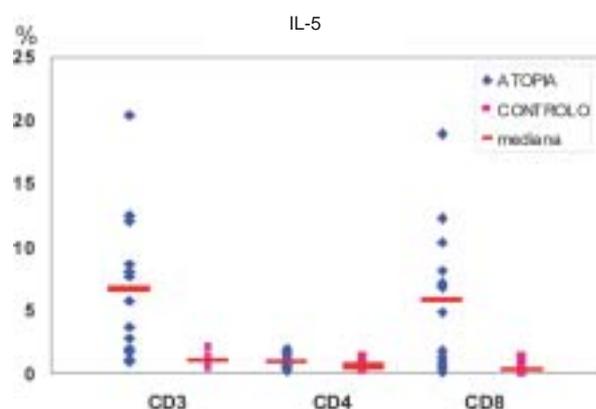


Fig. 7. A IL-5 expressou-se maioritariamente nos linfócitos T de sangue periférico no grupo de doentes atópicos relativamente ao grupo-controlo, não atópico ($p=0,004$), tendo sido a subpopulação de linfócitos T CD8 que mais contribuiu para essa expressão.

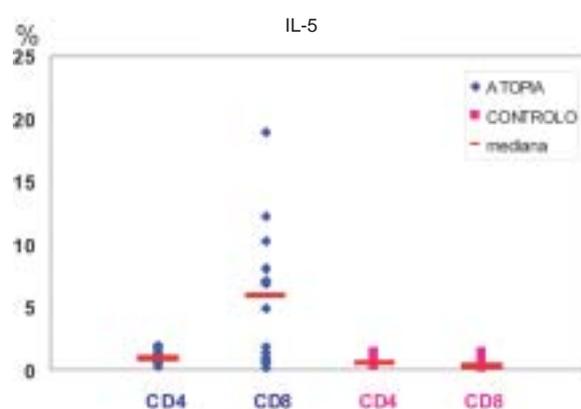


Fig. 8. No grupo atópico foram os linfócitos T CD8 que mais contribuíram para a expressão de IL-5 relativamente aos linfócitos T CD4 ($p=0,026$). No grupo não atópico não se encontraram diferenças significativas na expressão de IL-5 entre as subpopulações linfocitárias de sangue periférico.

lações linfocitárias, verificou-se que a percentagem de linfócitos T CD4 IL-5+ não diferia significativamente entre o grupo atópico e o grupo-controlo: 0,9% (0,3 - 1,9) *versus* 0,5% (0,3-1,3). No entanto, a percentagem de linfócitos T CD8 que expressavam IL-5 foi significativamente superior no grupo de doentes atópicos em relação aos controlos não atópicos [5,9% (0,1-18,9) *versus* 0,3% (0,1-1,3), $p=0,008$] (Fig. 7).

No grupo de doentes atópicos, a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+ foi significativamente superior à percentagem de linfócitos T CD4 IL-5+ [5,9% (0,1-18,9) *versus* 0,9% (0,3-1,9), $p=0,026$]. No grupo-controlo, a percentagem de linfócitos que expressavam IL-5 foi muito baixa, quer nos CD4 quer nos CD8, e sem diferenças significativas entre estas duas subpopulações linfocitárias (Fig. 8).

Observou-se apenas nos doentes atópicos uma correlação significativa entre a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+, os níveis séricos de ECP ($r_s=0,570$; $p=0,03$) e o número de eosinófilos circulantes ($r_s=0,629$; $p=0,028$) (Fig. 9).

No grupo de doentes atópicos, encontrou-se uma

correlação significativa entre a percentagem de células IL-4+ e a de células IL-5+, quer a nível de linfócitos T CD4 ($r_s=0,739$; $p=0,001$) quer a nível de linfócitos T CD8 ($r_s=0,837$; $p=0,001$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, em que avaliamos por citometria de fluxo a expressão de citocinas T1 e T2 em linfócitos circulantes de doentes atópicos e controlos saudáveis após estimulação policlonal, verificámos que a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD3 não diferiu entre os dois grupos, sendo expresso tanto pelos linfócitos T CD4 como T CD8. A expressão de IFN- γ no grupo atópico não mostrou diferenças significativas entre subpopulações linfocitárias T CD4 e T CD8, o que contrastou com o grupo-controlo, onde a expressão de IFN- γ foi significativamente mais elevada nos linfócitos T CD4.

Já a expressão de IL-4 e IL-5 nos linfócitos T CD3 diferiu significativamente nos doentes atópicos e controlos, estando associada esta diferença aos linfócitos T

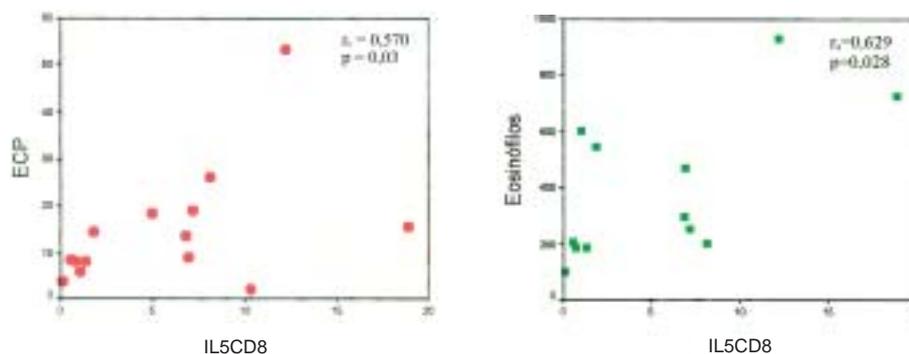


Fig. 9. Correlação entre a percentagem de linfócitos T CD8 IL-5+ e os níveis séricos de ECP e o número de eosinófilos circulantes apenas observada nos doentes atópicos.

CD8. No grupo atópico, a avaliação da produção de IL-4 entre as subpopulações linfocitárias T CD4 e CD8 não foi significativamente diferente (apesar de ser maior nos linfócitos T CD8), enquanto a produção de IL-5 foi significativamente diferente, com maior expressão nos linfócitos T CD8. Em contraste, nos controlos não atópicos, a avaliação da produção de IL-4 entre as subpopulações linfocitárias T CD4 e T CD8 foi significativamente diferente, com maior expressão nos CD4, enquanto a expressão de IL-5 foi muito baixa, não revelando diferenças significativas.

Além disso, apenas nos doentes atópicos se verificou uma correlação significativa dos linfócitos T produtores de IL-4 com a IgE sérica total e dos linfócitos T CD8+ produtores de IL-5 com os eosinófilos circulantes e com os níveis séricos de ECP.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação da expressão de citocinas (ELISPOT, hibridação *in situ*, ensaios de diluição limite)¹⁸. A grande limitação de todos estes métodos é a incapacidade de avaliar simultaneamente a expressão de diferentes citocinas e as células que as expressam. A citometria de fluxo tem a vantagem de avaliar a frequência de células produtoras de citocinas, permitindo demonstrar a co-expressão de

diferentes citocinas em células de fenótipo conhecido após um curto tempo de activação. Por outro lado, a possibilidade de usar sangue total tem a vantagem de não haver prévia manipulação e a activação celular ser feita no próprio meio onde as células se encontram¹⁷. Usou-se uma activação inespecífica com mitogénios em vez da activação específica com alergénios, que seria mais fiel à realidade biológica; no entanto, alguns estudos demonstram que a produção de citocinas é muito semelhante quando se usa PMA e ionomicina ou o alergénio¹⁷. Contudo, estes métodos não estão ainda estandardizados e a discrepância de resultados intracelulares pode ser devida a diferentes protocolos de estimulação, fixação e permeabilização¹⁹.

A percentagem de linfócitos T CD3 que expressavam IFN- γ não foi significativamente diferente entre doentes atópicos e controlos não atópicos. No entanto, nos controlos não atópicos, a percentagem de linfócitos que expressavam IFN- γ era significativamente superior na subpopulação T CD4, em relação à CD8. Esse perfil de predomínio Th1 (e não Tc1) dos controlos não foi encontrado no grupo atópico, no qual não se observou diferença significativa, em termos de percentagem de expressão de IFN- γ , entre as subpopulações CD4 e CD8

(Fig. 2). Entre o grupo de doentes atópicos e o grupo-controlo não houve diferenças significativas quanto à percentagem de linfócitos T CD8 que expressavam IFN- γ . São vários os artigos que referem uma expressão de IFN- γ invariável ou diminuta em relação aos controlos numa população atópica, tanto em sangue periférico como em lavados broncoalveolares^{4,6,20,21,22}. No entanto, a avaliação das células T que contribuem para este facto é muito controversa, e em nenhum deles se destacou o papel preferencial do perfil Th1 dos controlos em relação à expressão Th1 e Tc1 na doença atópica. Shirai e colaboradores fizeram a caracterização da frequência de linfócitos T CD4 que expressavam IFN- γ em sangue periférico e não encontraram diferenças significativas entre a população atópica e não atópica, constatando também uma menor expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4 dos doentes²³. Magnan descreveu em doentes atópicos que a diminuição do IFN- γ pelos linfócitos T CD4 estava directamente relacionada com a atopia e o aumento associado aos linfócitos T CD8 à asma⁶. No mesmo modelo e num outro estudo foi demonstrado existir uma diminuição significativa da expressão de IFN- γ em relação ao grupo-controlo nos linfócitos T CD4 e, nas fases mais tardias e graves da doença, a expressão do IFN- γ era maior nos linfócitos T CD8¹³. Isto sugere que no decurso desta patologia vários estádios poderão ser encontrados e que só um estudo longitudinal permitiria avaliar. Num estudo recente avaliou-se a expressão de IFN- γ de linfócitos de sangue periférico, LBA e biópsias brônquicas, verificando-se só existir um aumento nos linfócitos T CD8 do sangue periférico, sendo este atribuído a um processo inflamatório sistémico inerente à patologia em causa e não a uma característica sistémica²⁰.

No presente estudo, a IL-4 e IL-5 expressaram-se significativamente em maior quantidade nos linfócitos T CD3 na população atópica, estando associadas aos linfócitos T CD8, o que define claramente o perfil preferencial Tc2 nesta patologia. No grupo não atópico, a produção de IL-4 estava associada aos linfócitos T CD4, ou seja, a um perfil Th2. A frequência de células T CD3 pro-

ductoras de IL-4 correlacionou-se de forma significativa com os níveis de IgE, bem como a frequência de células T CD8 produtoras de IL-5 com os níveis de ECP e eosinófilos. Estes dados evidenciam a relação entre marcadores clínicos da asma ou da atopia com a frequência de células T produtoras de citocinas de perfil T2 e com funções biológicas relevantes nesta patologia. Foi também encontrada uma correlação significativa entre IL-4 e IL-5 nos linfócitos T CD4 e T CD8 no grupo atópico, sugerindo que a expressão destas citocinas é feita na mesma direcção, o que faz pensar na potenciação de uma em relação à outra, como já tem sido referido noutros estudos²⁴. Um número elevado de células T CD8 que expressam IL-5 tem sido observado em infiltrados inflamatórios de asma alérgica²⁵ e em dermatites atópicas¹². A importância das células T CD8 na patogénese e exacerbação da doença alérgica tem sido também recentemente ilustrada pela identificação de células T CD8 específicas de alérgeno em vários estudos^{26,27}. Num outro estudo, postula-se que a grande vantagem das células Tc2 é a capacidade de exercerem a sua actividade citolítica em ambiente T2, ou seja, em locais onde a proliferação das células Tc1 está comprometida ou mesmo ausente¹. Em modelos de infecção vírica também se verificou a presença de células Tc2, correlacionando-se curiosamente com parâmetros que habitualmente estão associados à atopia: aumento de IgE e eosinófilos. Assim, foi demonstrado que indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana tinham níveis elevados de IgE, sendo atribuída a sua síntese à capacidade de os linfócitos T CD8 produzirem IL-4 e IL-5 e expressarem CD40L^{28,29,30}. Outros estudos têm referido a existência de infecções virais (*Vírus Sincicial Respiratório* - RSV) concomitantes com exacerbações agudas de asma³¹. Nestes modelos de infecção, as células T CD8 são estimuladas a produzir IL-5 resultando uma acumulação de eosinófilos no tracto respiratório, bem como uma hiperreactividade das vias respiratórias. A população por nós estudada não apresentava qualquer sinal clínico sugestivo de infecção viral no momento do estudo. Para uma resposta imune

normal, o balanço Th1/Tc1 e Th2/Tc2 parece fulcral, mas até ao momento está por esclarecer todo o mecanismo que leva à alteração deste equilíbrio.

Assim, e apesar das limitações da metodologia que não nos permite avaliar a quantidade de citocina com efeitos biológicos, constatámos que, após activação, os linfócitos T circulantes de doentes atópicos expressam predominantemente citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5). Esse perfil, em contraste com o dos controlos não atópicos, caracteriza particularmente os linfócitos T CD8 (fenótipo Tc2). Estes também se correlacionam com os marcadores clínicos da atopia (IgE, ECP e eosinófilos).

Em conclusão, o nosso estudo permitiu verificar um aumento do perfil T2 (sobretudo Tc2) nos linfócitos circulantes de doentes atópicos. A monitorização destes parâmetros em diferentes fases da doença e/ou do seu tratamento (ex. imunoterapia), poderá vir a contribuir para um melhor esclarecimento do significado biológico destes achados laboratoriais.

BIBLIOGRAFIA

- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P et al. Human Tc1 and Tc2 / Tc0 CD8 T cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; 95: 231-40.
- Krug N, Madden J, Redington A E et al. T - cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:319-26.
- Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 450-63.
- Leonard C, Tormey V, Conor Burke and Poulter L W. Allergen - induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 368-75.
- Chung K F, Barnes P J. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54: 825-57.
- Magnan AO, Mély LG, Camilla CA et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1790-6.
- Shi H Z, Deng J M, Xu H et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1818-21.
- Gavett. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol* 1997; 272:1253-61.
- Shi H Z, Xiao G Q, Zhong D et al. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 204-9.
- Menzies-Gow A, Flood-Page P, Schmi K et al. Anti IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 714-9.
- Wahlstrom J, Dahlén B, Ihre E et al. Selective CD8+ T cells accumulate in the lungs of patients with allergic asthma after allergen bronchoprovocation. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 1-9.
- Akdis M, Simon H V, Weigh L et al. Skin homing CD8+ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 1999; 163: 466-75.
- Farrell A M, Antrobus P, Simpson D et al. A rapid flow cytometric assay to detect CD4+ and CD8+ T - helper (Th)0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. *British Journal of Dermatology* 2001; 144: 24-33.
- O'Sullivan S, Cormican L, Faul L, Ichinohe S, Johnston L, Burke M, Poulter W. Activated, cytotoxic CD8+ T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:560-4.
- Rebordão M, Silva M, Remédios A, Alvares E, Pinto H, Alfarroba E. Estudo de citocinas de linfócitos T e de Imunoglobulinas E e G em doentes atópicos candidatos a imunoterapia. *Rev Portuguesa Imunoalergologia* 2003;XI: 370-9.
- Pieker LJ, Singh MK, Zdravski Z et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory effector T cells by flow cytometry. *Blood*1995; 86:1408-19.
- Pala P, Hussell T, Openshaw P. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000;243:107-24.
- Bienvenu J, Monneret G, Fabien N, Revillard JP. The Clinical Usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab, Med* 2000; 38:267-85.
- Brown V, Warke T J, Shields M D, Ennis M. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax* 2003; 58: 311-6.
- Brightling CE, Symon F, Birring SS et al. Th2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 899-905.
- Becky Kelly E, Busse W W, Jar gour N N. A comparison of the airway response to segmental antigen bronchoprovocation in atopic asthma and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: 79-86.
- Smart J M, Horak E, Kemp A S, Robertsan C F, Tang M L. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN- γ responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 450-6.
- Shirai T, Suzuki K, Inui N et al. Th1 / Th2 profile in peripheral

- blood in atopic cough and atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 84-9.
24. Pène Y, Rousset F, Brière F, Chretien I, Wideman J, Bonnefoy J Y, Vries J E. Interleukin-5 enhances interleukin-4 induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur J Immunol* 1998; 18: 929-35.
 25. Shiota Y, Arikita H, Horita N et al. Intracellular IL-5 and T-lymphocyte subsets in atopic and nonatopic bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 294-8.
 26. Seneviratne S L, Jones L, King Abigail et al. Allergen-specific CD8+ T cells and atopic disease. *J Clin Invest* 2002; 110: 1283-91.
 27. Wahlstrom J, Dahlén B, Ihre E et al. Selective CD8+ T cells accumulate in the lungs of patients with allergic asthma after allergen bronchoprovocation. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:1-9.
 28. Paganelli R, Scala E, Ansotegui I J et al. CD8 T lymphocytes provide helper activity for IgE synthesis in human immunodeficiency virus infected patients with hyper IgE. *J Exp Med* 1995; 181: 423-8.
 29. Schwarze J, Mäkelä M, Cieslewicz G, Dakhama A, Lahn Michael, Ikemura T, Joetham A and Gelfand E. Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitisation by T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 163: 5729-34.
 30. Coyle A J, Erard F, Bertrand C, Walti S, Pircher H, Gros G. Virus specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *J Exp Med* 1995; 181: 1229-33.
 31. Yutaro Bardin P G, Fraenkel D J, Sanderson G, Schalkwyk E M; Holgate S T, Johnston S L. Peak expiratory flow changes during experimental rhinovirus infection. *Eur Respir J* 2000; 16: 980-5.