

Estudo de citocinas de linfócitos T e de Imunoglobulinas E e G em doentes atópicos candidatos a imunoterapia

Study of T lymphocyte cytokines and immunoglobulins E and G in atopic patients candidate for immunotherapy

Manuela Rebordão¹, Manuel Silva¹, Augusto Remédios¹, Emília Alvares²,
Helena Pinto², Esmeraldo Alfarroba³

¹ Serviço de Análises-Clinicas do Hospital Militar de Belém

² Serviço de Pneumologia do Hospital Militar de Belém

³ Director do projecto de Investigação ao abrigo do qual decorreu este trabalho

Resumo

Estudos anteriores demonstraram que linfócitos T CD4+ activados elaboram um padrão de citocinas rico em IL-4, IL-5 e pobre em IFN- γ em doenças alérgicas. Mais recentemente tem-se demonstrado que um padrão similar é produzido pelos linfócitos T CD8+ (padrão Tc2) desconhecendo-se a importância do contributo destas subpopulações na patogénese da doença alérgica.

Objectivo: Avaliar o contributo relativo de subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ para o perfil de citocinas T1 e T2 em linfócitos de sangue periférico de indivíduos atópicos.

Métodos: Utilizando-se a citometria de fluxo e a tripla imunofluorescência, avaliou-se a expressão intracelular de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos T.

Resultados: A citocina que foi expressa em maior quantidade foi o IFN- γ , não diferindo significativamente na subpopulação T CD4+ e T CD8+. As citocinas IL-4 e IL-5, foram expressas em menor quantidade nos linfócitos T CD4+ diferindo significativamente dos linfócitos T CD8+ (5,4+/-1,9% *versus* 10,1+/-6,5%; p=0,047 para a IL-4 e 0,91+/-0,45% *versus* 6,8+/-5,6%; p=0,028 para a IL-5).

Conclusão: A frequência de linfócitos T CD8+ produtores de IL-4 e IL-5 foi superior na patologia alérgica em relação à dos linfócitos T CD4, sendo no entanto predominante a produção de IFN- γ em ambas as populações linfocitárias. Estudos futuros serão necessários para caracterizar as propriedades citotóxicas e reguladoras destes linfócitos de sangue periférico na patologia alérgica.

Palavras-chave: Linfócitos T, Citocinas, IgE, IgG, IFN- γ , IL-4 e IL-5

Summary

Background: Previous studies have shown increased production of IL-4 and IL-5 and decreased production of IFN- γ by CD4+ activated lymphocytes (Th2) in allergic diseases. It has recently been demonstrated that a similar cytokine pattern can be produced by CD8+ T cells (Tc2) although their role in human allergic disease has not been defined.

Objective: To assess the relative contribution of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subsets towards type 1 and type 2 cytokine production in peripheral blood T cells from atopic subjects.

Methods: Expression of intracellular IFN- γ , IL-4 and IL-5 was assessed in peripheral blood T lymphocytes by flow cytometry and triple staining fluorescence.

Results: IFN- γ was the cytokine most expressed, without significant differences between CD4+ and CD8+ T cells. IL-4 and IL-5 were less expressed in CD4+ T lymphocytes than in CD8+ T lymphocytes (5,4+/-1,9% vs 10,1+/-6,5%; $p=0,044$ for IL-4 and 0,91+/-0,45% vs 6,8+/-5,6%; $p=0,010$ for IL-5).

Conclusion: The frequency of IL-4 and IL-5-producing peripheral blood CD8+ T cells was greater than that of CD4+ T cells, in allergic subjects. There was an increased frequency of IFN- γ production in both subsets of T cells. Further studies are required to characterize the cytotoxic and regulatory properties of peripheral blood CD8+ T lymphocytes in allergic diseases.

Key-words: T lymphocytes, cytokines, IgE, IgG, IFN- γ , IL-4 and IL-5

INTRODUÇÃO

A prevalência das doenças alérgicas (rinite, asma, dermatite) tem vindo a aumentar nas últimas décadas⁽¹⁾. A principal característica que distingue os doentes atópicos é a sua capacidade para desenvolver e manter respostas IgE aumentadas frente a antígenos ambientais comuns (alergénios).

Uma resposta alérgica aguda, resulta da libertação dos mediadores pré-formados e sintetizados de novo, quando o alergénio é reconhecido pela IgE que se encontra ligada aos receptores de alta afinidade dos mastócitos e dos basófilos⁽²⁾. A esta resposta segue-se outra, um pouco mais tardia, em que há recrutamento de eosinófilos, basófilos e linfócitos T a partir da circulação. A infiltração e activação dos eosinófilos é uma característica importante na alergia, podendo os mediadores inflamatórios por eles libertados (por exemplo, a proteína catiónica - ECP), ser correlacionados com a severidade da doença⁽³⁾. Os linfócitos T após reconhecimento dos alergénios processados pelas células apresentadoras de antígeno (APC), são os

responsáveis pela síntese de mediadores proteicos (citocinas, quimiocinas) que orquestram a diferenciação, recrutamento, acumulação e activação de células efectoras^(4,5).

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 que a produção de IL-4, IL-5 e IL-10 o perfil T2 (Th2 ou Tc2). Na doença alérgica a produção elevada de anticorpos IgE tem sido correlacionada positivamente com a presença de linfócitos Th2 no sangue periférico^(5,6,7). De facto, a IL-4 promove a diferenciação das células T CD4 naive em células produtoras de citocinas com perfil Th2 e em conjugação com a activação do CD40 promove a proliferação dos linfócitos B induzindo mudança de isotipo para IgE⁽³⁾. Tem um efeito inibitório da produção de citocinas proinflamatórias antagonizando o efeito do IFN- γ . Esta citocina é sintetizada pelos linfócitos com perfil Th2, células mastocitárias e linfócitos NK⁽⁸⁾.

A IL-5 é a citocina que favorece a diferenciação do eosinófilo influenciando a quimiotaxia, activação e sobrevivência local destas células^(4,5). É sintetizada pelos linfócitos T CD4 activados com perfil Th2, pelas células mastocitárias e de forma autócrina pelos próprios eosinófilos⁽⁸⁾.

O IFN- γ é uma citocina que actua nas células T CD4 promovendo a diferenciação dos linfócitos com perfil Th1 e inibindo a diferenciação dos linfócitos Th2. Promove a diferenciação de células B induzindo mudança de isotipo para IgG (efeito contra-regulador na síntese de IgE). Tem efeitos na maturação dos linfócitos T CD8, em células efectoras com actividades citotóxicas. O IFN- γ é produzido por todos os linfócitos e células NK após activação ou em resposta á IL-2 e IL-12⁽⁹⁾.

A influência da produção de citocinas de perfil T1 e T2 pelos linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ na patogénese da doença alérgica não é ainda devidamente conhecida⁽¹⁰⁾.

O presente trabalho teve como objectivo o estudo da produção de citocinas pelos linfócitos T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico, de indivíduos atópicos, de forma a caracterizar o perfil T1 e T2 em ambas as subpopulações. Pretendeu-se correlacionar estes perfis com marcadores característicos da doença alérgica: IgE total e específica, a IgG específica, o número total de eosinófilos e a ECP.

MATERIAIS E MÉTODOS

População

Estudámos 10 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 22,3 \pm 8,5 anos, sendo 6 do sexo masculino e 4 feminino. Oito tinham asma brônquica e dois rinite alérgica.

Cinco destes doentes estavam a fazer corticoste-

roides de inalação oral, oito corticosteroides de inalação nasal, dois broncodilatadores e três anti-histamínicos.

Dos quatro doentes sensíveis a ácaros e pólenes simultaneamente, dois foram estudados na época polínica.

De forma a avaliar alguns dos parâmetros séricos como níveis de IgE e IgG específicas de *Dermatophagoides pteronyssinus*, níveis de ECP e nº de eosinófilos por mm³, foi também estudada uma amostra de 8 indivíduos não atópicos, emparelhada para sexo e idade com o grupo de doentes atópicos. Todos tinham testes cutâneos negativos e não apresentavam clínica de doença alérgica.

Colheita de sangue periférico

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 e IgG específicas – Determinaram-se no soro por uma técnica imunoenzimática com leitura final de fluorescência (Fluoroenzymeimmunoassay - FEIA) no equipamento Cap-System da Pharmacia Diagnostics. Na determinação da IgE específica são utilizados calibradores (0,35 – 100 kU_A/l) para fazer uma curva de calibração à qual são referenciados os soros dos doentes a estudar. Os calibradores são

calibrados em relação ao “2nd International Reference Preparation 75/502 of Human Serum Immunoglobulin E” da Organização Mundial de Saúde. A standardização permite o cálculo dos níveis de IgE em unidades específicas dos alérgenos - U_A - em que U é a unidade internacional de IgE. São considerados positivos os resultados em que a concentração de IgE específica é superior a 0.35 kU_A/l . O limite de detecção é de 0.35 kU_A/l . Para a determinação da IgG são utilizados calibradores que se encontram de acordo com o “International Reference Preparation” – IRP 67/86 para as Imunoglobulinas séricas humanas A, G e M da Organização Mundial de Saúde para a determinação de IgG total. Estes calibradores são utilizados para a determinação de anticorpos IgG específicos, sendo os valores expressos em mg_A/l , onde A representa anticorpos antigénio específicos. Estes calibradores usados em duplicado e em várias concentrações (de 0,02 até 2,0) permitem construir uma curva de calibração na qual são referenciados os soros a estudar. O limite de detecção da IgG específica é de 0.02 mg_A/l .

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 da Pharmacia Diagnostics. O valor a partir do qual se considera o resultado positivo é de 15 mg/L.

Eosinófilos – Contagem no contador hematológico Coulter-GenS da Izasa, a partir de sangue total colhido em EDTA. É considerado valor de referência para adultos normais o valor compreendido entre 0-400/ mm^3 .

Estudo de Citocinas em linfócitos T

Activação

Partiu-se de sangue total colhido em heparina ao qual se juntou 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 10mg/ml com Phorbol-12-Myristate-13-Acetate- PMA, (Sigma) na concentração final de 25 ng/ml e ionomicina (Sigma) na concentração de 1mg/ml. Utilizou-se como controlo negativo da activação uma amostra de sangue contendo tudo o descrito anteriormente excepto PMA e ionomicina. A activação fez-se durante 4 horas a 37°C em atmosfera húmida e com 5% CO_2 .

Marcação de superfície

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

Fixação e permeabilização

Fez-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 - phycoerythrin (excitação a 486-575nm e emissão a 568-590). 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 μ l para as citocinas e 20 μ l 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 Citometro de Fluxo Epics[®]Elite equipado com um laser de 15 mW e com filtros apropriados para leitura de FITC (525), PE (575) e PC-5 (675). O número de células adquirido foi de 20000 e a informação computadorizada foi guardada em “list-mode” 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 esteres do formol⁽¹¹⁾. Foram utilizados como controlos negativos os linfócitos não estimulados.

Estudo estatístico

Após análise estatística descritiva foi utilizado para comparação de resultados um teste não paramétrico *Wilcoxon-Signed Ranks Test*. 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. Para simplificação da apresentação, exprimem-se os resultados em média aritmética e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população atópica apresentou níveis elevados de IgE total (média de 541,0 \pm 469,8kU/l) e positividade da IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus*, com valor médio de 56,5 \pm 34,5 kU_A/l. Os níveis de ECP encontraram-se acima dos valores de referência (18,5 \pm 12,7 μ g/l), bem como os eosinófilos (422,8 \pm 251,6 mm³). Os valores médios de IgG específica (29,6 \pm 14,2 mg_A/l) estavam também elevados comparativamente com uma população de controlo, não atópica, estudada simultaneamente (Tabela I).

Os linfócitos T (CD3⁺) de sangue periférico demonstraram uma elevada percentagem de expressão de IFN- γ a nível intracelular (média de 29,4 \pm 10,1%). Não se encontraram diferenças significativas na proporção de linfócitos T CD4 exprimindo IFN- γ (15,4 \pm 6,3%), em relação a subpopulação T CD8⁺ (14,0 \pm 5,6 % p=0,45) (Fig.1-A).

A frequência de linfócitos T CD3⁺ que expressaram IL-4 intracelular foi de 15,5 \pm 7,1%, sendo na subpopulação T CD4⁺ significativamente inferior à subpopulação T CD8⁺ (5,4 \pm 1,9% *versus* 10,1 \pm 6,5%; p=0,047) (Fig.1-B).

A percentagem de linfócitos T CD3⁺ que expressaram IL-5 intracelular foi de 7,6 \pm 5,7%. Esta expressão foi significativamente superior nos linfócitos T CD8⁺ do que nos linfócitos T

Tabela I – Resultados das determinações séricas da população atópica estudada. Estão expressos os valores de IgE e IgG específicas para *Dermatophagoides pteronyssinus*

	IgE total kU/l	IgE específica kUA/l	IgG específica mgA/l	ECP ug/l	Eosinófilos mm ³
Valores referência	(N<120)	(N<0,35)	(N<10,8*)	(N<15)	(N<400)
Média (Desvio padrão)	541 (495)	57 (36)	30 (15)	19 (13)	423 (267)
Amplitude de variação	100-1282	4-101	8-54	8-53	185-931

* valores médios calculados numa população de 8 indivíduos não atópicos

Fig 1 A



Fig 1 C

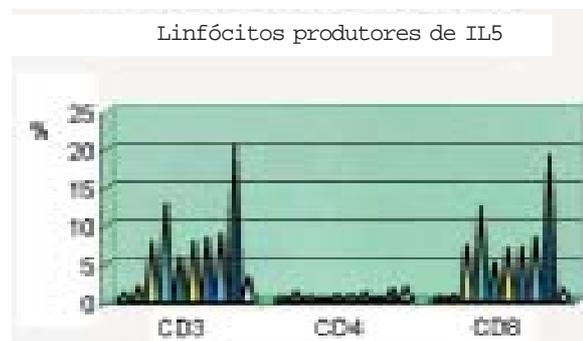


Fig 1 B

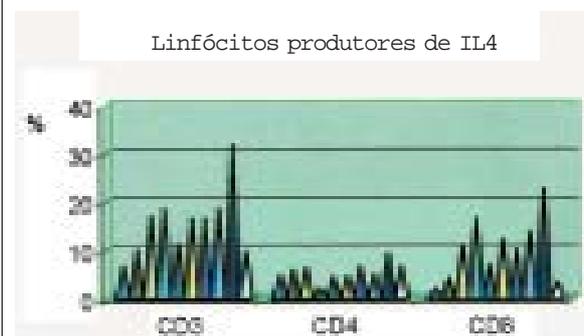
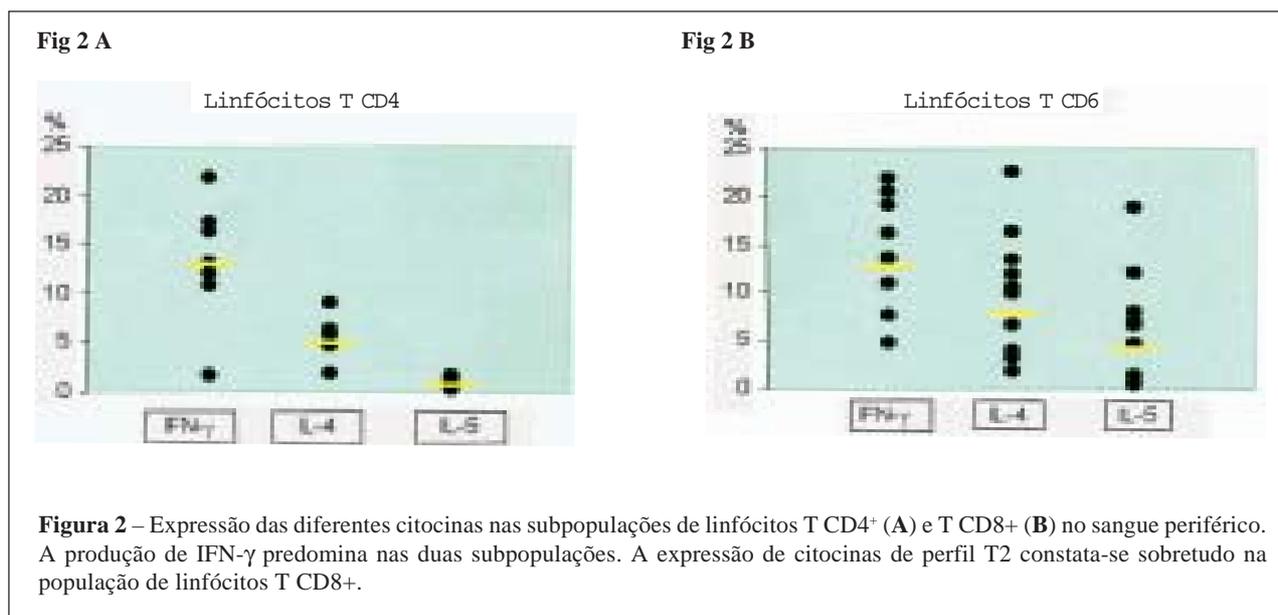


Figura 1 – Percentagem de linfócitos T CD3 produtores de diferentes citocinas e contributo das subpopulações T CD4 e CD8 nessa produção, em sangue periférico. Cada pico corresponde a um doente e traduz a frequência de linfócitos capazes de produzir IFN- γ - (A), IL-4 - (B) e IL-5 - (C). Enquanto que a produção do IFN- γ não difere nas duas subpopulações T ($p=0,45$), a expressão de citocinas T2 foi significativamente maior nas CD8+ (IL4, $p= 0,047$ e IL5, $p= 0,028$).



CD4⁺(6,8+/-5,6% versus 0,91+/-0,45%; p=0,028) (Fig.1-C)

Constatou-se uma correlação positiva significativa entre a expressão de IL-4 pelos linfócitos T CD3 e CD8 (r=0,976, p=0,001) acontecendo o mesmo para a IL-5 (r=0,790, p=0,001).

No que respeita ao perfil de expressão de citocinas nas diferentes populações linfocitárias, observou-se que nos linfócitos T CD4⁺ foi o IFN- γ que foi expresso em maior quantidade, seguindo-se por ordem decrescente respectivamente a IL-4 e IL-5 (Fig.2-A). Nos linfócitos T CD8⁺, a citocina com maior expressão foi também o IFN- γ seguindo-se igualmente e por ordem decrescente respectivamente a IL-4 e IL-5. Nesta população de linfócitos T CD8⁺ constatou-se uma grande heterogeneidade na expressão do IFN- γ assim como da IL-4 e IL-5 (Fig.2-B).

Encontrou-se uma correlação positiva significativa entre a expressão de IL-4 e IL-5 em linfócitos T CD3⁺ e os níveis séricos de ECP (IL-4: r=0,689, p=0,028; IL-5: r=0,650, p=0,042). Uma correlação positiva significativa foi igualmente demonstrável

entre os níveis séricos de ECP e a percentagem de expressão de citocinas na população de células T CD8⁺ (IL-4: r=0,648, p=0,043; IL-5: r=0,733, p=0,016), mas não de células T CD4⁺ (IL-4: r=-0,297, p=0,405; IL-5: r=-0,561, p=0,092).

Não foi encontrada qualquer correlação significativa entre a expressão de citocinas em linfócitos T e o número de eosinófilos circulantes ou os níveis de IgE total e específica.

A expressão intracitoplasmática do CD69 nos linfócitos T CD3 foi de 97,3+/-4,3%. Nos linfócitos T CD4⁺ a expressão foi de 66,4+/-6,1% e significativamente maior do que nos linfócitos T CD8 de 30,8+/-5,31% (p<0,001).

DISCUSSÃO

Neste estudo constatou-se que os linfócitos T de sangue periférico de indivíduos atópicos, e após estímulo inespecífico, expressaram citocinas de perfil T1 e T2. A citocina que caracteriza o perfil T1 (IFN- γ , foi expressa tanto pelos linfócitos T

CD4+ (Th1) como pelos linfócitos T CD8+ (Tc1) não havendo diferenças significativas nesta expressão entre as duas subpopulações. Das citocinas estudadas, o IFN- γ foi a citocina que maior expressão teve, quer nos linfócitos T CD4+ quer nos linfócitos T CD8+. As citocinas que caracterizam o perfil T2 (IL-4 e IL-5) foram também expressas nos linfócitos T CD4+ e T CD8+, com aumento significativo na população de linfócitos T CD8+. A IL-4 expressou-se em maior quantidade em relação à IL-5 tanto nos linfócitos T CD4+ como nos linfócitos T CD8+. A expressão da IL-4 e IL-5 pelos linfócitos T CD3 e T CD8 correlacionou-se de forma significativa com os níveis séricos de ECP.

A determinação das citocinas em sangue periférico por citometria de fluxo tem como vantagem a possibilidade de associar o fenótipo dos linfócitos T periféricos (CD3, CD4 e CD8) à citocina por eles produzida intracelularmente. Obtemos, desta forma, a frequência de células T capazes de produzir diferentes citocinas directamente em amostras de sangue periférico, com reduzida manipulação e em condições próximas às observadas *in vivo* ⁽¹²⁾. A estimulação das células T fez-se com um activador policlonal (PMA/ionomicina), sendo estudada a acumulação da citocina na célula e não a sua secreção. Estes são aspectos a ter em consideração quando se fazem comparações de resultados obtidos com diferentes metodologias ⁽¹³⁾. A expressão intracitoplasmática do CD69 nos linfócitos T, assegurou-nos estarmos a trabalhar com uma população que respondeu ao estímulo mesmo estando em minoria como é o caso dos linfócitos T CD8+.

Encontrámos nas células T circulantes e apesar da alergia ser uma patologia T2, uma maior expressão de IFN- γ (24,9%) seguindo-se IL-4 (15,5%) e IL-5 (7,7%) (Fig.2). *Majori e al* ⁽¹²⁾, usando o mesmo método numa população de 12 asmáticos sensíveis a ácaros, refere também uma maior produção de IFN- γ em relação à de IL-4 nas CD4+, com um ratio de 4,1

(no nosso estudo foi de 2,6). Nos nossos resultados a produção do IFN- γ parece resultar de uma distribuição equilibrada entre Th1 e Tc1, pois estes valores não diferem estatisticamente entre as subpopulações CD4 e CD8 (Fig.1-A). O predomínio da expressão de uma citocina T1, como o IFN- γ em linfócitos T de doentes atópicos com asma brônquica, poderá traduzir um mecanismo de regulação da própria doença alérgica («contrabalançando» a produção aumentada de IgE, eosinófilos e citocinas T2). Apesar das limitações do nosso estudo, que avalia linfócitos T circulantes estimulados policlonalmente, e não populações de linfócitos T estimulados de forma específica por alérgenos *in vitro*, diversos estudos têm evidenciado a alergia como uma doença sistémica ⁽¹⁴⁾ bem como um paralelismo na expressão de citocinas de linfócitos T CD3+ periféricos e do lavado broncoalveolar na asma ⁽¹⁵⁾. No estudo de *Magnan* ⁽¹⁶⁾, que avalia um número mais alargado de doentes, o número de linfócitos T CD8 circulantes produtores de IFN- γ , correlacionou-se com a hiperreactividade brônquica e com a severidade da asma. Estudos recentes têm revelado, na asma brônquica, um aumento de linfócitos T circulantes produtores de IFN- γ , quer na subpopulação CD4+ ⁽¹⁰⁾ quer na CD8+ ^(10,16).

Em relação ao IFN- γ verificou-se que é uma citocina expressa nos linfócitos T CD4 e CD8 apresentando na literatura valores muito diferentes. Será particularmente interessante acompanhar nestes doentes e ao longo do tempo as variações de expressão desta citocina, que à partida poderá espelhar a actividade reguladora da atopia.

No nosso estudo, a expressão de IL-4 e IL-5 foi bastante mais significativa nas células T CD8+ do que nas células T CD4+ (Fig.1-B e 1-C). O papel relativo dos linfócitos T CD4 e T CD8 produtores de citocinas na asma não é ainda devidamente conhecido ⁽¹⁰⁾. De facto, as doenças atópicas estão habitualmente correlacionadas com o perfil Th2, dado o papel regulador da IL-4 e IL-5 na síntese de IgE e na activação dos eosinófilos ⁽³⁾. O aumento

evidente na frequência destas células T CD8+ faz-nos pensar se terá a ver com a expansão de uma população de células T CD8+ com um possível papel etiopatogénico na doença alérgica, ou se é apenas porque a maior parte das células CD4+ que expressam IL-4 e IL-5 estão nos órgãos-alvo, uma vez que se trata de um estudo em sangue periférico. Esta segunda hipótese é ilustrada neste estudo por um só doente, cuja colheita de sangue periférico foi feita na época polínica. Neste verifica-se um elevado predomínio de linfócitos T CD8+ produtores de IL-4 e IL-5. No entanto a favor da primeira hipótese estão os outros nove doentes, que nos levam a perspectivar o estudo no sentido de melhor caracterizar a população de linfócitos T CD8+ que se evidencia.

Foi demonstrado que a grande maioria das células T específicas de alérgeno, isoladas de lesões da pele têm um fenótipo CD8+, estando estas correlacionadas com o grau de edema epidérmico⁽¹⁷⁾. Por outro lado, existem estudos que evidenciam a alergia como uma doença sistémica⁽¹⁴⁾, o que nos leva a pensar que este aumento de linfócitos T CD8+ em sangue periférico seja o reflexo do se passa no órgão-alvo. No artigo de *Magnan*⁽¹⁶⁾ é referido que o número de células T CD8 produtoras de IFN- γ está relacionado com a severidade da asma, com a hiperreactividade brônquica e ainda com a eosinofilia no sangue periférico. Estudos feitos com linfócitos T CD8+ específicos de ácaros e separados por tetrâmeros de MHC contendo peptídeos de ácaros, mostraram que o aumento da frequência destes linfócitos poderá estar igualmente associada à severidade da patologia e aos níveis elevados de IgE total e IgE específica⁽¹⁷⁾. Se separarmos do grupo de doentes por nós estudado os que expressam uma produção de citocinas maioritariamente à custa dos linfócitos T CD8 verificamos que os níveis de IgE total e específica são mais elevados assim como os valores de ECP e eosinófilos.

No nosso estudo, verificámos uma correlação positiva entre a expressão de citocinas T2 nos linfócitos T CD8+, particularmente da IL-5, com a ECP. Estudos recentes demonstraram que a ECP poderá ser um bom marcador na exacerbação da asma brônquica⁽¹⁸⁾. A produção de ECP por eosinófilos parece estar associada com a activação eosinofílica *in vivo*⁽⁸⁾, e a IL-5 é uma das principais citocinas envolvida na activação dos eosinófilos *in vitro*⁽⁵⁾. Os nossos dados parecem assim reforçar um possível papel das células T CD8+ produtoras de IL-4 e IL-5, na amplificação da resposta alérgica⁽¹⁷⁾.

Na população atópica estudada, houve uma expressão preferencial do IFN- γ nos linfócitos T CD4+ e T CD8+, enquanto que a expressão mais significativa de IL-4 e IL-5 foi nos linfócitos T CD8+. O acompanhamento ao longo do tempo das variações destes perfis de citocinas e da frequência dos linfócitos que as expressam poderá ser interessante no estudo da atopia, juntamente com outros parâmetros que têm sido avaliados na resposta às vacinas de dessensibilização –IgG específica⁽¹¹⁾, ECP⁽¹⁸⁾ e alteração do perfil Th2 para um perfil Th1⁽¹³⁾. Curiosamente e apesar de se tratar de um estudo “estático” e inicial foi também entre estes parâmetros que encontramos correlações significativas.

Estudos futuros estão a ser perspectivados no sentido de caracterizar uma população controlo, de alargar a população estudada e de a avaliar após a imunoterapia. É de todo o interesse caracterizar as capacidades citotóxicas e reguladoras dos linfócitos T CD8+ no sangue periférico, de forma a melhor compreender qual o seu papel na etiopatogenia da doença alérgica.

BIBLIOGRAFIA

1. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhino conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. 1998; 351:1225-1232.
2. Holloway JA, Gudín AM. Microenvironmental influences in atopic disease. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30:1197-1200.

3. Krishna MT, Salvi SS, Holgate ST. Pathogenesis of Asthma. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW eds. *Clinical Immunology*, Mosby; 2001: 49.1 - 49.11.
4. Kimber I, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*.2002; 46:1-5.
5. Holgate ST. Today's science – tomorrow's practice: basic mechanisms of allergy and their clinical implications. *Clin Exp All Rev*.2002; 2:48-54.
6. Negano Y, Rondo M, Tamaoki J, Isono K, Nagai A. Peripheral blood Th1 and Th2 profile in patients with moderate asthma: effect of inhaled corticosteroid. *J. Asthma*.2002; 39:247-53.
7. Shirai T, Suzuki K, Inui N, Suda T, Chida K, Nakamura H. Th1 / Th2 profile in peripheral blood in atopic cough and atopic asthma. *Clin. Exp. Allergy*.2003; 33:84-9.
8. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, eds. *Kuby Immunology*. New York: Freeman and Company; 2001: 308-311.
9. Parslow T, Stites D, Terr A, Imboden J, eds. *Medical Immunology*. Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2001: 156-61.
10. Cho SH, Stancin LA, Begishivili T, Bates PJ, Holgate ST, Johnston SL. Peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell Type 1 and Type 2 cytokine production in atopic asthmatic and normal subjects. *Clin Exp Allergy*.2002; 32:427-33.
11. Pieker LJ, Singh MK, Zdraveski Z et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory effector T cells by flow cytometry. *Blood*.1995; 86:1408-1419.
12. Majori M, Caminati A, Corradi M, Briante E, Scarpa S, Pesci A. T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite – sensitive asthma. *Clin Exp Allergy*.2000; 30:341-47.
13. Larche M. Changes in interferon - g producing following specific allergen immunotherapy: biology vs methodology. *Clin Exp Allergy*.2000; 30:297-300.
14. Denburg JA. The bone marrow and airway inflammation evidence for allergy as a systemic disease. *Clin Exp All. Rev*.2003; 3:23-27.
15. Brightling C, Symon F, Birring S, 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.
16. Magnan AO, Mely LG, Camilla CA et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IEN-gamma-producing CD8+ T cells in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care*. 2000; 161:1790-6.
17. Seneviratne SL, Jones L, King A, et al. Allergen – specific CD8+ T cells and atopic disease. *J.Clin.Invest*. 2002; 110:1283-91.
18. Sorkness C, Megill K, Busse WW. Evaluation of serum eosinophil cationic protein as a predictive marker for asthma exacerbation in patients with persistent disease. *Clin Exp Allergy*.2002; 32:1355-9.
19. Durham SR, Till SJ, . Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J.Allergy Clin.Immunol* 1998; 102:157-64.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Professor Doutor Luís Delgado e Professor Doutor Taborda Barata a revisão crítica do manuscrito.