

Linfócitos T na Mediação da Asma (*)

MARIANELA VAZ**

Sendo a asma brônquica uma doença conhecida desde a antiguidade, só nas últimas duas décadas se começaram a clarificar os mecanismos envolvidos na sua patogenia e o reconhecimento de que a inflamação das vias aéreas é um achado universal, mesmo em doentes assintomáticos, é talvez a mudança mais importante nos nossos conceitos sobre esta doença.

Até há alguns anos os estudos patológicos limitavam-se aos tecidos de doentes que morriam em mal asmático; a possibilidade de se recorrer a biópsias da mucosa brônquica e a lavados broncoalveolares (LBA) para observar o que se passava em doentes controlados, permitiu verificar que muitas das alterações estruturais e inflamatórias observadas "*post-mortem*" apareciam mesmo em asmáticos ligeiros, fora de crise.^{1,2,3}

A presença de grandes quantidades de células epiteliais descamadas e de numerosos eosinófilos têm sido dados constantes enunciados em biópsias e LBA e vários trabalhos demonstraram existir uma correlação entre o número de células epiteliais e de eosinófilos e seus mediadores e a severidade clínica e ao grau de reactividade das vias aéreas.^{4,10}

Uma das áreas que mais recentemente tem despertado o interesse no estudo da patogenia da asma é o papel dos linfócitos T na regulação e na expressão da inflamação associada a alergia e a asma.

Enquanto que o papel dos linfócitos B na regulação da síntese da IgE específica de antigénio na resposta humoral da asma alérgica está bem estabelecido, até há pouco não se conhecia qual era a importância dos linfócitos T nesta situação.

Estudos recentes têm permitido avaliar a intervenção dos linfócitos T na mediação da asma, por um lado no controlo da síntese da IgE, por outro na atracção e activação de células inflamatórias, das quais se destacam os eosinófilos, mas também os monócitos, neutrófilos e basófilos.

A - LINFÓCITOS T NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DA IgE

A verificação de níveis elevados de IgE nas imunodeficiências tímicas primárias e a inibição "*in vitro*" da síntese da IgE pelos linfócitos de doentes atópicos vieram chamar a atenção para o papel regulador das células T na produção de IgE.

Sabe-se hoje que as células B em repouso, requerem um primeiro sinal fornecido pela interacção física com as células T activadas, que pode consistir numa interacção clássica cognitiva (TCR / CD3+ moléculas classe II do MHC) ou interacções não específicas mediadas por proteínas de superfície presentes nas células CD4 activadas e células B. Um outro sinal importante necessário à síntese da IgE é fornecido pela IL-4 libertada pelas células T activadas, que é negativamente regulada pelo INF- γ e outras citocinas. Existem ainda outros sinais complementares que podem potenciar a síntese da IgE.¹¹⁻¹³

No rato foram identificados dois tipos de clones de linfócitos T CD4, denominados Th1 ou Th2 com base no perfil de produção de citocinas: Th1 - IL-2, IL-3, INF- γ , GM-CSF e TNF α mas não IL-4 e IL-5 e Th2 - IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, mas não IL-2 e INF- γ . Apesar de ainda estar por estabelecer uma certeza se no homem também existem estes dois tipos de células, vários estudos têm vindo a sugerir que as células T específicas de alérgénio se podem comportar com as células Th2 murinas.¹⁴⁻¹⁶

* Intervenção na Mesa redonda sobre Asma Brônquica, na Reunião Anual da S.P.A.I.C., Dezembro 1993

** Chefe de Serviço e Directora da Universidade de Imunoalergologia Hospital de S. João - Porto

B - LINFÓCITOS T E INFLAMAÇÃO NA ASMA

As primeiras evidências do envolvimento dos linfócitos T na patogenia da inflamação na asma resultaram de estudos anátomo-patológicos ultra-estruturais "post-mortem" e de tecidos de biópsias da mucosa que demonstram a presença de grande número de linfócitos, alguns atípicos, com forma irregular, localizados intraepiteliais. Mais recentemente, por intermédio de técnicas imunocitoquímicas, recorrendo a diversos anticorpos monoclonais, tem-se demonstrado a presença de linfócitos T activados, exprimindo à superfície moléculas de activação CD25 (IL-2R), HLA-DR e VLA-1, no sangue periférico, no LBA e em biópsias brônquicas.

Vários aspectos têm sido estudados:

• ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA ASMA AGUDA GRAVE

Corrigan e cols¹⁷ num primeiro trabalho publicado em 1988 estudaram fenótipos e marcadores de activação de células T do sangue periférico de doentes admitidos por asma grave (na admissão ao 3.º e 7.º dia) e compararam os resultados com controles, tendo verificado que a percentagem de células CD4 e CD8 eram idênticas em todos os grupos, mas os doentes com asma grave tinham um aumento significativo de marcadores de activação: IL-2R, HLA-Dr e VLA-1, sendo as células com IL-2R exclusivamente do fenótipo CD4. A percentagem de células com IL-2R e HLA-DR tendia a diminuir à medida que os doentes melhoravam clinicamente, sob influência da terapêutica.

Num estudo posterior¹⁸ estes autores alargaram a investigação original e além de marcadores de actividade foram analisar produtos solúveis da activação das células T - INF- γ e receptor solúvel da IL-2. Neste trabalho confirmaram que os linfócitos T CD4 dos doentes com asma aguda grave tinham um aumento significativo dos três marcadores de activação (IL-2R, HLA-DR e VLA-1), não expressando as células CD8 nem IL-2R nem VLA-1. Verificaram ainda que as concentrações de IL-2R e INF- γ eram significativamente mais elevadas nos doentes com asma aguda grave, que existia uma correlação entre as variações de débito expiratório máximo e a percentagem de células CD4 que expressavam IL-2R do dia 1 para o dia 3 e que as concentrações séricas de IL-2R diminuía significativamente do dia 1 para o dia 3, coincidindo com a melhoria do débito expiratório máximo. Estes

resultados sugerem que a activação dos linfócitos T CD4 é muito importante na crise aguda de asma.

• VARIAÇÕES DAS SUB-POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T APÓS PROVOCAÇÃO ESPECÍFICA

Alguns investigadores têm vindo a observar o que se passa com as subpopulações de linfócitos T após provocação brônquica específica em doentes asmáticos.

Assim, Gerblin e cols¹⁹ verificaram uma redução do número de linfócitos CD4 no sangue periférico imediatamente após provocação brônquica específica com um extracto de gramíneas a que os doentes estavam sensibilizados, que durava 72 horas, sem alteração das células CD8. Não se verificava nenhum fenómeno idêntico após provocação com metacolina, não dependendo portanto as alterações da broncoconstrição em si.

Para testar a hipótese de que a diminuição das células CD4 no sangue periférico se devia a uma chamada destas células ao pulmão, os mesmos autores²⁰ foram analisar o que se passava simultaneamente no sangue periférico e no líquido de lavado bronco-alveolar, nas mesmas condições. Confirmaram a diminuição dos linfócitos CD4 no sangue periférico e ao mesmo tempo um aumento significativo destas células no LBA, após a provocação com antigénio, mas não com o placebo, o que favorece a hipótese de a provocação antigénica condicionar uma chamada destas células ao pulmão.

• LINFÓCITOS T E EOSINÓFILOS

Sabe-se que os eosinófilos estão aumentados no sangue periférico e nas vias aéreas dos asmáticos e se correlacionam com a diminuição da função pulmonar e o aumento da reactividade brônquica.

Apesar de não se conhecerem ainda completamente os factores que levam à proliferação e aumento da sobrevivência dos eosinófilos nos doentes asmáticos, muitos estudos têm sugerido um papel importante dos linfócitos T na regulação destas células.

"In vitro" a IL-3, IL-5 e GM-CSF, que são libertados fundamentalmente pelos linfócitos, modulam a proliferação dos eosinófilos a partir dos progenitores, assim como a sua activação e libertação de mediadores.

Vários autores têm vindo a analisar nos últimos anos as relações entre linfócitos T e eosinófilos. Azzawi e cols²¹ estudaram o fenótipo dos linfócitos T e o estado de activação de linfócitos e eosinófilos nos tecidos colhidos por biópsias brônquicas em

asmáticos atópicos e não atópicos e em controlos e a sua correlação com a resposta à metacolina. Verificaram a presença de um número mais elevado de células CD3 e CD4 nos 2 grupos de asmáticos, quando comparados com os controlos, com diferenças insignificantes nas células CD8, assim como uma percentagem mais elevada de células CD25 (IL-2R) e de eosinófilos activados (EG2) nos asmáticos. A percentagem de células CD25 e EG2 era significativamente mais elevada nos doentes com hiperreactividade à metacolina.

Bradley e cols ²² ao estudarem os tecidos de biópsias feitas a 21 asmáticos atópicos, 10 atópicos sem asma e 12 controlos, verificaram que o número total de leucócitos (CD45) e de linfócitos CD3, CD4 e CD8, embora tendessem a ser mais elevados nos asmáticos, não apresentavam diferenças significativas, mas havia uma percentagem significativamente mais elevada de células CD25 e de eosinófilos activados (EG2) no grupo dos asmáticos. O número de eosinófilos activados correlacionava-se positivamente com o número de células CD3 e CD25 e com a reactividade à metacolina. Estes resultados suportam a hipótese de que os linfócitos T activados libertam produtos que regulam o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas.

Walker e cols ²³ verificaram no sangue periférico que o número de células T que expressavam IL-2R se correlacionava com a eosinofilia e que a sobrevida dos eosinófilos "*in vitro*" aumentava significativamente quando estas células eram cultivadas com soro de asmáticos, comparativamente com o que acontecia com o soro de controlos. Os factores existentes no soro dos asmáticos, responsáveis pelo aumento da sobrevida dos eosinófilos foram identificados, através de anticorpos neutralizantes, como IL-3, IL-5 e GM-CSF.

Bentley e cols ²⁴, num estudo de fragmentos de biópsias de doentes com asma ocupacional por isocianatos, de asmáticos extrínsecos e de controlos, não encontraram diferenças significativas no número de células CD3, CD4 e CD8, mas os doentes asmáticos, quer com asma ocupacional quer atópicos tinham uma percentagem mais elevada de eosinófilos totais (BM K13) e activados (EG2) e de células que expressavam IL-2R do que os controlos.

Os mesmos investigadores ²⁵ estudaram um grupo de doentes com asma intrínseca, comparando-os com doentes com asma extrínseca e controlos e verificaram que o número de linfócitos CD3 e CD4 era mais elevado no primeiro grupo. O número total de eosinófilos e EG2 e de células CD25 era significativamente mais elevado nos 2 grupos de

asmáticos do que nos controlos. O número de eosinófilos activados correlacionava-se com a pontuação de sintomas e com o pC20 da metacolina.

Estes resultados sugerem que a activação dos linfócitos T e a infiltração por eosinófilos são fenómenos comuns à asma intrínseca e à asma extrínseca.

A activação das células nos doentes não alérgicos poderá ser feita por agentes infecciosos, por auto-antígenos ou outros factores, podendo estar envolvido um fenómeno de mimetismo molecular, como nas doenças autoimunes.

Yang e cols ²⁶ verificaram que os linfócitos de doentes asmáticos, mas não de indivíduos normais aumentavam significativamente a proliferação e a sobrevida dos eosinófilos "*in vitro*", o que parecia não estar directamente relacionado com a presença de uma expressão aumentada CD25 dos linfócitos.

Todos estes trabalhos sugerem que os asmáticos têm um número aumentado de células CD4 activadas no sangue periférico e no tecido pulmonar e que estas células libertam citoquinas, nomeadamente IL-5 que regulam a chamada, aumentam a sobrevida e activam os eosinófilos.

• ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 E EFEITO DA CORTICOTERAPIA

O papel dos linfócitos T na mediação da asma pode ter uma importância muito grande não só na compreensão da patogénese da doença, mas igualmente na resposta à terapêutica.

Efectivamente, Corrigan e cols ²⁷ têm vindo a estudar a relação entre a activação de linfócitos T e a resposta à terapêutica com corticosteroides e apresentam resultados interessantes.

Quando compararam um grupo de asmáticos crónicos resistentes aos corticosteroides com um grupo de doentes sensíveis após uma e duas semanas de terapêutica verificaram que os primeiros tinham uma percentagem significativamente mais elevada de linfócitos T que expressavam as moléculas de activação IL-2R e HLA-DR.

Quando cultivaram "*in vitro*" células mononucleares do sangue periférico com PHA na presença ou ausência de dexametasona ou de ciclosporina A, verificaram que a dexametasona inibia significativamente a proliferação dos linfócitos T dos doentes sensíveis, mas não dos resistentes; a ciclosporina inibia em ambos os grupos, sendo o efeito menos marcado nos doentes resistentes.

O estudo da inibição da elaboração de IL-2 e INF- γ pelos linfócitos T estimulados por mitogénios revelou que a dexametasona só inibia essa produção

nos doentes sensíveis aos corticosteroides, enquanto que a ciclosporina inibia em ambos os grupos.

Estas observações demonstram que há um grupo de doentes que mantem uma activação permanente dos linfócitos T, mesmo a receberem corticosteroides, o que sugere que os linfócitos T podem ser um alvo da terapêutica com estes fármacos.

Num outro trabalho ²⁸ demonstraram que a terapêutica com corticosteroides instituída por exacerbações agudas de asma se associava a uma diminuição da IL-5 detectável no soro antes da medicação e a uma queda significativa dos eosinófilos periféricos, o que sugere que as exacerbações da asma estão associadas à produção de IL-5, que regula a eosinofilia; que os corticosteroides inibem.

• ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 NA ASMA E PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOQUINAS

Uma vez que a IL-4 é uma citocina muito importante nas doenças atópicas, modulando o crescimento dos mastócitos e promovendo a síntese de IgE e que a IL-5 é responsável pela diferenciação, aumento da sobrevivência e activação dos eosinófilos, é sedutor pensar que os atópicos terão um predomínio de células semelhantes às Th2 murinas.

Wierenga e cols ¹⁵ demonstraram que nos indivíduos atópicos os clones de células T específicas para o alérgeno tinham uma produção de citocinas com um padrão semelhante às Th2, enquanto que os clones não específicos de antígeno produziam grandes quantidades de INF- γ e pouca IL-4.

Robinson e cols ¹⁶ estudaram em 15 asmáticos e 10 controlos o perfil de expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de citocinas em células de LBA por técnica de hibridização "in situ" e verificaram que os asmáticos tinham mais células com mRNA para IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF, o que é compatível com a activação predominante de uma sub-população T do tipo Th2.

Os mesmos autores ²⁹ verificaram que após um teste de provocação brônquica específica as células do LBA apresentavam um aumento da expressão de mRNA para IL-4, IL-5, GM-CSF e IL-3, mas não para IL-2 e INF- γ e simultaneamente um aumento de eosinófilos.

Mais recentemente ³⁰ verificaram que havia uma associação significativa entre o número de células que expressavam mRNA para IL-4, IL-5 e GM-CSF e a obstrução brônquica, a hiperreactividade brônquica e a sintomatologia clínica.

Gagnon e cols ³¹ demonstraram em doentes sensíveis ao polen de lolium perene, que o perfil da

síntese de linfoquinas era influenciado pela exposição natural aos polens, parecendo que durante a estação polínica existe uma maior proporção de células Th2 em circulação.

Não parecem pois restar dúvidas de que os linfócitos T desempenham um papel extremamente importante na patogénia da asma brônquica.

BIBLIOGRAFIA

1. Laitinen LA, Heiro M, Laitinen A, Kava T, Haalela. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:599-606.
2. Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 87:1470-1473
3. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:434-457.
4. Kirby JG, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:379-383.
5. Kelly C, Ward C, Stenton CS, Bird G, Hendrick DJ, Walters EH. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airways responsiveness. *Thorax* 1988; 43:684-692.
6. Wardlaw AJ, Dunelto S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:62-69.
7. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:806-817.
8. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1745-1753.
9. Foresi A, Bertorelli G, Pesci A, Chetta A, Olivieri D. Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage and in bronchial biopsy in asthma during remission. *Chest* 1990; 98:528-535.
10. Bousquet J, Chané P, Jacoste JY, Enander I, Venge P, Simonnet C, Ahlstedt S, Michel FB, Godard P. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:649-660.
11. Vercelli D, Jabara HH, Arai K, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires IL-4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD₃ complex and MHC classe II antigens. *J Exp Med* 1986; 169:1295-1308.
12. Parronchi P, Tiri A, Macchia D, De Carli M, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Del Prete GF, Ricci M, Romagnani S. Noncognate contact-dependent B cell activation can promote IL-4 dependent *in vitro* human IgE synthesis. *J Immunol* 1990; 144:2102-2108.
13. Romagnani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990; 11:316.
14. Romagnani S. Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12:256-257.
15. Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg M. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4 T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144:4651-4656.

16. **Robison DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan CJ, Durham SR, Kay AB.** Predominant Th2 like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
17. **Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB.** T lymphocyte activation in acute severe asthma. *The Lancet* 1988; 1:1129-1132.
18. **Corrigan CJ, Kay AB.** CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:970-977.
19. **Gerblich AA, Campbell AE, Schuyler MR.** Changes in T lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N Engl J Med* 1984; 310:1349-1352.
20. **Gerblich AA, Salik H, Schuyler MR.** Dynamic T cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:533-537.
21. **Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham SR, Kay AB.** Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1407-1413.
22. **Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani A-MA, Shwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB.** Eosinophils, T lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:661-674.
23. **Walker C, Virchow JC, Bruijnzeel PLB, Blaser K.** T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J Immunol* 1991; 146:1829-1835.
24. **Bentley AM, Maestrelli P, Sietta M, Fabbri M, Robison DS, Bradley BL, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB.** Activated T lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate - induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:821-829.
25. **Bentley AM, Menz G, Storz CHR, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB.** Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:500-506.
26. **Yang JP, Renzi PM.** Interleukin-2 and lymphocyte - induced eosinophil proliferation and survival in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:792-801.
27. **Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB.** Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1026-1032.
28. **Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth V, Doi S, Kikuchi Y, Takatsu K, Durham SR, Kay AB.** CD4 T lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:540-547.
29. **Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Sun Ying, Kay AB, Durham SR.** Activation of CD4+T cells increased Th2-type cytokine mRNA expression and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:313-324.
30. **Robinson D, Sun Ying, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB, Hamid Q.** Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:397-403.
31. **Gagnon R, Akoum A, Hebert J.** Jol p I - induced IL-4 and INF- γ production by peripheral blood mononuclear cells of atopic and nonatopic subjects during and out of the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:950-956.