

Substância P na asma brônquica

Intervenção nos mecanismos de oxidação e activação celular

PRÉMIO SPAIC-UCB 2005 (2.º Prémio)

Substance P in Bronchial Asthma

Role in oxidant stress and in cell activation

PRÉMIO SPAIC-UCB 2005 (2nd Award)

Rev Port Imunoalergologia 2006; 14 (2): 105-116

Ana Todo-Bom¹, Anabela Mota Pinto², Sofia Vale Pereira³, Vera Alves⁴, Marília Dourado⁵, Celso Chieira⁶, Manuel Santos Rosa⁷

¹ Assistente Hospitalar Graduada, Serviço de Imunoalergologia, Hospital da Universidade de Coimbra

² Professora Associada de Fisiopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Directora do Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

³ Investigadora do Instituto de Patologia Geral, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

⁴ Investigadora do Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

⁵ Professora Auxiliar de Fisiopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

⁶ Director de Serviço, Serviço de Imunoalergologia, Hospital da Universidade de Coimbra

⁷ Professor Catedrático de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Director do Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

RESUMO

A Substância P (SP) descrita pela primeira vez no início do século XX, desempenha uma acção relevante a nível da inflamação neuroimune e do tónus da musculatura lisa. A asma brônquica é uma patologia crónica, com prevalência crescente em todos os países desenvolvidos. A inflamação crónica subjacente à doença pode limitar a reversibilidade funcional do órgão (respiratório), particularmente em casos clínicos mais arrastados. A importância que a enervação brônquica pode desempenhar neste processo tem sido recorrentemente analisada face à presença de um melhor conhecimento da asma, que possa permitir abordagens cada vez mais eficazes e mais direccionadas. É hoje indiscutível a intervenção da Substância P na activação de diversos grupos celulares, bem como na indução da produção acrescida de radicais oxidantes que, quando associada a redução das defesas anti-oxidantes, nomeadamente da capacidade antioxidante total (TAS) e da superóxido dismutase (SOD), condiciona inequivocamente a inflamação brônquica crónica. A SP constitui um substrato para a actividade da Dipeptidilpeptidase IV (DPPIV), uma molécula multifuncional, que, ao lado da

sua actividade como enzima, desempenha importantes funções imunoinflamatórias. A DPPIV foi identificada como sendo a molécula de activação linfocitária CD26, relacionável com outros marcadores de activação linfocitária, como o CD25.

O objectivo deste trabalho consiste em determinar o comportamento da substância P enquanto indutor de inflamação e de broncoconstrição em doentes com asma de evolução arrastada, confrontando-o com parâmetros funcionais ventilatórios e com os valores de TAS e de SOD como indicadores de protecção contra mecanismos oxidativos pró-inflamatórios, assim como com o CD26 e o CD25 no seu papel de activadores celulares, eventualmente centrados na modulação da resposta imunoinflamatória.

Foi seleccionado para o estudo uma população com mais de 65 anos de idade, que incluía um grupo de 64 doentes asmáticos (média de idades de 72.4 ± 5.1 anos) e um grupo controlo com 41 indivíduos saudáveis (média de idades de 79.2 ± 7.0 anos).

Em ambos os grupos procedeu-se à recolha de história clínica, à realização de testes cutâneos de alergia, à determinação da SP, da TAS e da SOD e à marcação linfocitária de CD25 e CD26. No grupo de asmáticos foi ainda realizado estudo funcional ventilatório.

Nos 64 doentes asmáticos, clinicamente estabilizados, 42 tinham testes cutâneos positivos, com sensibilização dominante para ácaros. No grupo de indivíduos doentes foram observados valores significativamente mais elevados de SP (116.2 ± 138.9 vs 39.5 ± 17.9 pg/ml) comparativamente ao controlo e significativamente mais reduzidos de TAS ($.85 \pm .13$ vs $.91 \pm .10$ mM) e de SOD (588.1 ± 156.1 vs 822.9 ± 179.5 U/gHb). A função pulmonar dos doentes com asma apresentava uma diminuição dos valores de volume expiratório máximo por segundo (VEMS) igual a 73.6 ± 25.3 l/s, e do débito expiratório máximo a 50% da capacidade vital (DEM50) igual a 38.8 ± 26.7 l, relativamente aos valores percentuais previsíveis. Os valores de CD25 estavam significativamente reduzidos nos doentes asmáticos (14.3 ± 5.9 vs 22.4 ± 7.8) enquanto os valores de CD26 se encontravam aumentados embora sem significado estatístico (41.9 ± 10.2 vs 39.4 ± 11.4).

O conjunto dos resultados confirma o impacto da intervenção neuroimune, nomeadamente da SP na asma brônquica e contribui para clarificar a rede de interacções subjacentes a essa intervenção. Este conhecimento terá necessariamente repercussão na intervenção diagnóstica e terapêutica nesta patologia.

Palavras-chave: Asma, SP, CD25, CD26, SOD, TAS.

ABSTRACT

The substance P (SP) was described in the beginning of the XXth Century, and its biological actions was recognized to have implications in neurogenic inflammation and constriction of smooth muscles. The bronchial asthma prevalence has been increasing in all developed countries. The changes associated to inflammatory chronicity can compromise the organ function reversibility. The role of neuromechanisms in the pathology of the disease has been investigated considering the hypotheses that better therapeutic approaches can be achieved. The stimulation of human cells by SP leads to their activation and to reactive oxygen species (ROS) release. Consequently a persisting inflammatory disability is observed, mainly if a decrease in the anti-oxidant defence occurs. SP is a substrate for dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), which is a multifunctional molecule with enzymatic and proinflammatory activities. CD26 was identified as the membrane DPPIV and is considered as an activation T cell marker, as well as CD25.

The aim of the present study was therefore to analyse if serum SP values in long-term asthma patients, were associated to lung function parameters, considering the role of SP in neurogenic inflammation and in bronchoconstriction. It

was also proposed to analyse the relationship of SP with superoxide dismutase (SOD) and total anti-oxidation activity in serum (TAS), considering the ROS production during the inflammatory process, as well as its association to CD26 and CD25 values and their immunologic and inflammatory properties.

A group of individuals older than 65 years including 64 asthmatic patients (mean age 72.4 ± 5.1 years) and 41 healthy individuals (mean age 79.2 ± 7.0 years) was selected.

Both subgroups were submitted to clinical observation, to skin prick tests and to SP, TAS and SOD. T cell CD26 and CD25 typing was also performed. Lung function tests were done to all patients.

Among patients studied, 42 presented positive skin tests, mainly to house dust mites. Asthmatic patients presented significant increased values of SP (116.2 ± 138.9 vs 39.5 ± 17.9 pg/ml) when compared to controls and a significant decrease of TAS ($.85 \pm .13$ vs $.91 \pm .10$ mM) and SOD (588.1 ± 156.1 vs 822.9 ± 179.5 U/gHb). All patients have clinical stability and presented forced expiratory volume in one second (FEV1) values of 73.6 ± 25.3 l/s and peak expiratory flow (PEF50) of 38.8 ± 26.7 l. The CD25 expression was significantly increased in disease (14.3 ± 5.9 vs 22.4 ± 7.8) while CD26 was only slightly increased (41.9 ± 10.2 vs 39.4 ± 11.4). These results confirm the role of SP in the respiratory pathology studied and give a contribution for a better knowledge of the network of immunoinflammatory pathway, associated to this chronic disorder. A final goal for these studies would be a better diagnostic and therapeutic approach in this pathology.

Key-words: Asthma, SP, CD25, CD26, SOD, TAS.

INTRODUÇÃO

A Substância P (SP) foi descrita por Gaddum e Schild no início do século XX, referindo-se ao pó obtido por extração a partir de componentes de cérebro e intestino equino, que tinha propriedades hipotensivas e de contração do músculo liso. Mais tarde, foi incluída na família das taquicininas, tal como a neuroquinina A (NKA) e a neuroquinina B (NKB) com as quais partilha a mesma sequência carboxil terminal¹.

As acções biológicas de substância P são mediadas através de receptores das taquicininas, que pertencem à estrutura de membrana do tipo da rodopsina. Há três tipos de receptores de taquicininas, demonstrando a substância P preferências para o receptor NK1¹.

Alguns dos efeitos mais apreciáveis, produzidos pela substância P e outras taquicininas libertadas pelas terminações periféricas dos neurónios sensoriais primários, traduzem-se pela designada inflamação neurogénica. As respostas produzidas a nível periférico pelos neuropeptídeos têm um papel proeminente a nível da vascularização, pro-

vocando vasodilatação, transdução de proteínas plasmáticas e ainda recrutamento, activação e adesão endotelial de células inflamatórias. Outras acções, mais localizadas, mediadas por mecanismos neurogénicos dependentes da SP incluem respostas de broncoconstricção.

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, caracterizada por uma obstrução brônquica generalizada mas variável, que é pelo menos parcialmente reversível espontaneamente ou através de intervenção farmacológica e que está associada a um aumento de reactividade a vários estímulos². A limitação ao fluxo aéreo descrita depende do efeito aditivo do processo inflamatório localizado e de contração da musculatura lisa respiratória, podendo ambas as vertentes resultar parcialmente da intervenção de taquicininas. Doentes asmáticos tendem a desenvolver um declínio progressivo da função pulmonar que se relaciona com a idade, sexo, duração e gravidade da asma³. Estudos de função ventilatória têm revelado que idosos com asma de longa evolução, por início relativamente precoce da doença, apresentam um padrão de obstrução das vias aéreas, basal e após prova de bron-

codilatação, mais marcado que idosos com asma de início tardio, por isso com duração inferior a 10 anos^{4,5}. As alterações funcionais referidas em asmáticos idosos, serão ainda potencialmente mais graves na medida em que o processo de envelhecimento, condicionando uma modificação do sistema imunitário, nomeadamente a nível do linfócito T, predispõe à ocorrência de infecções respiratórias amplificadoras da inflamação brônquica em asmáticos mal controlados⁶.

Estudos recentes demonstraram a importância da substância P na asma e na bronquite crónicas¹. De facto a SP tem acções pró-inflamatórias e na broncomotricidade que podem contribuir para as alterações observadas nas vias aéreas dos asmáticos. O reconhecimento da sua capacidade para provocar desgranulação dos mastócitos, por activação directa de proteínas G membranárias sugere a existência de um envolvimento, igualmente decisivo, em reacções de hipersensibilidade não-atópicas⁷.

Além de seu papel na inflamação neurogénica, a SP está envolvida na inflamação não-neurogénica. A nível da hematopoiese, a SP pode estimular a medula óssea, tendo como resultado o aumento da leucocitose durante a resposta inflamatória. Linfócitos, macrófagos, assim como mastócitos, expressam receptores para a SP que os pode estimular a produzir citocinas. Este facto, associado à capacidade que células inflamatórias têm para produzirem SP, pode conduzir a mecanismos de auto entretenimento do processo inflamatório. Aliás, macrófagos, activados por SP produzem mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2, tromboxano B2, interleucina-1, interleucina-6, e o factor de necrose tumoral (TNF α), e ainda iões superóxido⁸. A activação de células polimorfonucleares humanas pela substância P induz a produção de Radicais Oxigénio (ROS), de interleucina-8 e libertação de mieloperoxidase^{9,10,11}. Estes fenómenos podem alicerçar a fisiopatologia de uma crise de asma.

Os doentes asmáticos, durante uma crise apresentam lesões epiteliais características e produção de ROS, provocando um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante que tende a persistir^{12,13}. Para fazer face as estas agressões

oxidativas as células estão equipadas com um extenso repertório de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SDO). Este balanço pode eventualmente ser comprometido no caso de ocorrer redução da capacidade anti-oxidativa, nomeadamente da capacidade antioxidante total do plasma (TAS)¹⁴.

Várias enzimas estão envolvidas no metabolismo de substância P, como a endopeptidase neutra (NEP), a enzima conversora da angiotensina (ACE) e a dipeptidil-peptidase de IV (DPPIV)^{1,15}. O antigénio de activação linfocitária, CD26 é reconhecido como o marcador celular correspondente à DPPIV, uma peptidase membranar. O CD26 embora tendo apenas 6 aminoácidos na porção intracelular, tem uma participação importante na sinalização celular devido à sua associação com o CD45, que reconhece uma proteína tirosina fosfatase transmembranar do tipo I, identificada como a proteína de superfície de maior expressão nas células hematopoéticas nucleadas, resultando na modulação de proliferação celular¹⁶.

A molécula CD26, encontra-se numa grande variedade de células sobretudo epiteliais, de órgãos como o fígado, a pele, o baço, as glândulas parótidas, glândulas adrenais, o pulmão e a próstata^{17,18,19}. Em células de sangue periférico a sua presença é detectada quase exclusivamente nos linfócitos T activados^{20,21}.

Outro importante marcador de activação das células T é o CD25, uma glicoproteína que forma a cadeia- α do receptor da interleucina-2, presente nos linfócitos T e B activados.

OBJECTIVO

O objectivo deste trabalho consiste em determinar o comportamento da substância P no soro de doentes com asma de longa evolução, atendendo ao seu papel como indutor de inflamação e de broncoconstrição, confrontando-o com parâmetros funcionais ventilatórios, tendo por comparação uma população controlo da mesma faixa etá-

ria. Analisar os valores TAS e a SOD na mesma população, como indicadores de protecção contra mecanismos oxidativos pro-inflamatórios assim como o CD26 e CD25 no seu papel de activadores celulares, eventualmente centrados na modulação da resposta imunoinflamatória.

MÉTODOS

População

Um grupo de 105 idosos (com mais de 65 anos), com idades compreendidas entre os 65 e os 94 anos, incluindo 41 indivíduos pertencentes ao grupo controlo e de 64 doentes asmáticos, não-fumadores, foi seleccionado após o seu consentimento oral informado.

O grupo de doentes era constituído por 64 indivíduos não fumadores com asma persistente moderada e clinicamente estável. Todos os doentes referiam história de opressão torácica intermitente, sibilância e dificuldade respiratória durante pelo menos 30 anos antes da participação no estudo, consistente com o diagnóstico de asma de acordo com iniciativa global para asma (GINA). Todos os indivíduos estavam controlados, cumprindo medicação regular diária com 250µg a 500µg de dipropionato de beclometasona e β2-agonistas de curta acção nas agudizações. Qualquer outra medicação anti-asmática foi retirada pelo menos 4 semanas antes da inclusão no estudo.

O Quadro I representa as características dos indivíduos do grupo controlo e dos doentes asmáticos. A distribuição por sexo e a idade era semelhante nos dois grupos estudados.

Foram considerados critérios de exclusão para a totalidade da amostra, a presença de patologia sistémica, nomeadamente autoimune ou neoplásica, diabetes, dislipidémias, patologia hepática, cardíaca ou renal e ainda história de infecção nas últimas 6 semanas, ou de exposição recente a factores ambientais de risco.

Exames complementares

Foram realizados a todos os indivíduos incluídos no estudo, testes cutâneos de alergia por picada (*prick*) aos aeroalergénios comuns (ALK-ABELLO®) e que incluía *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Blatella germanica*, Gato, Cão, *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum officinale*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Platanus*, *Quercus suber* e *Olea europaea*.

Como controlo positivo foi incluído cloridrato de histamina (10mg/ml) e como controlo negativo, uma solução glicero-salina.

Os extratos alergénicos foram colocados na face anterior dos antebraços a uma distância de 3 cm entre eles e entre as articulações adjacentes e a picada realizada com lancetas metálicas tipo Morrow-Brown aplicadas perpendicularmente à pele com a profundidade de 1mm (Prick Lancetter-Dome Hollister Stier).

Após 20 minutos, foram efectuadas as leituras dos diâmetros médios das pápulas em milímetros, sendo considerados testes positivos, as pápulas com diâmetro igual ou superior a dois terços do controlo positivo. Em todos

Quadro I.

População	N	Masculino/Feminino	Idade Média	Idade Mínima/Máxima
Controlo	41	12/29	79,2±7,0	65/94
Asmáticos	64	21/43	72,4±5,1	65/83

os casos, o diâmetro da pápula nos testes positivos foi igual ou superior a 3 mm.

Todos os doentes foram avaliados do ponto de vista clínico e todos efectuaram uma espirometria basal usando o mesmo equipamento (Vitalograph Compact) pelo menos 6 horas depois da última toma de qualquer broncodilatador. Valores preditos foram avaliados de acordo com Knudson *et al*²², sendo as determinações das espirometrias obtidas, avaliadas por meio de um programa computadorizado de acordo com critérios de ATS'94. A aceitação para análise foi determinada usando os critérios de ATS'94, sempre que, dentro da mesma avaliação, três curvas fossem aceitáveis e reprodutíveis.

Recolheu-se cerca de 30 a 50 ml de sangue periférico da veia do antebraço para o doseamento de Substância P, TAS e SOD, CD25 e CD26 na população linfocitária.

Para o doseamento da Substância P foi necessária a adição, 5 minutos após a colheita, de aproximadamente 500 KIU/ml de aprotinina a todas as amostras, para evitar a degradação proteica. O doseamento sérico da substância P foi realizado pelo método competitivo imunoenzimático (R&D Systems, Minneapolis, USA). A absorvância, lida a 405 nm com uma correcção entre 570 e 590 nm, num leitor de microplacas (Behring ELISA Processador II, Dade Behring, Liederbach, Alemanha), é inversamente proporcional à concentração de Substância P na amostra.

Para avaliação da capacidade antioxidante total do plasma (TAS), foram utilizados reagentes da Randox comercializados sob a designação "Total Antioxidant Status", segundo metodologia baseada na capacidade plasmática de inibição de formação do catião radical ABTS⁺ [2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato)]. A actividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) eritrocitária foi avaliada usando o método de McCord e Fridovich descrito por Flohé e Ötting, com base na inibição da velocidade de redução do citocromo-C pelo radical superóxido gerado no sistema xantina/xantina oxidase. A variação de absorvância dos dois parâme-

tros foi medida num espectrofotómetro UVIKON UV-Vis termostaticado.

O estudo de antigénios de membrana das células do sangue periférico foi feito recorrendo a anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, anti-CD25 com fluoresceína isotiocianato (FITC) (Immunotech, Marseille, França), CD26 marcado com ficoeritrina (PE) (Immunotech, Marseille, França) (Dako, Dinamarca). As amostras foram adquiridas num Citómetro de Fluxo-*FACSCalibur* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), usando o software de aquisição *CellQuest* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) adquirindo dez mil células. Os dados foram posteriormente analisados com o software de análise *Paint-a-Gate* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) especificamente na população linfocitária.

Os cálculos estatísticos foram feitos utilizando o programa SPSS 12.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi usado para verificar se os parâmetros estudados se encontravam distribuídos normalmente. Nos parâmetros distribuídos normalmente utilizou-se o teste paramétrico t para avaliar duas variáveis independentes. Os parâmetros não distribuídos normalmente foram estudados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O estudo de correlação foi efectuado recorrendo ao coeficiente de Pearson. Os valores com um *p* inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Quarenta e dois doentes asmáticos idosos apresentaram testes cutâneos de picada positivos a aeroalergénios comuns. De acordo com os testes cutâneos de alergia, 6 doentes apresentavam reactividade cutânea moderada aos alergénios testados, com diâmetros das pápulas superiores a dois terços do valor da histamina, mas inferiores a este controlo positivo e 36 apresentavam reactividade cutânea marcada com diâmetro das pápula igual ou supe-

rior ao da histamina. Setenta por cento dos doentes estavam sensibilizados a ácaros e a maioria apresentava sensibilizações múltiplas.

O grupo de asmáticos, quando subdividido em alérgicos e não alérgicos, não mostrou diferenças significativas nos parâmetros biológicos analisados, pelo que foi sempre tratado na globalidade.

Os asmáticos demonstraram apresentar uma expressão significativamente aumentada de SP ($p = .009$), comparativamente aos controlos (Quadro 2, Figura 1).

O estudo de variáveis das defesas anti-oxidativas (TAS e SOD), revelou valores médios de TAS e SOD no grupo controlo significativamente superior à observada nos doentes asmáticos ($p = .000$) (Quadro 3, Figuras 2 e 3).

Quadro 2.

População	SP (pg/ml) ^{*/**} – Valor Médio	SP (pg/ml) – Mediana
Controlo	39.5±41.7	17.97
Asmáticos	116.2±138.9	49.02

* Teste Não-paramétrico de Mann-Whitney

** Significado Estatístico, $p = .009$

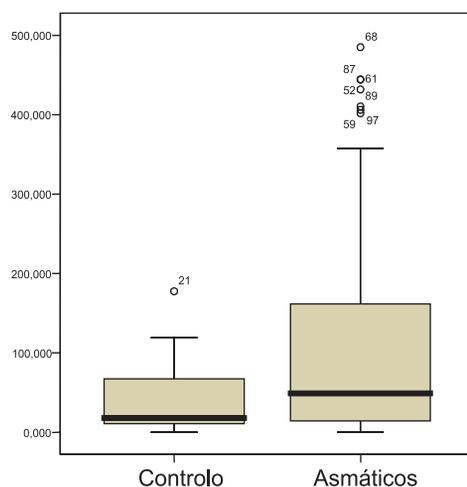


Figura 1. Valores de SP

Quadro 3.

População	TAS(pl) mM ^{*/**} Valor Médio	TAS(pl) Mediana	SOD(gv) U/gHb ^{*/**} Valor Médio	SOD(gv) U/gHb Mediana
Controlo	0.91±0.10	0.93	822.9±179.5	826.20
Asmáticos	0.85±0.13	0.85	588.1±156.1	562.90

* Teste t paramétrico

** Significado Estatístico $p = .000$

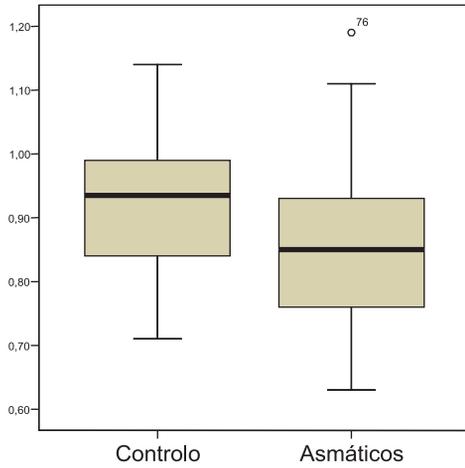


Figura 2. Valores de TAS

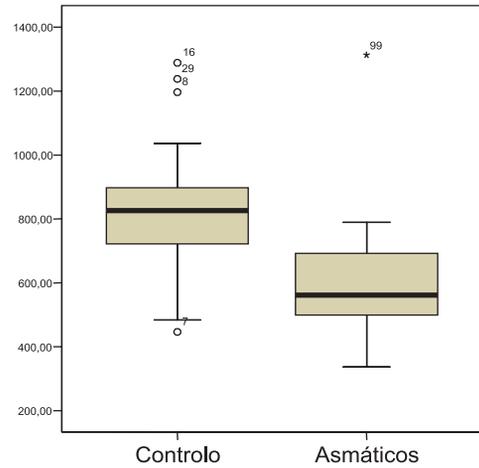


Figura 3. Valores de SOD

Os valores de CD25 estavam significativamente reduzidos nos doentes asmáticos ($p = .000$) enquanto os valo-

res de CD26 se encontravam aumentados mas sem significado estatístico (Quadro 4, Figuras 4 e 5).

Quadro 4.

População	CD25 ^{**} Valor Médio	CD25 Mediana	CD26 ^{***} Valor Médio	CD26 Mediana
Controlo	22.4±7.8	21.75	39.4±11.4	37.55
Asmáticos	14.3±5.9	13.45	41.9±10.2	43.10

* Teste t-paramétrico

** Significado Estatístico $p = 0,000$

*** Sem significado estatístico

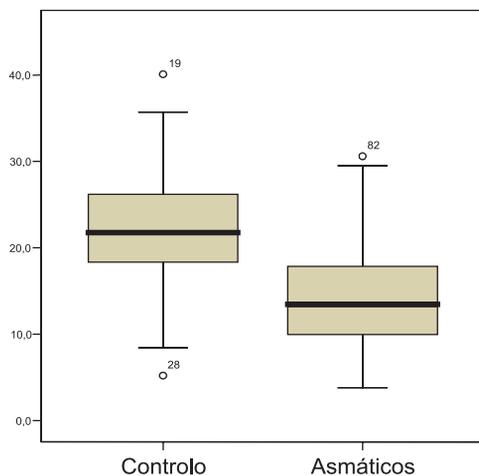


Figura 4. Valores de CD25

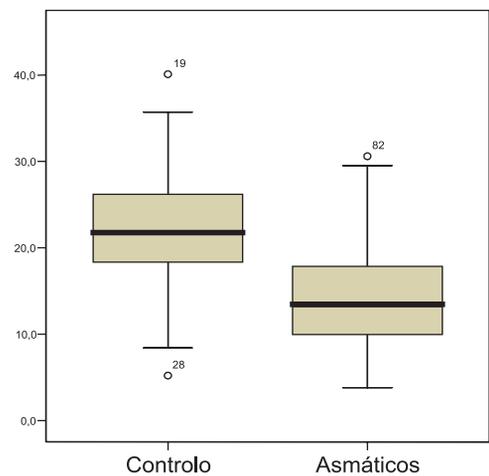


Figura 5. Valores de CD26

A função pulmonar dos doentes com asma apresentava uma diminuição dos valores de volume expiratório máximo por segundo (VEMS) igual a 73.6 ± 25.3 l/s, e do débito expiratório máximo a 50% da capacidade vital (DEM 50) igual a 38.8 ± 26.7 l, relativamente aos valores percentuais previsíveis.

DISCUSSÃO

Os valores aumentados de Substância P nos doentes asmáticos, quando comparados com os controlos normais, evidenciam o papel desta taquicinina na doença. Os estudos foram realizados em indivíduos com uma idade superior a 65 anos em que surgiram sintomas de asma há mais de 30 anos. A SP, ao actuar nos receptores do músculo liso brônquico condiciona o tónus brônquico e consequentemente o calibre das vias aéreas, e como interveniente na inflamação neurogénica, induz a produção de radicais de oxigénio, bem como a activação celular, particularmente de linfócitos. A população de asmáticos estudada revelou valores baixos de parâmetros ventilatórios relacionados com o padrão obstrutivo destes doentes. O calibre das vias aéreas resulta da acção sinérgica de tónus brônquico e da inflamação brônquica. Nos doentes asmáticos, a percentagem de VEMS observada correlacionava-se negativamente com a substância P (Pearson correlation= -0.272 , $p = 0,05$), o que permite inferir, atendendo ao aumento da SP nestes doentes, pela forte influência desta molécula no padrão obstrutivo ventilatório.

A produção de radicais de oxigénio contribui para a inflamação das vias aéreas dos doentes asmáticos e as defesas anti-oxidantes constituem os principais mecanismos de controlo deste processo. Aquela produção pode ser induzida pela acção da SP, conducente a uma resposta inflamatória cuja limitação e restituição funcional dependem da intervenção dos mecanismos de defesa antioxidante que nos asmáticos estudados apresentavam uma marcada redução com valores de TAS e de SOD significativamente inferiores aos do grupo controlo.

Durante o processo de envelhecimento, as defesas antioxidantes estão reduzidas o que, paralelamente à evolução da patologia presente (asma), traz implicações na acentuação da inflamação que tem vindo a ser referida em indivíduos mais idosos. Contudo, de acordo com alguns trabalhos, o processo de envelhecimento pode conduzir a uma redução de receptores de taquicininas ou frenação da resposta neurogénica a estímulos de neuromediadores como a acetilcolina²³.

A expressão dos marcadores de activação celulares, CD25 e CD26 estudados nos linfócitos revelaram comportamentos diferentes, observando-se uma elevação isolada e moderada dos CD26 (não significativa). O CD25 apresentou valores significativamente reduzidos no grupo de asmáticos, eventualmente associados ao perfil de citocinas do tipo Th2 habitual nestes doentes, com envolvimento de linfócitos B. Reforçando este conceito, observou-se no grupo controlo uma correlação muito significativa entre o CD25 e o CD26 (Pearson correlation= 0.664 , $p = 0,000$). Nos doentes asmáticos encontrou-se uma correlação positiva entre os níveis de SP e CD26 (Pearson correlation= 0.270 , $p = 0,03$), não observada no grupo controlo. Este aspecto pode entender-se como dependente dos níveis elevados de SP e das relações desta taquicinina com o CD26 (traduzida por uma correlação positiva entre estes dois parâmetros nos asmáticos), sugerindo que o processo normal de co-estimulação CD25CD26 possa estar perturbado neste último grupo. A expressão reduzida de CD25 tem sido associada ao processo de envelhecimento²⁴, facto susceptível de ocorrer no grupo de asmáticos idosos estudados.

A CD26, aumentada nos doentes asmáticos, comparativamente à população controlo, confirma a ocorrência de activação celular resultando de fenómenos inflamatórios em curso nesta patologia. Ainda, a actividade enzimática envolvida na degradação de outras taquicininas, como a enzima de conversão da angiotensina e a endopeptidase neutra, provavelmente tem papel de modulação na inflamação neurogénica que ocorre na mucosa das vias aéreas. Foi referido que a actividade aumentada dos efeitos sen-

soriais de neuropeptídeos e redução do seu catabolismo estaria associada a um aumento de vasodilatação de mucosa nasal, assim como de transudação plasmática e densidade acrescida de células inflamatórias^{25,26}.

O papel das células inflamatórias na inflamação neurogénica é difícil de definir e um dos problemas principais que se coloca assenta na variabilidade de expressão dos receptores destas células durante as diferentes fases da sua maturação e na passagem do local de origem para o local de inflamação¹. A SP pode actuar como um factor de indução de libertação de mediadores das células inflamatórias, sendo igualmente reconhecida a sua síntese por estas células, criando um mecanismo de auto-entretenimento do processo inflamatório e na eventual capacidade imunomoduladora. Isto explica o paradoxo observado entre a relativamente baixa concentração de SP nas terminações nervosas das vias aéreas e a sua presença na expectoração e no líquido de lavagem broncoalveolar produzida por células locais imunoinflamatórias²⁷ que confere a este neuropeptídeo um papel fundamental na obstrução das vias aéreas. O microambiente local nos diferentes tecidos parece ser importante, já que, como foi demonstrado, a injeção de substância P na pele saudável não induz infiltração de neutrófilos, enquanto na pele com uma resposta inflamatória se verifica uma acumulação de neutrófilos⁷.

A substância P aumenta no líquido de lavado broncoalveolar de asmáticos após prova de provocação com antigénio, embora se encontre reduzida no tecido pulmonar, em doentes que morreram em estado de mal asmático, reflectindo uma libertação exagerada de substância P nas vias aéreas nestas situações extremas e a consequente depleção no parênquima pulmonar¹. Nas vias aéreas, a imunoreactividade das taquicininas manifesta-se pela sua presença em fibras nervosas localizadas nas glândulas da sub-mucosa, músculo liso brônquico e rede vascular. Observam-se diferentes padrões de distribuição de receptores de taquicininas nas vias aéreas estando os receptores NK-1 localizados a glân-

dulas de submucosas, vasos brônquicos e epitélio. Recorrendo a antagonistas de adrenoreceptores e de colinoreceptores, foi provado que depois da eliminação das vias neuronais adrenérgicas e colinérgicas, persiste uma resposta secretória neurogénica não adrenérgica e não colinérgica, responsável por cerca de 40% da resposta secretória total¹⁰ confirmando o importante papel que a SP assume na patologia respiratória.

A sensibilização a aeroalergénios presente em alguns doentes não introduziu diferenças significativas relativamente aos asmáticos que apresentavam testes cutâneos negativos. Contudo, de acordo com outros autores, o calibre das vias aéreas e o grau de hiperreactividade brônquica podem estar associados à gravidade de atopia nos adultos com mais de 65 anos, pelo que não pode ser negligenciada²⁸. Aliás, embora os valores de IgE tendam a diminuir com a idade, uma alergia mediada por IgE pode estar presente em 75% dos asmáticos idosos²⁹.

O epitélio respiratório humano pode produzir espécies antioxidantes como mecanismo de defesa, que são consumidas face a diferentes agressões³⁰. A redução dos valores da superóxido dismutase tem sido referida na asma e em outras doenças crónicas, sendo o equilíbrio entre a agressão oxidativa e defesa antioxidativa afectado nestas circunstâncias. Alguns doentes asmáticos parecem ter, exclusivamente uma redução selectiva de SOD^{31,32}. Consistente com estas observações, foram já reportados níveis mais altos de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em condensados de ar expirado de asmáticos¹², correlacionando-se os níveis produzidos directamente com a gravidade da doença³³.

Estas alterações podem ocorrer associadas a perturbações da ingestão de nutrientes e estados inflamatórios crónicos. Outros estudos colocam em evidência o papel dos antagonistas de NK-1 e dos espoliadores de ROS na terapia da asma¹².

Em conclusão, o conjunto dos resultados confirma o impacto da intervenção neuroimune, nomeadamente da SP na asma brônquica e contribui para clarificar a rede

de interações subjacentes a essa intervenção. Esta realidade assume particular importância na população idosa com patologia respiratória mais arrastada. Constitui pois potencial de intervenção terapêutica a ser desenvolvida como complemento de actuação à já disponível e que ainda se revela manifestamente insuficiente para o total controlo clínico e funcional dos doentes com esta patologia crónica.

BIBLIOGRAFIA

- Harrison S, Geppetti P. Substance P (Review). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33:555-76.
- New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung and Blood Institute. *Lippincott Health Promot Lett.* 1997; 2:1,8-9.
- Kupczyk M. Long-term deterioration of lung function in asthmatic outpatients. *Respiration* 2004; 71:233-40.
- Braman S, Kaemmerlen J, Davis S. Asthma in the Elderly. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:336-40.
- Chanez P, Springall D, Vignola AM, Moradoghi-Hattvani A, Polak JM, Godard P, Bousquet J. Bronchial Mucosal Immunoreactivity of Sensory Neuropeptides in Severe Airway Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:985-90.
- Vignola AM, Scichilone N, Bousquet J, Bonsignore G, Bellia V. Aging and asthma: pathophysiological mechanisms. *Allergy* 2003; 58:165-75.
- Van der Kleij HPM, Kraneveld AD, Redegeld FAM, Gerard NP, Mortheau O, Nijkamp FP. The tachykinin NK1 receptor is crucial for the development of non-atopic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol* 2003; 476:249-55.
- Khodr B, Khalil Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. *Free Rad Biol & Med* 2001; 30:1-8.
- Black PH. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain, behaviour and Immunity* 2002; 16:622-53.
- Springer J, Groneberg DA, Pregla R, Fischer A. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regulatory Peptides* 2005; 124:195-201.
- Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:713-22.
- Springer J, Pleimes D, Scholz FR, Fischer A. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species. *Regulatory Peptides* 2005; 124:99-103.
- Henderson Jr WR, Chi EY, Teo JL, Nguyen C, Kahn M. A small molecule inhibitor of redox-regulated NF-kappa B and activator protein-1 transcription blocks allergic airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol* 2002; 169:5294-9.
- Todo Bom A, Proença T *et al.* O Sistema Antioxidante na Asma Brônquica: Condicionismos do Processo de Envelhecimento. *Rev Por Imunoalergologia* 2003; 11:17-29.
- Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H *et al.* Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25:1454-70.
- Proost P, Menten P, Struyf S, Schutyser E, De Meester I, Van Damme J. Cleavage by CD26/dipeptidyl peptidase IV converts the chemokine LD78 β into a most efficient monocyte attractant and CCR1 agonist. *Blood* 2000; 96:1674-80.
- Lacroix JS. Chronic rhinosinusitis and neuropeptides. *Swiss Med Wkly* 2003; 133:560-2.
- Lacroix JS, Buvelot JM, Polla BS, Lundberg JM. Improvement of symptoms of non allergic chronic rhinitis by local treatment with capsaicin. *Clinical Exp Allergy* 1991; 21:595-600.
- De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* 1999; 20:367-75.
- Gabrilovac J, Abramic M, Uzarevic B, Andreis A, Poljake L. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) enzyme activity on immature T-cell line R1.1 is down-regulated by dynorphin-A(1-17) as a non-substrate inhibitor. *Life Sci* 2003; 73:151-66.
- Marília Dourado. DPPIV/CD26 em Fisiopatologia Humana [dissertation]. Coimbra: University of Coimbra; 2000.
- Knudson R, Slavin R, Lebowitz M, Burrows B. The maximum expiratory flow volume curve: normal standards, variability and effects of age. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113:587-600.
- DeSouza CA, Clevenger CM, Greiner JJ, Smith DT, Hoetzer GL, Shapiro LF, Stauffer BL. Evidence for agonist-specific endothelial vasodilator dysfunction with ageing in healthy humans. *Journal of Physiology* 2002; 542:255-62.
- Dennett NS, Barcia RN, McLeod JD. Age associated decline in CD25 and CD28 expression correlate with an increased susceptibility to CD95 mediated apoptosis in T cells. *Exp Gerontol* 2002; 37:271-83.
- Grouzmann E, Monod M, Landis B, Wilk S, Nicoucar NB, Giger R *et al.* Loss of dipeptidylpeptidase IV activity in chronic rhinosinusitis contributes to the neurogenic inflammation induced by substance P in the nasal mucosa. *FASEB J* 2002; 16:1132-4.
- Durinx C, Neels H, Van der Auwera JC, Naelaerts K, Scharpe S, De Meester I. Reference values for plasma dipeptidyl-peptidase IV activity and their association with other laboratory parameters. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:155-9.

27. Joos GF, Pauwels RA. Pro-inflammatory effects of substance P: new perspectives for the treatment of airway diseases? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21:131-3.
28. Renwick DS, Connolly MJ. Persistence of atopic effects on airway calibre and bronchial responsiveness in older adults. *Age and Ageing* 1997; 26:435-40.
29. Huss K, Naumann PL, Mason PJ, *et al.* Asthma severity, atopic status, allergen exposure, and quality of life in elderly persons. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86:524-30.
30. Kelly F, Tetley T. Nitrogen dioxide depletes uric acid and ascorbic acid but not glutathione from lung lining fluid. *Biochem J* 1997; 325:95-9.
31. Smith L, Shamsuddin M, Sporn P, Denenberg M, Anderson J. Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. *Free Radical Biology & Medicine* 1997; 95:1301-7.
32. Comhair S, Bhatena P, Dweik R, Kavuru M, Erurum S. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen induced asthmatic response. *Lancet* 2000; 355:624-4.
33. Saleh D, Ernest P, Lim S, Barnes P, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients with induction of nitric oxide synthetase: effect of inhaled glucocorticoid. *Faseb J* 1998; 12:929-37.