

Asma – Reflexo da apoptose e de fenótipos de regulação

Asthma – A reflex of apoptosis and regulatory phenotypes

Rev Port Imunoalergologia 2007; 15 (3): 227-234

Ana Todo-Bom¹, Anabela Mota Pinto³, Vera Alves⁵, Sofia Vale Pereira⁴, Celso Chieira², Manuel Santos Rosa⁶

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

² Director de Serviço, Serviço de Imunoalergologia – Hospital da Universidade de Coimbra.

³ Professora Associada de Fisiopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Directora do Instituto de Patologia Geral – Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra.

⁴ Investigadora do Instituto de Patologia Geral – Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra.

⁵ Investigadora do Instituto de Imunologia – Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra.

⁶ 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 asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, e os linfócitos T desempenham um papel central na sua patogénese. Na inflamação alérgica quer os eosinófilos quer os linfócitos T podem ter um tempo de vida aumentado no local da inflamação, por redução da apoptose, mantendo-se activados. No pulmão encontra-se uma subclasse de linfócitos T que expressa receptor $\gamma\delta$. Estes linfócitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) representam 1 a 10% dos linfócitos maduros circulantes e desempenham funções importantes na primeira linha de defesa imunitária contra agentes microbianos, na inflamação alérgica e na regulação da inflamação crónica. O objectivo deste estudo consistiu na análise de linfócitos T na asma persistente de evolução arrastada em doentes idosos no que concerne à expressão de receptores de apoptose, na sua correlação com marcadores de activação (CD25 e HLADR) e ainda à expressão TCR $\gamma\delta$ nesta doença crónica comparativamente a indivíduos saudáveis do mesmo grupo etário e a indivíduos saudáveis adultos. Foram incluídos no estudo 64 doentes asmáticos (72 \pm 5 anos), com mais de 30 anos de evolução da doença e um grupo-controlo com 61 indivíduos, dividido em dois subgrupos de 41 indivíduos idosos (79 \pm 7 anos) e de 20 indivíduos adultos (38 \pm 12 anos). Todos os doentes foram avaliados do ponto de vista clínico e realizaram uma espirometria com *Vitalograph Compact*. As células do sangue periférico foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 anti-TCR $\gamma\delta$, anti-HLA-DR e anti-CD95. A análise estatística direccionou-se a comparar asmáticos com controlo-idosos e controlo-idosos com controlo-adultos. A percentagem média de *forced expiratory volume in the first second* (FEV1) foi de 73,6 \pm 25,3. Relativamente aos

receptores estudados, obtiveram-se os seguintes resultados em asmáticos vs controlo-idosos vs controlo-adultos: CD3: 74,9±7 vs 74,8±8,8 vs 76,7±4,2; CD4: 48,8±8,7 vs 43,5±10,2 vs 44,8±3,8; CD8: 23,3±7,9 vs 25,7± 10,2 vs 25,6±4,5; CD25: 14,3±5,9 vs 22,4±7,8 ($p=0,000$) vs 5,5 ±2,4 ($p=0,000$); TCR $\gamma\delta$: 2,8±2,1 vs 4,1 ± 3,3 ($p<0,05$) vs 4,6±2,1; HLA-DR: 18,4± 9,2 vs 17,8± 5,9 vs 15,4± 5,1 e CD95: 49,3±13,7 vs 52,6±12,1 vs 13,8± 10,8 ($p=0,000$). Em conclusão, as alterações imunológicas e inflamatórias associadas à idade determinam um aumento da expressão nos linfócitos T de CD25 e de CD95. Na asma, a probabilidade de células do sangue periférico expressarem um maior número de marcadores de activação e uma redução de marcadores de apoptose pode ser limitada nas formas estáveis da doença, não introduzindo modificações significativas às determinadas pelo envelhecimento. Os linfócitos T $\gamma\delta$ podem estar reduzidos na asma com evolução arrastada, podendo por isso exercer uma acção modesta na modulação da inflamação e contribuir para a cronicidade destas situações clínicas. Sendo a asma uma doença crónica irreversível qualquer análise ou interpretação fisiopatológica efectuada em formas tardias e arrastadas tem necessariamente de considerar as alterações decorrentes do processo de envelhecimento. A ausência de análise destes dados pode promover interpretações menos rigorosas, com ilações terapêuticas desajustadas.

Palavras-chave: Asma, envelhecimento, apoptose, TCR $\gamma\delta$, CD25.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways, and T lymphocytes play a central role in disease pathogenesis. The persistence of airway inflammation may depend on T lymphocyte and eosinophil increased survival in the bronchial mucosa, through apoptosis inhibition, with maintenance of their functional activation. The obstruction to the airway flow depends in part on the effect of the localised inflammatory process. T lymphocytes expressing $\gamma\delta$ receptors can be contained in human's lungs. These lymphocytes represent 1-10% of circulating mature T lymphocytes and play an important role in immune defence against pathogens and in regulation of chronic inflammation. The aim of the present study was to analyse T lymphocytes in long lasting asthma, considering apoptosis receptors and establishing correlations with activation markers such as CD25+ and HLADR+ and also considering $\gamma\delta$ T cells expression in this pathology, comparing these results with those from one healthy elderly population and from a healthy adult population. We studied a group of 64 individuals with asthma lasting for more than 30 years (72±5 years old) and a control group with 61 individuals including 41 elderly individuals (79±7 years old) and 20 adults (38±12 years old). All individuals were subjected to clinical evaluation and spirometric tests (Vitalograph Compact). Peripheral blood cells were stained with monoclonal antibodies anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-HLA-DR and anti-CD95. Statistical comparisons were done between asthmatics and elderly controls and between elderly controls and adult controls. The average percentage of predict Forced Expiratory Volume in the First Second (FEV1) was 73.6±25.3. The mean values of T cell receptors in the blood were the following for asthma vs elderly controls vs adult controls CD3: 74.9±7 vs 74.8±8.8 vs 76.7± 4.2; CD4: 48.8±8.7 vs 43.5±10.2 vs 44.8±3.8; CD8: 23.3±7.9 vs 25.7± 10.2 vs 25.6±4.5; CD25: 14.3±5.9 vs 22.4±7.8 ($p=0.000$) vs 5.5 ±2.4 ($p=0.000$); TCR $\gamma\delta$: 2.8±2.1 vs 4.1 ± 3.3 ($p<0.05$) vs 4.6 ±2.1; HLA-DR: 18.4± 9.2 vs 17.8± 5.9 vs 15.4± 5.1 e CD95: 49.3±13.7 vs 52.6±12.1 vs 13.8± 10.8 ($p=0.000$). In conclusion, the immunologic and inflammatory changes related to ageing determined an increase in CD95 and CD25 T cells expression. In asthma, blood cells can express increased activation and apoptosis markers but in patients under steroid therapy these receptors can be kept within normal range. The $\gamma\delta$ T cells can be reduced in long lasting asthma, and have modest modulation activity on allergic inflammatory reactions. Since asthma is a chronic disorder, studies directed to pathogenesis of such a prolonged disease should pay attention to elderly immunological and inflammatory changes, otherwise there will be a risk of misreading results and taking incorrect therapeutic attitudes.

Key-words: Asthma, elderly, apoptosis, TCR $\gamma\delta$, CD25.

INTRODUÇÃO

Asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas caracterizada por uma obstrução brônquica generalizada associada a uma hiperreactividade a vários estímulos e em que os linfócitos T (LT) têm um papel central^{1,2}. Doentes asmáticos habitualmente desenvolvem um declínio progressivo da função pulmonar que se relaciona com a duração e gravidade da asma³. Nas vias aéreas dos doentes asmáticos, os LT auxiliares (Th), particularmente com um perfil de citocinas Th2, estão funcionalmente activos regulando o recrutamento de células inflamatórias, nomeadamente de eosinófilos¹. A limitação do fluxo aéreo depende parcialmente do processo inflamatório localizado que se instala.

A apoptose tem uma importância central no desenvolvimento e no funcionamento do sistema imunoinflamatório. As células musculares, vasculares e epiteliais brônquicas, expressam o receptor Fas, um membro da família do receptor do factor de necrose tumoral (TNFR), também designado por Apo-1 ou CD95, que, por ligação com o seu ligando FasL, pode induzir apoptose e, desta forma, garantir a homeostasia das vias aéreas⁴. Mecanismos promotores de proliferação celular, necessários à reparação que ciclicamente ocorre na asma, podem condicionar a inibição da apoptose, favorecendo uma vida mais prolongada das células inflamatórias, com consequente agravamento da asma brônquica⁵. Na asma, os linfócitos T apresentam uma expressão aumentada de marcadores de activação, como o receptor de IL-2 (CD25) e como o *human leucocyte antigen* (HLA-DR) também envolvido na apresentação antigénica^{1,6}.

Existe no pulmão, na pele e no intestino, uma subclasse de linfócitos T com receptor (TCR) $\gamma\delta$, contrariamente à maioria dos LT que expressam o receptor $\alpha\beta$ ⁷. Estes LT $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) representam 1 a 10% dos linfócitos maduros circulantes e desempenham funções importantes, tanto na primeira linha de defesa imunitária contra agentes microbianos, como na regulação da inflamação crónica⁸. Os linfócitos TCR $\gamma\delta$ têm sido identificados nas vias respirató-

rias de doentes com rinite alérgica e com asma, e podem ter capacidade de intervenção na inflamação alérgica das vias aéreas por produzirem citocinas do tipo Th2 quando estimulados por alérgenos, tal como acontece com os LT que expressam o receptor $\alpha\beta$ ⁷. No entanto, estes linfócitos, na medida em que têm capacidade de efectuar uma produção rápida e em quantidade de INF γ em resposta, nomeadamente, a agentes microbianos, podem, pelo contrário, exercer uma acção reguladora da inflamação das vias aéreas dependente da agressão alérgica.

Os estudos dirigidos à avaliação de modificações ocorridas na asma de evolução arrastada são particularmente importantes, já que as alterações estabelecidas tendem a ser permanentes, não traduzindo apenas os agravamentos periódicos intercalados por remissões, que caracterizam a asma nas suas fases evolutivas mais prematuras. Este tipo de avaliação passa necessariamente pela inclusão de doentes idosos e, conseqüentemente, pela análise das alterações do sistema imunitário decorrentes do processo de envelhecimento. Na idade avançada, o processo de apoptose é importante, uma vez que determina a eliminação das células senescentes, constituindo uma forma de depuração celular e de garantir a homeostasia⁹. Durante o envelhecimento, a apoptose pode ser modelada por diversos factores que terão impacto variável no envelhecimento saudável, estando demonstrado que quando este mecanismo é menos eficiente é favorecido o aparecimento de doença¹⁰. Outro parâmetro que pode estar alterado é o número absoluto de TCR $\gamma\delta$ circulantes, habitualmente reduzido nos idosos, como consequência da redução do número total de linfócitos^{11,12,13}.

O objectivo deste estudo consistiu na análise da expressão de receptores de apoptose em linfócitos T (CD3) na asma persistente de evolução arrastada em doentes idosos, na sua correlação com a expressão de marcadores de activação (CD25 e HLADR) e na análise de linfócitos TCR $\gamma\delta$, pelo seu papel na modulação da resposta inflamatória, comparativamente a indivíduos saudáveis do mesmo grupo etário. Estabeleceram-se comparações para os mesmos parâmetros entre indivíduos saudáveis adultos e saudáveis idosos.

MATERIAL E MÉTODOS

População de estudo

Para a realização deste trabalho foram considerados dois grupos de estudo, o grupo de asmáticos constituído por 64 indivíduos com idade superior a 65 anos (média de idades 72 ± 5 anos) e o grupo-controlo, com 61 indivíduos. O grupo-controlo dividiu-se em dois subgrupos: um com 41 indivíduos idosos (média de idades de 79 ± 7 anos) e outro com 20 indivíduos adultos (média de idades de 38 ± 12 anos). Todos os indivíduos incluídos no estudo eram não fumadores e foram seleccionados após consentimento informado oral.

O grupo de asmáticos apresentava história de opressão torácica intermitente, sibilância e dificuldade respiratória, consistente com o diagnóstico de asma moderada persistente de acordo com o *Global Initiative for Asthma (GINA)*, pelo menos nos 30 anos que precederam a participação no estudo. Todos os indivíduos deste grupo estavam controlados com medicação regular diária de 250 a 500 μg de dipropionato de beclometasona e β_2 -agonistas de curta acção nas agudizações. Qualquer outra medicação anti-asmática foi retirada, pelo menos 4 semanas antes da inclusão no estudo.

Foram considerados como factores de exclusão a presença de infecção respiratória no mês anterior ao início do estudo, assim como outras doenças clinicamente relevantes, nomeadamente cancro, doença autoimune, infecção, diabetes, insuficiência cardíaca, renal e hepática e, ainda, exposição recente a factores de risco ambientais.

Exames complementares

Todos os doentes foram avaliados do ponto de vista clínico e realizaram, pelo menos 6 horas após a última toma de qualquer broncodilatador, uma espirometria usando o equipamento *Vitalograph Compact*.

Os valores preditivos foram medidos de acordo com Knudson e colaboradores¹⁴, sendo as determinações das espirometrias avaliadas por meio de um programa computadorizado de acordo com critérios de ATS'94. A aprovação para inclusão na análise foi determinada usando os

critérios ATS'94, sempre que dentro da mesma avaliação três curvas fossem aceitáveis e reprodutíveis.

Colheu-se cerca de 25 a 30 ml de sangue periférico por punção venosa. As células do sangue periférico foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD3 conjugado com ficoeritrina cianina 5 (PECy5) (Dako, Denmark), anti-CD4 conjugado com PECy5 (Dako, Denmark), anti-CD8 conjugado com ficoeritrina (PE) (Immunotech, Marseille, França), anti-CD25 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Immunotech, Marseille, França), anti-TCR $\gamma\delta$ conjugado com PE (Immunotech, Marseille, França), anti-HLA-DR conjugado com FITC (Immunotech, Marseille, França), anti-CD95 conjugado com FITC (Immunotech, Marseille, França), usando as especificações do fabricante. As amostras foram adquiridas num citómetro de fluxo-*FACS Calibur* (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.

A análise estatística foi realizada usando o *software* SPSS 12.0. Foram usados testes Kolmogorov-Smirnov para avaliar se as variáveis estavam distribuídas normalmente. Para as que tinham uma distribuição normal foi usado o teste T para variáveis independentes. As variáveis que não estavam distribuídas normalmente foram analisadas usando o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os valores com um p inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

As comparações estatísticas foram realizadas entre os controlos idosos e os asmáticos e entre os controlos idosos e os controlos adultos.

RESULTADOS

Todos os doentes estavam clinicamente estáveis e apresentavam uma percentagem média de *forced expiratory volume in the first second* (FEV1) de $73,6 \pm 25,3$.

Os valores médios no sangue periférico dos linfócitos T (CD3) e das suas subpopulações (CD4 e CD8) estavam dentro dos valores considerados normais, embora na asma se observasse uma tendência para valores aumentados de linfócitos T auxiliares (CD4) (Quadro 1).

Quadro 1. Valores médios no sangue periférico dos linfócitos CD3, CD4 e CD8 nos grupos-controlo e asmáticos.

População	CD3 Valor médio	CD4 Valor médio	CD8 Valor médio
Controlo – Adultos	76,7±4,2	44,8±3,8	25,6±4,5
Controlo – Idosos	74,8±8,8	43,5±10,2	25,7±10,2
Asmáticos	74,9±7	48,8±8,7	23,3±7,9

O grupo-controlo de idosos apresentava um aumento dos marcadores de activação HLA-DR e CD25, mas apenas este último com significado estatístico, quando comparado com o grupo-controlo de adultos. No grupo de asmáticos observou-se uma expressão significativamente diminuída do marcador CD25 comparativamente ao grupo-controlo de idosos ($p = 0,000$). Nos grupos referidos, as variações observadas para CD25 dependiam dos LT CD3 (Quadro 2). Os valores de HLA-DR foram semelhantes nos três grupos analisados.

Quadro 2. Valores médios da expressão de CD25, CD25/CD3, HLA-DR nos grupos-controlo e asmáticos.

População	CD25 Valor médio	CD25/CD3 Valor médio	HLADR Valor médio
Controlo – Adultos	5,5 ±2,4	3,6±1,4	15,4± 5,1
Controlo – Idosos	22,4±7,8 ^{*/**}	19,3±7,0 ^{*/**}	17,8± 5,9
Asmáticos	14,3±5,9 ^{*/**}	12,3±6,3 ^{*/**}	18,4± 9,2

* Teste t paramétrico

** Significado estatístico $p = 0,000$

O marcador de apoptose CD95 estava significativamente aumentado no grupo-controlo de idosos comparativamente ao grupo-controlo de adultos ($p = 0,000$). O grupo de asmáticos mostrava uma ligeira diminuição de CD95 em relação ao grupo de controlo de idosos. Os valores de TCR $\gamma\delta$ eram ligeiramente superiores a 4% nos grupos-controlo de idosos e de adultos, estando significativamente reduzidos nos asmáticos (Quadro 3).

Quadro 3. Valores médios da expressão de CD95 e $\gamma\delta$ nos grupos-controlo e asmáticos.

População	CD95 Valor médio	$\gamma\delta$ Valor médio
Controlo – Adultos	13,8±10,8	4,6±2,1
Controlo – Idosos	52,6±12,1 ^{*/**}	4,1 ±3,3
Asmáticos	49,3±13,7	2,8 ±2,1 ^{*/**}

* Teste t paramétrico

** Significado estatístico $p = 0,000$

DISCUSSÃO

Este estudo pretendeu analisar a possível intervenção dos linfócitos T, em particular da subpopulação TCR $\gamma\delta$, e a expressão de receptores CD95 em linfócitos, na asma brônquica persistente moderada com evolução arrastada, pela importância da sua intervenção na resposta imunoinflamatória desta patologia. Neste sentido, foram determinados, em asmáticos e controlos do mesmo grupo etário, fenótipos de linfócitos T susceptíveis de modular a inflamação brônquica crónica na asma. Uma vez que na população idosa existe um aumento da resposta inflamatória de base, foi também incluído no estudo, para análise dos mesmos parâmetros, uma população de adultos saudáveis. Esta resposta inflamatória, associada ao processo de envelhecimento, pode traduzir-se pela presença de células que expressam marcadores de activação e pela produção de citocinas pró-inflamatórias com um padrão preferencial Th2^{15,16}.

Na população de asmáticos foram encontrados valores não significativamente aumentados de linfócitos CD4, reconhecidos como indicadores de gravidade da asma¹⁷ pelo seu papel na patogénese desta doença e que está de acordo com a longa evolução clínica dos doentes estudados.

Os valores de CD25 estavam aumentados com significado estatístico no grupo-controlo de idosos comparativamente ao grupo-controlo de adultos. Pelo contrário, os asmáticos revelavam uma redução na expressão de CD25 e de CD3CD25, também com significado estatístico, e um discreto aumento de HLA-DR, quando comparados com o grupo-controlo de idosos. Este dado contraria os resultados de outros autores na asma brônquica, embora com trabalhos realizados em grupos etários mais jovens e com um número de doentes mais reduzido. A observação de uma correlação negativa, estatisticamente significativa entre CD25 e HLA-DR em asmáticos, indica comportamentos diferentes destes dois marcadores de activação em doentes idosos com asma brônquica. Uma possível explicação para este resultado reside no perfil de citocinas do tipo Th2, característico quer da asma, quer do envelhecimento com ambiente desfavorável à produção de IL2 e do seu receptor. Um desafio que se coloca na interpretação do papel dos CD25 na asma é perceber se a sua expressão nas vias aéreas traduz uma participação activa de linfócitos na resposta inflamatória, já que estas conclusões têm sido inferidas a partir de culturas celulares^{3,18}. Aliás, alguns trabalhos demonstram que LT CD25 positivos podem tornar-se anérgicos, ou seja, não respondentes a estímulos continuados e, por isso, já não se encontrando numa fase de desempenho activo na resposta imunoinflamatória¹⁹. A recente implicação da IL-2 nos fenótipos celulares reguladores abre mais uma via de explicação da intervenção do CD25 nos fenómenos imunoinflamatórios.

O estudo da susceptibilidade à apoptose pela expressão de CD95 demonstrou um aumento significativo deste receptor no grupo-controlo de idosos quando comparado com o grupo de controlo de adultos. De facto, a apoptose está envolvida em processos importantes do envelhecimento, como por exemplo na involução tímica, alte-

ração do reportório de linfócitos T na acumulação de células de memória e de células efectoras²⁰. No entanto os doentes asmáticos apresentavam um valor de CD95 diminuído, sem significado estatístico, comparativamente ao grupo-controlo de idosos. Os doentes estudados cumpriam baixas doses de corticoterapia inalada e estavam clinicamente controlados. De acordo com alguns estudos, a terapêutica com corticosteróides pode controlar a actividade da doença através da indução de apoptose celular, reduzindo a expressão de Fas (CD95) e também de CD25^{1,21}. A resistência dos linfócitos T à apoptose actuaría em sentido inverso, promovendo a manutenção de linfócitos T activados e a inflamação brônquica em curso²², situação que não foi observada no grupo de asmáticos estudados²³. Contudo, a ausência de marcadores de apoptose aumentados observada no grupo de asmáticos pode também ser resultado da intervenção dominante de LTh2 que caracteriza a asma. De facto, o sistema Fas/FasL manifesta maior actividade nos linfócitos com perfil de produção de citocinas do tipo Th1, que por se revelarem mais susceptíveis são preferencialmente eliminados²⁴. As alterações dos fenómenos de apoptose associadas à idade irão modular, com graus de impacto variáveis, a evolução da asma, e terão de ser valorizados na análise das alterações decorrentes da asma de longa evolução, que necessariamente atinge populações de grupos etários mais avançados²⁰. Foi observada uma correlação negativa e estatisticamente significativa entre a expressão de CD95 e CD3CD25 nos asmáticos, não se tendo observado esta correlação no grupo-controlo. Uma vez que os asmáticos analisados neste estudo tinham idade superior a 65 anos, a redução de CD95 nos indivíduos doentes foi pouco notória, confirmando-se, no entanto, a redução da apoptose nas células que também expressam este marcador de activação.

Na asma, o subtipo de LT $\gamma\delta$ com especificidade fenotípica e funcional capaz de produzir citocinas do tipo Th2 pode ter uma intervenção importante a nível da inflamação alérgica. De acordo com alguns autores, observam-se LT $\gamma\delta$ intra-epiteliais em número aumentado, quer

na mucosa nasal de doentes com rinite quer no líquido de lavagem broncoalveolar de doentes com asma^{25,26}. A intervenção destas células resulta da sua capacidade de identificar e responder a fracções alergénicas presentes no ambiente a que o doente está exposto de um modo continuado ou recorrente⁷. Neste trabalho, foi possível encontrar os LT $\gamma\delta$ significativamente reduzidos nos asmáticos com história de doença com mais de 30 anos de evolução, comparativamente ao grupo de controlo de idosos. É reconhecida a intervenção desta subpopulação de linfócitos na primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, podendo estar diminuída na população idosa²⁷. No entanto, no presente estudo os valores encontrados para este parâmetro no grupo-controlo de idosos foram semelhantes aos encontrados no grupo-controlo de adultos, não sendo por isso de concluir pela ocorrência de uma depleção selectiva deste tipo celular com o envelhecimento. Foi possível estabelecer uma correlação negativa com significado estatístico entre os LT $\gamma\delta$ e os linfócitos CD95 positivos, mas apenas no grupo de controlo de idosos. Aliás, determinações de CD95 $\gamma\delta$ efectuados pelo nosso grupo nesta população (não publicados) confirmam valores reduzidos de CD95 $\gamma\delta$ ($1,9 \pm 1,4$), que demonstram a ausência, nestas células, de uma expressão aumentada de Fas. Apesar da inflamação basal e das reconhecidas alterações imunológicas ocorridas no envelhecimento saudável, os linfócitos $\gamma\delta$ não demonstram sensibilidade aumentada à apoptose^{8,16}. Deste modo, os nossos resultados corroboram a hipótese de intervenção pró-inflamatória destas células no idoso, contrariamente ao referido em patologia respiratória nomeadamente na asma²⁸. Aos linfócitos TCR $\gamma\delta$ têm sido atribuídas indiscriminadamente propriedades pró-inflamatórias^{7,29} e anti-inflamatórias^{30,31}. Existem autores que reservam para os linfócitos $\gamma\delta$ uma acção reguladora na inflamação alérgica. Foi demonstrado que a estimulação de tecido de biópsia brônquica com anti-TCR $\gamma\delta$ não desencadeava a produção de IL5, estando também documentada a capacidade de os LT $\gamma\delta$ induzirem supressão da hiperreatividade brônquica³². Vários estudos mostram que estes

linfócitos podem sintetizar níveis elevados de IFN- γ , com efeitos inibitórios na síntese de IgE. Os processos infecciosos, na medida em que desencadeiam uma actividade intensa e rápida dos LT $\gamma\delta$, promovem um desvio para um ambiente citocínico do tipo Th1. Neste sentido, a diminuição observada do seu número traduz uma acção moduladora sobre a resposta alérgica mais modesta e, consequentemente, favorecedora da manutenção da doença.

Embora os LT $\gamma\delta$ tenham sido muito estudados na última década, a sua funcionalidade e o seu reportório de activação antigénica ainda não está completamente clarificado. Para além de uma indiscutível acção na resposta inata imunitária, nomeadamente na protecção contra agentes infecciosos e nos processos de reparação celular, parecem possuir um papel regulador que depende em grande parte da envôlvia e da sua janela de intervenção.

Em conclusão, as alterações imunológicas e inflamatórias associadas à idade determinam um aumento da expressão de CD25 nos linfócitos T e de CD95. Na asma, a probabilidade acrescida de células do sangue periférico expressarem marcadores de activação e de diminuição de apoptose pode ser limitado nas formas estáveis da doença e depende, em larga medida, da fase em que a avaliação é efectuada. Os LT $\gamma\delta$ estão reduzidos na asma, tendo uma acção limitada na modulação da inflamação alérgica, promovendo deste modo uma evolução arrastada da doença. A influência que o ambiente de citocinas de perfil Th2 que caracteriza a asma e o envelhecimento terá nos resultados apresentados não pode ser negligenciado na interpretação desses resultados. Sendo a asma uma doença crónica irreversível, qualquer análise ou interpretação fisiopatológica efectuada em formas tardias e arrastadas tem necessariamente de considerar as alterações decorrentes do processo de envelhecimento. A ausência de análise destes dados pode promover interpretações menos rigorosas com ilações terapêuticas desajustadas. Conclui-se ainda pela necessidade de se conhecerem os valores de referência em idosos saudáveis, relativamente a parâmetros imunoinflamatórios envolvidos na fisiopatologia da asma.

AGRADECIMENTOS

Cristina Lobo – Análise estatística

Leonor Salguinho – Apoio de secretariado

BIBLIOGRAFIA

- Melis M, Siena L, Pace E, et al. Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects. *Eur Respir J* 2002;19:257-66.
- New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung and Blood Institute. *Lippincott Health Promot Lett* 1997;2:8-9.
- Kupczyk M. Long term deterioration of lung function in asthmatic outpatients. *Respiration* 2004;71:233-40.
- Ramos-Barbón D, Presley JF, Hamid QA, Fixman ED, Martin JG. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest* 2005;115:1580-9.
- Simon H. Targeting apoptosis in the control of inflammation. *Eur Respir J* 2003;22(suppl 44):20s-1s.
- Chanez P, Springall D, Vignola AM, et al. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:985-90.
- Schramm C, Puddington L, Yamouyiannis CA, et al. Proinflammatory roles of T-Cell receptor (TCR) $\gamma\delta$ and TCR $\alpha\beta$ lymphocytes in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:218-25.
- Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, et al. Impairment of gamma/delta T lymphocytes in elderly: implications for immunosenescence. *Exp Gerontol* 2004;39:1439-46.
- Zhang X, Moilanen E, Adcock IM, Lindsay MA, Kankaanranta H. Divergent effect of mometasone on human eosinophil and neutrophil apoptosis. *Life Sciences* 2002;71:1523-34.
- Schindowski K, Leutner S, Muller WE, Eckert A. Age related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging* 2000;21:661-70.
- Argentati K, Re F, Donnini A, et al. Numerical and functional alterations of circulating gammadelta T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol* 2002 Jul;72:65-71.
- Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002 Jan-Mar;37(2-3):205-11.
- Re F, Poccia F, Donnini A, Bartozzi B, Bernardini G, Provinciali M. Skewed representation of functionally distinct populations of V γ 9V γ 2 T lymphocytes in aging. *Exp Gerontol* 2005;40:59-66.
- 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.
- Caruso C, Candore G, Colonna Romano G, et al. HLA Aging and longevity: a critical reappraisal. *Human Immunol* 2000;61:942-9.
- Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002;37:205-11.
- Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:970-7.
- Braman S, Kaemmerlen J, Davis S. Asthma in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:336-40.
- Frew AJ. Advances in environmental and occupational diseases 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1161-6.
- Ginaldi L, De Martinis M, Monti D, Franceschi C. The immune system in the elderly: activation-induced and damage-induced apoptosis. *Immunol Res* 2004;30:81-94.
- Melis M, Siena L, Pace E, et al. Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects. *Eur Respir J* 2002;19:257-66.
- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:563-73.
- Ying S, Khan LN, Meng Q, Barnes NC, Kay AB. Cyclosporin A, apoptosis of BAL T-cells and expression of Bcl-2 in asthmatics. *Eur Respir J* 2003;22:207-12.
- Jayaraman S, Castro M, O'Sullivan M, Bragdon MJ, Holtzman MJ. Resistance to Fas-Mediated T Cell Apoptosis in Asthma. *J Immunol* 1999;162:1717-22.
- Pawankar RU, Okuda M, Suzuki K, Okumura K, Ra C. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal/T cells in allergic and infectious rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1655-65.
- Spinozzi F, Agea E, Bistoni O, et al. Increased allergen specific, steroid sensitive T cells in bronchoalveolar lavage from patients with asthma. *Ann Intern Med* 1996;124:223-7.
- Akha AAS, Miller RA. Signal transduction in the aging immune system. *Curr Opin Immunol* 2005;17:486-91.
- Villarrubia N, León F, Bootello A. Los linfocitos T y su papel en procesos de hipersensibilidad en la mucosa digestiva y respiratoria. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2002;30:273-82.
- Zuany-Amorim C, Ruffié C, Hailé S, Vargaftig BB, Pereira P, Pretolani M. Requirement for T cells in allergic airway inflammation. *Science* 1998;280:1265-7.
- McMenamin C, Pimm C, McKersey M, Holt PG. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific/T cells. *Science* 1994;265:1869-71.
- McMenamin C, McKersey M, Kühnlein P, Hünig T, Holt PG. T cells down regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol* 1995;154:4390-4.
- N Krug, Erpenbeck VJ, Balke K, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage-derived CD4+, CD8+, and $\gamma\delta$ T cells in people with asthma after segmental allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:125-31.