

Paolo Ruggero Errante

Departamento de imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil.

*Artigo recebido em abril de 2016 e
aprovado em junho de 2016.*

LPS ESTIMULA A PRODUÇÃO DE CITOCINAS DO PADRÃO TH2 EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL E ASMA

RESUMO

Foi investigado o efeito do LPS sobre a síntese de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com imunodeficiência comum variável (CVID) e asma, e os seus resultados foram comparados com a produção de citocinas por PBMC de indivíduos saudáveis. Foi observado um aumento na produção de IL-4 e IL-5 por PBMC de pacientes com CVID com asma após 24 e 48 horas de exposição ao LPS. A produção de IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ TNF- α , IL-10 e IL-17 após exposição ao LPS no grupo CVID com asma e grupo controle não demonstram diferença estatística. A exposição ao LPS é capaz de induzir a produção de citocinas do padrão Th2 em pacientes com CVID com asma, capazes de influenciar o desenvolvimento clínico de asma e dano pulmonar.

Palavras-Chave: Imunodeficiência comum variável, imunodeficiência primária; deficiência primária de anticorpos; imunodeficiência celular.

LPS STIMULATES THE RELEASE OF TH2 CYTOKINES IN COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY PATIENTS WITH ASTHMA

ABSTRACT

To investigate the modulating effect of LPS on the synthesis of cytokines by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from common variable immunodeficiency patients with asthma, and their results were compared with the production of cytokines by PBMC of healthy individuals. Was observed an increase in the production of IL-4 and IL-5 by PBMC of CVID with asthma after 24 and 48 hours of exposure to LPS. The production of IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ TNF- α , IL-10 and IL-17 after exposure to LPS in CVID group with asthma and control group not demonstrate a statistical difference. The exposure to LPS is capable to induce Th2 cytokine release by PBMC of CVID patients with asthma, capable to influence the development of clinical asthma and pulmonary damage.

Keywords: Common variable immunodeficiency, primary immunodeficiency; primary antibody deficiency; cellular immunodeficiency.

Revista UNILUS Ensino e Pesquisa

Rua Dr. Armando de Salles Oliveira, 150

Boqueirão, Santos - São Paulo

11050-071

<http://revista.lusiada.br/portal/index.php/ruep>

revista.unilus@lusiada.br

Fone: +55 (13) 3202-4100

INTRODUÇÃO

A imunodeficiência comum variável (CVID) é uma imunodeficiência primária caracterizada por hipogamaglobulinemia, infecções recorrentes, autoimunidade, neoplasias e alergia. Nesses pacientes, distúrbios pulmonares crônicos podem levar ao desenvolvimento de bronquiectasia e doença pulmonar obstrutiva crônica ¹.

Nas últimas décadas observou-se um aumento do estilo de vida urbano, de famílias menos numerosas e redução do contato com animais, advento dos antibióticos e vacinas profiláticas, e alterações dos padrões alimentares e de higiene. De acordo com a hipótese da higiene ², existe uma relação entre o aumento da ocorrência de doenças alérgicas e redução na exposição microbiana durante a vida, induzindo o sistema imune a desenvolver uma resposta Th2, observada em processos alérgicos ³.

As doenças alérgicas são frequentes na sociedade moderna, e a hipótese da higiene sugere que este aumento é uma consequência da diminuição da estimulação do sistema imune por estímulos infecciosos. Acredita-se que esta falta de estímulo infeccioso favoreça o desenvolvimento de uma resposta imune Th2 em detrimento da resposta Th1 ⁴.

A asma alérgica é uma doença inflamatória das vias aéreas respiratórias associada com hiper-responsividade brônquica, obstrução das vias aéreas e produção de muco ⁵. A predominância de uma resposta imune adaptativa do padrão Th2 com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 em resposta a alérgenos induz o recrutamento e a ativação de eosinófilos, mastócitos e produção de IgE ⁶.

O efeito da exposição a endotoxinas e alérgenos é dose dependente, e o risco de doenças alérgicas é maior em baixas exposições, ao passo que a maior carga e tempo de exposição diminuem o risco. Ressalta-se que indivíduos asmáticos sibilantes apresentam um limiar mais baixo induzido por endotoxinas, responsável pela ausência de efeito protetor em alguns estudos ^{7,8}.

Endotoxinas bacterianas podem ativar os macrófagos que produzem IL-12 e estimulam a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 inibindo o padrão Th2 ⁹. O lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano é uma endotoxina encontrada no ambiente doméstico, e a exposição ao LPS pode induzir tanto uma resposta Th1 quanto Th2 ^{10,11}. Em função destes resultados conflitantes, foi investigado o efeito do LPS sobre a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com CVID e asma.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Foram selecionados durante o período de 2008 a 2010, 23 pacientes com CVID (idade entre 19 a 69 anos) com manifestação clínica da asma, e 25 indivíduos saudáveis como controle (idade entre 18 e 65 anos). Os pacientes com CVID foram selecionados na Divisão de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Brasil. Os critérios para a seleção de pacientes específicos com características clínicas de asma foram avaliados de acordo com o sistema padrão descrito pela Iniciativa Global para a Asma (GINA) ¹². Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados e supervisionados pela Comissão de Ética em Pesquisa da USP Faculdade de Medicina.

Teste de função pulmonar

A função pulmonar foi medida por espirometria usando um pneumotacógrafo de mão Vitalograph 2120 e software de análise por computador (Spirotrac IV; ambos da Vitalograph, Maids Moreton, UK). A interpretação dos resultados baseou-se nos critérios da European Respiratory Society de aceitabilidade e reprodutibilidade de curva fluxo-volume expiratória máxima ¹³.

Isolamento e cultura de PBMC

As PBMC de pacientes com CVID com asma e indivíduos saudáveis foram coletadas em frascos de polipropileno estéreis contendo ACD. O sangue foi diluído v/v em meio DMEM (Gibco) e adicionado sobre gradiente de centrifugação (Isolymp, Gallard-Schlesinger Na, Carle Place, NY, EUA). Após centrifugação a 400 g durante 20 minutos a 20°C, a camada contendo as PBMC foi recolhida e as células separadas. As células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS) (0.14 M de NaCl; Na₂PO₄ 0.01 M; pH 7,2), quantificadas, e a viabilidade verificada pelo uso de azul de tripano (Sigma Chemical Co.). Um total de 1x10⁶ de PBMC por poço foram cultivadas em placas

estéreis com 24 poços em um volume final de 1000 mL (DMEM com 5% de soro humano AB+, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina), a 37°C em atmosfera úmida saturada com 5% de CO₂ durante 12, 24 e 48 horas na presença de LPS (100 µg/mL).

Dosagem de citocinas

Após a estimulação das PBMC com LPS o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de IL-4, IL-5, IL-12p40, IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, IL-10 e IL-17 através da utilização de kit comercial Pelikine Compact ELISA (CLB, Amsterdam, Netherlands). Os limites de detecção foram para IL-4 de (0.5±0.6 pg/mL); IL-5 (0.5±0.6 pg/mL); IFN-γ (4±8 pg/mL); IL-12p40 e IL-12p70 (4±8 pg/mL); IL-10 (5±6 pg/mL), TNF-α (4±6 pg/mL) e IL-17 (4±8 pg/mL). A absorvância foi lida em comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA.

Análise estatística

As variáveis contínuas foram apresentadas na forma de média±desvio padrão e foram comparadas pelo teste ANOVA. Os resultados com p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

A estimulação das PBMC por LPS aumentou a produção de IL-4 e IL-5 no grupo composto por pacientes com CVID e asma após 24 e 48 horas, resultado estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle (*p<0.01) (Figura 1A, 1B).

A estimulação de PBMC com LPS induziu uma produção equivalente de IL-12p40 e IL-12p70 pelas PBMC de pacientes com CVID e asma e grupo controle nos períodos de 12, 24 e 48 horas (Figura 2A, 2B). O mesmo fenômeno foi observado para a produção de TNF-α e IFN-γ em todos os tempos experimentais (Figura 3A, 3B). Não foi observada uma diferença estatística na produção de IL-10 e IL-17 nos diferentes tempos experimentais na comparação dos dois grupos (Figura 4A, 4B).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi verificado que o LPS é capaz de influenciar uma maior produção das citocinas IL-4 e IL-5 nas primeiras 24-48 horas pelas PBMC de pacientes com CVID e asma.

A asma é uma doença inflamatória das vias respiratórias associadas a hiper responsividade brônquica e obstrução das vias aéreas 5, que apresenta forte associação com a resposta Th2 dos linfócitos T CD4 que secretam IL-4, IL-5 e IL-13⁹.

A presença de inflamação alérgica nos brônquios é muito importante em termos de prognóstico, especialmente em pacientes com CVID, que apresentam infecções crônicas e recidivantes do sistema respiratório¹. Também, as doenças pulmonares obstrutivas como asma e bronquiectasia estão presentes em mais de 50% dos pacientes com CVID¹⁴.

De acordo com a hipótese da higiene, a diminuição na frequência de infecções e redução na exposição aos microrganismos comensais ou patogênicos do ambiente levam a uma menor estimulação do sistema imune e aumento do risco de doença atópica e asma¹⁰. Este processo confere não somente proteção para atopia, mas também contra doenças autoimunes^{2,3}.

Alérgenos presentes na poeira doméstica, incluindo o LPS bacteriano são importante fonte de antígeno que pode influenciar a resposta imune adaptativa. Altos níveis de endotoxina foram correlacionados com aumento da produção de IFN-γ por células T CD4, onde se acredita que a exposição ambiental ao LPS é capaz de induzir uma resposta Th1¹⁵.

Neste estudo foi verificado que o LPS induziu uma maior produção de citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5) pelas PBMC de pacientes com CVID e asma nas primeiras 24-48 horas.

A IL-4 induz a síntese de IgE pelos linfócitos B, e a IL-5 causa recrutamento e ativação dos eosinófilos, ambos correlacionados com o aumento da gravidade da resposta inflamatório pulmonar em asmáticos¹⁶.

A inflamação leva ao acúmulo de muco no lúmen dos brônquios, hipertrofia da mucosa e submucosa², recrutamento de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, hipertrofia e hiperplasia das células da musculatura lisa¹⁶. Os leucócitos sequestrados na microvasculatura pulmonar produzem leucotrienos, radicais livres e fator de ativação plaquetária (PAF) que contribuem para o dano tecido local^{5,16,17}.

Os fibroblastos na presença de IL-4¹⁸ podem sintetizar componentes de matriz extracelular como o colágeno, que contribui para o desenvolvimento de obstrução das vias aéreas e redução da função pulmonar¹⁹.

Não foi observado neste estudo uma diferença na produção de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 como IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ e TNF- α entre pacientes com CVID e asma e indivíduos saudáveis, embora a literatura reporta o aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias por leucócitos de pacientes asmáticos expostos a *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*²⁰, e *Dermatophagoides farinae*^{21,22}.

Embora a IL-10 possua um papel modulador da resposta inflamatória²³, e a IL-17 esteja relacionada com a gravidade da doença^{24,25}, estas citocinas não foram detectadas em maiores quantidades em sobrenadantes de culturas celulares de pacientes com CVID e asma neste estudo.

Dessa forma foi demonstrado que exposição ao LPS pode levar a produção de IL-4 e IL-5, citocinas do padrão Th2 importantes para o desenvolvimento clínico da asma e dano pulmonar.

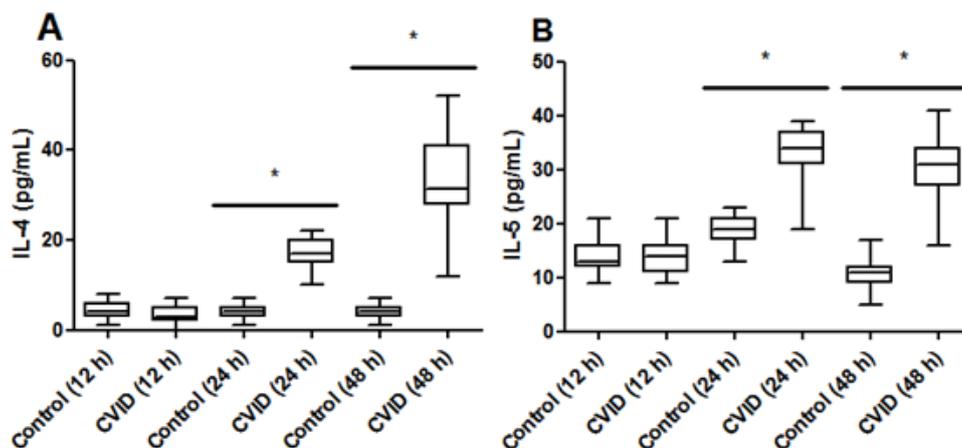
REFERÊNCIAS

1. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML, Franco JL, Gaspar HB. Primary Immunodeficiency Diseases: na Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* v.35, n.8, p.696-726, 2015.
2. Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* v.347, n.12, p.911-920, 2002.
3. Simpson CR, Anderson JA, Helmes PJ, Taylor MW, Prescott GJ, Godden DJ, Barker RN. Coincidence of immune-mediated diseases driven by Th1 and Th2 subsets suggests a common aetiology. A population-based study using computerized general practice data. *Clin Exp Allergy.* v.32, n.1, p.37-42, 2002.
4. Kero J, Gissler M, Hemminki E, Isolauri E. Could Th1 and Th2 diseases coexist? Evaluation of asthma incidence in children with celiac disease, type 1 diabetes, or rheumatoid arthritis: a register study. *J Allergy Clin Immunol.* v.108, n.5, p.781-783, 2001.
5. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* v.161, n.5, p.1720-1745, 2000.
6. Nwaru BI, Ahonen S, Kaila M, Erkkola M, Haapala AM, Kronberg-Kippilä C, Veijola R, Ilonen J, Simell O, Knip M, Virtanen SM. Maternal diet during pregnancy and allergic sensitization in the offspring by 5 years of age: a prospective cohort study. *Pediatr Allergy Immunol.* v.21, n.1, p. 29-37, 2010.
7. Braun-Fahrlander C, Gasser M, Grize L, Takken-Sahli K, Neu U, Stricker T, Varonier HS, Wüthrich B, Sennhauser FH; Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory symptoms; Air Pollution (SCARPOL) team. No further increase in asthma, hay fever and atopic sensitization in adolescents in Switzerland. *Eur Resp J.* v.23, n.3, p.407-413, 2004.
8. Duder T, Tapiainen T, Pokka T, Uhari M. Infections in child day care centers and later development of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. Prospective follow-up survey 12 years after controlled randomized hygiene intervention. *Arch Pediatr Adolesc Med.* v.161, n.10, p.972-977, 2007.
9. Guill MF. Asthma update: epidemiology and pathophysiology. *Pediatr Rev.* v.25, n.9, p.299-304, 2004.
10. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* v.347, n.12, p.869-77, 2002.
11. Park JH, Glod DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Resp Crit Care Med.* v.163, p.322-328, 2001.
12. von Mutius E. Presentation of new GINA guidelines for paediatrics. The Global Initiative on Asthma. *Clin Exp Allergy.* v.30, Suppl 1, p.6-10, 2000.
13. Donaire RM, González SA, Moya AI, Fierro LT, Brockmann PV, Caussade SL. Spirometry interpretation feasibility among pre-school children according to the European Respiratory Society and American Thoracic Society Guidelines. *Rev Chil Pediatr.* v.86, n.2, p.86-91, 2015.

14. Busse PJ, Farzan S, Cunningham-Rundles C. Pulmonary complications of common variable immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* v.98, n.1, p.1-8, 2007.
15. Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitization in infants at risk of asthma. *Lancet.* v.355, n.9216, p.1680-1683, 2000.
16. Markovic N, McCaig LA, Stephen J, Mizuguchi S, Veldhuizen RA, Lewis JF, Cepinskas G. Mediators released from LPS-challenged lungs induce inflammatory responses in liver vascular endothelial cells and neutrophilic leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* v.297, n.6, p.1066-1076, 2009.
17. Bron C, Catherinot E, Cadranet J, Oksenhendler E, Rivaud E, Couderc LJ. Pulmonary non-infectious diseases in common variable immunodeficiency. *Rev Pneumol Clin.* v.67, n.4, p.214-219, 2011.
18. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa H. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* v.132, n.2, p.168-176, 2003.
19. Phipps S, Benyahia F, Ou TT, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v.31, n.6, p.626-632, 2004.
20. Patel SP, Järvelin MR, Little MP. Systematic review of worldwide variations of the prevalence of wheezing symptoms in children. *Environ Health.* v.7, n.57, p.1-25, 2008.
21. Hallsworth MP, Soh CP, Lane SJ, Arm JP, Lee TH. Selective enhancement of GM-CSF, TNF-alpha, IL-1 beta and IL-8 production by monocytes and macrophages of asthmatic subjects. *Eur Respir J.* v.7, n.6, p.1096-1102, 1994.
22. Mitsuta K, Matsuse H, Fukushima C, Kawano T, Tomari S, Obase Y, Goto S, Urata Y, Shimoda T, Kondo T, Kohno S. Production of TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells through activation of nuclear factor kappa B by specific allergen stimulation in patients with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc.* v.24, n.1, p.19-26, 2003.
23. Magnan A, van Pee D, Bongrand P, Vervloet D. Alveolar macrophage interleukin (IL)-10 and IL-12 production in atopic asthma. *Allergy.* v.53, n.11, p.1092-1095, 1998.
24. van den Berg A, Kuiper M, Snoek M, Timens W, Postma DS, Jansen HM, Lutter R. Interleukin-17 induces hyperresponsive interleukin-8 and interleukin-6 production to tumor necrosis factor-alpha in structural lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v.33, n.1, p.97-104, 2005.
25. Kawaguchi M, Kokubu F, Fujita J, Huang SK, Hizawa N. Role of interleukin-17F in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets.* v.8, n.5, p.383-389, 2009.

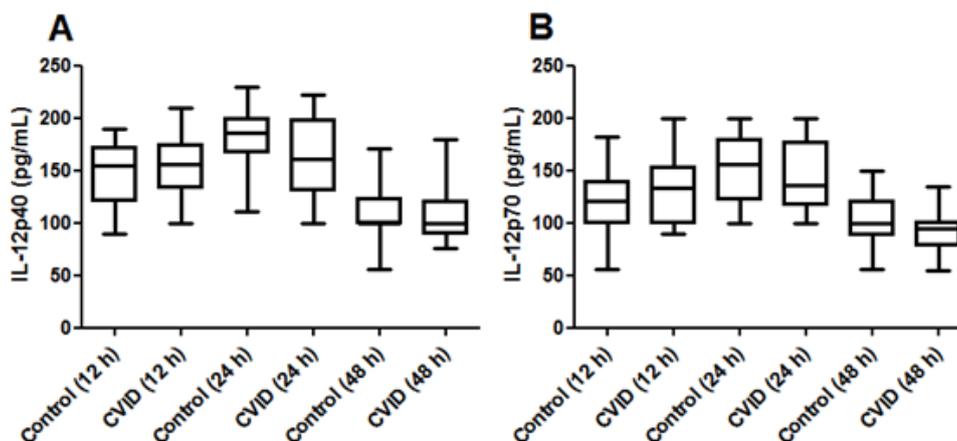
ANEXO – FIGURAS

Figura 1. Produção de IL-4 e IL-5 por PBMC de pacientes CVID e asma.



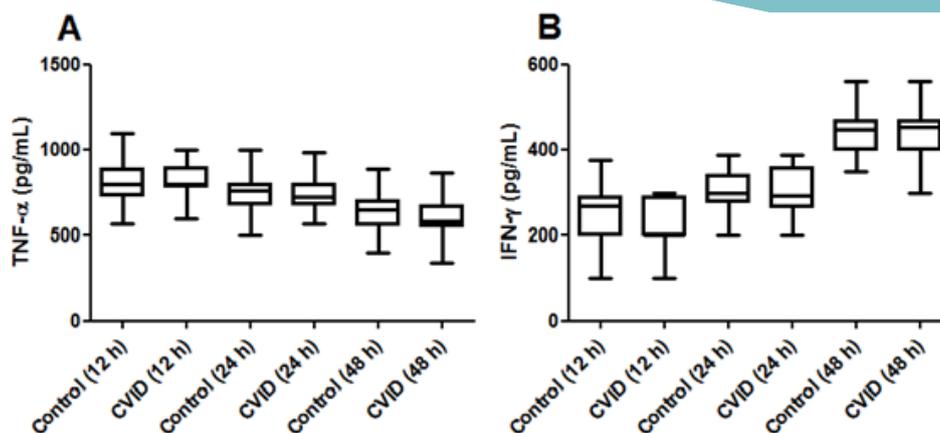
Legenda: A. PBMC de pacientes com CVID e asma apresentaram um aumento na produção de IL-4 com 24 e 48 horas de estímulo com LPS (ANOVA, * $p < 0,01$). B. PBMC de pacientes com CVID e asma apresentaram um aumento na produção de IL-5 com 24 e 48 horas de estímulo com LPS (ANOVA, * $p < 0,01$).

Figura 2. Produção de IL-12p40 e IL-12 p70 por PBMC de pacientes CVID e asma e indivíduos saudáveis.



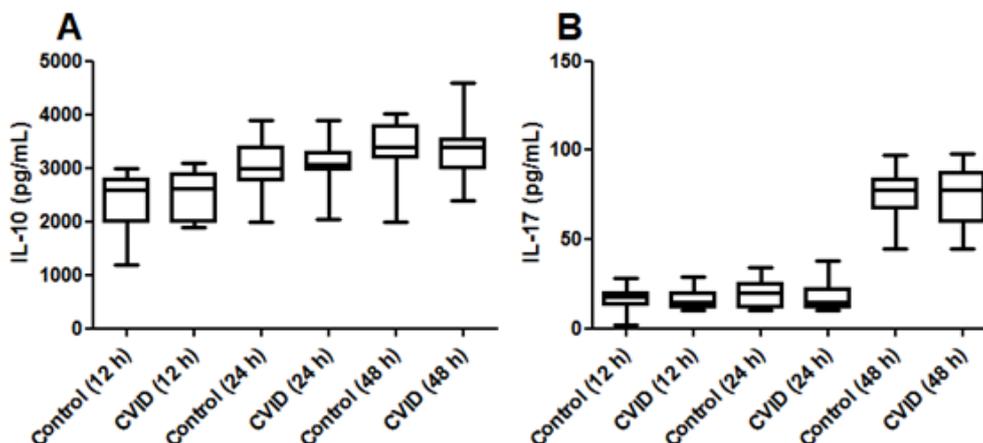
Legenda: A. PBMC de pacientes com CVID e asma não apresentaram diferença significativa na produção de IL-12p40 nos diferentes tempos experimentais. B. PBMC de pacientes com CVID e asma não apresentaram diferença significativa na produção de IL-12p70 nos diferentes tempos experimentais.

Figura 3. Produção de TNF- α e IFN- γ por PBMC de pacientes CVID e asma e indivíduos saudáveis.



Legenda: A. PBMC de pacientes com CVID e asma não apresentaram diferença significativa na produção de TNF- α nos diferentes tempos experimentais. B. PBMC de pacientes com CVID e asma não apresentaram diferença significativa na produção de IFN- γ nos diferentes tempos experimentais.

Figura 4. Produção de IL-10 e IL-17 por PBMC de pacientes CVID e asma e indivíduos saudáveis.



Legenda: A. PBMC de pacientes com CVID e asma não apresentaram diferença significativa na produção de IL-10 nos diferentes tempos experimentais. B. PBMC de pacientes com CVID e asma não apresentaram diferença significativa na produção de IL-17 nos diferentes tempos experimentais.