

Asma: um grande *chat* celular (cujo conteúdo ainda não conseguimos entender totalmente)

Asthma: a great cellular chat (but we don't get all of it)

Hisbello S. Campos¹

RESUMO

Pulmão RJ 2005; 14(2): 145-157

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas na qual fatores genéticos e ambientais interagem levando à alteração da estrutura e do funcionamento do trato respiratório. Ela não pode ser vista como uma doença puramente alérgica. Embora seja sabido que a atopia e a polarização da resposta imune mediada por linfócitos T no sentido T_H2 , juntamente com o processo de remodelamento, são importantes na sua patogenia, isso é apenas parte da história. Outros mecanismos, ainda não esclarecidos, estão envolvidos e são fundamentais. Os diferentes fenótipos da asma são o resultado da integração entre fatores genéticos e ambientais, que leva à interação entre mecanismos inflamatórios e estrutura alterada da via aérea através do epitélio e da camada mesenquimal subjacente, envolvendo citocinas, mediadores, fatores de crescimento e mecanismos de reparo. Quando esses imbricados mecanismos forem elucidados, possivelmente novos alvos terapêuticos na asma crônica serão identificados.

Descritores: patogenia da asma, imunologia da asma.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways in which genetic and environmental factors interact leading to altered structure and behavior of the respiratory tract. Asthma can't be seen as a purely atopic disorder. Although it is well known that atopy and polarization of the airway T-cell response toward a T_H2 -phenotype, together with remodeling events, are important in its pathogenesis, they are just part of the story. Many other mechanisms, not yet clarified, have important roles. The different phenotypes of asthma are just the result of an interplay of genetic and environmental factors, which causes interaction between inflammatory mechanisms and altered airway structure through the epithelium and underlying mesenchyme, and involves cytokines, mediators, growth factors and altered repairing mechanisms. By the time these mechanisms are elucidated, possibly novel therapeutic targets for chronic asthma will be identified.

Keywords: asthma pathogenesis, polarization of the airway T-cell response.

Glossário de siglas:

EGF - fator de crescimento epidérmico	MCP-1 - proteína quimiotática de monócito-1
FGF - fator de crescimento do fibroblasto	MIP-1 α - proteína inflamatória de macrófago - α
GC - glicocorticosteroide	PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas
G-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos	RANTES - regulado pela ativação, expresso e secretado por linfócitos T ("Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted")
GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócito	SCF - fator de célula-tronco
HRB - hiper-responsividade brônquica	STAT6 - transdutor de sinal e ativador da transcrição 6 (Signal transducer and activator of transcription 6)
IFN- α - interferon-alfa	TGF- β - fator transformador de crescimento beta
IFN- β - interferon-beta	TNF α - fator de necrose tumoral- α
IFN- γ - interferon-gama	TNF β - fator de necrose tumoral- β
IGF - fator de crescimento insulina-likeIL - interleucina	
M-CSF - fator estimulador de colônias de macrófagos	

1. Médico do Centro de Referência Prof. Helio Fraga, MS.
Local de realização: Centro de Referência Prof. Helio Fraga, MS.

Endereço para correspondência: Rua do Catete, 311/708 Catete 22220-001 Rio de Janeiro - RJ. E-mail: hisbello@globocom
Artigo recebido para publicação no dia 27/01/2005 e aceito no dia 11/05/2005, após revisão.

Introdução

Fatores genéticos e ambientais são importantes na definição da asma. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que fumaça de tabaco, poluição aérea e aeroalérgenos, dentre outros, ao interagirem com “genes da asma”, não só provocavam sintomas da doença em asmáticos como também eram causa dela¹. Se isso fosse verdade, a identificação desses fatores seria crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção que seriam aplicadas no início da vida visando à prevenção da doença. No entanto, esse conceito vem sendo contestado por experimentos recentes. Por exemplo, a hipótese de que o grau de exposição a aeroalérgenos (ácaros) no início da vida determinaria o risco de asma foi derrubada por estudo feito em domicílios de recém-natos que não mostrou associação entre concentrações de ácaros e subsequente aparecimento de sintomas asmáticos até os primeiros anos escolares². Mais ainda, enquanto um estudo revelou que a prevalência de asma em locais onde ácaros são infreqüentes não é menor do que em áreas com grandes infestações³, outros indicaram que a exposição a alérgenos de gato⁴ e de cachorro⁵ estariam associados com menor risco subsequente de asma. Vistos conjuntamente, esses estudos não apóiam a idéia de que a redução na exposição aos aeroalérgenos levaria a menor risco da doença. Ao mesmo tempo, há indícios de que a exposição a produtos microbianos, tanto pela via inalatória⁶ como oral-fecal⁷, no início da vida estaria associada a menor risco de asma. Acredita-se que a exposição microbiana precoce module o desenvolvimento de respostas imunes que não envolvem a predominância do linfócito T_H2 , característica da asma persistente⁸.

A questão importante não é apenas o que provoca as alterações características da asma no trato respiratório, mas também quando elas ocorrem. Aparentemente, o pulmão de um asmático é diferente; tanto as células constitutivas como as funcionais são distintas daquelas dos não-asmáticos. Certamente, essa diferença é resultado da predisposição genética, podendo haver participação da estimulação ambiental. É possível que a interação entre os fatores genéticos e ambientais ocorra ainda na fase intra-uterina, fazendo com que o asmático já nasça com seu aparelho respiratório alterado. Caso isso seja verdade, a questão seguinte é se essa alteração por si só é suficiente para gerar as manifestações clínicas da doença, ou se fatores externos são novamente necessários para tornar o asmático sintomático.

A patogenia da asma envolve intensa interatividade entre as células do trato respiratório. Uma ampla gama de citocinas participa do processo de

recrutamento e ativação de linfócitos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas e células neurais, entre outras, gerando as apresentações clínicas, funcionais e histopatológicas da asma. No presente trabalho, serão abordados os imbricados mecanismos envolvendo genes, meio ambiente e células alteradas na configuração daquilo que rotulamos como asma. Serão abordadas também as inúmeras incertezas que envolvem os mecanismos patogênicos da doença.

A genética da asma

A genética da asma é complexa, já que ela não é determinada por um único gen nem segue padrão Mendeliano. Ao contrário, aparentemente ela é determinada por um modelo poligênico com um padrão de penetrância incompleta e influência oligogênica, isso é, há diferentes *locus* responsáveis pela indução genética da asma. Análises de segregação sugerem que muitos genes estão envolvidos na patogênese da asma e que não há aquele que possa ser considerado o mais relevante⁹. Embora exista um traço comum entre os asmáticos – obstrução brônquica recorrente – há grande variação fenotípica, expressando heterogeneidade genética e influência ambiental. É possível que haja um pequeno grupo de genes – “genes da asma” – responsável pela expressão comum da doença, enquanto outros, ligados à expressão de diferentes fatores de risco para a asma, associados a fatores ambientais influenciariam a penetrância dos “genes da asma”. No primeiro grupo, podemos ter os genes que regulam a produção de IgE específica e a reação inflamatória aguda e crônica que envolve mastócitos, basófilos, eosinófilos e células T específicas para alérgenos. Tornando o tema ainda mais complexo, as interações tanto podem ocorrer entre genes e meio-ambiente, como entre os genes. Por exemplo, os polimorfismos podem envolver os genes responsáveis por citocinas pró-inflamatórias (IL-13, p. ex.), bem como por seus receptores, e/ou os genes envolvidos na transdução de sinal (STAT6). Alguns estudos demonstraram a possibilidade e importância dessas interações¹⁰.

Os resultados da busca pelos genes da asma devem ser interpretados com cuidado, já que múltiplos genótipos são comumente testados para um grande número de fenótipos e em amostras reduzidas. Dessa forma, erros do tipo 1 (resultados falso-positivos) podem ocorrer. Um candidato para integrar o grupo dos “genes da asma” é o ADAM-33. Ele está localizado no braço curto do cromossomo 20 e foi relacionado à asma e à hiper-responsividade brônquica (HRB)¹¹. Como ele foi

descrito no fibroblasto pulmonar e na célula muscular lisa, especula-se que ele esteja associado ao remodelamento das pequenas vias aéreas em asmáticos. Seus polimorfismos podem acelerar a proliferação dessas células, levando a HRB e à fibrose subepitelial. É possível, também, que ele regule a ação de citocinas, com alguns de seus polimorfismos potencializando a inflamação ou direcionando a resposta imune para o braço T_H2 ¹². A maior parte dos genes para as citocinas e seus receptores que regulam a inflamação alérgica estão localizados no braço curto do cromossomo 5q¹³. Na região 5q23-31 há diversos genes aparentemente importantes na patogênese da asma e no controle da síntese de IgE. Entre eles, os responsáveis pela codificação das interleucinas (IL) IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12 e IL-13, pelos receptores de corticosteróides e beta-2 adrenérgicos^{14,15}. A definição sobre se a resposta imune será predominantemente pelo braço T_H1 ou T_H2 também parece estar relacionada ao cromossomo 5q, mais precisamente na região 5q31.1¹⁶. No mesmo cromossomo, mas na região 5q33.2, encontra-se outro gen também relacionado à asma, o Tim1¹⁷. Esse gen codifica o receptor celular para o vírus da hepatite A (VHA) e há indícios de que essa infecção viral esteja fortemente associada à proteção contra o desenvolvimento da asma¹⁸. O mecanismo envolvido nessa modulação genética induzida por um patógeno específico tem origem no fato de a interação entre o VHA e o Tim1 alterar diretamente o balanço celular para o braço T_H2 . Dessa forma, ao apresentar o VHA ligado ao seu receptor, a célula T_H2 pode sofrer deleção clonal e, subseqüentemente, proteger contra o desenvolvimento de asma e de atopia. Mesmo na ausência da infecção pelo VHA, o Tim1 pode contribuir para a susceptibilidade para a asma, potencializando ou prevenindo a inflamação T_H2 -dependente. Esse efeito contrasta com o de outro gen relacionado à asma, o ADAM33¹¹. Esse último codifica uma metaloprotease que participa da resposta do epitélio respiratório à lesão e ao estresse, não parecendo participar da regulação dos componentes imunológicos da asma. As interações entre as células epiteliais e mesenquimais coordenam as respostas do epitélio respiratório à injúria oriunda do meio ambiente. O ADAM33 está ligado à amplificação desses mecanismos de reparo, levando à maior inflamação, ao remodelamento das vias aéreas e à asma. Mostrando a complexidade do envolvimento genético na asma, outro gen candidato, o GPRA está situado em outro cromossomo (7p), aparentemente próximo a outro gen possivelmente envolvido¹⁹.

O próprio ambiente uterino pode interferir na resposta fetal imune, uma vez que ele é organizado para proteger o feto da rejeição pela resposta T_H1 das células maternas. As mesmas citocinas que protegem o feto das respostas imunes citotóxicas podem afetar o desenvolvimento da resposta imune do embrião. Ao mesmo tempo em que níveis elevados de citocinas T_H2 (IL-4 e -10, p. ex.) poderiam reduzir a secreção de IFN- γ e outras citocinas T_H1 pelo feto, protegendo-o, também podem direcionar o sistema imune em formação para a produção de citocinas T_H2 e promover alergia. Esse direcionamento pode ser potencializado pela atopia materna, o que explica porque o desenvolvimento de doenças alérgicas na infância está mais relacionado à atopia materna do que à paterna²⁰. Há evidências de que, ainda na fase uterina, possa ocorrer a sensibilização pelos aeroalérgenos²¹.

A compreensão da genética da asma também trará informações importantes para seu tratamento. A farmacogenética é o estudo do papel de determinantes genéticos na resposta variável à terapia. O gen mais estudado com vista à farmacogenética é o responsável pela codificação da enzima citocromo p450. Já foi descrito que alterações nesse gen afetam o metabolismo de múltiplos fármacos²². A definição do genótipo do asmático pode ajudar a decisão terapêutica, aumentando a efetividade do medicamento e reduzindo as complicações.

Citocinas

As citocinas são parte dos diversos mediadores produzidos pelas células envolvidas na patogenia da asma, responsáveis pelas características agudas e crônicas do processo inflamatório da doença. Geralmente, citocinas são proteínas sinalizadoras extracelulares com tamanho menor que 80kD e glicosiladas que agem tanto sobre as células próximas como sobre as distantes. Podem ser vistas como um mecanismo de comunicação célula a célula que incluem fatores de crescimento e citocinas com propriedade quimiotóxica (quimiocinas). Elas agem nas células-alvo modulando uma ampla gama de funções celulares, incluindo ativação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação, liberação de outras citocinas e mediadores, crescimento e diferenciação celular, e apoptose²³. Sua ação se dá através dos receptores de citocinas, que podem agir como agonistas, antagonistas ou proteínas transportadoras que levam as citocinas para outros locais²⁴. Cada citocina pode ter múltiplas funções dependendo da célula que a produz e da(s) célula(s) alvo(s) (*pleiotropismo*). Ao mesmo tempo, diferentes citocinas podem ter a mesma função

biológica (*redundância*). Seus efeitos podem ser exercidos ao longo da corrente sanguínea em células distantes (*endócrino*), sobre células-alvo adjacentes àquela que a produz (*parácrino*) ou sobre a mesma célula que a produz (*autócrino*). Em função de sua natureza pleiotrópica e da superposição de efeitos, é difícil classificar o grande número de citocinas potencialmente envolvidas na patogenia da asma. Inicialmente, as citocinas foram categorizadas segundo suas principais funções. Dessa forma, elas foram divididas em quatro categorias:

a) Interferons (interferem com a replicação viral): interferon-alfa (IFN- α), interferon-beta (IFN- β) e interferon-gama (IFN- γ);

b) Fatores estimuladores de colônias (participam do crescimento e diferenciação dos vários elementos da medula óssea): fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulador de colônias de granulócito-macrófagos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e fator de célula-tronco (SCF);

c) Fatores de necrose tumoral (causam necrose hemorrágica de tumores ao serem injetados): fator de necrose tumoral- α (TNF α) e fator de necrose tumoral- β (TNF β);

d) Interleucinas (promovem a comunicação entre leucócitos): IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13, IL-15, IL-17 e outras.

Mais recentemente, com a evolução do conhecimento sobre elas e sobre a patogenia dessa doença, as citocinas passaram a ser agrupadas como:

1) Linfocinas: IL-2 (interleucina-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17;

2) Citocinas pró-inflamatórias: IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, GM-CSF, SCF;

3) Citocinas anti-inflamatórias: IL-10, IL-1ra, IFN- γ , IL-12, IL-18;

4) Citocinas quimiotáticas (quimiocinas): RANTES, MCP-1 (proteína quimiotática de monócito-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1 α , eotaxina, IL-8;

5) Fatores de crescimento: PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator transformador de crescimento beta), FGF (fator de crescimento do fibroblasto), EGF (fator de crescimento epidérmico), IGF (fator de crescimento insulina-like).

No Quadro 1 são apresentadas as principais citocinas envolvidas na patogenia da asma e seus efeitos, usando a classificação mais moderna.

Quadro 1 – Principais citocinas envolvidas na asma e seus efeitos*.

Citocina	Efeito
Linfocinas	
IL-2	Eosinofilia <i>in vitro</i> ; crescimento e diferenciação de células T.
IL-3	
IL-4	Eosinofilia <i>in vivo</i> ; fator pluripotencial hematopoiético.
IL-5	↑ eosinófilo; ↑ T _{H2} ; ↓ T _{H1} ; ↑ IgE.
IL-9	Maturação de eosinófilo; ↓ apoptose; ↑ T _{H2} ; HRB.
IL-13	
IL-15	Ativa eosinófilo; ↓ apoptose; ↑ IgE; ↑ HRB.
IL-16	Igual IL-2; crescimento e diferenciação de células T.
IL-17	Migração de eosinófilo; fator de crescimento e de quimiotaxia de células T CD4+.
Pró-inflamatórias	Proliferação de células T; ativa células epiteliais, endoteliais e fibroblastos.
IL-1	↑ adesão ao endotélio vascular; acumulação de eosinófilos <i>in vivo</i> ; fator de crescimento de T _{H2} e de célula B; quimiotaxia de neutrófilo; ativador de célula T e epitelial; HRB.
TNF- α	
IL-6	Ativa células endoteliais, epiteliais, apresentadoras de antígeno, monócitos/macrófagos; HRB;
IL-11	proliferação de fibroblastos.
GM-CSF	Fator de crescimento de célula T e B; ↑ IgE.
SCF	Fator de crescimento de célula B; ativa fibroblasto; HRB.
Inibitórias	Apoptose e ativação de eosinófilo; induz liberação de leucotrienos; proliferação e maturação de células hematopoiéticas; migração de células endoteliais; HRB.
IL-10	
IL-1ra	VCAM-1 no ↑ eosinófilos; fator de crescimento para mastócitos.
IFN- γ	↓ sobrevivência de eosinófilo; ↓ T _{H1} e T _{H2} ; ↓ ativação de monócito/macrófago; - células B e crescimento de mastócito; ↓ HRB.
IL-18	
Fatores de crescimento	↓ proliferação de T _{H2} ; ↓ HRB.
PDGF	↓ influxo de eosinófilo após alérgeno; ↓ T _{H2} ; ativa células endoteliais, epiteliais, monócitos/macrófagos alveolares; ↓ IgE; ↓ HRB.
TGF- β	Libera IFN- γ dos T _{H1} ; ativa células NK e monócitos; ↓ IgE. Proliferação de fibroblastos e de músculo liso da via aérea; síntese de colágeno. ↓ proliferação de célula T; bloqueia os efeitos da IL-2; proliferação de fibroblastos; quimiotaxia para monócitos, fibroblastos e mastócitos; ↑ proliferação de músculo liso na via aérea.

*- Chung e Barnes, 1999.

Conforme o Quadro 1 demonstra, as interleucinas desempenham papel fundamental na patogenia da asma. Dentre elas, aparentemente as IL-4, -5, -13 e -9¹. Enquanto a IL-4 é fundamental para a iniciação da resposta inflamatória T_H2, a IL-13 tem ação proeminente na fase efetora dessa resposta. A IL-13 é produto de um gen no cromossomo 5, na região q31-33, a mesma área que vem sendo relacionada à asma, e é um potente indutor da participação de eosinófilos, macrófagos e linfócitos na resposta inflamatória, da fibrose da via aérea, da metaplasia mucosa e da HRB². Os efeitos de outras citocinas T_H2 sobre o pulmão, como a IL-9, por exemplo, decorrem de sua capacidade de induzir a IL-13, sugerindo que essa última possa ser o caminho comum das respostas inflamatórias do tipo T_H2³. Dentre as citocinas T_H2, as IL-3, -4, -5, -9, -13 e o GM-CSF têm sua transcrição e produção aumentadas na asma mas, nas formas mais graves da doença, e em alguns casos de asma ocupacional, as células CD8⁺ também podem ser fontes dessas citocinas. É possível que os sinais primários que ativam as células T_H2 estejam relacionados à apresentação de um grupo de antígenos selecionados na presença das citocinas apropriadas. Nessa oportunidade, as moléculas co-estimuladoras na superfície da célula apresentadora de antígenos, em particular a interação B7.2/CD28, podem levar à proliferação de células T_H2⁴. Aparentemente, as citocinas também têm papel importante na apresentação do antígeno, podendo potencializar ou suprimir a capacidade dos macrófagos agirem como células apresentadoras de antígenos. Normalmente, o efeito dos macrófagos alveolares como apresentadores de antígeno é fraco, suprimindo as respostas proliferativas dos linfócitos T, diferente do que ocorre entre asmáticos⁵. Tanto o GM-CSF como o IFN- γ aumentam a capacidade de o macrófago apresentar o

alérgeno e, com a participação da IL-1 como co-estimuladora, leva à proliferação de linfócitos T_H2⁶. Os macrófagos alveolares podem ser uma fonte importante da “primeira onda” de citocinas, tais como a IL-1, o TNF- α e a IL-6, liberadas após a exposição a alérgenos inaláveis via receptores Fc ϵ R1L. A seguir, essas citocinas atuam sobre as células epiteliais levando à liberação de uma segunda leva de citocinas, que incluem o GM-CSF, a IL-8 e o RANTES, responsáveis pela amplificação da resposta inflamatória e pelo influxo de células secundárias, tais como os eosinófilos, as quais passam a liberar grande número de citocinas no local. Nesse mecanismo de atração de outras células, potencializando a reação inflamatória, as citocinas também têm importante efeito regulatório, modulando a expressão de moléculas de adesão tanto nas células endoteliais como nas epiteliais⁷.

Os fatores de crescimento, particularmente o PDGF e o TGF- β , liberados pelas células inflamatórias atraídas à via aérea (eosinófilos, macrófagos), como pelas células estruturais do trato respiratório (epiteliais, endoteliais e fibroblastos), estimulam a fibrogênese, recrutando/atraindo fibroblastos e transformando miofibroblastos⁸. A ação do PDGF e do EGF estimulando a proliferação de músculo liso, de vasos sanguíneos e de células calciformes, em conjunto com os efeitos do TNF- α e do FGF, levam à angiogênese, acarretando alterações anatomopatológicas características da asma. O próprio músculo liso peribronquico contribui para a patogenia da asma expressando e secretando citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Através das citocinas, as fibras musculares lisas interagem com células estruturais e inflamatórias, contribuindo para a inflamação, injúria e reparo das vias aéreas⁹.

As quimiocinas compõem um grupo de citocinas que controlam e direcionam a migração e ativação de várias populações de leucócitos. Estão divididas em dois grupos principais com base em sua seqüência homóloga e na posição dos dois primeiros resíduos cisteínicos: CxC (α) e CC (β)¹⁰. Há seis receptores CxC conhecidos e dez receptores funcionais CC, tendo sido identificados 16 CxC ligantes e 28 CC ligantes. A nomenclatura das quimiocinas, de seus receptores e de seus ligantes foi recentemente padronizada¹¹ (Quadro 2). Como cada quimiocina pode se ligar a diferentes receptores e cada receptor pode ligar-se a múltiplas quimio-

Quadro 2 – Nomenclatura padronizada das citocinas e de seus receptores.

Nome	Abreviação	Nome completo*	Receptores
CCL1	TCA3	T-cell activation-3	CCR8
CCL2	MCP-1	Monocyte chemotatic protein-1	CCR2
CCL3	MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1α	CCR1, CCR5
CCL5	RANTES	Regulated on activation, normal T cells expressed and secreted	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	Monocyte chemotatic protein-3	
CCL11	-	<i>Eotaxina</i>	CCR1, CCR2,
CCL13	MCP-4	Monocyte chemotatic protein-4	CCR3
CCL17	TARC	Thymus and activation-regulated chemokine	CCR3
CCL22	MDC	Macrophage-derived chemoattractant	CCR2, CCR8
CCL24	-	<i>Eotaxin-2</i>	CCR4, CCR8(?)
CCL26	-	<i>Eotaxin-3</i>	CCR4
CxCL8	IL-8	Interleucina-8	CCR3
CxCL12	SDF-1	Stromal-derived factor-1	CCR3 CxCR1, CxCR2 CxXR4

*- Apresentados em inglês para facilitar o entendimento das siglas.

cinas, elas agem em conjunto e têm múltiplas funções durante a resposta inflamatória/imune¹². O infiltrado celular que caracteriza a asma consiste, primariamente, em células mononucleares (linfócitos e macrófagos) e eosinófilos¹³. Como a ação dessas células sobre as vias aéreas, particularmente a do eosinófilo, é considerada lesiva na asma, a possibilidade de controlar a infiltração dos leucócitos no trato respiratório é vista como ação importante no tratamento dessa doença. No entanto, se considerada a diversidade na produção das quimiocinas e a promiscuidade nas ligações com seus múltiplos receptores, além dos seus múltiplos níveis de ação na patogenia da asma, pode ser difícil identificar um alvo específico para o desenvolvimento de novos fármacos.

A resposta imune na asma

A asma é uma doença inflamatória crônica do trato respiratório. Nela, o processo inflamatório é complexo e sofre a influência de diferentes estímulos, que podem ser alergênicos, neurais ou infecciosos. As células T ocupam lugar de destaque nessa imbricada rede de células, citocinas e impulsos nervosos, tanto promovendo a ação de outras células como regulando suas respostas. Como resultado da ação conjunta de fatores genéticos e ambientais, células e citocinas, temos alterações estruturais e funcionais do aparelho respiratório. Entre as primeiras, observa-se espessamento da parede brônquica, fibrose na membrana basal, metaplasia mucosa, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa e neovascularização (remodelamento brônquico).

Todas essas alterações são dependentes do tipo de resposta ao estímulo lesivo por parte do linfócito T. Aparentemente, as reações imunes predominantes na asma são do tipo T_H2 . Os linfócitos T_H1 e T_H2 são formados a partir de um precursor comum, o linfócito T_H0 . A diferenciação para outra população de células T é direcionada por sinais emitidos no microambiente. Na presença de células dendríticas $CD8\alpha^+$ e/ou das IL-12, IL-18 ou do IFN- γ , o linfócito T_H0 se diferencia em T_H1 . Essa evolução é mediada por um mecanismo dependente do transdutor de sinal e ativador de transcrição-1 (STAT-1) e do fator de transcrição T-bet¹. Por outro lado, na presença de $CD8\alpha^-$ e/ou da IL-4, são formadas células T_H2 . Esse processo de diferenciação envolve a transcrição de sinal mediada pelo STAT-6 e a ativação de um grande número de fatores de transcrição, incluindo o GATA-3, o fator nuclear de células T-c ativadas (NFAT-c) e o c-maf². Tornando ainda mais complexo esse processo, há um sistema de regulação mútua entre os linfócitos T_H1 e T_H2 , no qual

cada população celular é capaz de inibir e/ou regular o desenvolvimento e/ou o fenótipo induzido pela outra população. Aparentemente, enquanto o IFN- γ , produzido pelo T_H1 , inibe a população T_H2 , o inverso é modulado tanto pela IL4 como pela IL-10, produzida pelo T_H2 . A polarização para respostas T_H1 é importante para a ativação de macrófagos nas reações de hipersensibilidade retardada. Elas desempenham papel fundamental na patogênese de doenças como artrite reumatóide, sarcoidose e tuberculose. As respostas predominantemente T_H2 , por sua vez, estimulam as reações mediadas por anticorpos, ativam mastócitos e induzem eosinofilia nos tecidos, desempenhando papel importante nas respostas antiparasitárias e alérgicas, bem como na asma.

Há três componentes principais da resposta alérgica:

- 1) Formação de IgE específica;
- 2) Ativação dos mastócitos pela reexposição alérgica;
- 3) Inflamação alérgica, mediada principalmente pelo recrutamento e ativação dos eosinófilos.

Cada um dos eventos da resposta alérgica envolve: 1) recrutamento celular para o local da reação (quimiotaxia); 2) ativação dessas células, que passa a liberar seus produtos; 3) tráfego celular alterado, procurando manter as células próximas e promover a resposta alérgica. Um grupo de proteínas chamadas moléculas de adesão são estimuladas na superfície celular tanto das células inflamatórias como das células alvo (membrana endotelial dos vasos sanguíneos, tecido pulmonar, etc). Essas moléculas tentam limitar a reação inflamatória ao local da injúria tecidual ou da deposição do antígeno. No entanto, algumas delas participam da ativação celular, potencializando a reação inflamatória. Na verdade, essa é uma reação que visa a proteger o organismo contra o agente externo, porém com efeitos lesivos para o aparelho respiratório. A IgE é um dos cinco isótopos de anticorpos produzidos por linfócitos B humanos. Inicialmente, a célula B tem, em sua superfície, moléculas de IgM específicas para o antígeno (ou alérgeno, no caso da resposta alérgica). A célula T_H2 , através da IL-4, promove a mudança do isótipo da produção de IgE. Esse processo é antagonizado pelo IFN- γ , produzido pelas células T_H1 . O linfócito T_H2 , por sua vez, pode produzir IL-10, que inibe a produção do IFN- γ . Na modulação no sentido da produção de IgE, após o sinal da IL-4, é necessário um segundo sinal indutor que pode vir de várias fontes. Uma vez formada, a IgE liga-se tanto ao alérgeno causal como a receptores de IgE localizados em diferentes células, como os mastócitos. A ligação da IgE alérgeno-

específica ao mastócito leva à sua degranulação com a liberação de inúmeros mediadores responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, dando início a uma imbricada seqüência de reações inflamatórias. Essa ligação leva também à produção e liberação de diversas citocinas inflamatórias (IL-4 e TNF- α , por exemplo) e à ativação de moléculas de adesão (molécula de adesão de leucócito endotelial – ELAM-1; molécula de adesão intercelular-1 – ICAM-1; molécula de adesão da células vascular – VCAM-1). A ação dessas citocinas atrai os eosinófilos, os quais, por sua vez, produzem e liberam outras citocinas (IL-1, IL-3, IL-5 GM-CSF, TNF- α , entre outras), quimiotáticas e inflamatórias, potencializando e ampliando a reação inflamatória.

Os mecanismos celulares envolvidos na diferenciação T_H1/T_H2 envolvem predisposição genética, infecções virais e estimulação ambiental ainda na fase fetal. Esse tema é envolto por incertezas e algumas delas serão apresentadas a seguir. Com relação à participação viral, provavelmente alguns vírus modulam a diferenciação para o braço T_H1 e outros para o T_H2 , envolvendo diversas citocinas³. Como resultado de fatores “pró- T_H2 ” da placenta, o recém-nato tem fenótipo T_H2 ⁴. Acredita-se que estímulos ambientais no recém-nato possam restabelecer o equilíbrio T_H1/T_H2 , reduzindo o risco de asma. Essa crença é a base da “Hipótese da higiene”, que sugere que a melhoria das condições de higiene nas sociedades industrializadas, aliada a medidas efetivas de Saúde Pública e ao uso de vacinas e de antibióticos, reduziu a incidência de infecções que normalmente estimulariam o sistema imune de modo antagônico à asma⁵. Essa hipótese está apoiada em dados imprecisos, que incluem diversos estudos epidemiológicos que sugerem: 1) relação inversa entre o tamanho da família e o risco de desenvolver asma⁶; 2) que a matrícula precoce em creches e presumível exposição a agentes infecciosos parece proteger contra o desenvolvimento da asma⁷; 3) que a exposição a alérgenos epidérmicos de cães e gatos, bem como a endotoxinas bacterianas, podem reduzir o risco de asma⁸. Outro estudo indicou que a exposição a animais campestres e a ingestão de leite *in natura* no início da vida reduziria o risco de asma, de rinite e de sensibilização atópica⁹. Ao contrário, o uso de antibióticos no início da infância, que podem alterar a flora gastrointestinal e expor o intestino a endotoxinas está associado à maior incidência de alergia¹⁰. Dentre os patógenos considerados “protetores”, destacam-se o *M. tuberculosis*, o vírus do sarampo¹¹, o da hepatite B¹² e determinados vírus respiratórios. Esses agentes estimulariam as respostas T_H1 , limitando as T_H2 ¹³. É possível que exposições a

determinados agentes infecciosos no momento adequado levem à redução na produção de IFN- γ e à restauração do equilíbrio T_H1/T_H2 . No entanto, é possível que a relação inversa entre infecção pelo *M. tuberculosis* e risco de asma se deva ao fato que indivíduos que desenvolvem asma ou atopia podem ter déficit nas respostas imunes mediadas por células¹⁴ e incremento nas respostas humorais a alérgenos ou helmintos¹⁵. Toda a “modulação imune” apresentada acima pode iniciar-se ainda no útero através da transferência transplacentária de alérgenos e citocinas¹⁶. No entanto, há fatos que indicam que os mecanismos patogênicos da asma sejam mais complexos que os previstos na “hipótese da higiene” e no desequilíbrio T_H1/T_H2 . Por exemplo, a prevalência de doenças auto-imunes mediadas pelo linfócito T_H1 - diabetes tipo 1 e doença inflamatória do intestino, por exemplo – também está aumentando nos países industrializados nos últimos 20 anos.

Embora a “hipótese da higiene” seja motivo de debate na literatura especializada¹⁷, o valor da sensibilização alérgica numa situação genética propícia é indiscutível^{18,19}. No entanto, há debate sobre o valor do desequilíbrio T_H1/T_H2 na patogenia da asma. A hipótese de que a asma seria o resultado desse desequilíbrio no sentido T_H2 surgiu ao final da década de 80 do século XX e é sustentada pela observação de que há um perfil de citocinas T_H2 nessa enfermidade²⁰. Dentre as diversas citocinas com potencial para modular a inflamação das vias aéreas, algumas se destacam: a IL-4, ligada à síntese de IgE, a IL-5, relacionada à inflamação eosinofílica e a IL-13, que induz HRB independentemente da IgE e da eosinofilia^{21,22,23}. Todas as três (IL-4, IL-5 e IL-13) encontram-se aumentadas tanto na asma alérgica como na intrínseca²⁴. Entretanto, essa hipótese talvez sugira uma visão simplista dos mecanismos celulares envolvidos na patogenia da asma e é influenciada por ter sido desenvolvida, em grande parte, em modelos animais. No homem, não há células T que produzam apenas citocinas T_H1 ou T_H2 . Dependendo do estímulo, linfócitos T podem produzir IL-4 e IFN- γ ²⁵. Por essa razão, habitualmente é usada a relação IFN- γ /IL-4 para definir o fenótipo da resposta imune. No entanto, essa definição não leva em consideração a quantidade de citocinas produzidas nem a potência do sinal desencadeador de sua produção. Por exemplo, se um grupo de células T produz 20 unidades de IFN- γ e 2 unidades de IL-4, a razão é 10:1 e a resposta seria rotulada como T_H1 . Se essas mesmas células, ao serem sensibilizadas por determinado antígeno, produzissem 40 unidades de IFN- γ e 20 unidades de IL-4 (razão

2:1), essa resposta ainda seria identificada como T_H1 , mesmo que o aumento tenha sido de duas vezes na citocina T_H1 e de dez vezes na citocina T_H2 . Do mesmo modo, dependendo da citocina empregada para definir o fenótipo T_H , o resultado pode ser diferente. Por exemplo, assim como a IL-5, é considerada uma citocina T_H2 . Entretanto, nem sempre os níveis de ambas estão correlacionados após estimulação alérgica^{26,27}. Assim, se usada a IL-5 como produto T_H2 para definir o fenótipo da resposta, a relação T_H1/T_H2 pode ser diferente, assim como a classificação fenotípica, por conseguinte.

Tornando ainda mais complexa a discussão do valor do desequilíbrio T_H1/T_H2 na patogenia da asma, há estudos com resultados contrários à crença de que, dado o antagonismo entre as funções celulares T_H1 e T_H2 , desviar o sistema imune para o braço T_H1 protegeria contra a asma. Não há qualquer evidência direta que suporte essa hipótese. Em modelo murínico de asma, Hansen e colaboradores²⁸ demonstraram que as células T_H1 não atenuavam a HRB- T_H2 induzida nem a inflamação, e sim potencializavam essa última nas vias aéreas. De modo semelhante, Randolph e colaboradores²⁹, estudando humanos, demonstraram que as células T_H1 predominam na resposta imediata e as T_H2 na resposta tardia. Mostraram também que células T_H1 -antígeno específicas potencializavam a resposta inflamatória asmática. Outros estudos em humanos^{30,31} também sugeriram que desviar a resposta imune de T_H2 para T_H1 não afeta as medidas de desfecho da asma.

O efeito dos principais e mais efetivos medicamentos usados no tratamento da asma – glicocorticosteróides, beta 2 adrenérgicos e inibidores de fosfodiesterases – também fornece argumentos contrários à teoria do simples desequilíbrio T_H1/T_H2 . Caso a predominância do braço T_H2 seja relevante na patogenia da asma, é intuitivo imaginar que esses medicamentos desviassem a resposta imune para o braço T_H2 ou, pelo menos, manteriam o equilíbrio T_H1/T_H2 . No entanto, os glicocorticosteróides (GC) são potentes inibidores da resposta imune celular (predominantemente modulada pelo linfócito T_H1) e inibidores fracos e, às vezes, amplificadores da resposta imune humoral (mediada principalmente por células T_H2). É sabido que os GC: 1) direcionam a diferenciação do linfócito *T helper* no sentido do fenótipo T_H2 ³²; 2) bloqueiam a expressão de citocinas T_H1 e promovem a secreção das T_H2 ³³; 3) inibem a secreção de IL-12, citocina T_H1 ³⁴. Em conjunto, esses efeitos demonstram que os GC desviam a resposta imune para o braço T_H2 . Os beta 2 adrenérgicos reduzem a concentração

de IFN- γ (citocina T_H1) e aumentam a das IL-4, -5 e -10 (citocinas T_H2)³⁵. Estudos em humanos revelam que o uso de inibidores de fosfodiesterases (iPDE) reduz a expressão/secreção de citocinas T_H1 e direcionam para o fenótipo T_H2 ³⁶. Recentemente, Bielekova e colaboradores demonstraram que iPDE seletivos de PDE3 e de PDE4 têm efeito inibitório sobre as respostas imunes do tipo T_H1 e efeitos nulos, ou mesmo potencializadores, das respostas T_H2 ³⁷. Dessa forma, se o paradigma T_H1/T_H2 fosse tão relevante para a patogenia da asma, os doentes deveriam piorar com o uso desses medicamentos, exatamente o oposto do observado.

Há outros mecanismos imunes que devem ser considerados quando se tenta entender como mudanças ambientais em países industrializados poderiam interferir no risco de desenvolvimento da asma. A imunotolerância, induzida pela exposição das mucosas respiratória e gastrointestinal, é um deles. Em humanos, o grau da exposição alérgica parece afetar a indução da tolerância, com grandes exposições induzindo grande tolerância⁴⁵. Os mecanismos pelos quais antígenos respiratórios induzem tolerância de célula T incluem deleção clonal de linfócitos T, anergia e supressão ativa mediada por células regulatórias que secretam IL-10 ou fator transformador do crescimento- β (TGF- β), do mesmo modo que parece ocorrer na tolerância oral^{38,39}. O desenvolvimento de tolerância respiratória é iniciado pela captura de antígenos no pulmão por células dendríticas imaturas que apresentam continuamente o conteúdo antigênico. Essas células migram para os linfonodos pulmonares onde induzem uma fase inicial de ativação antígeno-específica das células T, que se segue por proliferação, expansão e depleção dessas células T dos órgãos linfóides. Parte dessas células sobrevive, mas permanecem refratárias (funcionalmente inoperantes) à exposição antigênica. Dessa forma, uma população de linfócitos T tolerantes a determinado antígeno previne o desenvolvimento de inflamação e de HRB⁴⁰. A IL-10 tem papel controverso nesse mecanismo. Ela é considerada uma citocina T_H2 essencial⁴¹, particularmente porque inibe a produção de citocinas T_H1 através da inibição da síntese de IL-12⁴². Entretanto, a IL-10 pode ter vários papéis na asma, e não apenas iniciar o desenvolvimento de respostas T_H2 , como também ter uma função regulatória tardia modulando negativamente a inflamação T_H2 .

Com base na argumentação acima, é possível que considerar a asma como polarização entre os braços T_H1 e T_H2 da resposta imune seja uma perspectiva exageradamente simplista. Certamente, há outros

fatores/mecanismos subjacentes com valor ainda desconhecido. Poder-se-ia interrogar ainda se as alterações teciduais e funcionais do trato respiratório (remodelamento), conjugadas a alterações características do epitélio brônquico de asmáticos não são partícipes importantes da patogenia da asma.

A inflamação, o epitélio brônquico e o remodelamento do pulmão na asma

Aparentemente, a inflamação crônica das vias aéreas presente na asma é regida pelos linfócitos T CD4⁺ do subtipo T_H2. Há evidências de que essa inflamação é mantida pela persistência de células T de memória (CD45RO⁺) cronicamente ativadas. Parte delas está direcionada para antígenos virais, parte para alérgenos e parte para fatores ocupacionais⁷⁸. Possivelmente, além da atopia e da polarização da resposta imune para o braço T_H2, o processo de remodelamento do pulmão também é um fator importante na patogenia da asma. Remodelamento é a denominação dada ao conjunto de lesões anatomopatológicas habitualmente observadas nas vias aéreas asmáticas: 1) lesão do epitélio ciliado estratificado; 2) depósito de fibras colágenas (tipos I, III, IV e V), laminina, tenascina C, proteínas da matrix celular e proteoglicans (versican, fibromodulina, biglican e decorina, entre outros) sob a membrana basal e 3) hiperplasia dos elementos constitutivos do trato respiratório (microvasos, nervos, células, calciformes e musculatura lisa)^{43,44}. Os miofibroblastos responsáveis pela secreção dessas novas fibras colágenas são capazes de gerar proteínas da matrix celular e citocinas pró-inflamatórias, e sua quantidade está diretamente relacionada à espessura da membrana sub-basal³². Indicando o papel ativo do epitélio brônquico na patogenia da asma, fatores de crescimento de fibroblastos (TGF-β, EGFs, bFGF, IGF-1, PDGF e endotelina-1) por ele sintetizados em quantidades elevadas, e com a participação da IL-11, contribuem para a hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa observada na asma⁴⁵. A superposição da resposta inflamatória sobre a via aérea remodelada resulta na heterogeneidade característica da asma. Tanto o padrão inflamatório quanto o remodelamento são conseqüência da carga genética, havendo interação positiva entre eles durante a vida do asmático.

Nos últimos anos, Holgate e colaboradores vêm analisando a hipótese de que um processo alterado de comunicação entre as camadas epitelial e mesenquimal do trato respiratório é um componente fundamental da patogenia da asma⁴⁶. Segundo ela, essas duas camadas formariam uma unidade básica, chamada

unidade trófica epitelial-mesenquimal (EMTU), que interagiria com as citocinas e mediadores derivados das células inflamatórias aumentando e prolongando as respostas celulares ao estímulo inflamatório. Durante o desenvolvimento pulmonar, o crescimento epitelial e mesenquimal é parcialmente regulado pelo equilíbrio na sinalização para EGF e TGF-β, como parece ocorrer nas formas crônicas da asma. É possível que, nos indivíduos geneticamente susceptíveis, fatores ambientais interajam com a EMTU precocemente e iniciem as mudanças estruturais das vias aéreas responsáveis pela perda da função pulmonar observada em crianças menores⁴⁷ e da resposta aos corticosteróides^{48,49}. Dessa forma, a susceptibilidade do epitélio brônquico pode preceder ou ser simultânea aos fatores predisponentes da inflamação T_H2, e ser um requisito para a instalação do ambiente favorável à cronicidade da inflamação e do remodelamento. As alterações anatomopatológicas já descritas do remodelamento podem ser parcialmente conseqüentes à ação do TGF-β, que potencializa a produção do fator de crescimento do tecido conjuntivo, direciona para a produção da matrix extracelular e ativa os miofibroblastos e as células musculares lisas⁵⁰. O binômio inflamação-T_H2/remodelamento, característico da asma e independente da atopia, pode também ser conseqüência da ação das IL-4 e IL-13, promotoras da liberação de TGF-β.

O epitélio brônquico é uma importante barreira física entre o meio externo e o tecido pulmonar. Há muito é sabido que ele se encontra lesado na asma, mas acreditava-se que esse fato era uma conseqüência da injúria inflamatória mantida. Esse processo, inicialmente imaginado como dependente da gravidade e da duração da asma, pode preceder em um a dois anos o aparecimento dos sintomas da asma⁵¹. Recentemente, surgiram evidências de que, na realidade, o epitélio brônquico é estrutural e funcionalmente anormal na asma^{52,53} e que ele não é apenas uma “vítima” do processo inflamatório da asma, sendo fonte importante de mediadores inflamatórios, incluindo: citocinas (IL-1β, TNF-α, IL-11, IL-16 e quimiocinas, entre outras); fatores de crescimento (EGF, PDGF, GM-CSF, TGF-α, TGF-β1-β2 e IGF-1) e enzimas indutoras de mediadores (INOS, cPLA₂, COX2, LO-15 e endotelina-1)⁵⁴. Assim, o epitélio brônquico é, de fato, “personagem” ativo e importante na patogenia da doença⁵⁵.

Indubitavelmente, o epitélio brônquico dos asmáticos é estruturalmente e bioquimicamente diferente e tem maior susceptibilidade à injúria quando comparado ao epitélio normal⁹². Além de mais

susceptível ao dano, aparentemente o processo de reparação também está comprometido, com a participação de vários fatores de transcrição (STAT-1, STAT-2 e fator nuclear- κ B)⁵⁶ geradores de reação inflamatória e alterações estruturais. A falência do crescimento e diferenciação das células epiteliais das vias aéreas resulta em injúria persistente da mucosa brônquica. Se a membrana basal é lesada, as células epiteliais e os fibroblastos podem interagir diretamente. Dessa forma, a mudança da arquitetura do trato respiratório (remodelamento) é resultante da ação de diversos mediadores e do comportamento alterado de células geneticamente modificadas que o constituem. Nesse ponto, a questão é saber se as diferenças observadas no epitélio brônquico asmático são a causa da doença ou se são secundárias ao seu desenvolvimento.

O epitélio brônquico possui uma grande rede de células apresentadoras de antígenos, incluindo as células dendríticas. Elas são derivadas de precursores CD34+ originários da medula óssea. Ao serem recrutadas nas vias aéreas, as células dendríticas perdem seus marcadores de superfície e passam a expressar grandes quantidades de moléculas classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Uma vez processado o antígeno, elas o apresentam ao linfócito T₀. Para a definição da polarização entre T_H1 e T_H2, são necessários dois sinais adicionais: 1) interação entre moléculas co-estimuladoras expressas nas células dendríticas e nos linfócitos T e 2) secreção de citocinas seletivas pelas células dendríticas. Na asma, para que ocorra o direcionamento à produção de citocinas T_H2, é fundamental que haja interação entre a molécula B7 (CD80 ou CD86) das células dendríticas com a CD28 das células T. Se a polarização acontece na presença de grandes quantidades de IL-12, o fenótipo será direcionado para T_H1. Caso a concentração dessa IL esteja reduzida, a IL-10 polariza a resposta imune para o braço T_H2.

Concluindo, o papel do T_H2 na ligação atopia-asma é indiscutível, mas não explica todos os fatores envolvidos na cronicidade e gravidade da doença. Dessa forma, conforme comentado acima, uma série de eventos ainda não esclarecidos deve tomar parte nos imbricados mecanismos que, unindo genes e meio externo num ambiente que envolve um epitélio estrutural e funcionalmente diferente, além de a ação desequilibrada de inúmeras citocinas, resulta naquilo que denominamos asma. As citocinas podem ser vistas como as “palavras” usadas no *chat* celular da asma. Sua ação, conjugada à das moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição, proteínas de membranas e

outros, formam as frases. Conhecemos o resultado final dessa conversa (os diferentes fenótipos da asma), mas ainda não conseguimos entender com clareza o “bate-papo”. Sabemos que ele evolui com idas e vindas, o que torna inadequada a expressão “cascata inflamatória”, muito usada na descrição da patogenia da asma, já que essa imagem prevê apenas um sentido de fluxo. A partir dessa interação, fibras musculares, elásticas e colágenas, linfócitos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, fibras neurais e células constitutivas do trato respiratório vão levar às alterações histológicas, funcionais e clínicas presentes na asma.

Agradecimentos

Meus agradecimentos à Maria Beatriz Campos pela revisão gramatical deste texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patino CM, Martinez FD. Interactions between genes and environment in the development of asthma. *Allergy* 2001;56:279-86.
2. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E, Wahn U. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 2000;356:1392-7.
3. Sporik R, Ingram JM, Price W, Sussman JH, Honsinger RW, Platts-Mills TA. Association of asthma with serum IgE and skin test reactivity to allergens among children living at high altitude. Tickling the dragon's breath. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1388-92.
4. Litonjua AA, Milton DK, Celedon JC, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. A longitudinal analysis of wheezing in young children: the independent effects of early life exposure to house dust endotoxin, allergens, and pets. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:736-42.
5. Remes ST, Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Dog exposure in infancy decreases the subsequent risk of frequent wheeze but not of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:509-15.
6. 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 E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347:869-77.
7. Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:381-7.
8. Martinez FD, Holt PC. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999;354 (Suppl 2):SII12-5.
9. Bleecker ER, Meyers DA. Recent advances in the genetics of asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25(Suppl 2):1-2.
10. Barnes KC, Mathias RA, Nickel R, Freidhoff LR, Stockton ML, Xue X, Naidu RP, Levett PN, Casolaro V, Beaty TH. Testing for gene-gene interaction controlling total IgE in families from Barbados: evidence of sensitivity regarding linkage heterogeneity among families. *Genomics* 2001;71:246-51

11. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benckekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426-30.
12. Shapiro SD, Owen CA. ADAM-33 surfaces as an asthma gene. *N Engl J Med* 2002;347:936-8.
13. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-6.
14. Moffatt MF, Cookson WO. Gene identification in asthma and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:247-52.
15. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleecker ER. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994;23:464-70.
16. Martinez FD. Maturation of immune responses at the beginning of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:355-61.
17. McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2001;2:1109-16.
18. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997;314:999-1003.
19. Wilson N. Human genetics: Narrowing down the candidates for asthma. *Nature Reviews Genetics* 2004;5:410-411.
20. Gern JE, Lemanske RF Jr, Busse WW. Early life origins of asthma. *J Clin Invest* 1999;104:837-43.
21. Warner JA, Miles EA, Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy* 1994;24(5):423-30.
22. Hall IP. Pharmacogenetics of asthma. *Eur Respir J* 2000;15:449-51.
23. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54:825-57.
24. Kishimoto T, Taga T, Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994;76:253-62.
25. Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clin Exp Allergy* 2002;32:17-29.
26. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999;103:779-88.
27. Temann UA, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest* 2002;109:29-39.
28. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
29. Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. *Eur Respir J* 1994;7:1431-8.
30. Chang TL, Shea CM, Urioste S, Thompson RC, Boom WH, Abbas AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. III. Responses of IL-2- and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *J Immunol* 1990;145:2803-8.
31. Tosi MF, Stark JM, Smith CW, Hamedani A, Gruenert DC, Infeld MD. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:214-21.
32. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* [ANO]; 3:507-11.
33. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contribution to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000;15:961-8.
34. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.
35. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
36. Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* 1996;97:604-12.
37. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1033-42.
38. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002;3:715-20.
39. Ray A, Cohn L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:985-93.
40. Holt PG, Yabuhara A, Prescott S, Venaille T, Macaubas C, Holt BJ, Bjorksten B, Sly PD. Allergen recognition in the origin of asthma. *Ciba Found Symp* 1997;206:35-49.
41. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-7.
42. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
43. von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Reitmeir P, Thiemann HH. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994;308:692-5.
44. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;343:538-43.
45. Platts-Mills T, Vaughan J, Squillace S, Woodfolk J, Sporik R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001;357:752-6.
46. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E; ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358:1129-33.

47. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M, Hubbard R. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:43-50.
48. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
49. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997;314:999-1003.
50. von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1211-4.
51. Strannegard IL, Larsson LO, Wennergren G, Strannegard O. Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria. *Allergy* 1998;53:249-54.
52. Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME, Di Prisco MC, Escudero JE, Corao LA, Sandia JA, Ferreira LJ, Botto C, Perez M, Le Souef PN. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:217-21.
53. Warner JA, Jones CA, Williams TJ, Warner JO. Maternal programming in asthma and allergy. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 5):35-8.
54. Bodner C, Godden D, Seaton A. Family size, childhood infections and atopic diseases. The Aberdeen WHEASE Group. *Thorax* 1998;53:28-32.
55. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990;323:502-7.
56. Sporik R, Squillace SP, Ingram JM, Rakes G, Honsinger RW, Platts-Mills TA. Mite, cat, and cockroach exposure, allergen sensitisation, and asthma in children: a case-control study of three schools. *Thorax* 1999;54:675-80.
57. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
58. Kay AB. Leucocytes in asthma. *Immunol Invest* 1988;17:679-705.
59. Wilson JW, Djukanovic R, Howarth PH, Holgate ST. Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:958-60.
60. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(1):109-15.
61. Ying S, Humbert M, Meng Q, Pfister R, Menz G, Gould HJ, Kay AB, Durham SR. Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:686-92.
62. Cohen S. Cytokine profile data. *Immunol Today* 2000;21:199-200.
63. Schuerwegh AJ, De Clerck LS, De Schutter L, Bridts CH, Verbruggen A, Stevens WJ. Flow cytometric detection of type 1 (IL-2, IFN-gamma) and type 2 (IL-4, IL-5) cytokines in T-helper and T-suppressor/cytotoxic cells in rheumatoid arthritis, allergic asthma and atopic dermatitis. *Cytokine* 1999;11:783-8.
64. Krug N, Jung T, Napp U, Wagner K, Schultze-Werninghaus G, Heusser C, Rieger CH, Schauer U, Fabel H. Frequencies of T cells expressing interleukin-4 and interleukin-5 in atopic asthmatic children. Comparison with atopic asthmatic adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:754-9.
65. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:175-83.
66. Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 1999;162:2375-83.
67. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;23-30;356(9248):2144-8.
68. Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Leckie MJ, Kanabar V, Khan J, Warrington SJ, Renzetti L, Rames A, Bock JA, Boyce MJ, Hansel TT, Holgate ST, Barnes PJ. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;23-30;356(9248):2149-53.
69. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol* 2000;18:309-45.
70. Almawi WY, Melemedjian OK, Rieder MJ. An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin Transplant* 1999;13:365-74.
71. Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1997;158:5589-95.
72. Agarwal SK, Marshall GD Jr. Beta-adrenergic modulation of human type-1/type-2 cytokine balance. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:91-8.
73. Essayan DM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Huang SK. Differential regulation of human antigen-specific Th1 and Th2 lymphocyte responses by isozyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:505-12.
74. Bielekova B, Lincoln A, McFarland H, Martin R. Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. *J Immunol* 2000;164:1117-24.
75. Chen Y, Inobe J, Marks R, Connella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;376:177-80.
76. Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, DeKruyff RH, Umetsu DT. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 2000;105(1):61-70.
77. Tsitoura DC, DeKruyff RH, Lamb JR, Umetsu DT. Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells. *J Immunol* 1999;163:2592-600.
78. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different

- patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
79. Coffman RL, Varkila K, Scott P, Chatelain R. Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivo. *Immunol Rev* 1991;123:189-207.
 80. Holgate ST. Airway inflammation and remodeling in asthma: current concepts. *Mol Biotechnol* 2002;22:179-89.
 81. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989;1:520-4.
 82. Zhang S, Smartt H, Holgate ST, Roche WR. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest* 1999;79:395-405.
 83. Holgate ST, Davies Puddicombe, Richter A, Lackie P, Lordan J, Howarth P. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interaction in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J* 2003;22:24S-9S.
 84. Stick S. The contribution of airway development to paediatric and adult lung disease. *Thorax* 2000;55:587-94.
 85. The Childhood Asthma Management Program Research Group. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. *N Engl J Med* 2000;343:1054-63.
 86. Pauwels RA, Pedersen S, Busse WW, Tan WC, Chen YZ, Ohlsson SV, Ullman A, Lamm CJ, O'Byrne PM; START Investigators Group. Early intervention with budesonide in mild persistent asthma: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2003;361:1071-6.
 87. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burgess JK, Black JL. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:474-7.
 88. Warner JO, Marguet C, Rao R, Roche WR, Pohunek P. Inflammatory mechanisms in childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 5):71-5.
 89. Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, Krishna MT, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *FASEB J* 2000;14:1362-74.
 90. Lackie PM, Baker JE, Gunthert U, Holgate ST. Expression of CD44 isoforms is increased in the airway epithelium of asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:14-22.
 91. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;54:825-57.
 92. Holgate ST, Lackie PM, Davies DE, Roche WR, Walls AF. The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29(Suppl 2):90-5.
 93. Wilson SJ, Leone BA, Anderson D, Manning A, Holgate ST. Immunohistochemical analysis of the activation of NF-kappaB and expression of associated cytokines and adhesion molecules in human models of allergic inflammation. *J Pathol* 1999;189:265-72. ■
-