

A Mota Pinto
A Todo-Bom
S Vale Pereira
V Alves
M Santos Rosa

Determinação da neopterin e de defesas antioxidantes na asma de evolução arrastada

The evaluation of neopterin and antioxidants in long lasting asthma

Recebido para publicação/received for publication: 06.07.14
Aceite para publicação/accepted for publication: 06.08.29

Resumo

A asma é uma doença caracterizada por uma resposta imuno-inflamatória a diferentes estímulos desencadeantes. A neopterin (NPT) é sintetizada por macrófagos após estimulação por interferon- γ produzido por linfócitos T e demonstrou-se ter capacidade de ampliar o potencial oxidativo das espécies reativas de oxigénio. A determinação de NPT é útil para monitorizar a activação imunológica celular dos linfócitos Th1.

Este estudo tem como objectivo analisar a NPT na asma de longa evolução enquanto marcador de um ambiente citocínico do tipo Th1. Avaliaram-se, no

Abstract

Asthma is a condition characterised by a chronic immunoinflammatory response to different triggers. Neopterin (NPT) is synthesised by human macrophages upon stimulation with interferon- γ and is also capable of enhancing the oxidative potential of reactive oxygen species. NPT is useful for the monitoring of cell-mediated (Th1-type) immune activation.

This study analysed the behaviour of NPT in long lasting asthma, considering its role as a marker of Th1 environment. Allergic parameters (skin prick tests, Immunoglobulin E (IgE), and eosinophil count) and NPT

¹ Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Directora do Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra / Associate Professor, Coimbra University Medical School. Director, General Pathology Unit, Coimbra University Medical School.

² Assistente Hospitalar Graduada de Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra / Hospital Assistant, Graduate in Allergy and Clinical Immunology, Coimbra University Hospitals.

³ Mestre em Biologia Celular. Técnico Superior de 2.ª Classe do Instituto de Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra / MSc in Cellular Biology. Senior Technician (Grade II), General Pathology Unit, Coimbra University Medical School.

⁴ Licenciada em Bioquímica. Assistente da Disciplina Imunologia e Investigadora do Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra / BSc in Biochemistry, Assistant, Clinical Immunology, Researcher in Clinical Immunology, Coimbra University Medical School.

⁵ Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Director do Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina de Coimbra / Cathedric Professor, Coimbra University Medical School. Director, Clinical Immunology Unit, Coimbra University Medical School.

Instituto de Patologia Geral
(Directora: Profª. Doutora Anabela Mota Pinto)
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Rua Larga
3004-504 Coimbra

Departamento de Imunoalergologia
(Director: Dr. Celso Chieira)
Hospitais da Universidade de Coimbra
Praceta Mota Pinto
3000 Coimbra

Instituto de Imunologia
(Director: Prof. Doutor Manuel Santos Rosa)
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Rua Larga
3004-504 Coimbra

grupo de asmáticos e no grupo-controlo, os indicadores de alergia (IgE, eosinófilos e testes cutâneos de alergia por picada). Determinou-se também a NPT, a proteína C reactiva (PCR), *total antioxidant status* (TAS) e *superoxide dismutase enzyme* (SOD).

Seleccionaram-se idosos com mais de 65 anos. Grupo-controlo – 41 indivíduos saudáveis (79 ± 7 anos); grupo de asmáticos – 64 indivíduos (72 ± 5 anos).

Os valores dos eosinófilos e de IgE estavam estatisticamente aumentados e os de NPT reduzidos entre asmáticos alérgicos e não alérgicos, respectivamente ($5,42 \pm 4,7$ vs $2,8 \pm 2,8$; $p < ,04$), ($493,2 \pm 549,8$ vs $85,3 \pm 194,4$ UI/ml; $p = ,000$), ($2,4 \pm 2,8$ vs $4,0 \pm 4,7$ ng/ml).

O estudo das defesas antioxidantes (TAS, SOD) revelou no grupo-controlo valores significativamente superiores aos dos asmáticos ($p = ,000$) tanto de TAS ($0,84 \pm 0,14/0,86 \pm 0,11$ vs $0,91 \pm 0,10$ mM) como de SOD ($584,8 \pm 108,7/595,6 \pm 235,9$ vs $822,9 \pm 179,5$).

Os resultados sugerem o envolvimento dos macrófagos na patogénese da asma. O défice das defesas antioxidantes é um factor de agravamento desta doença. O aumento da NPT na asma não alérgica consolida estas afirmações, sendo a determinação deste parâmetro susceptível de ser incluída no painel de estudos analíticos que permitem distinguir a asma alérgica da asma não alérgica.

Rev Port Pneumol 2006; XII (6): 669-682

Palavras-chave: Neopterin, envelhecimento, TAS, SOD.

were evaluated in an asthmatic group and in a control group. We also analysed the C Reactive Protein (CRP) concentration, Total Antioxidant Status (TAS) and Superoxide Dismutase Enzyme (SOD) in both groups.

A group of individuals aged over 65 years old was selected. It included 64 asthmatic patients (72 ± 5 years) and 41 healthy individuals (79 ± 7 years).

Blood cell counts showed statistically different median values of eosinophils (5.42 ± 4.7 vs 2.8 ± 2.8 ; $p < .04$), IgE (493.2 ± 549.8 vs 85.3 ± 194.4 UI/ml; $p = .000$) and NPT was non-statistically decreased (2.4 ± 2.8 vs 4.0 ± 4.7 ng/ml) in allergic asthmatic patients when compared with non-allergic asthmatic patients. Both allergic and non-allergic asthmatic patients presented a statistically significant decreased expression of TAS ($0.84 \pm 0.14/0.86 \pm 0.11$ vs 0.91 ± 0.10 mM) and SOD ($584.8 \pm 108.7/595.6 \pm 235.9$ vs 822.9 ± 179.5) when compared with normal control subjects.

Our results suggest macrophage involvement in asthma pathogenesis. The deficit in antioxidant defence impacts negatively on this disease. The increase of NPT values in non-allergic asthma consolidates these affirmations and mapping this parameter should be part of the work of an analytical study panel as it may lead to allergic asthma being distinguished from non-allergic asthma.

Rev Port Pneumol 2006; XII (6): 669-682

Key-words: Neopterin, asthma, aging, TAS, SOD.

Introdução

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, caracterizada por uma obstrução brônquica generalizada mas variável que é, pelo menos parcialmente, reversível, espontaneamente ou através de intervenção farmacológica, e que está associada a um aumento de reactividade a vários estímulos¹. A limitação ao fluxo aéreo descrita depende do efeito aditivo do processo inflamatório localizado e da contracção da musculatura lisa respiratória. Doentes asmáticos tendem a desenvolver um declínio progressivo da função pulmonar que se relaciona com idade, sexo, duração e gravidade da asma². As alterações funcionais referidas, em asmáticos idosos, serão ainda potencialmente mais graves, na medida em que o processo de envelhecimento condiciona modificações do sistema imunitário³. Na asma alérgica, estas alterações podem ser desencadeadas pela exposição a alérgenos, e o seu reconhecimento permitirá a implementação de medidas de controlo ambiental com repercussão positiva no prognóstico⁴.

De um modo geral, aceita-se que a resposta imunitária mediada por células depende da activação dos linfócitos T do tipo Th1, os quais caracteristicamente produzem e libertam interferon- γ (IFN- γ) e interleucina (IL)-2, contrariamente aos linfócitos do tipo Th2 que, quando activados, promovem a libertação de citocinas, como a IL-4, a IL-5, e a IL-10. As citocinas tipo Th2 estão envolvidas na resposta imunitária humoral e, em patologia alérgica, na produção de IgE específica.

A neopterin (NPT) é produzida por monócitos/macrófagos durante a resposta do tipo Th1 após estimulação pelo IFN- γ , sendo possível, através da determinação da sua concentração, monitorizar a activação imunitária mediada por células Th1^{5,6,7}.

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. It is characterised by a generalised but variable bronchial obstruction that is to some degree reversible, either spontaneously or through pharmacological intervention. The obstruction is associated with a heightened reaction to various stimulants¹. The air flow limitation described above depends on the cumulative effect of the inflammatory process and the contraction of the flat breathing musculature. Asthmatic patients tend towards a progressive decline of lung function that is connected to the age and gender of the patient and the duration and severity of the asthma². The abovementioned alterations to the lung function are potentially more serious when the aging process impacts on alterations to the immune system³. In cases of allergic asthma, these alterations may be brought on by exposure to allergens, and understanding this allows environmental control measures to be put into place. This has a positive impact on the prognosis⁴.

It is generally believed that the cell-mediated immune response depends on activation of Th1-type cell T lymphocytes. These typically produce and release interferon- γ (IFN- γ) and interleukin (IL)-2, unlike Th2-type lymphocytes which, when activated, promote the release of cytokines such as IL-4, IL-5, and IL-10. The Th2-type cytokines are involved in the humoral immune response and the production of the specific IgE in allergic pathologies.

Neopterin (NPT) is produced by monocytes/macrophages during the Th1-type response after stimulation by IFN- γ . It is possible to monitor the immune activation

Doentes asmáticos tendem a desenvolver um declínio progressivo da função pulmonar

A resposta imunitária mediada por células depende da activação dos linfócitos T do tipo Th1

A dissociação entre respostas imunitárias dos tipos Th1 e Th2 traduz-se numa relação inversa entre a concentração de IgE e de NPT. A produção de NPT por macrófagos é secundada pela produção de *reactive oxygen species*/espécies reactivas de oxigénio (ROS) por estas células⁸, e a determinação de NPT pode avaliar a extensão da activação celular imunitária, fornecendo uma informação indirecta sobre o desencadear do *stress* oxidativo devido a essa activação^{9,10}. Os antioxidantes têm um papel importante pela sua capacidade de limitar a resposta imunitária do tipo Th1, já que reduzem a sua capacidade oxidativa, o que, por outro lado, aumenta a produção de imunoglobulinas por células do tipo Th2¹¹.

Níveis aumentados de NPT no envelhecimento estarão provavelmente relacionados com as diversas alterações imunológicas associadas a este processo, incluindo activação, desregulação e disfunção celular^{12,13,14}.

O objectivo deste estudo consistiu na análise dos valores de NPT na asma de evolução arrastada, em doentes alérgicos e não alérgicos, avaliando ainda a produção de *total antioxidant status*/estado antioxidante total (TAS) e de *superoxide dismutase enzyme*/enzima superóxida dismutase eritrocitária (SOD) nestes doentes, de forma a esclarecer a sua implicação na fisiopatologia da inflamação crónica subjacente a este processo e o seu papel na identificação de formas não alérgicas da doença.

Métodos

População

Um grupo de 105 idosos (com mais de 65 anos) com idades compreendidas entre os 65 e os 94 anos, incluindo 64 doentes asmáticos (72±5 anos/42 alérgicos), e um grupo-controlo de 41 indivíduos não fumadores

measured by Th1 cells through determining its concentration^{5,6,7}.

The dissociation between immune responses of Th1 and Th2-types breaks down into an inverse relationship between the IgE and NPT concentration. NPT production by macrophages is seconded by the production of Reactive Oxygen Species (ROS) by these cells⁸ and determining NPT can assess the extension of the immune cellular activation. This gives indirect information on the impact this activation has on oxidative stress^{9,10}. The antioxidants play an important part due to their power to limit the Th1-type's immune response. They reduce its oxidative capacity as well as increasing the immunoglobulin from Th2-type cells¹¹.

It is likely that raised NPT levels in aging are related to the various immunological changes associated with the process. These include cell activation, deregulation and dysfunction^{12,13,14}.

This study analysed the behaviour of NPT in long lasting asthma in both allergic and non-allergic patients. It further analysed the Total Antioxidant Status (TAS) and Superoxide Dismutase Enzyme (SOD) production in these patients to clarify their role in the physiopathology of chronic inflammation subjacent to this process. It also studied their role in the identification of non-allergic forms of the disease.

Methods

Population

A group of 105 elderly people (aged over 65 years old) aged between 65 and 94 years of age, including 64 asthmatic patients (72±5 years/42 allergic) and a control group of 41 non-smokers (79±7 years old) were chosen

DETERMINAÇÃO DA NEOPTERINA E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NA ASMA DE EVOLUÇÃO ARRASTADA

A Mota Pinto, A Todo-Bom, S Vale Pereira, V Alves, M Santos Rosa

(79±7 anos), foram seleccionados e estudados após consentimento oral informado.

O grupo de doentes com o diagnóstico de asma persistente moderada de acordo com a *global initiative for asthma*/iniciativa global para asma (GINA) estava controlado cumprindo medicação regular diária com 250µg a 500µg de dipropionato de beclometasona e β2-agonistas de curta acção nas agudizações. Qualquer outra medicação anti-asmática foi retirada pelo menos 4 semanas antes da inclusão no estudo. A alergia foi definida pela presença de teste de picada positivo para pelo menos um alérgeno. O Quadro I representa as características dos indivíduos do grupo-controlo e do grupo de doentes asmáticos. A distribuição por sexo e por idade era semelhante nos dois grupos estudados.

Foram considerados como critérios de exclusão para a totalidade da população a presença de: patologia sistémica, nomeadamente auto-imune ou neoplásica, diabetes, dislipidemias, patologia hepática, cardíaca ou renal e, ainda, história de infecção nas últimas 6 semanas, ou de exposição recente a factores ambientais de risco.

Testes de diagnóstico

Os 105 indivíduos incluídos no estudo realizaram testes cutâneos de alergia por picada (*prick*-1mm Prick Lancetter-tames Hollister Stier) a 20 aeroalérgenos comuns (ALK-ABELLO) e que incluía *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepidoglyphus*

and studied after their informed spoken consent was obtained.

The group of patients diagnosed with moderate persistent asthma as defined by the Global (GINA) guidelines had their asthma controlled via regular daily medication of 250µg to 500µg of beclomethasone dipropionate with crisis control by rapid acting β2-agonists. Any other anti-asthma medication was withdrawn at least 4 weeks before the patient was included in the study. Allergy was determined by a skin prick test positive for at least one allergen.

Table I shows the characteristics of the control group and the asthma patient group. Gender and age distribution was similar in both groups.

Exclusion criteria for the total population were systemic pathology, particularly autoimmune or neoplastic, diabetes, dyslipidemias, hepatic, cardiac or renal pathology or history of infection in the last 6 weeks, or recent exposure to environmental risk factors.

Diagnostic tests

The 105 subjects of the study underwent skin prick allergy tests (*prick*-1mm Prick Lancetter-tames Hollister Stier) for 20 common aeroallergens (ALK-ABELLO). These included *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepidoglyphus*

Quadro I – Grupo controlo vs grupo de doentes asmáticos, distribuição por sexo e por idade.

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

Table I – Control group vs asthmatic patient group, distributed by gender and age

Groups	N	Male/ /Female	Median age	Minimum age/ /Maximum age
Control	41	12/29	79.2±7.0	65/94
Asthmatic	64	21/43	72.4±5.1	65/83

destructor, *Tyrophagus putrescentiae*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Blatella germanica*, gato, cão, *Dactylis glomerata*, *Pbleum pratense*, *Poa pratensis*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum officinale*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Platanus*, *Quercus suber* e *Olea europaea*. Como controlo positivo foi incluído cloridrato de histamina (10mg/ml) e, como controlo negativo, uma solução glicero-salina. Todos os doentes foram avaliados do ponto de vista clínico e todos efectuaram uma espirometria basal usando o mesmo equipamento (Vitalograph Compact) pelo menos 6 horas depois da última toma de qualquer broncodilatador. Valores teóricos previstos foram avaliados de acordo com Knudson *et al*¹⁵, sendo as determinações das espirometrias obtidas, avaliadas por meio de um programa computadorizado de acordo com critérios de ATS'94 e a aceitação para análise também determinada pelos mesmos critérios, sempre que dentro da mesma avaliação três curvas fossem aceitáveis e reprodutíveis. Recolheu-se cerca de 30 a 50 ml de sangue periférico da veia do antebraço a todos os participantes e processaram-se as amostras de sangue com posterior recolha e armazenamento, nas condições ideais, de soro e plasma. A determinação de IgE total foi efectuada com recurso ao *kit* (Coat-A-Count[®] Total IgE IRMA, DPC[®], CA, USA) com base num ensaio imuno-radiométrico (IRMA) em fase sólida de sensibilidade de 0,5 IU/ml. Esta técnica baseia-se na existência de anticorpos monoclonais anti-IgE marcados com I¹²⁵ em fase líquida e anticorpos policlonais anti-IgE aderentes à parede do tubo de poliestireno. Deste modo, a IgE presente na amostra fica retida entre estes dois anticorpos. As leituras foram feitas num contador de cintilações gama (Gamma-C-12, DPC[®], CA, USA) durante um minuto. A con-

destructor, *Tyrophagus putrescentiae*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria tenuis*, *Blatella germanica*, cat, dog, *Dactylis glomerata*, *Pbleum pratense*, *Poa pratensis*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum officinale*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Platanus*, *Quercus suber* and *Olea europaea*. Histamine chlorhydrate (10mg/ml) was included as a positive control and a glycerine-saline solution as a negative control.

All patients underwent a clinical evaluation and all had a base spirometry exam using the same equipment (Vitalograph Compact) at least 6 hours after their last dose from any bronchodilator. Predicted theoretical values were assessed according to the Knudson *et al*¹⁵ curve. The spirometry measurements obtained were assessed using a computer program, in line with the ATS '94 criteria, meaning that in each evaluation three curves were always acceptable and repeatable.

Approx. 30 – 50 ml of peripheral blood was taken from a vein in the forearm of each subject and the blood samples processed were then collected and stored under suitable conditions in serum and plasma.

Total IgE was determined using the Coat-A-Count[®] Total IgE IRMA, DPC[®], CA, USA kit with an immunoradiometric base (IRMA) in a solid state of 0.5 IU/ml sensitivity. This assay is based on the existence of monoclonal anti-IgE antibodies stained with I¹²⁵ in a liquid state and polyclonal anti-IgE antibodies immobilised to the wall of a polystyrene tube. In the procedure, the IgE present in the sample is captured between the two antibodies. The readings were made in a Gamma liquid scintillation counter (Gamma-C-12, DPC[®], CA, USA) for one minute. The concentration of total IgE in the sample was

centração de IgE total da amostra é directamente proporcional ao número de contagens por minuto. Esta concentração foi determinada comparando as contagens/minuto com um grupo de calibradores disponível com o *kit*.

Os níveis de NPT foram determinados em amostras de soro usando um ensaio imunoenzimático (ImmuChem™, ICN Pharmaceuticals Inc., CA, USA) com uma sensibilidade entre 0 ng/ml e 100 ng/ml. A absorvância, lida a 450 nm num leitor de microplacas, é inversamente proporcional à quantidade de neopterin presente na amostra. Todas as amostras foram recolhidas e guardadas protegidas da luz solar e todo o ensaio foi realizado de modo a evitar a sua exposição directa a esta fonte de luz¹⁶.

A determinação da proteína C reactiva (PCR) foi realizada em amostras de soro por nefelometria (Nephelometer System BN II, Dade Behring, Marburg, Alemanha). Este método é baseado na formação de imuno-complexos entre as proteínas do soro (neste caso a PCR) e um anticorpo específico que cobre as partículas de poliestireno. A intensidade da luz dispersa no nefelómetro depende da PCR presente na amostra e a concentração final de PCR foi medida por comparação com as diluições de um *standard* de concentração conhecida.

A partir do plasma, procedeu-se à determinação do TAS, com uso de reagentes Randox, de acordo com métodos que analisam a capacidade inibitória do 2,2'-azino-di-3-etilbenzotazolína sulfonate sínteses. A SOD foi avaliada de acordo com métodos de McCord, Fridovich / Flohé, Ötting^{17,18}.

Resultados

Todos os doentes estavam clinicamente estabilizados. A função pulmonar dos doentes com asma apresentava uma diminuição dos valores de volume expiratório máximo por

directly proportional to the number of counts per minute. The concentration was determined by comparing the counts/minutes with those obtained from the calibrators provided with the kit.

NPT levels were measured in serum samples using an immunoenzymatic test (ImmuChem™, ICN Pharmaceuticals Inc., CA, USA) with a sensitivity between 0 ng/ml and 100 ng/ml. The absorbance, read at 450 nm on a microplate reader, is inversely proportional to the quantity of neopterin present in the sample. All the samples were collected and stored away from sunlight and the entire test was conducted avoiding direct exposure to sunlight¹⁶.

C Reactive protein (CRP) was measured in Nephelometer serum samples (Nephelometer System BN II, Dade Behring, Marburg, Germany). This method is based on immunocomplexes forming between the serum proteins (in this case the CPR) and a specific antibody which covers the polystyrene particles. The intensity of the light dispersed in the Nephelometer depends on the CRP present in the sample and the final concentration of CRP was measured by comparison with the dilutions of a known standard concentration.

TAS is determined via the plasma, using Randox reagents, in line with methods for analysing the inhibitory capacity of 2,2'-azino-di-3-etilbenzotazolína sulfonate synthesis. SOD was evaluated in accordance with the McCord, Fridovich / Flohé, Ötting methods^{17,18}.

Results

All the patients were clinically stable. The lung function of the asthma patients showed a decrease in the Forced Expiratory Volume at one second values: FEV1 = 73.6±25.3 l/

segundo, VEMS= $73,6 \pm 25,3$ l/s, e do débito expiratório máximo a 50% da capacidade vital, DEM 50= $38,8 \pm 26,7$ l, relativamente aos valores percentuais previsíveis

Dentro do grupo dos asmáticos, 42 indivíduos (65,6%) tinham diagnóstico de alergia por apresentarem testes cutâneos positivos a aeroalergénios comuns, sendo 39 doentes (70%) sensibilizados a ácaros do pó doméstico e a maioria polissensibilizados. O grupo não alérgico era constituído por 22 doentes que não reagiram a aeroalergénios comuns, embora em 3 casos fosse identificada alergia a fármacos (2 casos a anti-inflamatórios não esteróides – AINE, e 1 caso a penicilina).

O hemograma revelou valores médios de eosinófilos significativamente diferentes entre asmáticos alérgicos e não alérgicos ($5,42 \pm 4,7$ vs $2,8 \pm 2,8$; $p < .04$).

Os valores de imunoglobulinas foram comparados entre asmáticos alérgicos e não alérgicos encontrando-se a IgG aumentada ($11,9 \pm 2,5$ vs $10,4 \pm 2,2$ g/L; $p = .03$) e a IgA e IgM sem alterações estatisticamente significativas entre os dois grupos ($3,2 \pm 1,4$ vs $2,6 \pm 1,3$ g/L; $1,1 \pm 0,5$ vs $1,2 \pm 0,7$ g/L).

Os valores de IgE estavam significativamente aumentados em asmáticos alérgicos quando comparados com não alérgicos ($493,2 \pm 549,8$ vs $85,3 \pm 194,4$ UI/ml; $p = .000$).

Os valores de PCR estavam reduzidos em asmáticos alérgicos quando comparados com não alérgicos ($0,3 \pm 0,4$ vs $0,4 \pm 0,3$ mg/dl).

Os valores de NPT estavam reduzidos em asmáticos alérgicos quando comparados com não alérgicos ($2,4 \pm 2,8$ vs $4,0 \pm 4,7$ ng/ml) (Fig. 1).

Os doentes asmáticos alérgicos apresentavam valores de NPT apenas ligeiramente superiores aos observados no grupo-controlo ($2,4 \pm 2,8$ vs $2,1 \pm 1,9$ ng/ml), enquanto em as-

s and Forced Expiratory Flow at 50% of Vital Capacity, FEF 50= $38,8 \pm 26,7$ l, compared to the predicted percentage values.

42 subjects from the asthmatic group (65.6%) were diagnosed as having allergies as their skin prick tests were positive for common aeroallergens. 39 of these patients (70%) were sensitive to domestic dust mites and the majority was pollen-sensitive. The non-allergic group was made up of 22 patients who showed no reaction to common aeroallergens, although allergy to medicines was seen in 3 cases (2 cases of allergy to non-steroid anti-inflammatories and 1 case of penicillin allergy).

The haemogram showed median eosinophil values which were significantly different in the patients with allergic asthma from those with non-allergic asthma: (5.42 ± 4.7 vs 2.8 ± 2.8 ; $p < .04$).

Immunoglobulin values were compared in the allergic asthma and non-allergic asthma patients. While the IgE was higher (11.9 ± 2.5 vs 10.4 ± 2.2 g/L; $p = .03$), the IgA and IgM showed no statistically significant changes between the two groups: 3.2 ± 1.4 vs 2.6 ± 1.3 g/L; 1.1 ± 0.5 vs 1.2 ± 0.7 g/L).

The IgE values were statistically higher in allergic asthma patients when compared with non-allergic asthma patients: (493.2 ± 549.8 vs 85.3 ± 194.4 UI/ml; $p = .000$).

The CRP values of allergic asthma patients were lower than those of non-allergic asthma patients: (0.3 ± 0.4 vs 0.4 ± 0.3 mg/dl).

The NPT values were lower in allergic asthma patients than those of non-allergic asthma patients: (2.4 ± 2.8 vs 4.0 ± 4.7 ng/ml) (Fig. 1).

The allergic asthma patients had only slightly higher NPT values than those of the control group: (2.4 ± 2.8 vs 2.1 ± 1.9 ng/ml). These

DETERMINAÇÃO DA NEOPTERINA E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NA ASMA DE EVOLUÇÃO ARRASTADA

A Mota Pinto, A Todo-Bom, S Vale Pereira, V Alves, M Santos Rosa

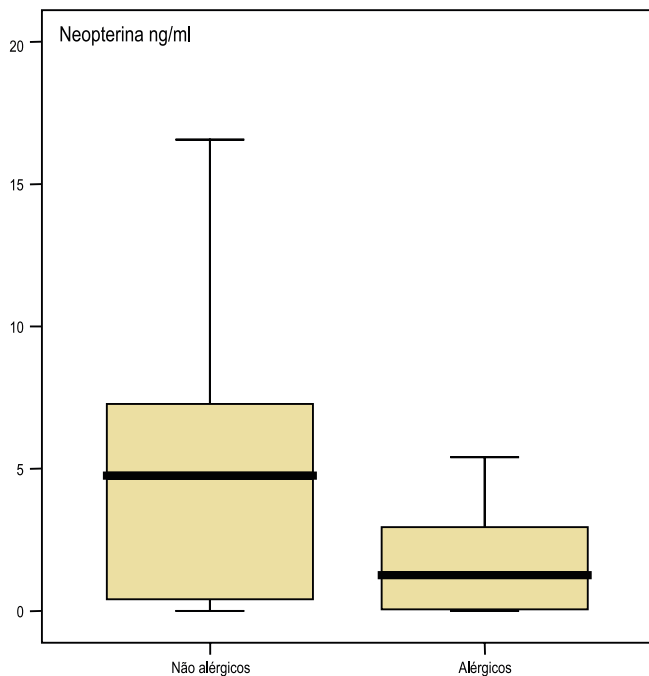


Fig. 1 – Valores de NPT no grupo de alérgicos ($2,4\pm 2,8$ ng/ml) e não alérgicos ($4,0\pm 4,7$ ng/ml)

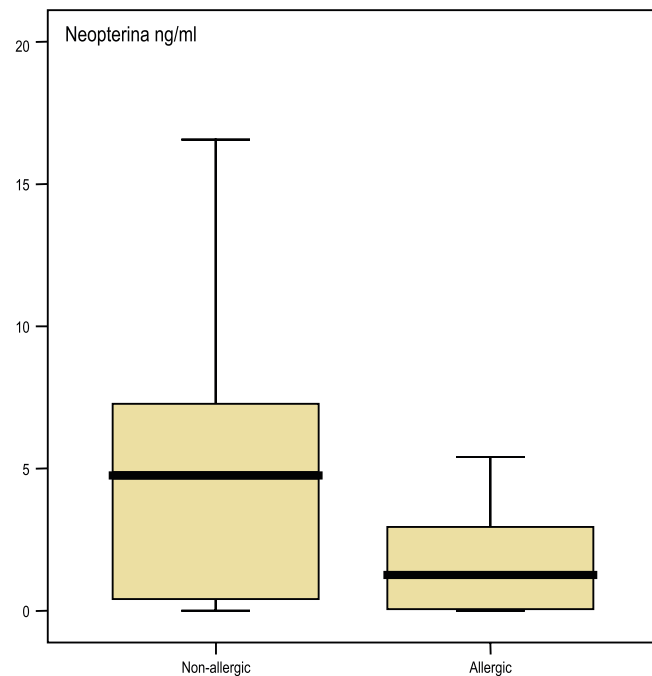


Fig. 1 – NPT values in the allergic (2.4 ± 2.8 ng/ml) and non-allergic group (4.0 ± 4.7 ng/ml)

máticos não alérgicos esses valores estavam muito aumentados ainda comparativamente ao grupo controlo ($4,0\pm 4,7$ vs $2,1\pm 1,9$ ng/ml). Se compararmos os valores de NPT dos doentes sem sensibilidade a aeroalergénios ($n=22$), mas excluindo os doentes com hipersensibilidade a fármacos ($n=3$), os valores médios encontrados nos restantes 19 indivíduos sem qualquer manifestação de alergia são significativamente inferiores aos do grupo-controlo ($4,7\pm 4,8$ vs $2,1\pm 1,9$ ng/ml; $p<,05$).

Cinquenta e oito por cento dos doentes não alérgicos apresentavam valores de NPT aumentados ($>2,1$ ng/ml), o que acontecia apenas em 34% dos doentes alérgicos ($p<0,05$). O estudo das variáveis das defesas antioxidantes (TAS e SOD) revelou valores médios de TAS e de SOD no grupo controlo significativamente superiores aos observados nos

values were much higher in the non-allergic asthma patients than those of the control group: (4.0 ± 4.7 vs 2.1 ± 1.9 ng/ml). In comparing the NPT values of patients who had no sensitivity to aeroallergens ($n=22$) but excluding the patients with a hypersensitivity to medicine ($n=3$), the median values found in the remaining 19 subjects showing no sign of allergy are significantly lower than those of the control group: (4.7 ± 4.8 vs 2.1 ± 1.9 ng/ml; $p<,05$).

Fifty-five percent of the non-allergic patients had higher NPT values (>2.1 ng/ml). This was only true for 34% of the allergic patients ($p<0.05$).

This study into the variables of the TAS and SOD antioxidant defences showed that while the median TAS and SOD values of the control group were significantly higher than those

DETERMINAÇÃO DA NEOPTERINA E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NA ASMA DE EVOLUÇÃO ARRASTADA

A Mota Pinto, A Todo-Bom, S Vale Pereira, V Alves, M Santos Rosa

doentes asmáticos ($p = .000$) (Quadro II), embora sem alterações significativas entre alérgicos e não alérgicos (Quadro III).

seen in the asthmatic patients ($p = .000$) (Table II), there were no significant changes between the allergic and non-allergic patients (Table III).

Quadro II – Valores médios e medianas de TAS e SOD no grupo-controlo vs grupo de asmáticos

Grupos	TAS(pl) mM ^{*/**} Valor Médio	TAS(pl) Mediana	SOD(gv) U/gHb ^{*/**} Valor Médio	SOD(gv) U/gHb Mediana
Controlo	0,91±0,10	0,93	822,9±179,5	826,20
Asmático	0,85±0,13	0,85	588,1±156,1	562,90

* Teste t paramétrico

** Significado estatístico $p = .000$

Table II – Median values and median TAS and SOD in the control group vs the asthmatic group

Groups	TAS(pl) mM ^{*/**} Mean value	TAS(pl) Median	SOD(gv) U/gHb ^{*/**} Mean value	SOD(gv) U/gHb Median
Control	0.91±0.10	0.93	822.9±179.5	826.20
Asthmatic	0.85±0.13	0.85	588.1±156.1	562.90

* 'T' test parameter

** Statistical significance $p = .000$

Quadro III – Valores médios e medianas de TAS e SOD no grupo-controlo vs grupo de asmáticos (alérgicos e não alérgicos)

Grupos	TAS(pl) mM [*] Valor médio	TAS(pl) Mediana	SOD(gv) U/gHb [*] Valor médio	SOD(gv) U/gHb Mediana
Controlo	0,91±0,10	0,93	822,9±179,5	826,20
Alérgicos	0,84±0,14 ^{**}	0,86	584,8±108,7 ^{***}	583,55
Não alérgicos	0,86±0,11	0,84	595,6±235,9 ^{**}	541,60

* Teste t paramétrico

** Significado estatístico $p = .000$

*** Significado estatístico $p = .022$

Table III – Median values and median TAS and SOD in the control group vs the asthmatic group (allergic and non-allergic)

Groups	TAS(pl) mM [*] Mean value	TAS(pl) Median	SOD(gv) U/gHb [*] Mean value	SOD(gv) U/gHb Median
Control	0.91±0.10	0.93	822.9±179.5	826.20
Allergic	0.84±0.14 ^{**}	0.86	584.8±108.7 ^{***}	583.55
Non-allergic	0.86±0.11	0.84	595.6±235.9 ^{**}	541.60

* 'T' test parameter

** Statistical significance $p = .000$

*** Statistical significance $p = .022$

Discussão

Estes estudos foram efectuados em indivíduos com mais de 65 anos e com asma brônquica com mais de 30 anos de evolução. A função ventilatória desta população de asmáticos revelou redução dos valores percentuais do volume expiratório máximo por segundo relativamente aos padronizados para a sua idade. Cerca de dois terços dos doentes apresentava reactividade cutânea significativa para aeroalergénios comuns e a maioria apresentava também valores elevados de IgG e de IgE em relação aos considerados normais para a população avaliada. Os doentes alérgicos tinham ainda contagens aumentadas de eosinófilos no sangue comparativamente aos asmáticos não alérgicos. Estes parâmetros constituem habitualmente marcadores de alergia, embora estejam descritas situações de asma alérgica, nomeadamente a proteínas polínicas, com valores de IgE dentro dos considerados normais e sem apresentarem evidência de eosinofilia no sangue. Uma dificuldade inerente à abordagem nesta patologia reside na capacidade de distinção de formas alérgicas e não alérgicas da doença, partindo naturalmente do pressuposto de que essa avaliação permitirá uma intervenção terapêutica mais eficaz e direccionada. Os valores elevados de IgE e a eosinofilia constituem indicadores de alergia, embora possam surgir associados a outras patologias. De acordo com alguns autores, a hiperreactividade brônquica e o grau de broncoconstricção está claramente associada à atopia, pelo que a caracterização da asma, deste ponto de vista, não deva ser negligenciada¹⁹. Embora a IgE tenda a diminuir com a idade, uma reacção alérgica mediada por IgE pode estar presente em 75% dos asmáticos idosos^{20,21}. Pelo contrário, os níveis de NPT tendem a estar reduzidos na alergia, enquanto a produção de valores elevados de NPT ocorre em processos infeccio-

Discussion

Patients in this study were aged over 65 years old and had had bronchial asthma for over 30 years. The ventilatory function of this population of asthmatics showed a reduction in the percentile values of the FEV when compared with the standard values for that age group. Approx. two thirds of the patients had significant cutaneous reaction to common aeroallergens and the majority of them also had higher IgG and IgE values in relation to those considered normal for the population in question. The allergic patients had raised blood eosinophil counts compared to the non-allergic asthma patients. These parameters are the usual markers of allergy although they are descriptive of allergic asthma situation, particularly to polyclinic proteins. IgE values were within those considered normal and there was no evidence of eosinophilia in the blood.

One of the difficulties inherent in approaching this pathology lies in the capacity to distinguish allergic and non-allergic forms of the disease, naturally starting from the presupposition that such an evaluation allows for a quicker and more highly focussed therapeutic intervention. The raised IgE and eosinophil values are indicators of allergy, although they can be associated to other pathologies. Several authors suggest that bronchial hyperactivity and the degree of bronchconstriction are clearly associated to atopia. This being the case, characterising the type of asthma should also be done, from this point of view¹⁹. While IgE tends to diminish with age, an allergic reaction mediated by IgE may be present in 75% of the elderly asthmatics^{20,21}. Conversely, the NPT levels tend to be lowered in allergy while the production of raised NPT values occurs in

A hiperreactividade brônquica e o grau de broncoconstricção está claramente associada à atopia

sos, virusais e bacterianos que são reconhecidos como importantes desencadeantes de crises de asma. No presente estudo, as concentrações de NPT e de IgE foram comparadas em doentes alérgicos e não alérgicos tendo em conta a relação dissociativa reguladora entre linfócitos Th1 e Th2 na resposta imunológica de indivíduos alérgicos. Os valores de IgE estavam significativamente aumentados em doentes alérgicos. Os doentes com valores de NPT aumentados, acima de >2,1 ng/ml, apresentaram valores de IgE menos elevados ($IgE \leq 336,58$ UI).

Os valores mais elevados de NPT foram detetados na asma não alérgica. Este grupo de doentes incluía três asmáticos sem sensibilidade cutânea a aeroalergénios mas com diagnóstico de alergia a fármacos. A exclusão destes indivíduos do grupo de doentes asmáticos não alérgicos resulta num aumento ainda mais marcado dos valores de NPT, com diferenças estatisticamente significativas relativamente aos alérgicos. Esta análise sugere que um ambiente citocínico tipo Th2 ou uma depressão selectiva do sistema imunológico possa estar associada a este comportamento^{22,23}. As células Th1 estimularão os macrófagos a produzir NPT, que, na medida em que provocam uma resposta humoral mais reduzida, minimizam a resposta imunológica mediada por anticorpos, nomeadamente por IgE. O valor de NPT tem sido directamente correlacionado com o valor de IFN- γ , sendo também considerado um marcador sensível e útil na monitorização da resposta imunitária do tipo Th1⁵.

A NPT está aparentemente envolvida na patogénese da asma, particularmente nas formas não alérgicas. A histamina, um importante mediador libertado por mastócitos na resposta alérgica mediada por IgE e por linfócitos com fenótipo Th2, pode induzir supressão significativa da síntese de NPT²⁴.

infections, viruses and bacteria which are not seen as important triggers of asthma crises. In our study, the NPT and IgE concentrations found in both allergic and non-allergic patients were compared, taking the dissociate regulatory relationship between the Th1 and the Th2 lymphocytes in the immunological response in allergic individuals into account. The IgE values were significantly raised in allergic patients. Patients with NPT values raised above >2.1 ng/ml had less raised IgE values: ($IgE \leq 336.58$ UI).

The highest NPT values were seen in non-allergic asthma. This group of patients included three asthmatics with no cutaneous sensitivity or sensitivity to aeroallergens but who were diagnosed with allergy to medicines. The exclusion of these subjects from the non-allergic asthma patient group resulted in an even more marked rise in the NPT values, with statistically significant differences relative to the allergic group. This analysis suggests that a Th2-type cytosine environment or a selective depression of the immune system may be associated to this behaviour^{22,23}. The Th1 cells stimulate the macrophages to produce NPT which, as it provokes a reduced humoral response, minimises the immunological response mediated by antibodies, namely by IgE.

The NPT value, in being directly correlated with the IFN- γ value, is also considered a marker which is sensitive and useful in monitoring the Th1-type immune response⁵.

NPT is seemingly involved in the pathogenesis of asthma, particularly the non-allergic forms of asthma. Histamine, an important mediator released by mastocytes in the allergic response mediated by IgE and by Th2-phenotype lymphocytes, may induce suppression of NPT synthesis²⁴.

A NPT está aparentemente envolvida na patogénese da asma, particularmente nas formas não alérgicas

A produção de radicais de oxigénio aumenta a inflamação brônquica em asmáticos, sendo as defesas antioxidantes consideradas importantes mecanismos de controlo negativo neste processo pró-inflamatório²⁵. As células epiteliais e fagocíticas activadas no decurso da resposta celular e humoral são as principais fontes de ROS. A redução significativa de TAS e de SOD observada em ambos os grupos de doentes asmáticos analisados neste trabalho, quando comparado com controlos, pode afectar o processo de reparação tecidual na asma, embora este facto não seja aparentemente influenciado pela sensibilização a aeroalergénios^{26,27}.

Outros marcadores biológicos, como a PCR, apesar de estarem ligeiramente aumentados na asma não alérgica, não foram relevantes no contexto do presente estudo.

Os nossos resultados sugerem o envolvimento dos macrófagos na patogénese da asma. O défice das defesas antioxidantes é seguramente um factor de agravamento desta doença. O aumento observado da NPT na asma não alérgica consolida estas afirmações, sendo a determinação deste parâmetro susceptível de vir a ser incluída no painel de estudos analíticos que permitem distinguir a asma alérgica da asma não alérgica.

The production of oxygen radicals increases bronchial inflammation in asthmatics and the antioxidant defences are considered important negative control mechanisms in this pro-inflammatory process²⁵. The epithelial and phagocytic cells activated during cellular and humoral response are the main sources of ROS. The significant reduction of TAS and SOD seen in both the asthmatic groups analysed in this study, when compared to the control, may affect the tissue repair process in asthma even though this fact is not seemingly influenced by sensitivity to aeroallergens^{26,27}.

While other biological markers such as CRP are slightly raised in non-allergic asthma, this was not relevant to the context of our study. Our results suggest that macrophages play a part in the pathogenesis of asthma. The antioxidant defence deficit is clearly an aggravating factor in this disease. The increased NPT seen in non-allergic asthma backs up these statements, and determining this parameter should be part of the remit of an analytical studies panel working to distinguish allergic asthma from non-allergic asthma.

A produção de radicais de oxigénio aumenta a inflamação brônquica em asmáticos

O défice das defesas antioxidantes é seguramente um factor de agravamento desta doença

Bibliografia/Bibliography

1. New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung and Blood Institute. Lippincott Health Promot Lett 1997; 2(7):1, 8-9.
2. Kupczyk M. Long-term deterioration of lung function in asthmatic outpatients. Respiration 2004;71:233-40.
3. Vignola AM, Scichilone N, Bousquet J, Bonsignore G, Bellia V. Aging and asthma: pathophysiological mechanisms. Allergy 2003;58:165-175.
4. Braman S, Kaemmerlen J, Davis S. Asthma in the Elderly. Am Rev Respir Dis 1991;143:336-340.
5. Ledochowski M, Murr C, Widner B, Fuchs D. Inverse Relationship between Neopterin and Immunoglobulin E. Clinical Immunol 2001;98(1):104-108.
6. Kaski JC. Neopterin – A Forgotten Biomarker. JACC 2003;42(6):1140-6.
7. Mildvan D, Spritzler J, Grossberg SE, Fahey JL, Johnston DM, Schock BR, Kagan J. Serum Neopterin, an Immune Activation Marker, Independently Predicts Disease Progression in Advanced HIV-1 Infection. Clin Infect Dis 2005;40:853-8.

DETERMINAÇÃO DA NEOPTERINA E DE DEFESAS ANTIOXIDANTES NA ASMA DE EVOLUÇÃO ARRASTADA

A Mota Pinto, A Todo-Bom, S Vale Pereira, V Alves, M Santos Rosa

8. Khodr B, Khalil Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. *Free Rad Biol & Med* 2001;30:1-8.
9. Widner CB, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a Marker for Immune System Activation. *Current Drug Metabolism* 2002;3:175-187.
10. Hoffman G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm Res* 2003;52(8):313-21.
11. Murra C, Schroecksnadela K, Winkler C, Ledochowksic M, Fuchsa D. Antioxidants may increase the probability of developing allergic diseases and asthma. *Medical Hypotheses* 2005;64:973-977.
12. Frick B, Schroecksnadel K, Neurauder G, Leblhuber F, Fuchsa D. Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age. *Clin Biochem* 2004;37:684-687.
13. Fahey JL, Schnelle JF, Boscardin J, Thomas JK, Gore ME, Aziz N, Sadeghi H, Nishanian P. Distinct categories of immunologic changes in frail elderly. *Mech Ageing Develop* 2000;115:1-20.
14. Ledochowski M, Murr C, Jäger M, Fuchs D. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. *Exp Gerontol* 2001;36:1739-1747.
15. 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.
16. Laich A, Neurauder G, Wirleitner B, Fuchs D. Degradation of serum neopterin during daylight exposure. *Clin Chim Acta* 2002;322:175-178.
17. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243(21):5753-60.
18. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104.
19. Renwick DS, Connolly MJ. Persistence of atopic effects on airway calibre and bronchial responsiveness in older adults. *Age and Ageing* 1997;26:435-440.
20. Huss K, Naumann PL, Mason PJ, et al. Asthma severity, atopic status, allergen exposure, and quality of life in elderly persons. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:524-30.
21. Scichilone N, Messina M, Battaglia S, Catalano F, Bellia V. Airway hyperresponsiveness in the elderly: prevalence and clinical implications. *Eur Respir J* 2005; 25:364-375.
22. Menz G, De Sousa JJ, Rothe T, Schmitz-Schumann M, Virchow C. Neopterin in phases of exacerbation of bronchial asthma and in experimental asthma conditions. *Pneumologie* 1990;44: 232-3.
23. Murr C, Hainz U, Asch E, Berger P, Jenewein B, Saurwein-Teissl M, et al. Association of increased neopterin production with decreased humoral immunity in the elderly. *Exp Gerontol* 2003;38:583-587.
24. Gruber A, Murr C, Wirleitner B, Werner-Felmayer G, Fuchs D. Histamine suppresses neopterin production in the human myelomonocytoma cell line THP-1. *Immunology Letters* 2000;72:133-136.
25. Todo Bom A, Proença T, et al. O Sistema Antioxidante na Asma Brônquica: Condicionaismos do Processo de Envelhecimento. *Rev Port Imunoalergologia* 2003;XI:17-29.
26. Smith L, Shamsuddin M, Sporn P, Denenberg M, Anderson J. Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. *Free Radical Biology & Medicine* 1997;95:1301-07.
27. Comhair S, Bhatena P, Dweik R, Kavuru M, Erurum S. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen induced asthmatic response. *Lancet* 2000;355:624-24.