

CURSO PÓS-GRADUADO

Imunologia na prática pneumológica

Conceitos actuais sobre defesa imunológica do pulmão

VI. Doenças do interstício por agressores extrínsecos *

LUIS DELGADO

Serviço de Imunologia, Faculdade de Medicina e Hospital de S. João, 4200 Porto.

As doenças do interstício pulmonar constituem um grupo muito diverso de patologias inflamatórias que envolvem as estruturas alveolares e intersticiais do pulmão, i.e. a região anátomo-funcional habitualmente designada por "Pulmão Profundo", e que reúnem características clínicas, fisiológicas e radiológicas comuns (1,2). Os progressivos avanços no conhecimento da biologia celular e molecular do Pulmão Profundo têm levado a sugerir a existência de mecanismos comuns na patogenia destas entidades (2,3). Estes mecanismos têm sido formulados com base no tipo de "alveolite" encontrada, i.e. o perfil das células imunes

e inflamatórias que infiltram o interstício e os alvéolos, e na frequente evolução destas patologias para a fibrose pulmonar, com ou sem reacção granulomatosa (2-6).

A hipótese da participação da resposta imunológica na patogenia das doenças pulmonares intersticiais tem como principal ponto de partida a sua frequente associação a situações de imunopatologia, como são exemplo as doenças auto-imunes (1,7), ou a situações em que há contacto repetido do aparelho respiratório com poeiras orgânicas que, reconhecidas antigénicamente, sensibilizam o indivíduo (8).

Das numerosas entidades nosológicas englobadas nas doenças do interstício pulmonar (1,7) as que são atribuíveis a agentes exógenos - ocupacionais ou ambientais, drogas ou iatrogénicas - ocupam um lugar de destaque, essencialmente por dois motivos: por um lado, muitas delas são potencialmente preveníveis por atitudes correctas de Saúde ocupacional e ambiental

* Os resultados apresentados neste trabalho serviram de base à participação do autor no Curso Pós-Graduado "Imunologia na Prática Pneumológica", X Congresso de Pneumologia, Lisboa, Novembro de 1994

Recebido para publicação: 96.4.9

(9); por outro, a identificação do(s) agente(s) etiológico(s) permitirá, à partida, uma investigação mais frutuosa da sequência dos mecanismos patogénicos envolvidos e, idealmente, uma melhor compreensão das entidades nosológicas de causa desconhecida. Além disso, a identificação de agentes exógenos causadores de doença respiratória terá um particular impacto em termos de Saúde Pública pois, muito provavelmente, outros indivíduos igualmente expostos virão a desenvolver a doença (8).

O objectivo deste trabalho é o de revêr alguns aspectos dos mecanismos imunopatogénicos das doenças do interstício por agressores extrínsecos, nomeadamente as que se associam à inalação de poeiras orgânicas e que designamos de Pneumonites de Hipersensibilidade. Não foi nosso objectivo fazer uma revisão detalhada da fisiopatologia e das características clínicas e de diagnóstico destas entidades, sendo o leitor mais interessado remetido para algumas das cuidadas publicações na literatura médica Nacional (1-16). Quizemos, tão sómente, apresentar alguns dados da investigação imunológica destas doenças que poderão representar um pequeno exemplo *da Imunologia na Prática Pneumológica*.

Ocupações de risco e prevalência das Pneumonites de Hipersensibilidade.

Apesar da identificação clínica destas entidades datar do séc. XVIII, a partir dos trabalhos de Ramazzini, a individualização clínica e patogénica destas formas de lesão pulmonar ocupacional data dos anos 30, pela descrição do "pulmão de fazendeiro" por Campbell (17). A partir dos anos 60, após o estabelecimento das bactérias termofílicas como agentes etiológicos do "pulmão de fazendeiro" (18), têm sido identificadas numerosas poeiras orgânicas e ambientes ocupacionais (19-21) que podem originar a doença (revistos nas refs 11 e 12).

Contudo, a verdadeira prevalência das pneumonites de hipersensibilidade, quer na população laboral, quer na que ocorre aos hospitais, tem sido difícil de estabelecer, dadas as dificuldades de diagnóstico e um menor

alerta dos clínicos para a sua identificação. Para isso contribui o facto dos sinais e sintomas da doença serem frequentemente não específicos, semelhando outras doenças, infecciosas (pneumonia vírica, gripe, p.ex.) ou intersticiais (sarcoidose, p.ex.) e também porque frequentes vezes estão associadas a condições particulares de ambiente profissional e/ou doméstico que podem passar despercebidas numa história ocupacional menos cuidada. Por outro lado, os anticorpos precipitantes para o antigénio inalado, o marcador por excelência da sensibilização ocupacional, podem desaparecer com o afastamento, dificultando a identificação de formas crónicas e avançadas, ou serem falsamente negativos pela utilização na sua pesquisa de métodos pouco sensíveis e mal standardizados.

A prevalência dos vários agentes etiológicos tem diferenças geográficas importantes, quer nacionais quer mesmo regionais, que têm sobretudo a ver com microambientes laborais e/ou domésticos próprios de cada área, por sua vez condicionados por factores socioeconómicos. Entre nós, a doença surge essencialmente nos operários da indústria da cortiça (Suberose) e nos criadores de aves (21-22).

No caso da indústria da cortiça, que representa actualmente 3,3% do comércio externo de Portugal, o principal produtor mundial deste produto (23,24), há uma concentração particular no distrito de Aveiro, onde laboram 64,5% dos cerca de 10 500 operários desta indústria (24,25) e, nomeadamente, no concelho de St.^a Maria da Feira, onde se localizam cerca de 67% das unidades fabris de transformação da cortiça (26). Estudos conduzidos em operários desta indústria, por Ramiro Ávila, Cortez Pimentel e Thomé Villar, revelaram uma prevalência de Suberose entre os 14 e 19% (27,28). Um outro estudo, realizado em duas fábricas de St.^a Maria da Feira e em que tivemos a oportunidade de colaborar (29,30), levou-nos à conclusão que as diferentes condições laborais influenciam de modo importante o aparecimento da doença. Assim, numa unidade de menores dimensões, mais artesanal, em que as diferentes fases de laboração se encontravam menos individualizadas, a prevalência de queixas respiratórias foi da ordem dos 68% e dos 17% para a Suberose. Numa outra unidade mais moderna, com maior separação das

zonas laborais, esses números foram, respectivamente, de 45 e 9% (29,30). Neste contexto é de realçar que, actualmente, mais de 80% das unidades de transformação da cortiça ainda têm menos de 10 operários, sendo habitualmente empresas de pequena dimensão, baixa tecnologia e carácter familiar e, seguramente, com baixos níveis de higiene industrial (24,26).

A prevalência da doença de criadores de aves é ainda mais difícil de estabelecer, pois tratando-se de uma actividade de ocupação de tempos livres o doente frequentemente não reconhece e/ou valoriza os seus sintomas, ou abandona a ocupação o que, também à partida, não é garante de regressão da doença. Na revisão de 432 criadores de pombos que acorreram a uma consulta hospitalar, Ramiro Ávila e cols. relataram a sua presença em cerca de 4% (21). Em 242 criadores de pombos, que acorreram a uma Reunião Columbófila, encontramos uma prevalência da doença na ordem dos 5% (31).

Anticorpos precipitantes na resposta imune e diagnóstico das Pneumonites de Hipersensibilidade.

A produção de anticorpos para o material antigénico inalado tem sido considerada uma característica fundamental da resposta imune nas pneumonites de hipersensibilidade e um dos argumentos fundamentais do envolvimento da hipersensibilidade de tipo III nesta doença (revisto na ref^a 32). Esses anticorpos são facilmente demonstráveis, quer no soro quer no lavado broncoalveolar (LBA), por métodos imunológicos de precipitação ou de enzimo-imunoensaio (21,31,33,34). No entanto, eles estão também presentes em indivíduos expostos sem doença, apesar de, habitualmente, em níveis mais baixos. Assim, a demonstração de anticorpos precipitantes para o antigénio em causa é considerada um marcador de exposição e não de doença, sendo a não standardização dos métodos de pesquisa *in vitro* a principal dificuldade na sua valorização prática (35,36). A utilização de material antigénico apropriado, bem como de métodos que permitam uma quantificação mais precisa, poderão levar a uma melhor discriminação dos indivíduos expostos e com doença.

Assim, num estudo de criadores de pombos (31), verificamos que a presença de anticorpos precipitantes para um extracto das penas dos pombos, apesar de uma menor sensibilidade para o diagnóstico, melhora a sua especificidade - i.e. origina menor número de "falsos-positivos" (Quadro I).

QUADRO I

Anticorpos precipitantes no diagnóstico da doença de criadores de pombos (31). Em 242 criadores de pombos foram pesquisados, por difusão dupla em gelose, anticorpos precipitantes para vários extractos antigénicos. Apesar de uma menor sensibilidade, as precipitinas para as penas têm maior especificidade para o diagnóstico (estabelecido por critérios clínicos, radiológicos e funcionais)

Precipitinas para:	Fezes de pombo	Soro de pombo	Penas de pombo
Especificidade	44%	60%	70%
Sensibilidade	90%	77%	73%
Valor predictivo Positivo	27%	31%	36%

No caso do *Penicillium frequentans*, a positividade em trabalhadores expostos varia dos 16 aos 32% (27,30) e, em doentes, dos 81% nas formas de pneumonite de hipersensibilidade a 27% nos doentes com quadros de asma (37). No entanto, em nenhum dos estudos publicados até à data (27,30,36) a presença de precipitinas se relacionou com as alterações espirométricas, radiográficas ou da lavagem broncoalveolar.

Recentemente (38), estudámos a utilização de um método de fluoro-enzimoimunoensaio, o "CAP® System", na quantificação destes anticorpos no soro e LBA de 20 doentes com queixas respiratórias associadas a uma longa exposição na indústria da cortiça (média 18 anos). Nestes, em que se incluíram 9 doentes com pneumonite de hipersensibilidade e 11 com asma brônquica, (tendo 8 precipitinas positivas) foi possível verificar, a par de uma boa concordância entre os métodos (19 dos 20 casos), uma relação entre a sua quantidade no LBA e a gravidade clínica da Pneumonite de Hipersensibilidade. Assim, neste último grupo, os níveis de IgG específica para o *Penicillium frequentans* no LBA correlacionam-se

negativamente com a Capacidade Vital e Capacidade Pulmonar Total, o que não aconteceu com os seus níveis séricos (Fig.1). Do mesmo modo, apenas para os níveis de IgG específica no LBA se verificou uma correlação significativa com o nº total de células e linfócitos do LBA ($r_s=0,75$, $p=0,03$, correlação de Spearman).

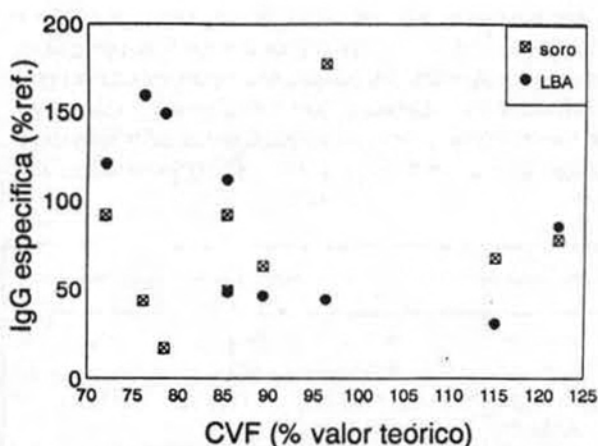


Fig. 1 - Quantificação de IgG específica para o *Penicillium frequentans* em nove doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade (Suberose). Verifica-se uma correlação inversa entre a Capacidade Vital Forçada e os níveis de IgG específica no lavado broncoalveolar (LBA; $r_s=0,783$, $p=0,027$) mas não no soro ($r_s=0,259$, $p=0,463$).

Apesar de continuar a ser controversa a participação da resposta humoral na patogenia das pneumonites de hipersensibilidade, estes dados reforçam observações experimentais recentes (39-41) que sugerem que a formação de complexos antígeno-anticorpo no pulmão profundo, conseqüente à inalação crónica do antígeno, poderá ter um papel importante na formação de granulomas e na ampliação inflamatória e activação celular no interstício pulmonar.

Os linfócitos T no lavado broncoalveolar e na mediação das Pneumonites de Hipersensibilidade.

A principal característica histopatológica das Pneumonites de Hipersensibilidade é a presença de um infiltrado difuso de células mononucleares no interstí-

cio pulmonar, com formação de granulomas e diferentes graus de fibrose (42-44) e que se acompanha de um predomínio de linfócitos T supressores/ citotóxicos (CD8+), quer no parênquima pulmonar (44) quer no lavado broncoalveolar (45). Neste, é característica a presença de um elevado número de linfócitos T, que chegam a atingir cerca de 90% das células e que, funcional (44) e fenotipicamente (46), se comportam como células citotóxicas e/ou supressoras. Caracteristicamente, estas mesmas células podem encontrar-se, apesar de em menor número, no LBA de indivíduos expostos mas assintomáticos, o que tem sido interpretado como um sinal de "alveolite subclínica" mas cujo verdadeiro significado clínico e prognóstico permanece por esclarecer (6,14,47,48).

No entanto, as alterações pulmonares observadas em modelos animais expostos por via inalatória ao antígeno, após a transferência passiva de linfoblastos (49) ou de células T (50) de animais sensibilizados, apoia também o papel destas células na regulação da inflamação intersticial das Pneumonites de Hipersensibilidade. Por outro lado, o infiltrado mononuclear e as lesões que se observam em modelos experimentais (39) são inibidas pela imunossupressão com corticosteróides ou ciclosporina A (51), fármacos que reconhecidamente interferem na função efectora dos linfócitos T, nomeadamente na sua actividade citotóxica. Alguns estudos, no homem (44,45) e no animal de experiência (revistos na ref^a 39), sugerem que uma diferente actividade imunorreguladora destes linfócitos pulmonares, poderá estar na base da diferente evolução clínica e patológica observada em indivíduos com idêntica exposição.

Em trabalho anterior (52) pudemos confirmar que nas Pneumonites de Hipersensibilidade, nomeadamente nos trabalhadores da indústria da cortiça, o número de linfócitos CD8+ no LLBA se correlaciona inversamente com os parâmetros ventilatórios (CVF e DLCO/VA), sugerindo a sua intervenção na patogenia da doença. A identificação mais recente de diferentes fenótipos nas subpopulações linfocitárias CD8+, a que correspondem diferentes actividades efectoras e de imunorregulação (Quadro II), levou-nos a melhor caracterizar nesta patologia as diferentes subpopula-

QUADRO II

Fenótipos linfocitários estudados e funções atribuídas

Fenótipo	Função atribuída	Referência
CD8+CD45RA-	linfócitos T citotóxicos de "memória"	<i>J Immunol</i> 1991; 146:2088-94
CD8+CD29+	linfócitos T citotóxicos efectores	<i>Cellular Immunol</i> 1990; 128, 314-28
CD3+CD16/56+e CD8+CD57+	linfócitos T não restrictos ao MHC, com baixa actividade NK	<i>Am Rev Respir Dis</i> 1987; 135:941-9
CD4-CD8-CD29+e TCR1+	linfócitos T gama/delta: citotoxicidade não restricta ao MHC e imunidade antibacteriana	<i>J Immunol</i> 1989; 143:1108-17 <i>Immunol Today</i> 1991; 12 (10):346-8
CD3-CD16/56+e CD8-CD57+	actividade NK	<i>J Immunol</i> 1986; 136 (12): 4480-6

ções de linfócitos a que tem sido atribuída actividade citotóxica (53).

Incluimos neste estudo 14 doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade (13 casos de Suberose e 1 caso de Pulmão de Criador de Aves), todos com sintomas respiratórios e "alveolite" intensa (linfócitos no LBA = $61,5 \pm 6,1\%$ $59,5 \pm 16,1 \times 10^4$ /ml; CD4/CD8 = $0,38 \pm 0,24$; linfócitos CD8+ = $65,3 \pm 3,4\%$). A maior parte dos linfócitos CD8+ obtidos no LBA eram CD29+ e CD45RA-, i.e. com o fenótipo dos linfócitos T citotóxicos restrictos ao MHC (Quadro III). A expressão percentual do CD29 nos linfócitos CD8+ (i.e. a percentagem de linfócitos CD8+ que marca com anticorpo anti-CD29) foi significativamente mais elevada na LBA do que no sangue ($83,5 \pm 4,6\%$ versus $57,8 \pm 5,4\%$, $p < 0,01$).

Em 6 casos de Suberose quantificámos também os linfócitos T não-restrictos ao MHC e com fenótipo NK, pela expressão linfocitária do CD57, e a coexpressão de CD 16 e CD56, habitualmente considera-

QUADRO III

Subpopulações CD8+ nas Pneumonite de Hipersensibilidade (53). A percentagem de linfócitos positivos (média \pm SEM) foi calculada por imunofluorescência de duas cores e cimetria de fluxo em 11 doentes. O aumento dos linfócitos T CD8+ no LBA verifica-se sobretudo pelo aumento da subpopulação CD29+

	CD8+	CD8+CD29+	CD8+CD45RA+
Lavado			
Bronco alveolar	65,2 \pm 3,4%	55,0 \pm 5,0%	9,6 \pm 6,6%
Sangue	34,7 \pm 2,7%	19,7 \pm 2,1%	13,3 \pm 5,2%

dos marcadores de linfócitos NK (linfócitos não-T, não-B, com actividade "Natural Killer"). A presença destes antigénios em linfócitos que co-exprimem marcadores T (CD8 ou CD3), serviu-nos para definir a subpopulação T citotóxica não-restricta ao MHC (Quadro II). No LBA das Pneumonites de Hipersensibilidade predominou o fenótipo CD8+ CD57+ ($21,0 \pm 4,8\%$) sobre o CD3+ CD16/56+ ($4,6 \pm 0,5\%$), o mesmo acontecendo nas subpopulações NK: o número relativo de linfócitos CD8-CD57+ foi maior que o CD3-CD16/56+ ($7,5 \pm 1,0\%$ versus $2,0 \pm 0,8\%$) (Fig. 2). Por outro lado, a fenotipagem de linfócitos T gama/delta mostrou que o valor relativo de linfócitos TCR1+ no LBA, de $8,1 \pm 3,6\%$, foi semelhante ao fenótipo CD4-CD8-CD29+ com $9,7 \pm 3,1\%$. Em nenhum dos casos estudados e para ambos os fenótipos, o número relativo de linfócitos T gama/delta no LBA foi superior ao do sangue.

Apesar de um número limitado de observações, os dados obtidos sugerem a presença de uma população heterogénea de linfócitos com o fenótipo das células citotóxicas e "Natural Killer" no pulmão profundo dos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade, sem uma expansão preferencial dos linfócitos T gama/delta, e com uma proporção minoritária das subpopulações linfocitárias com fenótipo "supressor" (CD8+CD45RA+).

As implicações funcionais do recrutamento desta população heterogénea de linfócitos citotóxicos ao pulmão e o seu papel na regulação da inflamação intersticial nas Pneumonites de Hipersensibilidade, está ainda por estabelecer. No entanto, dados recentes

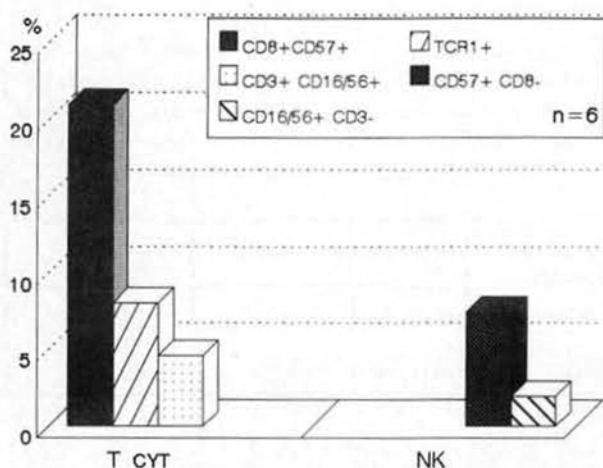


Fig. 2— Proporção relativa de subpopulações linfocitárias com distintos fenótipos dos linfócitos T citotóxicos "não restrictos ao MHC" no lavado broncoalveolar de seis doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade. Estão representados os valores percentuais médios, determinados por imunofluorescência de duas cores e citometria de fluxo. É característico o predomínio do fenótipo CD8+CD57+ dos linfócitos T citotóxicos (T CYT) sobre os linfócitos Gama/Delta (TCR1+) e «Natural Killer» (NK).

(54,55) que apontam para um papel das células NK e das subpopulações de linfócitos CD8+ na indução e ampliação das resposta T de hipersensibilidade retardada (de tipo T_H1), reforçam a hipótese da sua participação na imunopatogenia das Pneumonites de Hipersensibilidade.

Os mastócitos e a activação de fibroblastos nas Pneumonites de Hipersensibilidade.

Os mastócitos são potentes células inflamatórias claramente envolvidas em situações de imunopatologia pulmonar, onde têm sido sobretudo implicados na mediação da hipersensibilidade imediata, pela sua ligação de alta afinidade à IgE. Apesar deste mecanismo não estar implicado na patogenia das Pneumonites de Hipersensibilidade, dados recentes sugerem que os mastócitos humanos participam também em situações de inflamação crónica e fibrose no pulmão, possivelmente através da libertação de citocinas e mediadores que modulam a actividade dos fibroblastos (39,56).

Neste sentido, os mastócitos estão normalmente presentes nos alvéolos pulmonares e surgem em número aumentado no LBA de doenças pulmonares intersticiais (57). Também relevante é a observação, num modelo experimental de pneumonite de hipersensibilidade em ratinhos deficientes de mastócitos (W/WV, de uma dependência da doença da transplantação de mastócitos derivados da medula óssea (58).

No sentido de avaliar a participação destas células na patogenia da Suberose e a sua relação com os diversos quadros clínicos desta doença (37,38), analisámos a sua presença, por duas colorações distintas—Wright-Giemsa (WG) e Azul de Toluidina (AT) — em 53 amostras de lavado broncoalveolar de trabalhadores da indústria da cortiça com queixas respiratórias (59). Para além de uma excelente correlação entre os dois métodos de coloração (Fig. 3), verificámos que o número de mastócitos no LBA estava significativamente mais elevado nos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade ($n=25$) - $13,9 \pm 4,7$ mastócitos/ 20 campos/ 40 μ l ($x \pm SEM$) — quando comparados aos doentes com asma brônquica ($n=7$) ou bronquite crónica ($n=8$) - $1,5 \pm 0,7$ ($p < 0,002$, teste de Mann Withney).

Encontrámos, também, uma correlação positiva entre o n.º de mastócitos no LBA com os níveis de Albumina ($r_s = 0,53$, $p < 0,05$, correlação de Spearman) e de IgG ($r_s = 0,50$, $p < 0,05$) do LBA, bem como com o n.º absoluto de linfócitos ($r_s = 0,50$, $p < 0,05$). Nos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade verificámos, também, que o subgrupo com maior n.º de mastócitos ($>5/20$ campos/40 μ l, $n=7$) tinha uma menor Capacidade Vital Forçada ($80,3 \pm 16,2\%$ versus $98,8 \pm 17,6\%$, $n=14$, $p < 0,02$), não havendo diferenças no tempo médio de exposição ($18,4 \pm 5,6$ versus $16,6 \pm 11,5$ anos, p n.s.) entre ambos.

Estas observações sugerem um papel dos mastócitos na resposta celular do interstício pulmonar à inalação de poeiras orgânicas da cortiça, nas formas de Pneumonite de Hipersensibilidade. Por outro lado, a sua presença na superfície broncoalveolar relaciona-se com a intensidade da linfocitose e da inflamação do interstício pulmonar. Face a dados recentes que apontam para interações bidireccionais na diferencia-

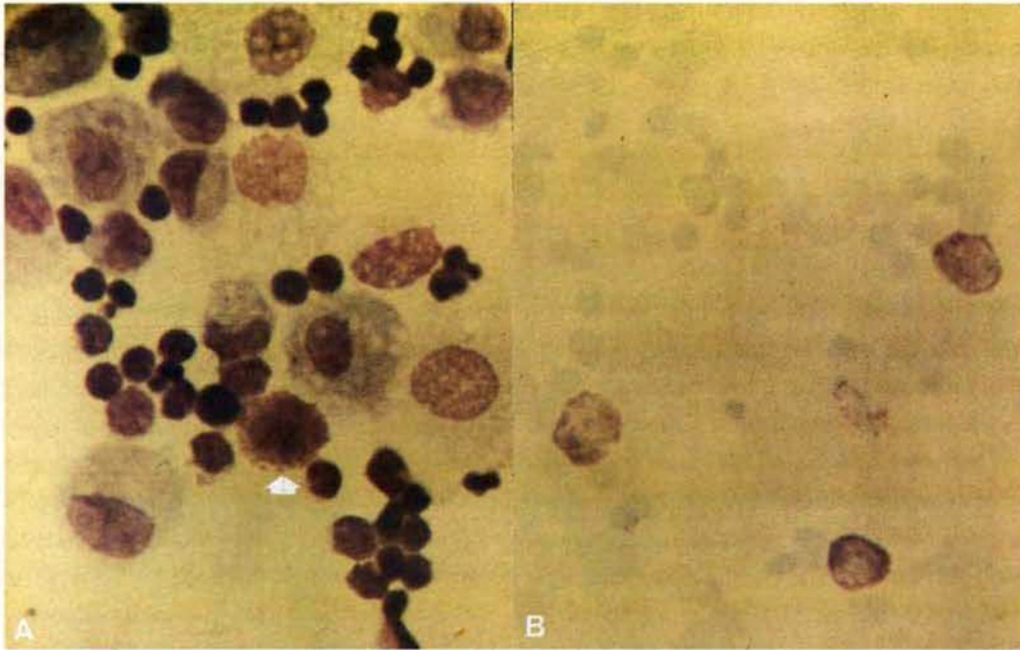


Fig. 3 – Presença de mastócitos no lavado broncoalveolar de doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade (Suberose). Os mastócitos são facilmente identificados pela coloração de *Wright-Giemsa* (A) ou pelo *Azul de Toluidina* (B). Em 53 amostras analisadas verificámos uma excelente correlação entre os dois métodos de coloração (*WG/AT* $r_s=0,96$, $p<0,001$) e entre as contagens de dois observadores (*AT*: $r_s=0,89$, *WG*: $r_s=0,98$, $p<0,001$).

ção, proliferação e activação de mastócitos e fibroblastos (56, 60) fomos também investigar a relação entre a presença de mastócitos na superfície broncoalveolar e a activação de fibroblastos no pulmão profundo, avaliada pelos níveis de hialuronato na LBA (61).

O hialuronato é um glicosaminoglicano presente na matriz intersticial do pulmão e é produzido por fibroblastos após vários estímulos inflamatórios (62, 63). O seu aumento no LBA tem sido relacionado com a activação de fibroblastos em diversas patologias pulmonares que evoluem para a fibrose, como a Sarcoidose, o Pulmão de Fazendeiro e a Fibrose Pulmonar Idiopática (63). Em 25 doentes, com 22 ± 11 anos de exposição na indústria de cortiça, podemos verificar a existência de níveis mais elevados no LBA dos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade do que nos casos com envolvimento das vias aéreas

(asma e/ou bronquite crónica, média geométrica $19,9\mu\text{g/L}$ versus $92,2\mu\text{g/L}$, $p<0,0002$, teste de *Mann Withney*), assim como nos doentes com $\text{DLCO/VA} < 80\%$ ($113,7$ vs $32,1\mu\text{g/L}$ se $>80\%$). Os níveis de hialuronato correlacionaram-se directamente com o nº de mastócitos ($r_s=0,68$, $p<0,001$) e linfócitos ($\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) do LBA ($r_s=0,76$, $p<0,001$) e inversamente com a DLCO/VA ($r_s=-0,58$, $p<0,01$).

Assim, na Suberose, a activação de fibroblastos pulmonares poderá estar relacionada com a resposta inflamatória local à inalação de poeiras de cortiça com fungos e parece reflectir a intensidade da infiltração de linfócitos T e mastócitos no pulmão profundo. Por outro lado, a identificação do CD44, uma molécula envolvida na adesão e migração extra-vascular dos linfócitos, como o principal receptor celular para o hialuronato (64,65), leva a colocar a hipótese da uma

possível intervenção deste glicosaminoglicano nas interacções celulares do pulmão profundo nas Pneumonites de Hipersensibilidade.

Heterogeneidade dos Macrófagos Alveolares na resposta inflamatória do interstício pulmonar.

Os macrófagos são as principais células residentes na superfície alveolar, onde desempenham, pela sua actividade fagocítica, um importante papel de depuração do material inalado que atinge a interface do pulmão profundo com o meio ambiente (66). No entanto, tal como outras populações macrofágicas, os macrófagos alveolares (M ϕ A) produzem uma grande diversidade de substâncias que poderão participar na mediação de situações inflamatórias agudas e crónicas do pulmão e na indução da resposta imune aos antígenos inalados (67-69).

Sabendo-se que à partida representam apenas um dos compartimentos das populações macrofágicas pulmonares (66) e das células que podem potencialmente funcionar como apresentadoras de antígeno no pulmão (70), os M ϕ A são por si uma população heterogénea, estrutural e funcionalmente (69). Por exemplo, em relação à sua função acessória na resposta imunológica de linfócitos T e B, consideráveis variações têm sido descritas (revisito nas referências 68 e 71). Na espécie humana, a maioria dos estudos sugere que, pelo menos no indivíduo normal, a sua função é essencialmente de supressão da resposta linfocitária a mitógenos ou antígenos, particularmente na proporção macrófagos/linfócitos habitualmente encontrada no pulmão profundo (71). No entanto, estudos mais detalhados têm demonstrado que em proporções inferiores, ou após fraccionamento a partir do LBA, os M ϕ A humanos poderão funcionar como células apresentadoras de antígeno (72) de modo comparável aos monócitos circulantes.

É possível que, subjacente à heterogeneidade na função acessória das populações macrofágicas recuperadas por lavagem broncoalveolar, estejam diferentes subpopulações e/ou estádios de diferenciação celular, cuja dinâmica será potencialmente alterada em situa-

ções inflamatórias. De facto, quer em situações inflamatórias que envolvem o interstício pulmonar (73) ou as vias aéreas (74), quer em modelos experimentais (75), tem sido observado o recrutamento de células de tipo "monocítico" e/ou dendrítico à superfície broncoalveolar, células com importantes funções acessórias na resposta imune (76). Assim, estas poderão ser em parte responsáveis pelo aumento da capacidade de apresentação antigénica das populações macrofágicas recuperadas do pulmão nestas situações (70, 71, 77). Por outro lado, a diminuição da função acessória dos macrófagos alveolares poderá estar dependente da maturação destas células no pulmão, já que em parte eles se originam dos monócitos circulantes e estes últimos adquirem igualmente funções de supressão da resposta T após maturação "in vitro" (78).

No homem, a característica autofluorescência dos M ϕ A tem permitido, com recurso à citometria de fluxo, separar as células mononucleares obtidas por digestão enzimática do pulmão em duas subpopulações - de baixa e elevada autofluorescência - com efeitos diametralmente opostos na activação de linfócitos T, i.e. estimulação intensa ou supressão, respectivamente (79). Se é certo que essas células de baixa autofluorescência, com características das células dendríticas, estão habitualmente pouco representadas no lavado broncoalveolar (LBA) de indivíduos normais (80), em modelos experimentais, como é a inflamação pulmonar induzida pelo BCG (75, 81), elas estão claramente aumentadas no LBA e podem ser distinguidas dos M ϕ A que suprimem a resposta dos linfócitos T com base nas suas características citométricas (81). De facto, é possível observar no LBA células com características morfológicas que se assemelham às células dendríticas, quer directamente (Fig. 4) quer após a sua cultura "in vitro" (Fig. 5).

Partindo da hipótese que em situações de inflamação intersticial do pulmão a heterogeneidade natural das populações macrofágicas recuperadas pelo LBA estará aumentada, por recrutamento de células monocíticas ou dendríticas e/ou por modificações das características das células residentes impostas pelas citocinas e mediadores produzidos localmente, fomos investigar a possibilidade da citometria de fluxo

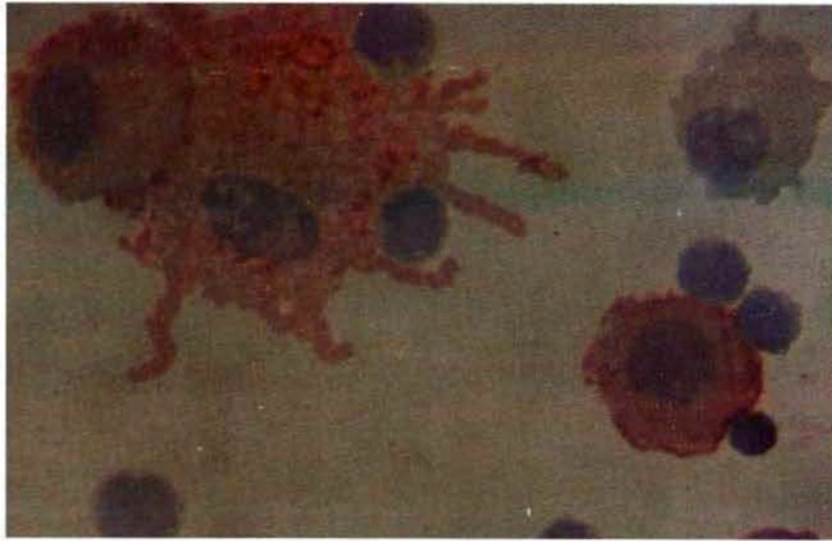


Fig. 4 – Heterogeneidade morfológica dos Macrófagos Alveolares. Presença de Macrófagos com morfologia dendrítica, formando agregados com linfócitos, no LBA de um doente com uma Pneumonite de Hipersensibilidade por isocianatos, 5 dias após exposição ao antigénio (endurecedor contendo HDI); a heterogeneidade é também aparente na expressão de HLA-DR (coloração vermelha) que pode ser predominantemente de membrana, citoplasmática ou mesmo negativa (imunocitoquímica para HLA-DR, APAAP, x200 na ampliação original).

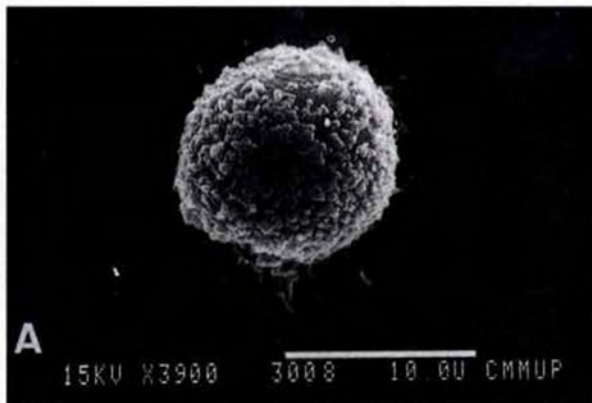


Fig. 5 – Heterogeneidade morfológica dos Macrófagos Alveolares. Em cultura alguns Macrófagos do LBA apresentam, em contraste com a morfologia mais habitual (A), longos prolongamentos citoplasmáticos (B), sugerindo a morfologia das células dendríticas (microscopia electrónica de varrimento, x3900 e x2700 na ampliação original).

permitir a caracterização de diferentes fenótipos de macrófagos broncoalveolares nas Pneumonites de Hipersensibilidade.

Estudámos, assim, 11 casos de Pneumonite de Hipersensibilidade que comparámos a 6 doentes com

exposição ocupacional, mas sem doença pulmonar intersticial, e a 7 com Sarcoidose, todos não-fumadores. Nos respectivos LBA a região dos linfócitos foi definida e separada dos macrófagos com base nas características de dispersão de luz - ortogonal (SSC

"side scatter") e em linha recta (FSC "forward scatter") - que são típicas destas células (Fig. 6A) e aferida, num histograma de contorno, pela sua expressão elevada de CD45 (o "antigénio leucocitário comum") e baixa dispersão de luz ortogonal (Fig. 6B). Em todos os casos estudados foi possível definir, nas

não-autofluorescentes (M \emptyset NF 63,4% vs 36,3% de M \emptyset AF, $p=0,007$) (Fig. 6E e F). Na Sarcoidose as duas subpopulações estão presentes no LBA em proporção idêntica (M \emptyset NF 42,4% vs M \emptyset AF 47,8%, $p.n.s.$).

Assim, comparativamente à Sarcoidose, as Pneumonites de Hipersensibilidade parecem distinguir-se

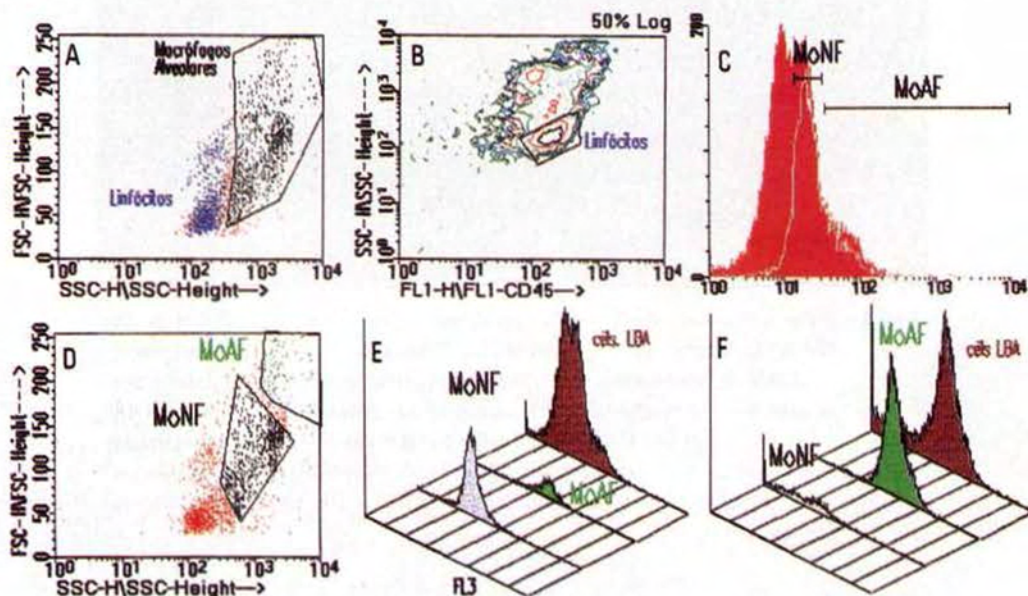


Fig. 6 - Caracterização por citometria de fluxo dos macrófagos do lavado broncoalveolar. A. identificação da região dos macrófagos e linfócitos com base nas suas características no histograma de dispersão de luz ortogonal (SSC "side scatter") e em linha recta (FSC "forward scatter") - e, num histograma de contorno, pela sua expressão de CD45 e dispersão de luz ortogonal (B). C. histograma de distribuição da autofluorescência vermelha (FL3) dos M \emptyset A, onde é possível definir duas regiões distintas de macrófagos autofluorescentes (M \emptyset AF) e "não-autofluorescentes" (M \emptyset NF). A proporção relativa destas duas subpopulações é, nas Pneumonites de Hipersensibilidade (D e E), muito distinta da dos casos sem doença intersticial (F).

células com a dispersão de luz característica dos M \emptyset A, duas regiões distintas com base no histograma de distribuição da autofluorescência vermelha (Fig. 6D e C), a partir das quais se calculou a proporção relativa das subpopulações de macrófagos autofluorescentes (M \emptyset AF) e "não-autofluorescentes" (M \emptyset NF) (Fig. 6E e F).

A proporção relativa das duas subpopulações de M \emptyset A foi diferente nos 3 grupos estudados (Fig. 7). Enquanto que nos doentes sem doença pulmonar intersticial predominam os macrófagos alveolares autofluorescentes (M \emptyset AF) 67,4 % versus 30,8 % de M \emptyset NF, $p=0,02$, teste de Wilcoxon) nas Pneumonites de Hipersensibilidade (PH) há um predomínio franco dos

pela presença no LBA de uma proporção significativamente mais elevada de M \emptyset A "não-autofluorescentes" (63,4% vs 42,4%, $p=0,03$, Fig. 7) que, simultaneamente, poderão ter um tamanho (FSC) próximo ao dos monócitos circulantes (89). Resultados preliminares apontam também para uma diferente expressão, nestas duas subpopulações, de antigénios caracteristicamente expressos nos monócitos (CD45, CD 14, CD4 e HLA-DR), sugerindo diferentes estadios de diferenciação/maturação dos macrófagos recuperados no LBA.

Face aos dados recentes que apontam para diferente actividade destas subpopulações na estimulação "in vitro" de linfócitos T (79-81), estes resultados são consistentes com a hipótese de, no pulmão profundo

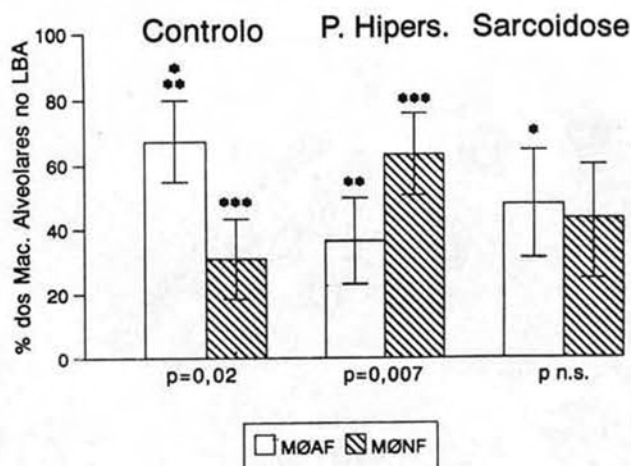


Fig. 7 – Proporção relativa de duas subpopulações de macrófagos do LBA, definidas pela autofluorescência e citometria de fluxo, em indivíduos não-fumadores. Enquanto que nos doentes sem doença pulmonar intersticial (Controlo, n=6) predominam os macrófagos alveolares autofluorescentes (MØAF) nas Pneumonites de Hipersensibilidade (P. Hipers., n=11) há um predomínio franco dos não-autofluorescentes (MØNF). Na Sarcoidose (n=7) as duas subpopulações estão presentes no LBA em proporção idêntica. Estão assinaladas, pelo nº de asteriscos, as diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo Controlo.

das Pneumonites de Hipersensibilidade, predominar uma população macrofágica apresentadora de antígeno aos linfócitos T ("não-autofluorescentes") e haver uma redução dos macrófagos "supressores" (autofluorescentes). Estudos futuros, dirigidos à caracterização fenotípica e funcional destas subpopulações e seu isolamento, poderão vir a corroborar esta hipótese.

CONCLUSÃO

Apresentámos alguns dados da investigação imunológica das doenças do interstício pulmonar, que

tiveram por objectivo uma melhor caracterização da resposta imune e inflamatória do pulmão profundo à inalação de poeiras orgânicas. Face aos resultados obtidos e aos avanços recentes no conhecimento da biologia celular do Pulmão, propõe-se um modelo dos mecanismos envolvidos na imunopatogénese das Pneumonites de Hipersensibilidade (Fig.8), muitos dos quais poderão ser comuns a outras doenças pulmonares por agressores extrínsecos e/ou a doenças intersticiais idiopáticas. Espera-se que uma melhor compreensão destes mecanismos complexos permita perspectivar, no futuro, novas terapêuticas neste importante grupo de patologia pulmonar.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece a colaboração de todos os Colegas que, directa ou indirectamente, participaram nos trabalhos apresentados, pois os resultados obtidos só foram possíveis graças à colaboração de várias equipas de investigação. Nestas, destaco a colaboração dos Drs. João Carlos Winck, J. Manuel Sapage, J. Moura e Sá, Fernando Filipe e Veiga de Macedo e das Dr^{as} Silvia Torres, Natália Taveira, Aurora Carvalho e Isabel Melo, do Departamento de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia. No Serviço de Imunologia agradeço a colaboração da Dr^a Josefina Rodrigues e Dr. Carlos Cuesta (Unidade de Imunoalergologia, H. S. João), da Sr^a D^a Irene Dória e D^a Conceição Magalhães, Dr. João Pedro Ramos e Prof. Doutor Fleming Torrinha. Reconhece-se, também, a colaboração da Sr^a D^a Alice Guimarães (Centro de Morfologia Experimental) e do Eng^o Carlos Sá (Centro de Metalurgia e Ciências dos Materiais), da Universidade do Porto, nos trabalhos de microscopia electrónica. Aos Drs João Carlos Winck e Jorge Palmares agradeço a revisão crítica do manuscrito. Este trabalho foi parcialmente financiado por uma bolsa do ex-Instituto Nacional de Investigação Científica (n^o 27343) e pelo projecto 901.86.55 da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica.

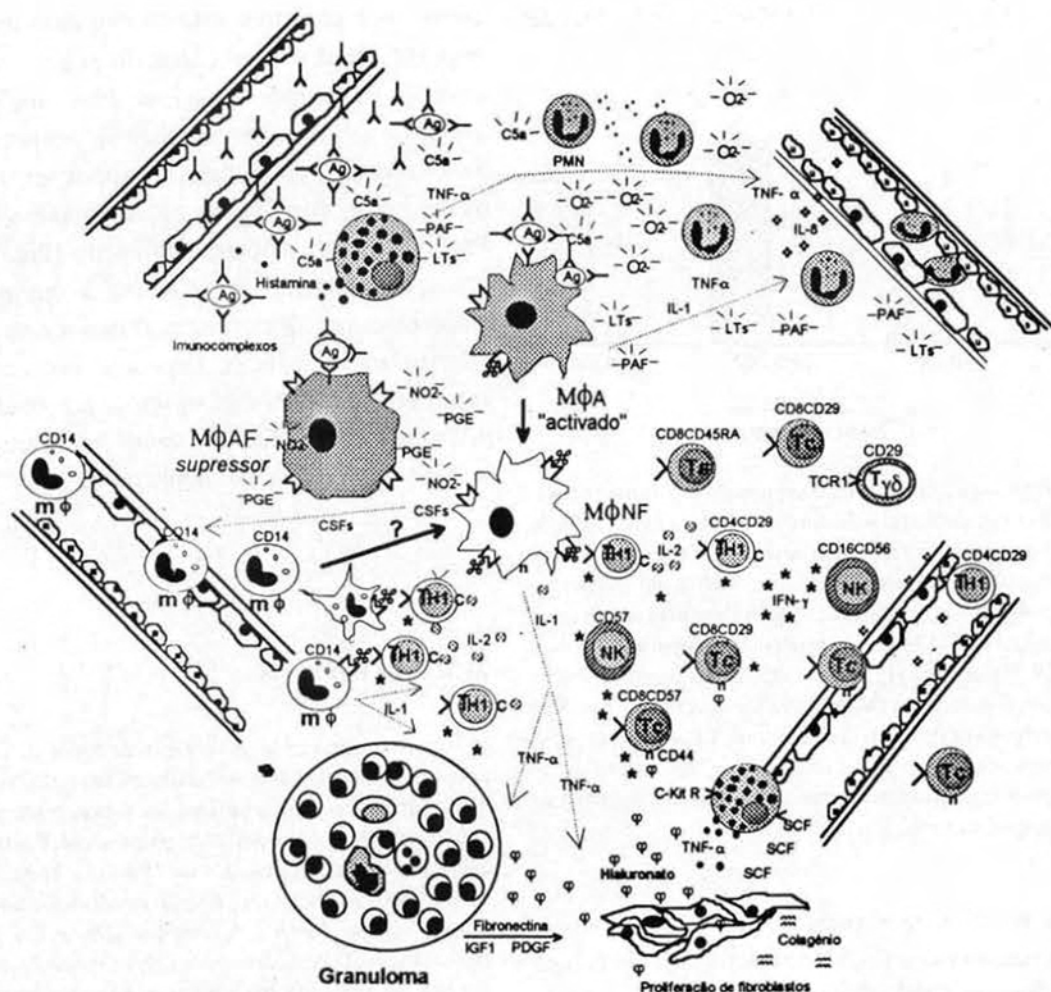


Fig. 8 – Modelo dos mecanismos imunopatológicos que intervêm na patogénia das Pneumonites de Hipersensibilidade, desde a sua fase aguda até à fase crónica de infiltração mononuclear, formação de granulomas e fibrose (organizado a partir de dados pessoais e das refs 39-41, 60 e 82-88). Em cima: a formação de complexos antígeno/anticorpo levará a uma reacção inflamatória com participação de polimorfonucleares neutrófilos, mastócitos e activação macrofágica, resultando libertação de enzimas, metabolitos reactivos de oxigénio (O_2^-), leucotrienos (LTs), factor activador de plaquetas (PAF) e citocinas (IL-1 e $TNF\alpha$); estes levam a quimiotactismo celular e contribuem para activação do endotélio, com produção de IL-8, aumento da adesividade leucocitária e recrutamento celular (PAF, LTs, C5a, IL8). No meio: a participação de várias subpopulações de macrófagos alveolares que, "activados", contribuem para a lesão pulmonar e apresentação antigénica aos linfócitos T auxiliares (CD4+CD29+); estes, conjuntamente com as diversas subpopulações de linfócitos T citotóxicos e NK recrutados (produtores de $IF\gamma$), contribuem para o

desenvolvimento de mecanismos de hipersensibilidade retardada (reposta de tipo T_H 1 e activação macrofágica). A acção desses macrófagos ("não-autofluorescentes" MΦNF), monócitos e células dendríticas, "auxiliadoras" de linfócitos T, pode ser contrariada pela acção de macrófagos alveolares "supressores" (autofluorescentes MΦAF) e seus mediadores (PGE_2 , NO_2^-) ou de linfócitos $CD8^+$ "supressores" ($CD8^+CD45RA^+$). Em baixo: um grupo heterogénio de linfócitos T citotóxicos, produtores de $IF\gamma$, contribuem também para a activação e proliferação de fibroblastos. Estes, através da produção de hialuronato contribuem, conjuntamente com a IL 1 e $TNF\alpha$, para a adesão "homotípica" de macrófagos e linfócitos e formação de granulomas. Os mastócitos poderão também surgir e participar na fase crónica, sob influência do "stem-cell factor" (SCF) dos fibroblastos e de linfocinas. A proliferação e estimulação dos fibroblastos e a fibrose intersticial é, assim, promovida por diversas células e mediadores: macrófagos (fibronectina, IGF1, PDGF, $TNF\alpha$), linfócitos ($IF\gamma$) e mastócitos (Histamina, $TNF\alpha$).

BIBLIOGRAFIA

1. TELES DE ARAÚJO A. Doenças do Interstício Pulmonar, in *Pneumologia na Prática Clínica*. Freitas e Costa M, ed. Edição da Clínica de Doenças Pulmonares da Faculdade de Medicina de Lisboa; 2º Volume: 637-688.
2. CHRÉTIEN J. Pulmão Profundo: uma entidade a individualizar. Limites. Estruturas. Modalidades de Abordagem, in *Pulmão Profundo. Estruturas e Mecanismos*. Robalo Cordeiro AJA, ed. XIV Jornadas de Actualização Pneumológica. Coimbra, 1990; 1: 1-12.
3. COSTABEL U. Células efectoras alveolares. Mecanismos normais e patológicos, in *Pulmão Profundo. Estruturas e Mecanismos*. Robalo Cordeiro AJA, ed. XIV Jornadas de Actualização Pneumológica. Coimbra, 1990; 2:13-24.
4. AZEVEDO-BERNARDA R. Fibroses Intersticiais do Pulmão, in *Pulmão Profundo. Estruturas e Mecanismos*. Robalo Cordeiro AJA, ed. XIV Jornadas de Actualização Pneumológica. Coimbra, 1990; 10: 125-147.
5. ÁVILA R, DUARTE P, MENDES B, FROES F, SANTOS AC, AMARAL-MARQUES R. A agressão do Pulmão Profundo por partículas orgânicas, in *Pulmão Profundo. Estruturas e Mecanismos*. Robalo Cordeiro AJA, ed. XIV Jornadas de Actualização Pneumológica. Coimbra, 1990; 15: 225-237.
6. ROBALO CORDEIRO AJA. Alveolites sub-clínicas - perspectiva imunológica. *Rev Port Imunoalergol* 1992; 1 (3): 73-85.
7. ROBALO CORDEIRO. Repercussões pulmonares das doenças sistémicas. Âmbito e limites. *Arq da S.P.P.R.* 1992; 8 (4) suplemento: 93-100.
8. ÁVILA R. Sintomas e doenças resultantes da exposição a poeiras orgânicas. *Arq da S.P.P.R.* 1992; 9 (1) : 27-56.
9. ALVIM FERRAZ MCM, FERRAZ JM, MOURA MRS. A importância da poluição atmosférica em Medicina do Trabalho. *Arq da S.P.P.R.* 1992; 9 (4) :167-173.
10. RODRIGUES J, MOREIRA DA SILVA JP, DELGADO JL, CASTEL-BRANCO MG. Pneumonite de Hipersensibilidade. *Rev Port Imunoalergol* 1992; 1 (3): 113- 122.
11. MOURA PIRES J, MONTEIRO R, CAMACHO E, NEVES MC. Pneumonite de Hipersensibilidade. *Boletim do Hospital Pulido Valente* 1994; VII (1): 33-40
12. TELES DE ARAÚJO A, RAYMUNDO ME. Doenças Ocupacionais do Pulmão, in *Pneumologia na Prática Clínica*. Freitas e Costa M, ed. Edição da Clínica de Doenças Pulmonares da Faculdade de Medicina de Lisboa, 1992; 2º Volume: 691-744.
13. VIEIRA L. A importância do estudo do lavado broncoalveolar no diagnóstico e prognóstico da Pneumonite de Hipersensibilidade. *Boletim do Hospital Pulido Valente* 1994; VII (1): 41-46.
14. SEGORBE LUÍS A. Contribuição para o estudo da alveolite subclínica do Criador de Aves. *Via Pneumológica* 1992; V (1): 51-60.
15. LEITE A C P. A lavagem broncoalveolar em patologia pulmonar ocupacional. *Coimbra Méd.* 1987; 8 Supl.1: 83-90.
16. TELES DE ARAÚJO A. Resposta imune nas alveolites alérgicas extrínsecas. *Imunopatologia da obstrução das vias aéreas*. Bugalho de Almeida A, Freitas e Costa M, eds. Lisboa 1992; 39-47.
17. CAMPBELL JM. Acute symptoms following work with hay. *Br Med J* 1932; 2:1143-1144.
18. PEPYS J, JENKINS PA, FESTENSTEIN GN, et al. Farmer's lung: Thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet* 1963; 18: 182-196.
19. ÁVILA R, TELES DE ARAÚJO A, VILLAR TG. Doença pulmonar nos corticeiros. *Jornal do Médico* 1968; 1319: 8-10.
20. PIMENTEL JC. Furrier's lung. *Thorax* 1970; 25: 387-398.
21. VILLAR TG, ÁVILA RG. Granulomatoses pulmonares de causa inalatória. Lisboa, 1976.
22. ÁVILA R. Factores de agressão do aparelho respiratório numa fábrica de cortiça. *Jornal do Médico* 1973; 1573: 46-47.
23. INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA. Estatísticas do Comércio Externo, 1992.
24. DELGADO AP, GODINHO IM. A Indústria na região Norte: caracterização estrutural. *Perspectivas de evolução da indústria na Região Norte. Desafios dos Anos 90*. Associação Industrial Portuguesa, ed. 1994.
25. INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA. Estatísticas Industriais, 1989.
26. ASSOCIAÇÃO DOS INDUSTRIAIS E EXPORTADORES DE CORTIÇA DO NORTE. Estatísticas de Janeiro de 1991
27. ÁVILA R, GALVÃO LUCAS J, ARAÚJO AT, LACEY J, et al. Estudo epidemiológico da doença respiratória dos trabalhadores da indústria da cortiça. *O Médico* 1973; 1146: 255-268.
28. PIMENTEL C, ÁVILA R. Doença respiratória dos operários da indústria da cortiça (<<suberoses>>). *Novos aspectos e possibilidades de diagnóstico*. *Jornal do Médico* 1974; 1594: 16-28.
29. CARVALHO A, VEIGA DE MACEDO A, DELGADO L,

- FLEMING TORRINHA, et al. Respiratory effect of mouldy cork dust. Clinical investigation. Fifth European Congress on Diseases of the Chest. 1984; 1:12 (resumo).
30. CARVALHO A, VEIGA DE MACEDO A, DELGADO L, FLEMING TORRINHA, et al. Manifestações broncopulmonares em operários inalando poeiras de cortiça. *O Médico* 1986;115: 310-318
 31. SÁ HC, TAVEIRA N, DELGADO L, JOÃO FM, et al. Doença dos criadores de pombos. Estudo numa população de risco. *Arq S.P.P.R.* 1987; IV (1): 37-42.
 32. BURRELL R, RYLANDER R. A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Resp Dis* 1981; 62: 332-343.
 33. PATTERSON R, WANG JLF, FINK JN, CALVANICO NJ, ROBERTS M. IgA and IgG antibody activities of serum and bronchoalveolar lavage fluids from symptomatic and asymptomatic pigeon breeders. *Am Rev Resp Dis* 1979; 120: 1113-1118.
 34. RODRIGUES MJA, GOMES MJM, FREITAS O, AMARAL-MARQUES R. Identificação de imunoglobulinas G específicas por ELISA. *Arq. S.P.P.R.* 1991; 8(2):119-123.
 35. RICHERSON HB, BERNSTEIN LI, FINK JN, HUNNINGHAKE GW, NOVEY HS et al. Guidelines for the clinical evaluation of Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84, 5 (part 2): 839-44.
 36. SAPAGE JM, DELGADO JL, TORRES S, VICENTE P, WINCK JC, RODRIGUES FFP, RIBEIRO JI. Suberose: contributo da Lavagem Broncoalveolar no diagnóstico da patologia respiratória nos trabalhadores da Indústria da cortiça. *Arq S.P.P.R.* 1992; 9 (6): 321-327.
 37. ÁVILA R, VILLAR TG. Respiratory disease in cork workers (Suberosis). *Thorax* 1973; 28: 409-23.
 38. DELGADO L, WINCK JC, SAPAGE JM, TORRES S, MOURA E SÁ J, FLEMING TORRINHA. Anticorpos IgG para o *Penicillium frequentans* na doença respiratória dos trabalhadores da indústria da cortiça (Suberose). Aplicação de um método de fluoro-enzimo-ensaio na sua quantificação. *Arq. S.P.P.R.* 1994; 11 (5): 353- 354 (resumo).
 39. SALVAGGIO JE, MILHOLLON B. Induction and modulation of pulmonary inflammation by organic dusts: cytokines, immune complexes and <<all of those things>>. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 731-733.
 40. MULLIGAN MS, WARD PA. Immune complex-induced lung and dermal vascular injury. Differing requirements for Tumor Necrosis Factor- α and IL-1. *J Immunol* 1992;149: 331-339.
 41. DENIS M, CORMIER Y, FOURNIER M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 477-483.
 42. REYES CN, WENZEL FJ, LAWTON BR, EMANUEL DA. The pulmonary pathology of Farmer's Lung Disease. *Chest*.1982; 81 (2):142-146.
 43. KAWANAMI O, BASSET F, BARRIOS R, LACRONIQUE, FERRANS VJ, CRYSTAL RG. Hypersensitivity Pneumonitis in man. Light- and electron-microscopic studies of 18 lung biopsies. *Am J Pathol*.1983;110: 275-289.
 44. SEMENZATO G, AGOSTINI C, ZAMBELLO R, TRENTIN L, CHILOSI M, PIZZOLO G, MARCER G, CIPRIANI A. LUNG T cells in Hypersensitivity Pneumonitis: phenotypic and functional analyses. *J Immunol*. 1986;137:1164-1172.
 45. SEMENZATO G, TRENTIN L. Cellular immune responses in the lung of hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J*.1990; 3: 357-359.
 46. SEMENZATO G, TRENTIN L, ZAMBELLO R, AGOSTINI C, CIPRIANI A, MARCER G. Different types of cytotoxic lymphocytes recovered from the lungs of patients with Hypersensitivity Pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1988;137: 70-74.
 47. SOLAL-CÉLIGNY PH, LAVIOLETTE M, HÉBERT J, CORMIER Y. Immune reactions in the lungs of asymptomatic dairy farmers. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 964- 967.
 48. CORMIER Y, BÉLANGER J, LAVIOLETTE. Persistent bronchoalveolar lymphocytosis in asymptomatic farmers. *Am Rev Respir Dis*.1986;133: 843-847.
 49. SCHUYLER M, GOTT K, SHOPP G, CROOKS L. Experimental hypersensitivity pneumonitis: influence of donor sensitization. *J Lab Clin Med*. 1990;115: 621- 628.
 50. SCHUYLER M, GOTT K, SHOPP G, CROOKS L. CD3+ and CD4+ cells adoptively transfer experimental Hypersensitivity Pneumonitis. *Am Rev Respir Dis*. 1992. 146:1582-1588.
 51. DENIS M, CORMIER Y, LAVIOLETTE M. Murine Hypersensitivity Pneumonitis: a study of cellular infiltrates and cytokine production and its modulation by cyclosporin A. *Am Rev Resp Cell Mol Biol* 1992; 6: 68-74.
 52. DELGADO L, WINCK JC, SAPAGE JM, TORRES S, RIBEIRO JI, MOURA E SÁ. Respiratory disease in cork workers: characterization of Suberosis alveolitis by bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Journal* 1992; 5 (suppl 15): 503-504s (abstract).
 53. DELGADO L, RAMOS JP, WINCK JC, CUESTA C, TORRINHA JAF. Cytotoxic lymphocytes in Hypersensitivity Pneumonitis. Meeting of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, Sept 1992 (abstract).
 54. Romagnani S. Induction of T_H1 and T_H2 responses: a key role for the <<natural>> immune response? *Immunol Today* 1992;13 (10): 379-381.
 55. KEMENY DM, NOBLE A, HOLMES BJ, DIAZ-SANCHEZ D. Immune regulation: a new role for the CD8+ T

- cell. *Immunol Today* 1994;15 (3):107-110.
56. JORDANA M. Mast cells and fibrosis - who's on first? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 7-8.
 57. PESCI A, BERTORELLI G, OLIVIERI D. Mast cells in bronchoalveolar lavage fluid and in transbronchial biopsy specimens of patients with farmer's lung disease. *Chest* 1991;100:1197-1202.
 58. TAKIZAWA H, OHTA K, HIRAI K, MISAKI Y, HORIUCHI T, et al. Mast cells are important in the development of hypersensitivity pneumonitis. A study with the mast-cell-deficient mice. *J Immunol* 1989;143:1982-1988.
 59. DELGADO L, CUESTA C, WINCK JC, SAPAGE JM, MOURA E SÁ J E FLEMING TORRINHA JA. O aumento de mastócitos broncoalveolares caracteriza as Pneumonites de Hipersensibilidade nos trabalhadores da indústria da cortiça. *Archivos de Bronconeumologia* 1993; 29 (suppl 1): 54-55 (resumo).
 60. VALENT P. The riddle of the mast cell: kit(CD117)-ligand as the missing link? *Immunol Today* 1994;15:111-114.
 61. DELGADO L, WINCK JC, SAPAGE JM, MOURA E SÁ J E FLEMING TORRINHA JA. O Hialurano no lavado broncoalveolar, um marcador de ativação dos fibroblastos, reflecte a intensidade da inflamação intersticial na Suberosse. *Arq S.P.P.R.* 1993;10 (1): 79 (resumo).
 62. WHITESIDE TL, BUCKINGHAM RB. Interactions between cells of the immune system and hyaluronate synthesis by human dermal fibroblasts. The biology of hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium* 143:1989;171-186.
 63. HÄLLGREN R, EKLUND A, ENGSTROM-LAURENT A, THUNELL M, SCHMEKEL B. Hyaluronate in bronchoalveolar lavage fluid: a new marker in sarcoidosis reflecting pulmonary disease. *Br Med J* 1985; 290:1778-81.
 64. KOOPMAN G, VAN KOOYK Y, DE GRAAF M, MEYER JLM, FIGDOR CG, PALS ST. Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J Immunol* 1990;145: 3589-3593.
 65. PARDI R, INVERARDI L, BENDER JR. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol Today* 1992; 13 : 224-230.
 66. BRAIN JD. Lung Macrophages: how many kinds are there? What do they do? *Am Rev Respir Dis* 1988;137: 507-509.
 67. NATHAN B. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319- 324.
 68. HERSCOWITZ HB. In defense of the lung: paradoxical role of the pulmonary alveolar macrophage. *Annals of Allergy* 1985; 55: 634-650.
 69. ROSSMAN MD, DOUGLAS SD. The Alveolar Macrophage: receptors and effector cell function, in *Immunology and Immunologic Diseases of the Lung*. Daniele RP, ed. Blackwell Scientific Publications 1988; 9:167-183.
 70. HOLT PG. Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. *Eur Respir J* 1993; 6:120-129.
 71. HOLT PG. Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract: the role of alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 261-270.
 72. RICH EA, TWEARDY DJ, FUJIWARA H, ELLNER JJ. Spectrum of immunoregulatory functions and properties of human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: 258-265.
 73. MELIS M, GJOMARKAJ M, PACE E, MALIZIA G, SPATAFORA M. Increased expression of Leukocyte Function Associated Antigen-1 (LFA-1) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *Chest* 1991;100: 910-916.
 74. POULTER LW, JANOSSY G, POWER C, SREENAN S, BURKE C. Immunological/ physiological relationships in asthma: potential regulation by lung macrophages. *Immunol Today* 1994;15: 258-261.
 75. HAVENITH CEG, BREEDIJK AJ, HOEFESMIT ECM. Effect of bacillus CalmetteGuérin inoculation on numbers of dendritic cells in bronchoalveolar lavages of rats. *Immunobiology* 1992;184: 336-347.
 76. GEPPERT TD, LIPSKY PE. Antigen presentation at the inflammatory site. *Crit Rev Immunol* 1989; 9: 313-362.
 77. LEM VM, LIPSCOMB MF, WEISSLER JC, NUNEZ G, BALL EJ, STASTNY P, et al. Bronchoalveolar cells from sarcoid patients demonstrate enhanced antigen presentation. *J Immunol* 1985;135:1766-1771.
 78. SCHAUBLE TL, BOOM WH, FINEGAN CK, RICH EA. Characterization of suppressor function of human alveolar macrophages for T lymphocytes responses to Phytohemagglutinin: cellular selectivity, reversibility, and early events in T cell activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 89-97.
 79. NICOD LP, LIPSCOMB MF, TOEWS GB, WEISSLER JC. Separation of potent and poorly functional human lung accessory cells based on autofluorescence. *J Leuk Biol* 1989; 45: 458-465.
 80. NICOD LP, LIPSCOMB MF, WEISSLER JC, LYONS CR, ALBERTSON J, TOEWS GB. Mononuclear cells in human lung parenchyma. Characterization of a potent accessory cell not obtained by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: 818-823.
 81. HAVENITH CEG, BREEDIJK AJ, VAN MIERT P, BLIJLEVEN N, CALAME W, BEELEN RHJ, Et al. Separation of alveolar macrophages and dendritic cells via autofluorescence: phenotypical and functional characterization. *J Leuk Biol* 1993; 53: 504-510.
 82. WARREN JS. Relationship between Interleukin-1(3 and

- Platelet-activating Factor in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat. *Am J Pathol* 1992;141 (3): 551-560.
83. DENIS M, BEDARD M, LAVIOLETTE M, CORMIER Y. A study of monokine release and Natural Killer activity in the bronchoalveolar lavage of subjects with Farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1993;147: 934-939.
84. MILLS CD. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J Immunol* 1991; 146: 2719-2723.
85. MILBURN HJ. Lymphocyte subsets in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 1992; 5: 5-7.
86. DENIS M, CORMIER Y, LAVIOLETTE M, GHADIRIAN E. T cells in Hypersensitivity Pneumonitis: effects of in vivo depletion of T cells in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6:183-189.
87. DENIS M, GHADIRIAN E. Murine hypersensitivity pneumonitis: bidirectional role of interferon-gamma. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 783-792.
88. DENIS M, GHADIRIAN E. Murine hypersensitivity pneumonitis: production and importance of Colony-stimulating factors in the course of a lung inflammatory reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 441-446.
89. DELGADO L, WINCK JC, RODRIGUES J, RAMOS JP, TORRINHA JAF. Heterogeneidade dos Macrófagos Alveolares em doenças pulmonares granulomatosas. Caracterização por citometria de fluxo (em preparação).