



Revista Portuguesa de Pneumologia

ISSN: 0873-2159

sppneumologia@mail.telepac.pt

Sociedade Portuguesa de Pneumologia  
Portugal

Rebordão, Manuela; Delgado, Luís; Pinto, Helena; Remédios, Augusto; Taborda-Barata, L  
Repercussão da imunoterapia específica na população T1 e T2 de linfócitos periféricos em doentes  
atópicos

Revista Portuguesa de Pneumologia, vol. XII, núm. 2, marzo-abril, 2006, pp. 107-130

Sociedade Portuguesa de Pneumologia

Lisboa, Portugal

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169718462002>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Prémio Thomé Villar/Boehringer Ingelheim 2004\*

## Thomé Villar/Boehringer Ingelheim Award 2004\*

Manuela Rebordão<sup>1</sup>  
Luís Delgado<sup>2</sup>  
Helena Pinto<sup>3</sup>  
Augusto Remédios<sup>4</sup>  
L. Taborda-Barata<sup>5</sup>

Repercussão da imunoterapia específica na população T1 e T2 de linfócitos periféricos em doentes atópicos

*Specific immunotherapy effect on peripheral blood T1/T2 lymphocytes in atopic patients*

Recebido/aceite para publicação/received/accepted for publication: 05.11.12

### Resumo

A coordenação das características humorais e celulares da resposta alérgica, sabe-se hoje, está dependente da regulação por linfócitos T. As vacinas de alérgenos são uma terapêutica que consegue modular a resposta das células T, e cujos mecanismos imunológicos permanecem incompletamente esclarecidos.

**Objectivo:** Avaliar o efeito da imunoterapia, após um ano de tratamento, na expressão de citocinas

### Abstract

Allergen-specific immunotherapy has been used for successful treatment of atopic diseases. They may act by modifying the patterns of cytokines produced by T cells. However, the precise mechanism by which it accomplishes these effects is still incompletely understood.

**Objective:** To evaluate the effect of one year immunotherapy on cytokines profiles T1 and T2 of peripheral blood lymphocytes in atopic patients.

\* Trabalho vencedor *ex-aequo* (Secção A)

<sup>1</sup> Técnica Superior de Saúde. Assistente principal. Serviço de Análises Clínicas do Hospital Militar de Belém/Senior Health Technician. Senior assistant. Belém Military Hospital Analysis Clinic

<sup>2</sup> Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Serviço e Laboratório de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Hospital de São João, Porto/Associate Professor at Porto University Medical School. Immunology Unit and Laboratory, Porto University Medical School, Hospital de São João, Porto

<sup>3</sup> Tenente-coronel médica – Directora do Serviço de Pneumologia do Hospital Militar de Belém/Medical Lieutenant Colonel – Director of Pulmonology Unit, Belém Military Hospital

<sup>4</sup> Tenente-coronel farmacêutico – Director do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Militar de Belém/Pharmacist Lieutenant Colonel – Director of Analysis Clinic, Belém Military Hospital

<sup>5</sup> Professor Auxiliar de imunologia clínica, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. Director do Serviço de Imunoalergologia do Hospital Pêro Covilhã/Assistant Professor Immunology Unit, Beira Interior University Health Sciences School. Immunoallergologist, Director of Immunoallergy Unit, Pêro Covilhã Hospital

de perfil T1 e T2 em linfócitos de sangue periférico de doentes atópicos.

**Material e métodos:** Estudaram-se dez doentes atópicos sensibilizados a aeroalergénios comuns a fazerem vacinas de alergénios num período médio de um ano. Dentre estes, seis foram estudados antes e após a vacina. Como controlo estudou-se um grupo atópico sem imunoterapia constituído por 14 doentes também sensibilizados a aeroalergénios comuns e um grupo de indivíduos não atópicos, saudáveis, constituído por 7 elementos. A activação dos linfócitos T fez-se com PMA, ionomicina e brefeldina e estudaram-se as citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 por citometria de fluxo. Procedeu-se a análise estatística por testes não paramétricos (Teste de Mann-Whitney U e Wilcoxon), considerando-se significativo  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** A expressão de IL-4 e IL-5 nas células T, caracteristicamente aumentada nos doentes atópicos, respectivamente 13,8 (3,1-31,8) e 6,7% (1,0-20,4), é significativamente mais baixa no grupo que realizou a imunoterapia [5,4 (2,9-15,6)  $p = 0,007$  e 2,1% (0,6-4,8)  $p = 0,035$ ] não diferindo do grupo controlo não atópico [5,1 (4,1-6,9) e 1,0 (0,4-2,1)]. Os níveis de IFN- $\gamma$  não variaram significativamente entre os três grupos estudados, mas a razão IFN- $\gamma$  / IL-4 nos linfócitos T CD4 aumentou significativamente nos doentes submetidos a imunoterapia. Por outro lado, houve um aumento da expressão de IL-10 nas células T circulantes do grupo sob imunoterapia, comparativamente a controlos não atópicos [1,9 (1,0-4,9) *versus* 1,4% (0,9-1,4)  $p = 0,02$ ], sendo mais evidente nos linfócitos T CD8. A IL-10 correlacionou-se de forma significativa com todas as citocinas de perfil T2 (IL-4 e IL-5) e com o fenótipo Tc2.

**Conclusão:** Após um ano de imunoterapia, a resposta das células T do sangue periférico a uma estimulação policlonal evidenciou uma diminuição da expressão das citocinas (IL-4 e IL-5),

**Methods:** We studied 10 atopic patients sensitised to common environmental allergens receiving immunotherapy over one year mean period. Six of these patients were studied before and after immunotherapy. Fourteen atopic patients untreated and 7 non-atopic subjects were used as control groups. Intracellular cytokine production (IFN- $\gamma$ ; IL-4; IL-5; IL-10) was determined by flow cytometry following stimulation with phorbol myristate acetate (PMA), ionomycin and brefeldin. Mann-Whitney U and Wilcoxon non-parametric tests were utilized for the statistical analysis.

**Results:** The expression of IL-4 and IL-5 in T cells, characteristically increased in atopic patients, respectively 13.8 (3.1 – 31.8) and 6.7% (1.0-20.4), was significantly lower in the immunotherapy group [5.4 (2.9 -15.6)  $p = 0.007$  and 2.1% (0.6 – 4.8)  $p = 0.035$ ] and similar in the non-atopic control group. The levels of IFN- $\gamma$  did not differ between the studied groups but the ratio IFN- $\gamma$  / IL-4 produced by CD4+ T lymphocytes increased significantly in the patients receiving immunotherapy. In addition, there was an increase in the expression of IL-10 by T cells of the immunotherapy group compared to the non-atopic controls [1.9 (1.0 – 4.9) *versus* 1.4% (0.9 – 1.4)  $p = 0.02$ ], being more evident in CD8+ T lymphocytes. IL-10 correlated significantly with all the profile T2 cytokines (IL-4 and IL-5) and with the phenotype Tc2.

**Conclusion:** After one year of immunotherapy the peripheral T cells response to a polyclonal stimulation revealed a reduction in IL-4 and IL-5 production, characteristically increased in atopic disease. The increase of IL-10 that we found in our study suggested the existence of a profile T2 regulatory population, more evident in CD8+ T lymphocytes.

## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L. Taborda-Barata

caracteristicamente aumentadas na doença alérgica. **Rev Port Pneumol 2006; XII (2): 107-130**

O aumento da IL-10, que também verificámos, sugere a existência de uma população reguladora de perfil T2, sendo mais evidente nos linfócitos T CD8.

**Keywords:** Immunotherapy, T1 and T2 lymphocytes, ratio IFN- $\gamma$  / IL-4, IL-10.

**Rev Port Pneumol 2006; XII (2): 107-130**

**Palavras chave:** Imunoterapia, linfócitos T1 e T2, razão IFN- $\gamma$  / IL-4, IL-10.

### Introdução

A doença atópica caracteriza-se por uma resposta inflamatória com um padrão particular dependente da síntese aumentada de IgE e activação de células efectoras características – mastócitos e eosinófilos<sup>1</sup>. Actualmente, sabe-se que a coordenação das características humorais e celulares da resposta alérgica está dependente da regulação por linfócitos T<sup>2</sup>. Assim, os linfócitos T2 produtores de IL-4 potenciam a síntese de IgE e o aumento da expressão vascular de moléculas de adesão e selectinas, responsáveis pelo recrutamento selectivo de eosinófilos, enquanto os linfócitos T2 produtores de IL-5 influenciam a produção, maturação, activação e sobrevivência dos eosinófilos<sup>3,4,5</sup>. Em contraste, os linfócitos que expressam citocinas T1 inibem o desenvolvimento da diferenciação de células T2 e das respostas alérgicas através da produção de IFN- $\gamma$ <sup>6</sup>. Também, reciprocamente, as células T2 inibem as T1 através da IL-4<sup>7</sup>. Em trabalhos anteriores, em que ava-

### Introduction

An atopic disease has a particular pattern of inflammation depending on increased IgE synthesis and activation of the characteristic effector cells – mastocytes and eosinophils<sup>1</sup>. It is known that humoral and cellular characteristics of the allergic response is regulated by T lymphocytes<sup>2</sup>. Thus, the IL-4 producer lymphocytes increase IgE synthesis and vascular expression of the molecules of adhesion and selectins, responsible for the selective recruitment of eosinophils, while the IL-5 producer lymphocytes influence the production, maturation, activation and survival of the eosinophils<sup>3,4,5</sup>. In contrast, the T1 cytokines expression lymphocytes inhibit the differentiation of T2 cells and the allergic responses through the production of IFN- $\gamma$ <sup>6</sup>. In addition, the T2 cells reciprocally inhibit the T1 through the IL-4<sup>7</sup>.

In former studies we used flow cytometry to evaluate the expression of T1 and T2 cytokines in circulating lymphocytes in

*Sabe-se que a coordenação das características humorais e celulares da resposta alérgica está dependente da regulação por linfócitos T*

***Uma das terapêuticas moduladoras da resposta alérgica utilizada desde longa data é a vacinação com alérgenos***

liámos por citometria de fluxo a expressão de citocinas T1 e T2 em linfócitos circulantes de doentes atópicos, pudemos verificar a existência de uma expressão de IL-4 quer em linfócitos T CD4 (Th2) e T CD8 (Tc2), enquanto a expressão de IL-5 foi predominante nas células T CD8 (Tc2). Além disso, o número de células T produtoras de IL-4 correlacionou-se com a IgE sérica destes doentes, enquanto as Tc2 (IL-5) com o número de eosinófilos circulantes e ECP sérica.

Uma das terapêuticas moduladoras da resposta alérgica utilizada desde longa data é a vacinação com alérgenos<sup>8</sup>. Apesar da longa experiência clínica com este tipo de terapêutica, os mecanismos imunológicos que lhe são subjacentes permanecem ainda desconhecidos. Se, nos estudos iniciais, se atribuiu essencialmente um papel modulador à IgG<sup>9</sup>, os estudos mais recentes têm apontado para uma modulação dos linfócitos T através de um possível mecanismo de anergia (as células T deixam de responder ao alérgeno)<sup>10,11</sup> ou/e desvio imune (a expressão de citocinas das células T muda de um perfil T2 para um perfil T1)<sup>12,13,14,15</sup>. Em relação à modificação do perfil de citocinas induzida pela imunoterapia, os resultados são variáveis, estando descritos aumentos de IFN- $\gamma$  com diminuição das citocinas de perfil T2<sup>16</sup>, aumentos de IFN- $\gamma$  sem modificação dos níveis de IL-4<sup>17</sup>, decréscimo de ambas as citocinas<sup>18</sup> e ainda decréscimo de IL-4 sem modificação dos níveis de IFN- $\gamma$ <sup>19</sup>. Na avaliação da expressão destas citocinas tem sido referida a razão IFN- $\gamma$ /IL-4 como um bom índice de avaliação do tratamento com imunoterapia por traduzir o balanço T1/T2<sup>20</sup>. Por outro lado, mais recente-

atopic patients and were able to verify the existence of expression of IL-4 both in CD4 (Th2) and CD8 (Tc2) T lymphocytes of IL-5 expression however, was predominant in CD8 (Tc2) T cells. In addition, the number of IL4 producer T cells correlated with the serum IgE of these patients while the Tc2 (IL-5) correlated with the number of circulating eosinophils and the serum level of eosinophil cationic protein (ECP).

One of the treatments to allergic response with a long-standing history is allergen vaccination<sup>8</sup>. Despite a long clinical experience with this type of treatment, the subjacent immunological mechanisms remains unknown. While earlier studies attributed a modulator role to IgG<sup>9</sup>, more recent studies have pointed to T lymphocytes through a possible anergy mechanism (T cells stopped responding to allergen)<sup>10,11</sup> and/or immune deviation (a change in T cells cytokines expression from a T2 to a T1 profile)<sup>12,13,14,15</sup>. The results of cytokines profiles modification induced by immunotherapy are variable. Increases of IFN- $\gamma$  with decrease in T2 cytokines profile<sup>16</sup>, increases of IFN- $\gamma$  without change in IL-4<sup>17</sup> levels, a decrease in both cytokines<sup>18</sup> and a decrease in IL-4 with no change in IFN- $\gamma$  levels<sup>19</sup> are described evaluating cytokines express in the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio has been cited as a good index in the immunotherapy evaluation since it translate the T1/T2 balance<sup>20</sup>. On the other hand, IL-10 has been more recently studied as an immunoregulator cytokine<sup>21</sup>. Akdis refers to a large increase in this cytokine expression in an autocrine form, in the specific antigen T cells, associated with anergy and inflammatory

mente, a IL-10 tem sido também estudada como uma citocina imunorreguladora<sup>21</sup>. Akdis refere um grande aumento na expressão desta citocina, de forma autócrina, nas células T específicas de antígeno, estando associada à anergia e à inibição de reações inflamatórias<sup>10</sup>.

Neste estudo procurámos avaliar as populações T1 e T2 de doentes atópicos submetidos à imunoterapia há pelo menos um ano. Estudámos, por citometria de fluxo, a expressão de citocinas dos linfócitos circulantes estimulados policlonalmente, avaliando o IFN- $\gamma$ , a IL-4, a IL-5, a proporção relativa IFN- $\gamma$ /IL-4 e uma citocina predominantemente supressora: a IL-10.

### Material e métodos

#### População

Estudámos dez indivíduos atópicos, sendo sete sensíveis a ácaros do pó da casa (*Dermatophagoides pteronyssinus*) e três sensíveis a pólenes de gramíneas. Apresentavam uma média de idades de 27,5 (13-54) anos, sendo seis do sexo masculino e quatro do sexo feminino. Cinco tinham asma brônquica associada a rinite, três rinite alérgica e dois asma brônquica. Todos os doentes estavam a fazer vacinas de alergénios, com extractos standardizados biologicamente, adsorvidos em hidróxido de alumínio ou fosfato de cálcio (3 casos), com um tempo médio de tratamento de 19 (6-57) meses. Seis destes doentes foram estudados antes do tratamento (avaliação basal) e após 12 (6-19) meses. Os doentes mantiveram a sua terapêutica habitual durante o período do estudo: todos utilizavam corticosteróides tópicos nasais, oito também corticos-

inhibition reactions<sup>10</sup>.

This study evaluates the T1 and T2 populations of atopic patients who have been undergoing immunotherapy for at least one year. We used flow cytometry to study the cytokines expression of the circulating lymphocytes with polyclonal stimulation, evaluating IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio and a predominantly suppressor cytokine: IL-10.

### Methods

#### Population

We studied ten atopic patients. Seven were sensitive to house dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and three sensitive to grass pollen. Their mean age was 27.5 (13-54) years; six were male. Five had bronchial asthma associated with rhinitis; three had allergic rhinitis and two had bronchial asthma. All the patients were receiving allergen vaccination with biologically standardised extracts, absorbed in aluminium hydroxide or calcium phosphate (3 cases). Mean length of treatment was 19 (6-57) months.

Six of these patients had been studied before treatment (basal evaluation) and after 12 (6-19) months. Patients continued with their usual treatment during the period of the study. All of them used topical nasal corticosteroids, eight also used inhaler corticosteroids (associated with inhalers bronchodilator in two patients) and oral anti-histamines when necessary in four patients.

The atopic control group consisted of 14 patients sensitive to house dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*), four of whom were also sensitive (to a lesser de-

---

**Procurámos avaliar as populações T1 e T2 de doentes atópicos submetidos à imunoterapia há pelo menos um ano**



teróides inalados, associados a broncodilatadores inalados em dois doentes e anti-histamínicos orais, quando necessário, em quatro doentes.

O grupo atópico era constituído por 14 indivíduos sensíveis a ácaros do pó da casa (*Dermatophagoides pteronyssinus*), sendo 4 também sensíveis (em menor grau) a pólenes de gramíneas. Apresentavam uma média de idades de 22,3 (13-58) anos, sendo 9 do sexo masculino e 5 feminino. Onze tinham asma brônquica e três rinite alérgica.

Cinco destes doentes estavam a fazer corticosteróides de inalação oral, oito corticosteróides de inalação nasal, dois broncodilatadores e três anti-histamínicos. Todos eram seguidos na consulta de Alergologia do Hospital Militar de Belém. O grupo não atópico era constituído por sete indivíduos, com idade média de 25,6 (20-38) anos, sendo cinco do sexo masculino e dois do sexo feminino. Foram recrutados no Hospital Militar de Belém com aceitação voluntária de participação no estudo e tendo como critérios de exclusão qualquer doença concomitante, local ou sistémica, que afectasse o sistema imunitário (neoplasia, doença auto-imune ou inflamatória crónica, insuficiência renal crónica, diabetes mellitus, atopia, imunodeficiência). A todos foram feitas provas de sensibilidade cutânea, doseamentos de IgE total e específica, avaliação da função renal, hepática e radiografia de tórax.

gree) to grass pollen. The mean age was 22.3 (13-58) years old. Nine subjects were male. Eleven had bronchial asthma and three allergic rhinitis.

Five of these patients were taking inhaled corticosteroids; eight nasally inhaled corticosteroids, two bronchodilators and three anti-histamines. All these patients were having Allergology consultations at Belém Military Hospital.

The non-atopic control group consisted of by seven individuals. Their mean age was 25.6 (20-38) years. Five were male and two female. They were recruited at Belém Military Hospital and voluntarily accepted to participate in the study. Exclusion criteria included any concomitant local or systemic disease that interfered with immune system (neoplasia, autoimmune disease or chronic inflammation, chronic renal insufficiency, diabetes mellitus, atopia, immunodeficiency). All underwent subcutaneous sensitivity tests, total and specific IgE measurements evaluation of renal and hepatic function and chest radiography.

#### Study of the cytokines expression in T lymphocytes

##### Stimulation

Equal parts of RPMI 1640 (GibcoBRL) enriched with L-glutamin 200mM (GibcoBRL) were added to total blood collected in heparin. This was stimulated with Brefeldin A (Sigma) in a concentration of 10µg/mL with PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Sigma) in a final concentration of 25 ng/mL and ionomycin (Sigma) in a concentration of 1µg/mL. A blood sample incubated with all

### Estudo da expressão de citocinas em linfócitos T

#### *Ativação*

Ao sangue total colhido em heparina juntou-se, em partes iguais, RPMI 1640 (GibcoBRL) enriquecido com L-glutamina 200mM (GibcoBRL). A activação fez-se em presença de brefeldina A (Sigma) na concentração de 10µg/mL com PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Sigma) na concentração final de 25 ng/mL e ionomicina (Sigma) na concentração de 1µg/mL. Utilizou-se como controlo negativo da activação uma amostra de sangue incubada com tudo o descrito anteriormente, excepto PMA e ionomicina. A activação fez-se durante 4 horas a 37°C em atmosfera húmida e com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Marcação de superfície*

Os linfócitos foram estudados usando como marcadores de superfície o anticorpo monoclonal CD3 marcado com o fluorocromo PC5 - ficoeritrina-cianina 5,1 (excitação a 486-580 nm e emissão a 660-680 nm), e o anticorpo monoclonal CD8 marcado com FITC - isotiocianato de fluoresceína (excitação a 486-580 nm e emissão a 504-541 nm), ambos da Immuno-tech (Izasa). As células foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente com 10µL de anticorpo monoclonal CD3 e 20µL de CD8.

#### *Fixação e permeabilização*

Efectuou-se a fixação e permeabilização dos linfócitos T de acordo com as instruções do produtor (Fix e Perm, Caltag Laboratories). Após a marcação de superfície, lavaram-se as células com um tampão

the abovementioned except PMA and ionomycin was used as a negative control stimulation. Stimulation was for 4 hours at 37°C in a humid atmosphere and with 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Surface markers*

The lymphocytes were studied using as surface markers the monoclonal antibody CD3 marked with the fluorochrome PC5 - phycoerythrin cyanin 5.1 (excitation at 486-580nm and emission at 660-680nm), and the monoclonal CD8 antibody marked with FITC - fluorescein isothiocyanate (excitation at 486-580nm and emission at 504-541nm), both from Immuno-tech (Izasa). The cells were incubated for 15 minutes at room temperature with 10µL of the monoclonal CD3 antibody and 20µL of CD8.

#### *Fixation and permeabilization*

The T lymphocytes underwent fixation and permeabilization in accordance with the manufacturer's instructions (Fix and Perm, Caltag Laboratories). After surface marking, the cells were washed with a phosphate-buffered-saline (PBS) for 5 minutes at 2,000 rpm. After fixation for 15 minutes at room temperature, the permeabilization and marking of the intracellular cytokines was carried out.

#### *Marking of the intra-cellular cytokines*

Human anti-cytokines monoclonal antibodies IFN-γ, IL-4, IL-5 and IL-10 (PharMingen), all conjugated with the fluorochrome PE - phycoerythrin (PE) (excitation at 486-575nm and emission at 568-590) were used. The intra-cytoplasmatic expression of CD69 PE (Becton



fosfato salino (PBS) durante 5 minutos a 2000 rpm. Após fixação durante 15 minutos à temperatura ambiente, fez-se a permeabilização e a marcação das citocinas intracelulares.

#### *Marcação de citocinas intracelulares*

Utilizaram-se anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 (PharMingen), todas conjugadas com o fluorocromo PE - ficoeritrina (excitação a 486-575 nm e emissão a 568-590). Para avaliação da activação *in vitro* estudou-se também a expressão intracitoplasmática de CD69 PE (Becton Dickinson). A quantidade de anticorpos usados foi de 3  $\mu$ L para as citocinas e 20  $\mu$ L para o CD69. O tempo de incubação foi de 15 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se lavagens para posterior análise.

#### *Análise por citometria de fluxo*

Para a análise por citometria de fluxo utilizou-se um citómetro de fluxo Epics®Elite equipado com um *laser* de 15 mW e com filtros apropriados para leitura de FITC (525nm), PE (575nm) e PC-5 (675nm). O número de células adquirido foi de 20 000 e a informação computadorizada foi guardada em *listmode* para mais tarde ser avaliada de acordo com o *software* de análise do próprio equipamento. Os resultados foram expressos em percentagem de células (linfócitos T totais ou CD4 ou CD8) que coraram de forma positiva para uma dada citocina. O *gate* de linfócitos foi feito a partir do CD3 PC-5. Os linfócitos T CD4+ foram identificados como CD3+CD8- devido à diminuição da expressão do CD4 nos linfócitos T na presença de esteres do *phorbol*<sup>22,23</sup>. Foram

Dickinson) was also studied for the evaluation of the *in vitro* stimulation. 3  $\mu$ L cytokine antibodies and 20  $\mu$ L at CD69 were used. Incubation time was 15 minutes at room temperature, followed by washes for posterior analysis.

#### *Analysis by flow cytometry*

An Epics®Elite Flux Cytometer equipped with a 15 mW laser and filters suitable for reading FITC (525nm), PE (575nm) and PC-5 (675nm) was used for the flow cytometry analysis. 20,000 cells were acquired and the computer information was stored in "listmode" to be evaluated later in accordance with the equipment's own software analysis. The results were expressed in % of cells (total T lymphocytes or CD4 or CD8) which colour in a positive way for a specific cytokine. The lymphocyte gate was determined by the CD3 PC-5. The CD4+ T lymphocytes were identified as CD3+CD8- due to the decrease in the expression of CD4 on the T lymphocytes in the presence of phorbol esters<sup>22,23</sup>. The non-stimulated lymphocytes were used as negative controls.

#### *Statistical study*

Statistical analysis were performed by using the Mann-Whitney U test (comparison of a variable between 2 groups) and the Wilcoxon-Signed Rank Test (comparison of a variable in the same group). The Spearman correlation test was used to study the correlations. Value of p less than 0.05 was considered significant. Results are expressed in median, maximum and minimum values.

utilizados como controlos negativos os linfócitos não estimulados.

#### *Estudo estatístico*

Após análise estatística descritiva e verificação da distribuição não normal dos dados, foram utilizados testes não paramétricos para avaliação dos resultados: *Mann-Whitney U test* (comparação de uma variável entre 2 grupos) e *Wilcoxon-Signed Rank Test* (comparação de uma variável no mesmo grupo). Para o estudo das correlações usou-se o teste de correlação de Spearman. O valor de p foi considerado significativo quando inferior a 0,05. Os resultados são expressos em medianas, valor máximo e mínimo.

### **Resultados**

#### **Expressão de interferon gama (IFN- $\gamma$ )**

A percentagem de linfócitos T CD3 produtores de IFN- $\gamma$  no grupo submetido a imunoterapia é discretamente mais baixa do que no grupo-controlo e também do que no grupo atópico, não havendo diferenças significativas entre os três grupos (Fig.1). O mesmo se verifica quando se faz a análise das subpopulações linfocitárias T CD4 e T CD8.

#### **Expressão de IL-4**

A expressão de IL-4 nos linfócitos T CD3 no grupo com imunoterapia foi muito semelhante ao do grupo-controlo, respectivamente 5,4 (2,9-15,6) e 5,1% (4,1-6,9), não diferindo estatisticamente ( $p=0,92$ ). No entanto, verifica-se uma expressão significativamente mais baixa quando se compara com o grupo atópico: 13,8% (3,1-31,8) (Fig. 2).

### **Results**

#### **Expression of interferon gama (IFN- $\gamma$ )**

The percentage of IFN $\gamma$  producer T CD3 lymphocytes in the immunotherapy group is slightly lower than in the control normal group and also lower than in the atopic group. There were no significant differences between the three groups (Fig. 1). The same was seen in analysing the CD4 and CD8 T lymphocyte subpopulations.

#### **Expression of IL-4**

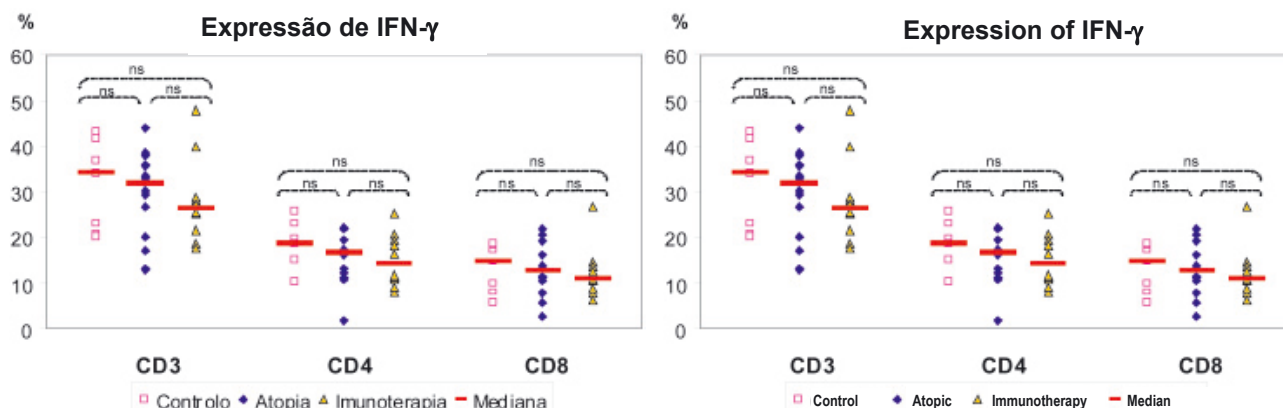
The expression of IL-4 by CD3 T lymphocytes was very similar to the control group, 5.4 (2.9-15.6) and 5.1% (4.1-6.9) respectively. There was no significant difference ( $p=0.92$ ). It was, however, markedly lower than in the atopic group: 13.8% (3.1-31.8) (Fig. 2).

In the CD4 lymphocyte, a significant decrease in production of IL-4 - 2.5% (1.7-7.8) was seen in the immunotherapy group as compared to the control group - 4.2% (3.1-5.6) - and the atopic group - 6.0% (2.0-9.1).

In the CD8 T lymphocyte the expression of IL-4 was 3.3% (6-7.8) only differed significantly in the control group - 1.3% (0.9-1.8). A great dispersion of results was seen in the atopic patients not undergoing immunotherapy : between 0.5 and 22.7% (Fig. 2).

#### **Expression of IL-5**

The expression of IL-5 by CD3 T lymphocytes of the atopic patients is significantly higher than in non-atopic control population: 6.7% (1.0-20.4) versus 1.0% (0.4-2.1) respectively,  $p=0.087$ . This ex-



Na subpopulação linfocitária T CD4 verificou-se, no grupo com imunoterapia, uma diminuição significativa da produção de IL-4 - 2,5% (1,7-7,8) – quer comparativamente ao grupo controlo - 4,2% (3,1-5,6) – quer com o grupo atópico - 6,0% (2,0-9,1). Já na subpopulação T CD8, a expressão de IL-4 foi de 3,3% (6-7,8), apenas diferindo significativamente do grupo-controlo - 1,3% (0,9-1,8) –, verificando-se nos doentes atópicos sem imunoterapia uma grande dispersão de resultados: entre 0,5 a 22,7% (Fig. 2).

#### Expressão de IL-5

Nos linfócitos T CD3 dos doentes atópicos, a expressão de IL-5 é significativamente mais elevada do que na população-controlo, não atópica: respectivamente 6,7% (1,0-20,4) *versus* 1,0% (0,4-2,1), p=0,087. Já no grupo submetido a imunoterapia verifica-se que essa expressão se reduz significativamente para 2,1% (0,6-4,8),

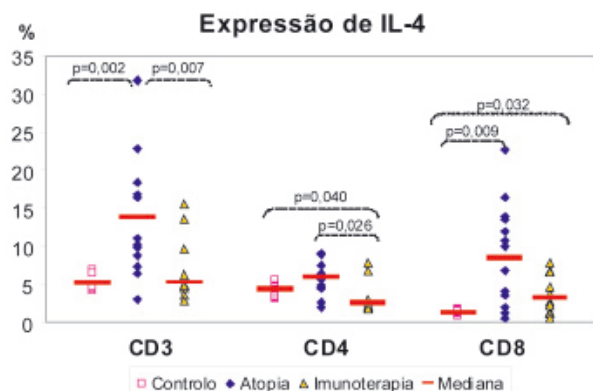
pression reduces significantly in the group undergoing immunotherapy to 2.1% (0.6-4.8), p=0.035, coming close to and not differing from the non-atopic control group (Fig. 3).

In the CD8 T lymphocytes, an expression of IL-5 close to that of the total (CD3) T population was detected, i.e. an increase in the expression of the atopic population (Fig. 3) decreasing in the patients undergoing immunotherapy, although this group continued above the values of the control group: 1.9 (0.5-4.5) *versus* 0.3% (0.1-1.3), p=0.011.

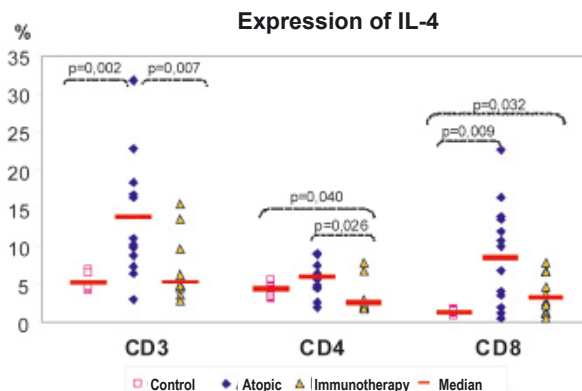
In the CD4 T lymphocyte the expression of IL-5 was very small in all the groups studied (Fig. 3), and a significant decrease was seen in the immunotherapy group when compared to the atopic group: 0.3 (0.1-1.0) *versus* 0.85% (0.3-1.9), p=0.001.

## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

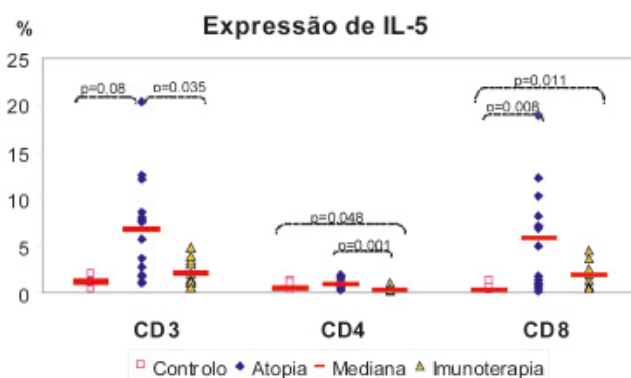
Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L Taborda-Barata



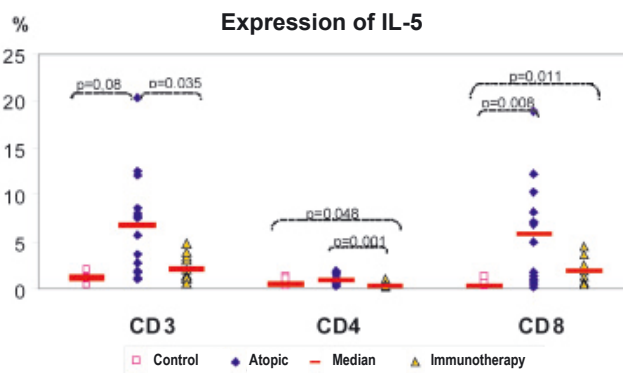
**Fig. 2** – Expressão de IL-4 nos linfócitos T circulantes. Os linfócitos T CD3 do grupo com imunoterapia apresentam, comparativamente aos atópicos, uma redução da expressão de IL-4, aproximando-se dos valores do grupo-controlo. Nos linfócitos T CD4, a expressão de IL-4 após a imunoterapia desce abaixo dos valores do grupo-controlo, enquanto os linfócitos T CD8 permanece com níveis que não diferem do grupo atópico.



**Fig. 2** – Expression of IL-4 in the circulating T lymphocytes. The CD3 T lymphocytes of the group undergoing immunotherapy show a reduction in the expression of IL-4 as compared to the atopic group, coming close to that of the control group. The expression of IL-4 in the CD4 T lymphocytes after immunotherapy decreases to below the values of the control group while the CD8 T lymphocytes remain at levels which are not different from the atopic group.



**Fig. 3** – Expressão de IL-5 em linfócitos T periféricos. A IL-5 expressa nos linfócitos T CD3 diminui significativamente no grupo a fazer imunoterapia comparativamente ao grupo dos atópicos e não diferindo do grupo-controlo. Apenas nos linfócitos T CD8 a expressão está aumentada em relação ao controlo em oposição aos linfócitos T CD4, cujo valor de IL-5 está abaixo do grupo-controlo.



**Fig. 3** – Expression of IL-5 in peripheral T lymphocytes. The IL-5 expressed in the T CD3 lymphocytes decreased significantly in the group undergoing immunotherapy as compared to the atopic group and did not differ from the control group. Only in the CD8 T lymphocytes is the expression increased in relation to the control group as opposed to the CD4 T lymphocytes whose IL-5 value is lower than the control group.

$p=0,035$ , aproximando-se e não diferindo do grupo-controlo, não atópico (Fig. 3). Na subpopulação de linfócitos T CD8 verificou-se uma expressão de IL-5

**Expression of T1 and T2 cytokines after beginning immunotherapy**  
It was possible to compare the expression of T1 and T2 cytokines in

próxima da população T total (CD3), i.e., o aumento da expressão na população atópica (Fig. 3) diminui nos doentes submetidos a imunoterapia, embora neste grupo se mantenha acima dos valores-controlo: 1,9 (0,5-4,5) *versus* 0,3% (0,1-1,3),  $p=0,011$ .

Na subpopulação de linfócitos T CD4 a expressão de IL-5 foi muito reduzida em qualquer dos grupos estudados (Fig. 3), verificando-se uma diminuição significativa no grupo com imunoterapia comparativamente ao grupo atópico: 0,3 (0,1-1,0) *versus* 0,85% (0,3-1,9),  $p=0,001$ .

#### Evolução da expressão de citocinas T1 e T2 após início da imunoterapia

Num grupo de seis doentes atópicos foi possível comparar a expressão de citocinas T1 e T2 de linfócitos circulantes em situação basal e após um período de 12 (6-19) meses de imunoterapia. Verificou-se uma redução significativa das citocinas T2 (IL-4 e IL-5) em qualquer das subpopulações linfocitárias estudadas sem variação significativa na expressão do IFN- $\gamma$  (Fig. 4)

#### Razão IFN- $\gamma$ /IL-4 e IL-10

A avaliação da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 nos linfócitos T circulantes revela uma diminuição na população atópica, comparativamente com os controlos, particularmente na subpopulação CD8. Já no grupo submetido a imunoterapia verificámos uma subida da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 que deixa de diferir significativamente do grupo-controlo (Fig. 5).

#### Expressão de IL-10

O estudo da expressão da IL-10 foi feito no grupo controlo e no grupo a fazer

circulating lymphocytes at basal situation and after 12 (6-19) months of immunotherapy. A significant reduction of the T2 (IL-4 and IL-5) cytokines in all the lymphocyte subpopulations studied was observed with no significant variation in IFN- $\gamma$  expression (Fig. 4).

#### IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio and IL-10

The evaluation of the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio in circulating T lymphocytes showed a decrease in the atopic population when compared to the control, particularly in the CD8 subpopulation. A rise in the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio was seen in the immunotherapy group that did not differ significantly from the control group (Fig. 5).

#### Expression of IL-10

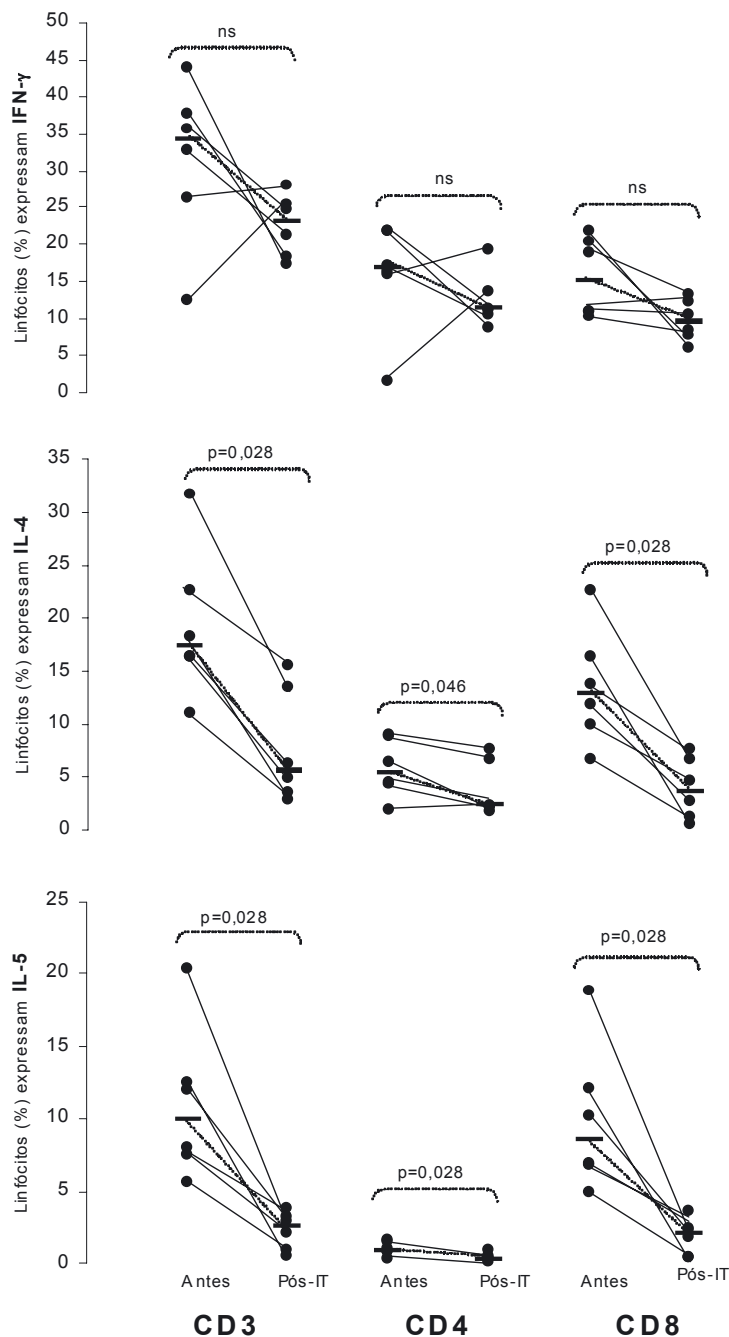
We studied IL-10 expression in the control and immunotherapy groups. There was a significant and higher expression of IL-10 CD3 T lymphocytes in the immunotherapy group: 1.9 (1-4.9) *versus* 1.4% (0.9-1.4),  $p=0.02$ . This difference was seen in CD8 subpopulation (Fig. 6) while in CD4 T lymphocytes the expression of IL-10 did not differ statistically in the two groups.

In the immunotherapy group the IL-10 expressed by CD3 T lymphocytes correlated significantly with the expression of IL-4 ( $r_s=0.72$ ,  $p=0.03$ ) and IL-5 ( $r_s=0.80$ ,  $p=0.01$ ) by CD3T lymphocytes. This correlation was even more significant in CD8T lymphocytes: IL-4 ( $r_s=0.88$ ;  $p=0.002$ ) and IL-5 ( $r_s=0.98$ ;  $p=0.001$ ). This was however not seen in the CD3 T lymphocytes of the non-atopic control group: IL-4 ( $r_s=-0.45$ ;  $p=0.30$ ) and IL-5 ( $r_s=0.03$ ;  $p=0.95$ ).



## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

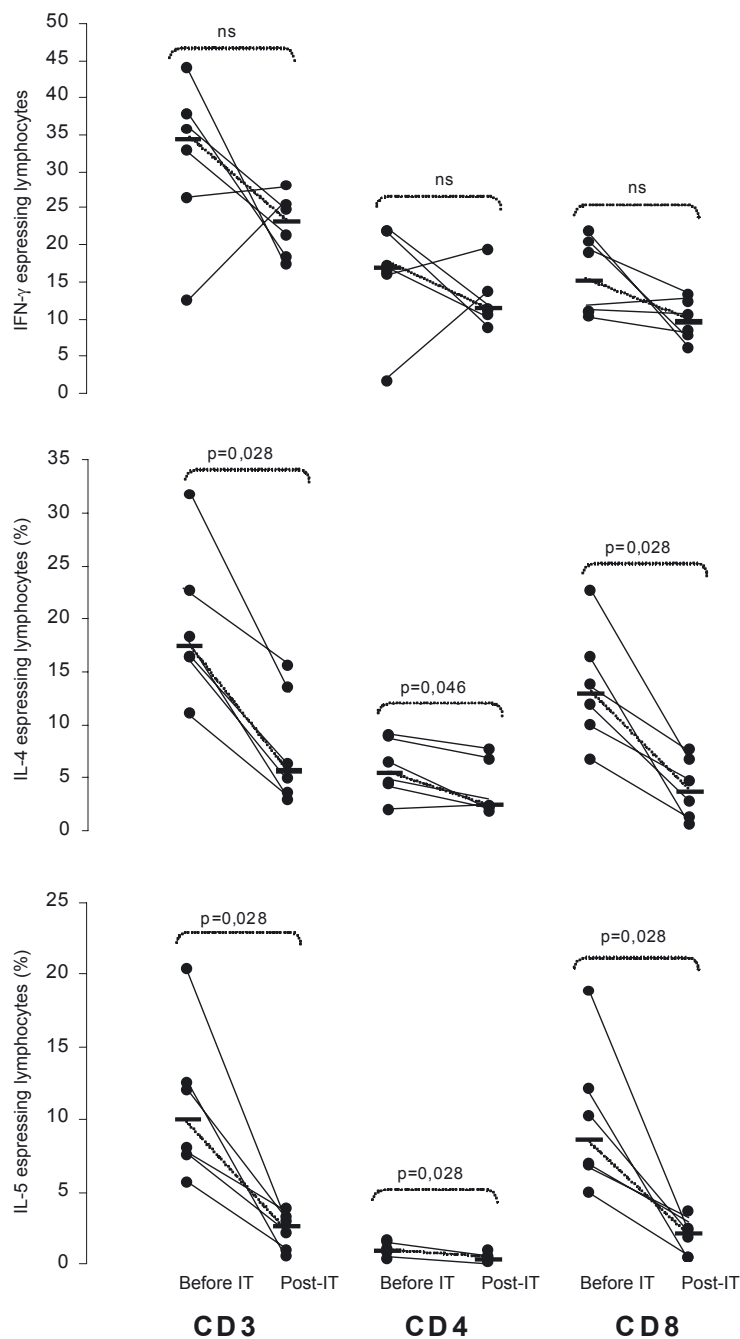
Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L Taborda-Barata



**Fig. 4** – Expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 nos linfócitos T circulantes de seis doentes atópicos estudados em situação basal (Antes) e após um ano de imunoterapia (Pós-IT). Em todas as populações de linfócitos, as citocinas IL-4 e IL-5, mas não IFN- $\gamma$ , baixam significativamente com o tratamento. ns=p $\geq$ 0,05.

# REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

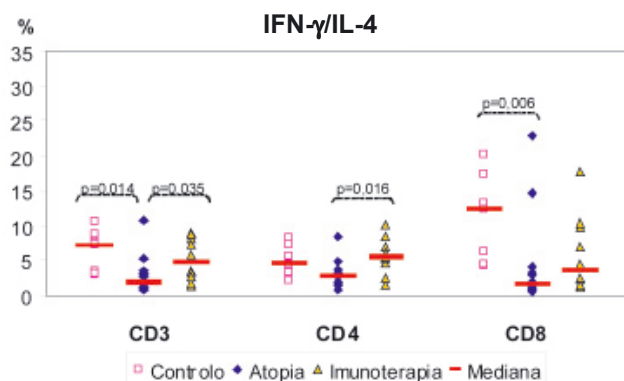
Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L Taborda-Barata



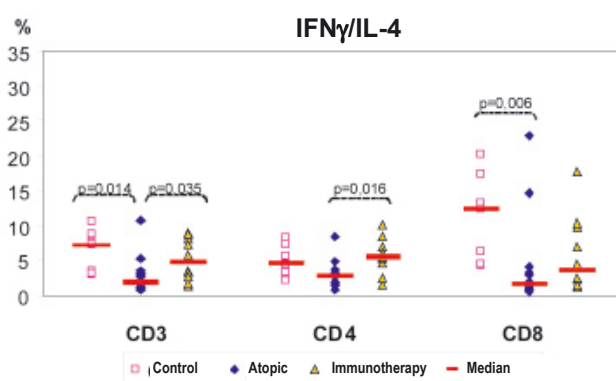
**Fig. 4** – Expression of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-5 in circulating T lymphocytes in the six atopic patients studied before (Before) and after one year of immunotherapy (Post-IT). The IL-4 and IL-5 cytokines but not IFN- $\gamma$  lowered significantly with treatment. ns= $p \geq 0.05$ .

## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L Taborda-Barata



**Fig. 5** – Expressão da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 em linfócitos T periféricos. No grupo submetido à imunoterapia, a razão aumenta comparativamente à atopia aproximando-se dos valores dos controlos não atópicos, dos quais não diferem significativamente.



**Fig. 5** – Expression of the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio in peripheral T lymphocytes. The ratio rose in the group undergoing immunotherapy compared to the atopic group, coming close to the values of the non-atopic control group, from which they did not differ significantly.

imunoterapia. Constatou-se uma expressão significativa e mais elevada nos linfócitos T CD3 na população a fazer a imunoterapia: 1,9 (1-4,9) *versus* 1,4% (0,9-1,4),  $p=0,02$ . Esta diferença verificou-se na subpopulação CD8 (Fig. 6) enquanto nos linfócitos T CD4 a expressão de IL-10 nos dois grupos estudados não diferiu estatisticamente.

No grupo de doentes atópicos com imunoterapia, a IL-10 expressa nos linfócitos T CD3 correlacionou-se de forma significativa com a expressão de IL-4 ( $r_s=0,72$ ,  $p=0,03$ ) e de IL-5 ( $r_s=0,80$ ,  $p=0,01$ ) nos linfócitos T CD3. Esta correlação foi ainda mais significativa nos linfócitos T CD8: IL-4 ( $r_s=0,88$ ;  $p=0,002$ ) e IL-5 ( $r_s=0,98$ ;  $p=0,001$ ). O mesmo não se verificou nos linfócitos T CD3 do grupo-controlo não atópico: IL-4 ( $r_s=-0,45$ ;  $p=0,30$ ) e IL-5 ( $r_s=0,03$ ;  $p=0,95$ ).

### Discussão

Neste estudo, em que avaliámos citocinas T1 e T2 em linfócitos circulantes de

### Discussion

This study evaluated the cytokines T1 and T2 in circulating lymphocytes of atopic patients one year after specific immunotherapy. In the study we saw significant modifications in this expression when compared to healthy controls and atopic patients not undergoing immunotherapy. Thus, in contrast with the IFN- $\gamma$  which did not differ significantly, the expression of IL-4 and IL-5 in the T cells (typically increased in atopic patients) is significantly lower in the group undergoing immunotherapy. This reduction of IL-4 was seen in a more expressive way in the CD4+ (Th2) subpopulation, where the typical increase seen in the atopic patients became lower than the control group (Fig. 2).

In the same way, the analysis of the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio of immunotherapy group come close to the profile characteristic of the control group. It did not differ significantly from these and was in clear contrast to the atopic patients not undergoing immunotherapy (Fig. 5).

***Em contraste com o IFN- $\gamma$  que não varia significativamente, a expressão de IL-4 e IL-5 nas células T (...) é significativamente mais baixa no grupo que realizou imunoterapia***

doentes atópicos um ano após imunoterapia específica, verificámos modificações significativas dessa expressão, quando comparada com a de controlos saudáveis e doentes atópicos sem imunoterapia.

Assim, em contraste com o IFN- $\gamma$  que não varia significativamente, a expressão de IL-4 e IL-5 nas células T (caracteristicamente aumentada nos doentes atópicos) é significativamente mais baixa no grupo que realizou imunoterapia. Esta redução de IL-4 verifica-se de forma mais expressiva na subpopulação CD4+ (Th2), onde o aumento característico observado nos doentes atópicos passa a níveis inferiores ao do grupo-controlo (Fig. 2).

Do mesmo modo, a análise pela razão IFN- $\gamma$ /IL-4 nos doentes atópicos submetidos a imunoterapia mostra uma aproximação ao perfil característico do grupo-controlo, não diferindo significativamente destes, e em claro contraste com os atópicos não tratados (Fig. 5).

Finalmente, verificámos também que a IT aumenta a expressão de IL-10 nas células T circulantes, comparativamente a controlos não atópicos, variação essa que apenas se observou na subpopulação CD8 (Fig. 6).

O estudo da expressão das citocinas intracelulares de linfócitos de sangue periférico por citometria de fluxo, após um estímulo inespecífico, tem demonstrado ser um método bastante rápido e sensível, permitindo a avaliação dos níveis de citocinas produzidas e acumuladas, ao mesmo tempo que se identifica o fenótipo das células que as expressam. Este método tem sido utilizado por vários autores na investigação da imunoterapia por alérgenos<sup>20,24</sup> e, nalguns deles, é demonstrado

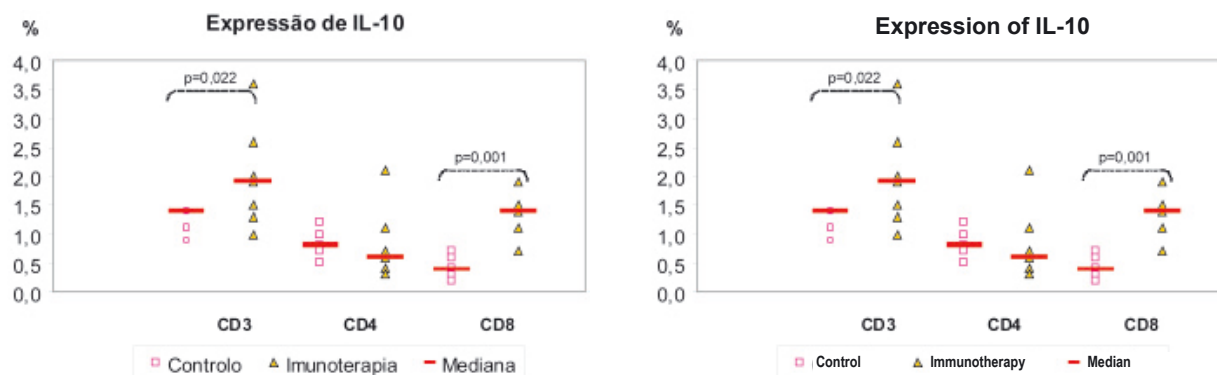
Finally, we also saw that immunotherapy increases IL-10 expression by circulating T cells when compared to the non-atopic control subjects. This variation was only seen in the CD8 subpopulation (Fig. 6). Using flow cytometry to study the expression of intra-cellular cytokines of peripheral blood lymphocytes following an unspecific stimulation proved to be a relatively quick and sensitive method. It allowed the measurement of cytokines produced and accumulated and at the same time identified the cells phenotypes that expressed them. Some authors have used this method in researching allergen immunotherapy<sup>20,24</sup> and some of them have shown that the use of mitogens to activate the expression of cytokines in peripheral lymphocytes is extremely similar to stimulation performed with a specific allergen<sup>15,24,25</sup>. In addition to this, some authors claim that polyclonal stimulation allows anergic cells to be studied as these stop responding to the allergen<sup>11</sup>.

We have some reservations over the interpretation of our results because of the design of the study. The decision to start immunotherapy, the type of extract used and the time of analytical evaluation depended exclusively on the clinical criteria of the patients own doctors. The lack of a placebo group also limited the results interpretation.

The reduction of T2 cytokines expression seen in our atopic patients after one year of immunotherapy cancelled out the characteristic increase seen in the atopic disease<sup>26,27</sup>, bringing the expression level close to the non-atopic control subjects. Many studies have reported a decrease in IL-4 and IL-5 levels after treatment with

## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L Taborda-Barata



**Fig. 6** – Expressão de IL-10 nos linfócitos T periféricos. O grupo com imunoterapia teve uma expressão mais elevada de IL-10 nos linfócitos T CD3, particularmente à custa dos CD8+, comparativamente com os controlos.

**Fig. 6** – Expression of IL-10 in the peripheral T lymphocytes. The immunotherapy group had a higher expression of IL-10 in the CD3 T lymphocytes, particularly in CD8+, when compared with controls.

que a utilização de mitógenos na activação da expressão de citocinas em linfócitos periféricos traduz de forma muito idêntica a estimulação feita por um alergénio específico<sup>15,24,25</sup>. Além disso, alguns autores defendem que a estimulação policlonal permitirá fazer o estudo de células anérgicas- uma vez que estas deixam de responder ao alergénio<sup>11</sup>.

A interpretação dos resultados que obtivemos coloca-nos certas reservas, por algum viés do desenho deste estudo. Assim, a decisão de iniciar a imunoterapia, o tipo de extracto utilizado e a cronologia da avaliação analítica foi exclusivamente dependente do critério clínico dos médicos que acompanhavam estes doentes. A inexistência de um grupo com placebo também limita a interpretação dos resultados.

A diminuição da expressão de citocinas T2 que verificámos nos nossos doentes atópicos após um ano de imunoterapia anulou o aumento caracteristicamente

allergenic vaccines<sup>15,18,19,20</sup>. All these studies were made on samples of peripheral blood using lymphocytes and mitogens as activators and specific allergens<sup>15,18,19</sup>, with house dust mites vaccines, (extracts of house dust mites absorbed to aluminium hydroxide<sup>20</sup>, standardised extracts of *Dermatophagoides farinae*<sup>18</sup>) of pollens<sup>15</sup>, (birch extracts) synthetic peptides<sup>19</sup> (of cat hair). They had a variable treatment time: one year<sup>20</sup>, 8 months<sup>18</sup>, 5 months<sup>15</sup> and 6 weeks<sup>19</sup>.

IFN- $\gamma$  expression did not vary significantly in T lymphocyte subpopulations after immunotherapy. Majori used a similar methodology to that used in our evaluate to study an atopic asthmatic group undergoing allergenic immunotherapy. After one year he also found no significant differences in the expression of IFN- $\gamma$  in CD4 and CD8 T lymphocytes<sup>20</sup>. Literature results are conflicting. In a study made on lymphocytes cultures of peripheral blood of patients with allergic rhini-



observado na doença atópica<sup>26,27</sup>, colocando o nível de expressão próximo dos controlos não atópicos.

São vários os estudos que invariavelmente têm apontado para uma diminuição dos níveis de IL-4 e IL-5 após o tratamento com vacinas de alergénios<sup>15,18,19,20</sup>. Todos estes estudos foram feitos em amostras de sangue periférico sendo utilizados como activador linfocitário mitogénios<sup>20</sup> e alergénios específicos<sup>15,18,19</sup>, com vacinas de ácaros, (extractos de ácaros adsorvidos em hidróxido de alumínio<sup>20</sup>, extractos standardizados de *Dermatophagoides farinae*<sup>18</sup>) de pólenes<sup>5</sup> (extractos de videiro), péptidos sintéticos<sup>19</sup> (de pêlo de gato) e com tempo variável de tratamento: um ano<sup>20</sup>, 8 meses<sup>18</sup>, 5 meses<sup>15</sup> e 6 semanas<sup>19</sup>.

Em relação ao IFN- $\gamma$ , a sua expressão não variou significativamente nas subpopulações de linfócitos T após a imunoterapia. Majori, utilizando uma metodologia semelhante à nossa, estudou um grupo atópico asmático a fazer imunoterapia alérgica e, ao fim de um ano, também não encontrou diferenças significativas na expressão de IFN- $\gamma$ , nos linfócitos T CD4 e CD8<sup>20</sup>. No entanto, os dados da literatura são muito variáveis. Num estudo feito em culturas de linfócitos de sangue periférico de doentes com rinite alérgica, em presença do alergénio específico (*Dermatophagoides farinae*), os valores de IFN- $\gamma$  foram mais baixos após o tratamento com imunoterapia<sup>18</sup>. Bellinghausen e colaboradores, usando técnicas diferentes (citometria de fluxo, ELISA e PCR) para fazer o doseamento do IFN- $\gamma$  após a administração da dose de manutenção da vacina alérgica (veneno de abelha), constatou nos mesmos doentes um aumento da pro-

tis, in the presence of a specific allergen (*Dermatophagoides farinae*) the IFN- $\gamma$  levels were lower after immunotherapy treatment<sup>18</sup>. Bellinghausen *et al* used different techniques (flow cytometry, ELISA and PCR) for the IFN- $\gamma$  measurement after administration of an allergenic vaccine (bee venom). This produced an increase production of this cytokine by T CD8 T lymphocytes in these patients<sup>24</sup>.

This different results led us to study the modifications of the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio as translators of the dynamic T1/T2 balance, as other authors have suggested<sup>20,26</sup>. Thus, examining the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio, we saw that after one year of treatment with specific immunotherapy, CD4 T cells increased to levels close to the control, significantly different from the atopic population levels. These data showed an alteration in the T1/T2 balance expressed by CD4 lymphocytes in favour of a major increase in the cytokine profile expression in detriment of Th2. The expression of IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio by CD8 T lymphocytes, revealed great levels that favour a major expression of Tc1 cytokines but did not differ significantly from the atopic group. However, and despite being levels produced after one year of treatment, these results could suggest a 'normalisation' of T1/T2 cytokines balance. Equally, Majori studied cytokines production in CD4 and CD8 T lymphocytes of peripheral blood at different time points (basal, 3 months after immunotherapy and at the end of one year) and the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio was always increased in CD4 T lymphocytes. In CD8 T lymphocytes, as in our study, no significant differences were found<sup>20</sup>. Benjaponpitak recently

dução desta citocina associada aos linfócitos T CD8<sup>24</sup>.

Esta variabilidade de resultados fez-nos estudar as modificações da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 como tradutoras da dinâmica do equilíbrio T1/T2, tal como foi sugerido por outros autores<sup>20,26</sup>. Assim, quando olhámos para a razão IFN- $\gamma$ /IL-4, constatámos que ao fim de um ano de tratamento com imunoterapia específica o valor nas células T CD4 aumentou para níveis próximos do controlo, distanciando-se significativamente do valor da população atópica. Estes dados mostraram uma alteração do equilíbrio T1/T2 expresso pelos linfócitos CD4 no sentido de uma maior expressão de citocinas de perfil Th1, em detrimento das Th2. A expressão da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 nos linfócitos T CD8, apesar de também ter revelado valores aumentados no sentido de uma maior expressão de citocinas Tc1, não se distanciou de forma significativa do grupo atópico. No entanto, e apesar de serem valores após um ano de tratamento, estes resultados poderão sugerir uma “normalização” do equilíbrio das citocinas T1/T2. Da mesma forma, Majori estudou a produção de citocinas em linfócitos T CD4 e CD8 de sangue periférico em vários tempos (basal, 3 meses após imunoterapia e ao fim de um ano), e o valor da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 foi sempre crescente nos linfócitos T CD4. Nos linfócitos T CD8, tal como no nosso estudo, não encontrou diferenças significativas<sup>20</sup>. Benjaponpitak investigou recentemente em seis doentes alérgicos a cinética da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 em células T CD4 periféricas durante o tratamento com diferentes vacinas de alérgenos (extractos aquosos de ácaros

studied the kinetic of IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio in peripheral CD4 T lymphocytes in six allergic patients during treatment with different allergen vaccines (aqueous extracts of house mite dust – *Dermatophagoides farinae* / *pteronyssinus* and aqueous extracts of pollen – *Lolium perenne*). He saw that in the initial phase and during the period of increasing allergen dose (6-10 months) there was a decrease in the value of the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio levels. This increased after a maintenance dose (10-53 months), with a significant increase when compared with the basal level, as our results showed<sup>28</sup>. Xi Yang contested that the ratio was a good parameter in evaluating the efficacy of immunotherapy<sup>13</sup>.

The mechanism by which immunotherapy modifies the production of cytokines is not known. It has been said that the allergen exposure method in addition to its properties may determine the cytokines T cells response. A greater concentration of allergen may alter the interaction between antigen presentation and T cells<sup>12</sup>. In immunotherapy, allergen doses are high and administered subcutaneously, making monocytes antigens presenting cells stand out over dendritic cells<sup>24</sup>. The change of cytokines T2 profile to T1 has been underlined, as has the inducing of the tolerance by specific allergen cells. Recent studies have demonstrated the presence of regulator IL-10 producers cells in peripheral blood of individuals who have acquired tolerance to a particular allergen<sup>11</sup>. Akdis investigated the response of T cells after immunotherapy to bee venom and stated that there was an increase in CD4 T cells expressing six times more IL-10 after 28 days

*Dermatophagoides farinae/pteronysinus* e extractos aquosos de poléns *Lolium perenne*) e verificou que na fase inicial e durante o período de dose crescente do alergénio (6-10 meses) houve uma diminuição do valor da razão IFN- $\gamma$ /IL-4, tornando-se crescente após a dose de manutenção (10-53 meses), com um aumento significativo quando comparado com o valor basal, tal como os nossos resultados<sup>28</sup>. Xi Yang aponta a razão como um bom parâmetro na avaliação da eficácia da imunoterapia<sup>13</sup>. O mecanismo pelo qual a imunoterapia modifica a produção de citocinas é desconhecido. Foi referido que a via de exposição ao alergénio, assim como as suas propriedades, podem determinar a resposta das células T à produção de citocinas. Uma maior concentração de alergénio poderá alterar a natureza da interacção entre as células apresentadoras de antígeno e as células T<sup>12</sup>. No caso da imunoterapia, as doses de alergénio são elevadas e administradas por via subcutânea fazem destacar o monócito como célula apresentadora de antígeno, ao invés das células dendríticas<sup>24</sup>. Aponta-se para uma modificação do perfil de citocinas T2 para T1, a par da indução de tolerância nas células específicas de alergénio. Neste sentido, estudos recentes têm revelado a presença de células reguladoras produtoras de IL-10 no sangue periférico, de indivíduos que adquirem tolerância a um alergénio particular<sup>11</sup>. Akdis investigou a resposta das células T após imunoterapia a veneno de abelha e constatou, após 28 dias de tratamento, um aumento de células T CD4 que expressavam seis vezes mais IL-10<sup>29</sup>. Verificou, *in vitro*, que a anergia das células T pela imunoterapia específica era revertida pela

of treatment<sup>29</sup>. It has been seen *in vitro* that anergy of the T cells to specific immunotherapy was reversed by the addition of anti IL-10 antibodies, suggesting that the presence of these cells in peripheral blood is connected to tolerance to the specific allergens. Another study characterised the immune deviation as a suppression of Th1 (IFN- $\gamma$ ) and Th2 (IL-4 and IL-5) cytokines cells producers and an increase in IL-10 and TGF- $\beta$  T cells producers namely the regulator/suppressor T cells<sup>21</sup>. Recent evidence indicates that *in vitro* and *in vivo* regulator T cells suppress the effector T cells simultaneously with the antigen presenting cells<sup>30</sup>. In our study, the expression of IL-10 after one year of immunotherapy treatment was significantly higher than in the CD3 T lymphocytes as compared to the non-atopic group. This difference was attributed to CD8 T lymphocytes (Fig. 6). Curiously, the IL-10 expressed in the CD3 T lymphocytes showed a positive correlation with the expression of all the profile T2 cytokines in the CD3+, and the correlation was even tighter in the CD8 T lymphocyte subpopulation. From this data it emerged that at the end of one year of immunotherapy, the IL-10 producer cells may be associated with regulator profile Tc2 phenotype. Tanchot *et al* studied the induction of tolerant cells to high concentrations of specific antigens (in an animal model and using clones of CD8 T cells) and showed the appearance of a great production of IL-10, specifically associated with cells that became tolerant<sup>31</sup>. In another more recent study it was shown that IL-10 produced by CD8 T cells represented the inhibitory soluble factor, ca-

adição de anticorpos anti IL-10 sugerindo que a presença destas células no sangue periférico estaria relacionada com a tolerância aos alérgenos específicos. Outro estudo caracteriza o desvio imune como a supressão da proliferação das células T produtoras de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4 e IL-5) e aumento das células T produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ , designadas células T reguladoras/supressoras<sup>21</sup>. Evidências recentes indicam que *in vitro* e *in vivo* as células T reguladoras suprimem as células T efectoras em conjugação simultânea com as células apresentadoras de antígeno<sup>30</sup>. No nosso estudo, a expressão de IL-10 ao fim de um ano de tratamento com imunoterapia foi significativamente superior nos linfócitos T CD3, comparativamente com o grupo não atópico, sendo esta diferença atribuída aos linfócitos T CD8 (Fig. 6). Curiosamente, a IL-10 expressa nos linfócitos T CD3 correlacionou-se positivamente e de forma significativa com a expressão de todas as citocinas de perfil T2 nas CD3+, melhorando esta correlação na subpopulação de linfócitos T CD8. Estes dados sugerem que ao fim de um ano de imunoterapia as células produtoras de IL-10 poderão estar associadas a um fenótipo regulador de perfil Tc2. Tanchot e colaboradores estudaram a indução de células tolerantes a elevadas concentrações de antígenos específicos (num modelo animal e a partir de clones de células T CD8) e evidenciaram o aparecimento uma grande produção de IL-10, especificamente associado às células que se tornaram tolerantes<sup>31</sup>. Num outro estudo mais recente, foi demonstrado que a IL-10 produzida pelas células T CD8 representava o factor inibitório solúvel capaz de

pable of changing the proliferative and cytotoxic capacity of these cells, transforming them into regulator or immunosuppressor cells. In the study there was in addition a functional similarity of the IL-10 CD8 T cells producers to CD4 T cells, also producers of IL-10<sup>32</sup>.

On the other hand, there is evidence that *in vivo* immunotherapy not only decreases the reactivity to the allergen itself but also prevents 'new sensitivities' to other allergens not included in the vaccine<sup>33</sup>. This data suggests that immunotherapy induces regulatory mechanisms not limited to the allergen involved. This could in part depend on IL-10. This cytokine has immunoregulatory characteristics and is known to be able to suppress the response presenting T cells antigens through inhibiting the co-stimulatory signals<sup>34</sup> and suppressing the proliferation of T cells by inhibiting the production of IL-2 and the expression of its receptor<sup>35</sup>.

In conclusion, one year of immunotherapy with allergens induced significant modifications in the cytokines profile of peripheral T lymphocytes of atopic patients. These changes are characterised by a decrease in IL-4 and IL-5 expression and a greater relative proportion of T1 cytokines profile (an increase in the IFN- $\gamma$ /IL-4 ration). We also saw an increase in IL-10 regulator cytokine expression, which is associated with a Tc2 phenotype. Further studies should be carried out to better define these regulatory mechanisms in allergen immunotherapy in well selected patient groups.



alterar a capacidade proliferativa e citolítica destas células, transformando-as em células reguladoras ou imunossupressoras. Este estudo sugere ainda uma semelhança funcional das células T CD8 produtoras de IL-10 com as células T CD4, também produtoras de IL-10<sup>32</sup>.

Por outro lado, há evidência de que a imunoterapia *in vivo* não só diminui a reactividade ao próprio alérgeno, como previne “novas sensibilizações” a outros alérgenos não incluídos na vacina<sup>33</sup>. Estes dados sugerem que a imunoterapia induz mecanismos reguladores que não estão apenas limitados ao alérgeno envolvido, o que poderá em parte depender da IL-10. Esta citocina com características imunorreguladoras sabe-se que tem a capacidade de suprimir a resposta das células T às células apresentadoras de antígenos através da inibição dos sinais co-estimulatórios<sup>34</sup> e da supressão da proliferação das células T por inibição da produção de IL-2 e da expressão do seu receptor<sup>35</sup>.

Em conclusão, a imunoterapia com alérgenos induziu ao fim de um ano modificações significativas no perfil de citocinas dos linfócitos T periféricos de doentes atópicos. Estas alterações caracterizaram-se por uma diminuição da expressão de IL-4 e IL-5 e uma maior proporção relativa de citocinas de perfil T1 (aumento do rácio IFN- $\gamma$ /IL-4). Simultaneamente, evidenciámos um aumento da expressão da citocina reguladora IL-10, que verificámos associar-se a um fenótipo Tc2. Novos estudos deverão ser perspectivados no sentido de melhor caracterizar estes mecanismos reguladores na imunoterapia com alérgenos em grupos de doentes criteriosamente seleccionados.

## Bibliografia/Bibliography

1. Lemanske R, Busse W. Asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 5502-19.
2. Becky-kelly E, Busse W, Jarjour N. A comparison of the airway response to segmental antigen bronchoprovocation in atopic asthma and allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 79-86.
3. Shi HZ, Deng JM, Xu H et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1818-1821.
4. Menzies-Gow A, Flood-Page P, Schmi K et al. Anti IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 714-9.
5. Krug N, Madden J, Redington A E et al. T - cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:319-326.
6. Albas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996; 383 (6603): 787-93.
7. Maggi EP, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piacini M, Rugin FS, De Carli M, Rcci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN- $\gamma$  and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. J Immunol 1992; 148: 2142-2148.
8. Freeman J. Further observation on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. Lancet 1911; 2: 814.
9. Neerven RJJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch - Nielsen A, Arnved J, Ipsen H. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum IgE facilitated allergen presentation. J Immunol 1999; 163: 2944-2952.
10. Akdis C, Blaser K. IL-10 induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. FASEB J 1999; 13:603-609.
11. Levings M, Roncarolo MG. T- regulatory 1 cells: A novel subset of CD4+ T cells with immunoregulatory properties. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 5109-12.
12. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy 2000; 55: 522-530.
13. Yang X. Does allergen immunotherapy alter the



## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L Taborda-Barata

- natural course of allergic disorders? *Drugs* 2001; 61 (3):366-374.
14. Durham S, Till S. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:157-64.
15. Gabrielsson S, Soderlund A, Paulie S, Kraan TCM, Blomberg M, Rak S. Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen specific IL-4 and IL-13 producing cells during pollen season. *Allergy* 2001; 56: 293-300.
16. Jutel M, Pickler WJ, Skrbic D, Urmyler A, Dahindeu C and Meller U. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increased of IFN- $\gamma$  secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *The J of Immunol* 1995; 154: 4187-4194.
17. Durham SR, Ying S, Varney VA et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increase the number of cells expressing messenger RNA for IFN- $\gamma$ . *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1356-65.
18. Tanaka A, Ohashi Y, Kakinoki Y and Nakai. Immunotherapy suppresses both Th1 and Th2 responses by allergen stimulation, but suppression of the Th2 response is a more important mechanism related to the clinical efficacy of immunotherapy for perennial allergic rhinitis. *Scand J Immunol* 1998; 48: 201-211.
19. Pene J, Desroches A, Paradis L et al. Immunotherapy with Fel d1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells of patients allergic to cats. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 571-8.
20. Majori M, Caminati A, Corradi M, Briante E, Scarpa S, Pesci A. T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:341-47.
21. Jutel M, Akdis M, Budak F, Casaulta C, Wrzyszc M, Bkaser K, Akdis C. IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1205-1214.
22. Pieker LJ, Singh MK, Zdravski Z et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory effector T cells by flow cytometry. *Blood* 1995; 86:1408-1419.
23. Pala P, Hussell T, Openshaw P. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000; 243:107-124.
24. Bellinhausen J, Metz G, Enk A, Christmann S, Krop J, Salog J. Insect venom immunotherapy induces interleukin - 10 production and Th2 to Th1 shift and changes surface marker expression in venom - allergic subjects. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1131-1139.
25. O'Brien RM, Xu H, Rolland JM, Byron KA, Thomas WR. Allergen-specific production of interferon- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells and CD8+ T cells in allergic disease and following immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 333-340.
26. Rebordão MM, Silva M, Remédios A, Alvares E, Pinto H, Alfarroba E. Estudo de citocinas de Linfócitos T e de Imunoglobulinas E e G em doentes atópicos candidatos a imunoterapia. *Rev Port Imunoalergologia* 2003; XI (4):370-379.
27. Rebordão MM, Delgado L, Pinto HP, Remédios A, Taborda-Barata L. Citocinas T1 e T2 na doença atópica: avaliação do contributo relativo de diferentes subpopulações celulares T periféricas. *Rev Port Imunoalergologia* 2005 (a aguardar publicação).
28. Benjaponpitak S, Oro A, Maguire P et al. The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(3Pt 1):468-75.
29. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.
30. Leon K, Pérez R, Lage A, Carneiro J. Modelling T-cell-mediated suppression dependent on interactions in multicellular conjugates. *J Theor Biol* 2000; 207:231-254.
31. Tanchot C, Guillaume S, Delon J, Bourgeois C, Franzke A, Sarukhan A, Trautmann A, Rocha B. Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity* 1998; 8:581-590.
32. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195(6):695-704.
33. Roches A, Paradis L, Menardo JL et al. Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract: VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(4):450-3.
34. Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'Garra

## REPERCUSSÃO DA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA NA POPULAÇÃO T1 E T2 DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EM DOENTES ATÓPICOS

Manuela Rebordão, Luís Delgado, Helena Pinto, Augusto Remédios, L. Taborda-Barata

- A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. of clonal anergy by endogenously produced IL-10.  
Annu Rev Immunol 2001; 19:683-765. International Immunol 1994; 6(10):1605-1612.
35. Becker JC, Czerny C, Brocker EV. Maintenance