

Caracterização imunofenotípica das subpopulações de linfócitos do lavado broncoalveolar de pacientes com silicose*

ÂNGELA FERREIRA¹, JOSE DA SILVA MOREIRA², REGINA CAETANO³, JOSÉ MANOEL GABETTO⁴, THEREZA QUIRICO-SANTOS⁵

A lavagem broncoalveolar é um procedimento simples e seguro, na avaliação das pneumopatias relacionadas à exposição a poeiras minerais. O objetivo do estudo foi caracterizar as subpopulações celulares no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes silicóticos. A lavagem broncoalveolar foi realizada em 26 trabalhadores com diferentes formas de silicose: forma simples (n = 12), complicada (n = 13) e um paciente com a forma aguda da doença. Como grupo controle, foram incluídos sete indivíduos saudáveis. Os pacientes com silicose apresentaram intensa pleocitose com predomínio de macrófagos alveolares e tendência à linfocitose. As subpopulações de linfócitos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) dos indivíduos saudáveis apresentaram fenótipo de células maduras. A grande maioria era constituída por células CD2⁺TCR $\alpha\beta$ (87,3%) e somente 2,9% das células T apresentaram marcação CD2⁺TCR $\gamma\delta$. A relação CD4/CD8 foi de 1,8, com poucas (16%) células T imaturas duplo-negativas CD4⁻CD8⁻. Em contraste, pacientes com silicose apresentaram redução acentuada das subpopulações dos linfócitos maduros CD2⁺CD4⁺, CD2⁺CD8⁺ e aumento marcante (47%) de células imaturas (DN) duplo-negativas (CD4⁻CD8⁻). Não foi observado aumento das células NK (CD56⁺). A análise do conteúdo protéico e a determinação da relação Ig/albumina permitiram caracterizar produção local de imunoglobulinas no microambiente pulmonar. Como não foi observado aumento percentual de plasmócitos e linfócitos B (CD19⁺) no LBA desses pacientes, é possível concluir que as células produtoras de imunoglobulinas estão possivelmente localizadas no interstício pulmonar. Estes resultados sugerem que, durante a evolução da silicose, ocorre o desenvolvimento de linfopose extratímica e surgimento de órgão linfóide terciário, no microambiente pulmonar desses pacientes. (*J Pneumol* 2000;26(3):107-112)

Phenotypic characterization of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage of patients with silicosis

Bronchoalveolar lavage is a safe and simple technique to evaluate lung disease related to exposure to mineral dusts. The aim of this study was to characterize the lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage of patients with silicosis. Bronchoalveolar lavage was carried out in 26 workers with different forms of silicosis: simple form (n = 12), complicated (n = 13) and 1 patient with acute form of the disease. As a control group, 7 healthy individuals were included. Compared to the control group, silicotic patients showed intense pleocytosis constituted mainly by alveolar macrophages with slight lymphocytosis. Lymphocyte subsets present in the bronchoalveolar fluid (BAL) of normal individuals were mature lymphocytes with phenotype CD2⁺TCR $\alpha\beta$ (87.3%) and only 2.9% were CD2⁺TCR $\gamma\delta$. CD4/CD8 ratio was 1.8 with few (16%) immature double negative T cells subsets (CD4⁻CD8⁻). In contrast, silicotic patients showed reduction of the more mature lymphocyte

* Departamentos de Medicina Clínica, Patologia, Radiologia e Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, e Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Suporte financeiro: CAPES.

1. Prof. Adjunto do Departamento de Medicina Clínica da UFF.
2. Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia da UFRGS.
3. Chefe do Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário Antônio Pedro.

4. Prof. Titular do Departamento de Radiologia da UFF.

5. Prof. Titular do Departamento de Biologia Celular e Molecular da UFF.

Endereço para correspondência – Ângela Santos Ferreira, Rua Marquês de Paraná, 303 – 7º andar – 24030-120 – Niterói, RJ. Fax (21) 719-0951; E-mail: nani@ax.ibase.org.br

Recebido para publicação em 22/7/99. Reapresentado em 26/10/99. Aprovado, após revisão, em 4/1/00.

subset CD2⁺CD4⁺, CD2⁺CD8⁺ and a great increase (47%) of immature (CD4⁺CD8⁻) T cell subsets. No increase in the NK (CD56⁺) cell population was observed. Biochemical analysis of protein contents and determination of the Ig/albumin ratio characterized local immunoglobulin production within the pulmonary microenvironment. Furthermore, lack of increase of plasma cells, as well as the maintenance of the percentage of B lymphocyte population (CD19⁺) in the BAL of silicotic patients, favors the hypothesis that the cells responsible for Ig production are possibly located in the interstitial space. Altogether the results suggest development of lymphopoiesis and tertiary lymphoid tissue within the pulmonary microenvironment during the clinical course of silicosis.

Descritores – lavagem broncoalveolar, subpopulações de linfócitos, silicose, imunofenotipagem

Key words – bronchoalveolar lavage, lymphocyte subsets, silicosis, immunophenotyping

Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho

LBA – lavado broncoalveolar

FCS – soro fetal bovino

PBS – tampão fosfato-salina

BALT – sistema linfóide associado ao brônquio

FITC – isotiacianato de fluoresceína

RD – rodamina

TCR – receptor de antígeno de linfócito T

INTRODUÇÃO

A silicose tem sido descrita como doença pulmonar ocupacional crônica causada pela exposição a partículas de sílica cristalina⁽¹⁾. Formas mais graves da doença, muitas vezes fatais, estão geralmente relacionadas a certos tipos de ocupação em que há elevada concentração de partículas de sílica livre no ambiente de trabalho⁽²⁾. Na orla da baía da Guanabara, no Estado do Rio de Janeiro, existem inúmeros estaleiros cujos jateadores de areia, encarregados da limpeza dos cascos de navios, estão expostos a altas concentrações de poeira mineral. Esses trabalhadores desenvolvem, na faixa etária de maior produtividade, formas graves da doença, que acabam incapacitando o indivíduo para atividades profissionais, vida familiar e social^(3,4). A presença de grupos de radicais reativos nos planos de clivagem na sílica recém-fraturada parece conferir maior toxicidade a esta. Isto, de certa forma, explicaria a alta patogenicidade da doença nos jateadores de areia⁽⁵⁾.

Ainda são obscuros os mecanismos celulares envolvidos no processo de inflamação e fibrogênese, no microambiente pulmonar. Estudos com lavado broncoalveolar (LBA) obtido de animais e pacientes com doença relacionada à exposição à sílica indicam que os macrófagos alveolares são importantes mediadores da fibrose, participando ativamente na fagocitose e, provavelmente, na liberação de fatores quimiotáticos para outras células. A interação entre as populações de linfócitos e macrófagos, via elaboração de mediadores (*e.g.*: citocinas, quimiocinas), expressão de integrinas e indução de adessinas, promove maior interação com células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, influenciando a patogênese da injúria e regeneração, em resposta à sílica⁽⁶⁾.

A presença de linfócitos circundando as lesões granulomatosas na silicose humana é conhecida há bastante tempo, mas não o fenótipo nem os mecanismos implicados no recrutamento das células envolvidas na patogênese da lesão. Estudos realizados por diferentes grupos, utilizando

modelo animal⁽⁷⁻⁹⁾ e indivíduos com silicose⁽¹⁰⁻¹²⁾, mostram resultados contraditórios, na caracterização imunofenotípica das células presentes no lavado broncoalveolar. Este trabalho teve por objetivo realizar a caracterização imunofenotípica das populações celulares presentes no lavado broncoalveolar de trabalhadores portadores de silicose com diversas formas clínicas da doença.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 26 trabalhadores portadores de silicose, em acompanhamento clínico mensal, no ambulatório de pneumopatias ocupacionais do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense (UFF). Todos os pacientes eram do sexo masculino, com média de idade de 44,3 anos (21-62 anos) e predomínio (65,4%) da cor branca. A maioria (76,9%) dos doentes silicóticos era de jateadores de areia e trabalhava num dos estaleiros situados na orla da baía da Guanabara. O tempo de exposição à poeira de sílica variou de 3 a 28 anos, com média de 16,2 anos. Doze pacientes (46,2%) desenvolveram a doença, em até 15 anos de exposição, sendo que o mais jovem (21 anos), com apenas três anos de exposição à poeira, desenvolveu a forma aguda e mais grave da doença. O diagnóstico de silicose foi baseado na história ocupacional de exposição à sílica e na radiografia de tórax, apresentando alterações compatíveis com a doença⁽¹³⁾. De acordo com as alterações radiológicas do tórax, os pacientes foram assim agrupados: *grupo 1* – pacientes com silicose simples, apresentando pequenas opacidades no parênquima pulmonar; *grupo 2* – pacientes com silicose complicada, caracterizada pela presença de grandes opacidades no parênquima pulmonar. Também foi incluído no estudo um paciente com silicose

aguda, com comprometimento alveolar consolidativo à radiografia de tórax.

Sete voluntários sadios do sexo masculino, moradores na região do Grande Rio, foram selecionados como grupo controle, segundo os critérios de Ettensohn *et al.*⁽¹⁴⁾, com média de idade de 32,4 anos (25 a 42 anos), sendo cinco indivíduos brancos e dois pretos.

Todos os indivíduos incluídos no estudo deram seu consentimento por escrito para participar no projeto aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário da UFF.

LAVAGEM BRONCOALVEOLAR

As broncofibroscopias foram sistematicamente realizadas pelo mesmo profissional. O broncofibroscópio (*Pentax BF 18X*, Japão) foi cuidadosamente introduzido pela cavidade oral e fixado no segmento ou subsegmento do lobo médio ou língula, nos casos de comprometimento difuso à radiografia de tórax ou na área em que a doença era mais proeminente. A lavagem foi realizada com a infusão de 100ml (cinco volumes de 20ml) de solução salina estéril através do canal do broncofibroscópio. O líquido de lavagem, cuidadosamente aspirado por sucção manual, foi coletado em tubos de polipropileno, acondicionados em banho de gelo.

PROCESSAMENTO DO LBA

Após medida do volume total do LBA, 20ml do líquido foram filtrados em gaze estéril e o restante processado para pesquisa de bacilos álcool-acidorresistentes, fungos, células neoplásicas e pesquisa de cristais de sílica. O filtrado, distribuído em tubos *Falcon* (Becton Dickinson Labware, Nova Jersey, EUA) de fundo cônico, foi centrifugado a 200xg, durante 10 minutos, em centrifuga refrigerada de bancada (*spin VI*, Incibrás, São Paulo, Brasil). O sobrenadante foi estocado a -80 C. O botão celular foi ressuspenso em PBS (tampão fosfato-salina), pH 7,2, contendo 2% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, Brasil), a celularidade total determinada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular verificada pelo teste de exclusão, com azul tripan. A concentração final foi ajustada para 2×10^6 células/ml e a contagem diferencial realizada em preparações de citocentrífuga (*Shandon Cytospin 2*, Japão) coradas pelo Wright-Giemsa. Foram contadas pelo menos 200 células, não sendo enumeradas células epiteliais e eritrócitos.

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Um milhão (10^6) de células do LBA em PBS-2% FCS foram incubadas por 45min a 4 C, com a concentração ótima do anticorpo monoclonal conjugado a diferentes fluorocromos (Coulter, Miami, EUA): T11-RD1 (rodamina)/B1-FITC (isotiacianato de fluoresceína): marcador das populações de linfócitos pan-T e linfócitos pan-B; T4-RD1/T8-FITC:

marcador das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ auxiliar/efetor e dos linfócitos CD8⁺ citotóxico/supressor; NK-1RD: marcador de células NK CD56⁺; TiGammaA.1-FITC: marcador da cadeia γ do TCR dos linfócitos T $\gamma\delta$.

Após incubação com o anticorpo, as células foram lavadas três vezes com PBS-2% FCS gelado e o botão ressuspenso em fixador PBS-formol contendo 0,05% de azida sódica. A análise da fluorescência, na superfície de pelo menos 10^4 células, foi determinada utilizando-se o programa LYSYS II versão 1.0 11/90, no citômetro de fluxo (*Scalibur*[®], Becton Dickinson, San Jose, EUA), com *laser* de argônio ajustado para 488nm, correspondendo à faixa de emissão de elétrons dos fluorocromos FITC e RD. As células mortas foram excluídas da análise, tendo como base o ajuste fino do feixe de luz.

ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO LBA

O sobrenadante foi filtrado em membranas MSI (*Ultrafuge filter*, Westboro, MA, EUA), em centrifuga refrigerada (*spin VI*, Incibrás, São Paulo, Brasil) a 400xg, durante 10 minutos, visando excluir proteínas de peso molecular menor que 10kDa. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry modificado⁽¹⁵⁾ e a albumina e imunoglobulinas IgG e IgA, por nefelometria (Behring Hoechst, Alemanha).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados expressos como média aritmética \pm desvio padrão (DP) foram analisados pelo teste *t* de Student; quando os dados apresentaram variância não homogênea, empregou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para verificar diferença entre os grupos. Os resultados foram considerados significantes para o nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A lavagem broncoalveolar foi realizada no segmento medial do lobo médio, em 25 pacientes que apresentavam lesão difusa à radiografia simples do tórax e nos sete controles. Apenas no paciente com silicose aguda, foi lavado o segmento anterior do lobo inferior direito do pulmão, por ser o local onde as lesões predominavam. A broncoscopia foi inteiramente normal nos pacientes e indivíduos controles, não havendo nenhuma intercorrência durante o exame. Somente dois pacientes apresentaram, após a broncoscopia, febre acima de 37,5 C, que cedeu com uso de antitérmicos.

Após infusão de 100ml de solução salina estéril, não se observou diferença estatística na média do volume de líquido recuperado entre grupo controle e pacientes silicóticos. A viabilidade das células do LBA estava dentro dos limites aceitáveis (86 a 100%) para estudos *in vitro* de funcionalidade celular. Os pacientes silicóticos apresenta-

ram, em relação ao grupo controle, um aumento significativo ($p < 0,05$) do número total de células no LBA (Tabela 1). Não foi observada diferença entre as médias apresentadas pelos pacientes com silicose simples e complicada. Também não se observou (Tabela 1) diferença significativa ($p > 0,05$) nos percentuais das células recuperadas, entre os indivíduos do grupo controle e silicóticos nem intergrupos (simples e complicada). O percentual de macrófagos no LBA do grupo controle foi superior, observando-se nos pacientes silicóticos uma tendência à linfocitose. O paciente com silicose aguda apresentou acentuada pleocitose (125×10^6) com 27% de linfócitos no LBA.

IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO LBA

Os indivíduos sadios apresentaram perfil de imunomarcção das células do LBA, semelhante ao descrito na literatura^(16,17). Na Tabela 2, são apresentados os valores percentuais obtidos na análise por citometria de fluxo das subpopulações de células não aderentes, presentes no LBA do grupo controle, dos pacientes com silicose simples, complicada e do paciente com silicose aguda. Os indivíduos sadios apresentaram relação CD4/CD8 de 1,8, mostrando haver no LBA um predomínio de células CD4⁺ (48,9%) com percentual menor de células CD8⁺ (34,1%) e raros linfócitos B (CD19⁺). O valor percentual médio das células NK

(CD56) com atividade citotóxica natural foi de 7,3%, enquanto 16% eram linfócitos imaturos (DN) duplo-negativos para CD4 e CD8. O painel de anticorpos monoclonais utilizados permite inferir que a população predominante de células não-aderentes no LBA de indivíduos sadios apresenta o fenótipo CD2 (87,3%), TCR $\alpha\beta$, já que poucas células (2,9%) apresentaram marcação com anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$. Em contraste, os pacientes silicóticos apresentaram redução significativa das subpopulações de linfócitos CD2 ($p < 0,01$), CD4⁺ ($p < 0,05$) e CD8⁺ ($p < 0,05$), porém um aumento significativo ($p < 0,01$) das células duplo-negativas CD4⁻CD8⁻. Não houve diferença significativa na imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos do LBA de pacientes com silicose simples e complicada. O paciente com silicose aguda apresentou um aumento acentuado de células imaturas duplo-negativas DN (CD4⁻CD8⁻), correspondendo à subpopulação predominante no LBA deste paciente.

Não foi observada diferença significativa em relação às populações de células NK e linfócitos TCR $\gamma\delta$, quando se comparou o grupo de silicóticos com o grupo controle.

ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTÉICO DO LBA

Não foi observada (Tabela 3) diferença significativa no conteúdo protéico e na concentração de albumina no LBA, entre os indivíduos do grupo controle e pacientes silicóticos nem intergrupos (simples e complicada). O paciente com silicose aguda apresentou aumento aproximadamente cinco vezes maior (510,0mg/L) que o grupo controle (110,0mg/L), na concentração de proteínas totais no LBA.

Os pacientes com silicose complicada apresentaram valores de albumina superiores àqueles com silicose simples, sugerindo lesão mais extensa da membrana alvéolo-capilar. Essas alterações foram ainda mais acentuadas no paciente com silicose aguda.

Na Tabela 4, são apresentados os resultados da determinação, por nefelometria, das imunoglobulinas IgG e IgA presentes no microambiente pulmonar de indivíduos sadios e pacientes com silicose simples, complicada e aguda. Os valores encontrados no grupo controle para IgG, IgA e os índices da relação IgG/albumina e IgA/albumina estão dentro da faixa da normalidade. Pacientes com silicose apresentaram, em relação ao grupo controle, au-

TABELA 1
Variáveis do lavado broncoalveolar de pacientes silicóticos

Variáveis	Controle* (n = 7)	Simples* (n = 12)	Complicada* (n = 13)	Aguda (n = 1)
Vrec (ml)	63,3 ± 8,4	59,5 ± 10,0	58,4 ± 10,3	39
Viab (%)	98,6 ± 1,5	93,4 ± 3,2	95,4 ± 3,4	97
Total cels x 10 ⁶	27,4 ± 17,5	61,7 ± 34,2	63,5 ± 41,9	125
Cels/ml x 10 ³	433,4 ± 244,1	1.019,2 ± 493,2	1.052,9 ± 660,6	3.270
Macrófagos %	91,1 ± 7,0	84,8 ± 11,4	85,7 ± 10,9	70
Linfócitos %	8,4 ± 6,6	11,2 ± 11,7	11,0 ± 4,1	27
Neutrófilos %	0,4 ± 0,7	1,7 ± 2,9	2,3 ± 5,1	3
Eosinófilos %	0	2,2 ± 4,9	0,2 ± 0,4	0

* Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão.
Vrec. = Volume recuperado. Viab. = Viabilidade.

TABELA 2
Caracterização imunofenotípica realizada por citometria de fluxo das populações celulares do LBA dos pacientes silicóticos

Subpopulações (%)	Controle* (n = 7)	Simples* (n = 12)	Complicada* (n = 13)	Aguda (n = 1)
T CD2	87,3 ± 6,3	47,2 ± 23,2	60,4 ± 26,4	10,1
B CD19	1,1 ± 0,6	0,9 ± 0,6	1,3 ± 1,6	0,1
CD4	48,9 ± 13,7	24,6 ± 13,7	36,9 ± 22,4	2,6
CD8	34,1 ± 12,1	19,7 ± 14,8	20,4 ± 11,9	6,3
DN CD4 ⁻ CD8 ⁻	16,0 ± 4,7	53,1 ± 23,3	41,2 ± 26,4	90,8
NK CD56	7,3 ± 2,2	9,9 ± 6,4	9,1 ± 7,4	ND
TCR $\gamma\delta$	2,9 ± 2,3	3,3 ± 4,5	2,3 ± 3,4	2,1

* Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão.

TABELA 3
Determinação do conteúdo protéico no LBA de pacientes com silicose

	Proteína total mg/L	Albumina mg/L
Controle*	110,0 ± 44	49,4 ± 19,0
Simples*	140,0 ± 60	51,05 ± 21,82
Complicada*	140,0 ± 50	60,07 ± 27,76
Aguda	510,0	81,93

* Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão.

TABELA 4
Determinação de IgG e IgA no LBA de pacientes com silicose

	Controle*	Simples*	Complicada*	Aguda
IgG (mg/L)	12,3 ± 8,1	23,5 ± 17,7	28,1 ± 11,5	274,0
IgA (mg/L)	5,9 ± 1,9	11,9 ± 6,4	10,4 ± 3,5	38,0
IgG/Albumina	0,25 ± 0,07	0,35 ± 0,1	0,56 ± 0,27	3,34
IgA/Albumina	0,13 ± 0,04	0,23 ± 0,08	0,20 ± 0,09	0,46

* Resultados expressos em média aritmética ± desvio padrão.

mento acentuado ($p < 0,01$) no conteúdo local de IgG e IgA, no LBA, não sendo, porém, observada diferença significativa entre os grupos de pacientes com silicose simples e complicada. O paciente com silicose aguda apresentou um aumento marcante de IgG (274,0mg/L) e IgA (38,0mg/L), no LBA, correspondendo, respectivamente, a vinte e duas e seis vezes o valor de referência do grupo controle.

DISCUSSÃO

A lavagem broncoalveolar recolhe amostra da superfície alveolar, possibilitando uma análise dinâmica do microambiente pulmonar. Em muitas doenças pulmonares, as alterações decorrentes do processo patológico não se refletem no sangue periférico.

A importância do LBA é inquestionável nos estudos de pesquisa clínica, sendo, no entanto, importante a padronização metodológica para obtenção de resultados consistentes e confiáveis. As principais controvérsias referem-se ao volume instilado, ao número de locais lavados, à utilização ou não da primeira amostra, à determinação da celularidade e à contagem diferencial das células no LBA⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Os relatos contraditórios referentes às alterações na celularidade do LBA em pacientes com silicose podem ser, em parte, atribuídos: i) à análise em diferentes estágios da doença; ii) ao pequeno número de pacientes avaliados; e iii) à falta de padronização das técnicas usadas no recolhimento e análise das amostras^(21,22).

Nas pessoas cronicamente expostas à sílica, o LBA é caracterizado pelo aumento de células inflamatórias eventualmente acompanhado de linfocitose⁽²³⁻²⁶⁾. Nos pacientes silicóticos incluídos no presente estudo, observou-se aumento significativo ($p < 0,01$) na celularidade total do LBA em relação ao grupo controle, com tendência à elevação do percentual de linfócitos, embora não tenha sido observada diferença na celularidade do LBA dos pacientes com silicose simples e complicada. Entretanto, o paciente com silicose aguda com extensa injúria pulmonar apresentava pleocitose com linfocitose de 27%. De modo semelhante, Bégin *et al.*⁽²⁷⁾, em estudo realizado com trabalhadores da indústria de granito, também não observaram diferença significativa na celularidade do LBA, quando com-

param grupos de pacientes com silicose simples e complicada.

Em indivíduos normais, as subpopulações celulares de linfócitos encontradas nas estruturas alveolares são semelhantes àquelas do sangue periférico^(16,17). A maioria dos linfócitos T recuperados no LBA ou de biópsias brônquicas expressa TCR $\alpha\beta$ ⁽²⁸⁾. No presente estudo, o percentual (2,86%) de células TCR $\gamma\delta$ encontradas no LBA dos indivíduos sadios está de acordo (1-5%) com o descrito na literatura^(29,30). Os pacientes silicóticos apresentaram valores semelhantes, sendo encontrado, independentemente do tipo de silicose, percentual médio 2,51% de linfócitos TCR $\gamma\delta$, no LBA. As células TCR $\gamma\delta$ parecem desempenhar, na mucosa, um papel importante na resposta imune contra patógenos microbianos intracelulares e na indução da tolerância a antígenos inalados e/ou ingeridos^(31,32).

A realização de dupla marcação permitiu evidenciar, no LBA do grupo controle e de pacientes com silicose, as populações de linfócitos T imaturos: duplo-positivas (CD4⁺CD8⁺) e duplo-negativas (CD4⁻CD8⁻). Os pacientes silicóticos apresentaram, em relação ao grupo controle de indivíduos sadios, uma redução significativa das subpopulações de linfócitos T maduros com fenótipo CD2⁺CD4⁺, CD2⁺CD8⁺ e aumento do percentual das células imaturas duplo-negativas CD4⁻CD8⁻. Estas alterações foram mais acentuadas no paciente com silicose aguda. Estes resultados sugerem que o microambiente pulmonar alterado pela doença seja um sítio de linfopoese extratímica, possivelmente com formação local de repertório de células T. Existem evidências de que, durante o processo inflamatório, a retenção de antígenos e a produção local de mediadores (*e.g.*: citocinas, quimiocinas) determinam a formação de tecido linfóide terciário^(33,34). Estudos posteriores em citometria de fluxo, utilizando tripla marcação, são fundamentais para caracterizar o estágio de diferenciação das subpopulações celulares presentes no LBA. A análise do repertório (TCR) dos linfócitos da periferia e do microambiente pulmonar poderá esclarecer se realmente o microambiente pulmonar dos pacientes com silicose é um sítio extratímico de geração de linfócitos.

O aumento acentuado de imunoglobulinas no lavado broncoalveolar dos pacientes com silicose, bem como seu aumento percentual em relação à albumina, indicam uma produção local de imunoglobulinas, no microambiente pulmonar. Como não foi observado aumento percentual de plasmócitos e linfócitos B (CD19⁺), no LBA desses pacientes, esses resultados sugerem que as células produtoras de imunoglobulinas estão localizadas no interstício pulmonar. Esta hipótese advém do fato da existência de centros germinativos no BALT (sistema linfóide associado ao brônquio), inclusive de humanos, após exposição das vias aéreas à estimulação antigênica⁽³⁵⁾. Os pacientes silicóticos com formas mais avançadas (complicadas) da doença apre-

sentaram, em relação ao grupo de pacientes com silicose simples, valores superiores de IgG, mas não de IgA. O aumento de albumina no LBA, neste grupo, sugere também haver comprometimento da membrana alvéolo-capilar, com a progressão da doença e passagem de proteínas através dessa barreira. De modo semelhante ao presente estudo, outros pesquisadores⁽³⁶⁾ também observaram haver aumento discreto na concentração de albumina, no LBA dos pacientes com silicose complicada. O paciente com silicose aguda apresentou valores acentuadamente mais elevados de albumina, IgG e IgA, indicativos de lesão mais extensa da membrana alvéolo-capilar.

A utilização de anticorpos monoclonais e imunofenotipagem, por meio de citometria de fluxo, permitiu mostrar a existência de alterações imunológicas no microambiente pulmonar, nas diferentes formas da silicose. Importante ressaltar que um aumento nas subpopulações de linfócitos T imaturos (CD4-CD8-) e da produção local de imunoglobulinas acompanhava a gravidade da doença. Estudos posteriores do LBA, mediante técnicas avançadas de biologia celular e molecular, deverão fornecer melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na injúria pulmonar, inflamação, reparo e fibrose, que ocorrem na silicose. A compreensão desses mecanismos permitirá vislumbrar novas perspectivas terapêuticas para esta doença que, ainda hoje, incapacita e ceifa tantas vidas, no auge da sua produtividade.

REFERÊNCIAS

1. Wagner GR. Asbestosis and silicosis. *Lancet* 1997;349:1311-1315.
2. American Thoracic Society. Adverse effects of crystalline silica exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:761-765.
3. Ferreira AS. Perfil da silicose dos jateadores de areia. *Pulmão RJ* 1991; 1:81-82.
4. Ferreira AS. Importância do lavado broncoalveolar no estudo do microambiente pulmonar na silicose, Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
5. Vallyathan V, Castranova V, Pack D, et al. Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1003-1009.
6. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;156:1666-1680.
7. Kumar RK. Quantitative immunohistologic assessment of lymphocyte populations in the pulmonary inflammatory response to intratracheal silica. *Am J Pathol* 1989;135:605-613.
8. Struhar D, Harbeck RJ, Mason RJ. Lymphocyte populations in lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid, and peripheral blood in rats at various times during the development of silicosis. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:28-32.
9. Absher MP, Trombley L, Hemenway DR, Mickey RM, Leslie KO. Biphasic cellular and tissue response of rat lungs after eight-day aerosol exposure to the silicon dioxide cristobalite. *Am J Pathol* 1989;134: 1243-1251.
10. Avolio G, Galiotti F, Giorgis GE, Oliaro A, et al. Dati sulle sottopopolazioni cellulari nel lavaggio broncoalveolare nei silicotici ed asbestosici. *Minerva Med* 1987;78:1457-1459.
11. Chabbou A, Hamzaoui A, Kamel A, et al. Etude des populations cellulaires du poumon profond et du sang circulant dans la silicose. *Tunis Med* 1987;65:161-167.
12. Costabel U, Teschler H. Inflammation and immune reactions in interstitial lung disease associated with inorganic dust exposure. *Eur Respir J* 1990;3:363-364.
13. International Labour Office. Guidelines for the use of ILO International classification of radiographs of pneumoconiosis, ed. rev. Geneva. ILO, 1980. [Occupational Safety and Health Series, 22].
14. Ettensohn DB, Jankowski MJ, Duncan PG, Lalor PA. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject: technical aspects and inter-subject variability. *Chest* 1988;94:275-280.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
16. Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989;2:561-585.
17. BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(Suppl 5):S169-202.
18. Gibson PG, Robinson BWS, McLennan G, Bryant DH, Breit SN. The role of bronchoalveolar lavage in the assessment of diffuse lung diseases. *Aust N Z J Med* 1989;19:281-291.
19. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:481-486.
20. Colt HG. Bronchoalveolar lavage. "How I do it". *J Bronchology* 1996; 2:154-156.
21. Sharma SL, Ponde JN, Verma, K. Bronchoalveolar lavage fluid. Analysis in silicosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 1988;30:257-261.
22. Garcia JGN, Stasek JE. Occupational lung disease. In: Baughman RP, ed. Bronchoalveolar lavage. St. Louis: Mosby Year Book Inc, 1992; 153-192.
23. Christman JW, Emerson RJ, Graham WGB, Davis GS. Mineral dust and cell recovery from the bronchoalveolar lavage of healthy Vermont granite workers. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:393-399.
24. Rom WN, Bitterman PB, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking subjects with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1429-434.
25. Kamel A, Hamzaoui A, Hamzaoui K, et al. Lavage alveolaire dans la silicose. *Tunis Med* 1989;67:311-314.
26. Christman JW, Emerson RJ, Hemenway DR, Graham WGB, Davis GS. Effects of work exposure, retirement, and smoking on bronchoalveolar lavage measurements of lung dust in Vermont granite workers. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1307-1313.
27. Bégin RO, Cantin AM, Boileau RD, Bisson GY. Spectrum of alveolitis in quartz-exposed human subjects. *Chest* 1987;6:1051-1067.
28. Spinazzi F, Bertotto A. Cellular mechanisms in the pathogenesis of bronchial asthma. *Immunol Today* 1995;16:407-408.
29. Saltini C, Richeldi L, Holroyd KJ, Dubois RM, Crystal RG. Lymphocytes. In: Crystal RG, West JB, eds. The lung. New York: Raven Press, 1991;459-482.
30. Blasi A, Olivieri D, Giacomelli PO. Pulmão como órgão de defesa. In: Tarantino AB, ed. Doenças pulmonares. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997;179-187.
31. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria and protozoa. *Immunologist* 1995;3:221-225.
32. Thomas WR, Cooper D, Holt PG. Immunity at body surfaces. *Immunologist* 1995;3:201-203.
33. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin in lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996;183:1461-1472.
34. Socco R, Cuff CA, Ruddle NH. Mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol* 1997;9:851-857.
35. Chvatchko Y, Kosco-Vilbois MH, Herren S, Lefort J, Bonnefoy JY. Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge. *J Exp Med* 1996; 184:2353-2360.
36. Scharfman A, Hayem A, Dauril M, Marko O, Hannotiaux MH, Lafitte JJ. Special neutrophil elastase inhibitory activity in BAL fluid from patients with silicosis and asbestosis. *Eur Respir J* 1989;2:751-757.