

## Neopterin e Pulmão Profundo: demonstração de síntese local

## Neopterin and "Deep-Lung": Demonstration of Local Synthesis

A. MOTA PINTO (1), M. A. SANTOS ROSA (2), C.P. LEITE E (3) A.J. A. ROBALO CORDEIRO (4).

CENTRO DE IMUNOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
CENTRO DE PNEUMOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA (CNC3-INIC).

### RESUMO

A Neopterin (NPT) integra-se na família das Pteridinas, e tem sido referida como um marcador da resposta imunitária celular. A NPT reflecte a activação dos macrófagos quando este é activado pelas células T, especialmente através do interferão gama.

O objectivo deste trabalho, foi evidenciar a síntese local de NPT pelos macrófagos do pulmão profundo, comparando os níveis desta molécula no Líquido de Lavagem Broncoalveolar (LLBA) e no soro, em várias patologias pulmonares.

Procedeu-se à avaliação dos níveis de NPT no LLBA e no soro de 68 doentes, e à avaliação matemática do Líquido de Revestimento Alveolar (LRA) de alguns casos seleccionados, usando a Ureia (Ur) para avaliar o factor de diluição introduzido pelo soro fisiológico do LLBA.

A determinação de NPT feita por um método radioimunológico («Henning RIACid») no soro e no LLBA, e a determinação da Ur por um espectrofotómetro «Baush & Lomb Spectronic 2000».

Verificou-se que os níveis de NPT eram superiores no LRA do que no LLBA e que a relação média da NPT do LRA com o soro era superior à unidade. Estes dados sugerem a síntese local de NPT no pulmão profundo.

Os autores concluem pelo interesse do doseamento desta molécula no LRA de patologia seleccionada em complemento de estudos no soro.

### SUMMARY

Neopterin (NPT) is a member of a group of compounds known as Pteridines and has been reported as a marker for activated cell-mediated immunity. NPT reflects activation of macrophages by T-cell specially when stimulated with gamma interferon.

The aim of this study was to demonstrate a local production of NPT by macrophages in deep lung comparing the values of this molecule in Bronchoalveolar Lavage Fluid (LLBA) and serum of some pulmonary pathologies.

NPT levels were measured in LLBA and in serum of 68 patients. Epithelial Lining Fluid (LRA) was calculated in some selected cases, using Urea (Ur) levels to evaluate the dilution factor introduced by lavage of saline solution.

NPT levels in BALF and serum were performed radioimmunoassay («Henning-RIACid») and Ur was assessed by a Spectrophotometer «Baush & Lomb Spectronic 2000».

NPT levels were higher in LRA than BALF, and LRA/Serum ratio was superior to 1. These data suggests that NPT may result from a local production mechanism.

The authors conclude for the interest of NPT measurements in LRA in the study of selected pulmonary pathologies.

(1) Assistente da Faculdade de Medicina de Coimbra (Imunologia)

(2) Professor Associado da Faculdade de Medicina de Coimbra (Imunologia)

(3) Assistente Graduado de Pneumologia dos HUC

(4) Director do Centro de Imunologia da FMC e do Serviço de Pneumologia dos HUC



INTRODUÇÃO

A Neopterina (NPT) integra-se na família das Pteridinas, subgrupo das Pterinas (Fig. 1), cujo estudo se iniciou ainda no século passado, embora a primeira definição estrutural de um dos seus elementos (a xantopterina) apenas tivesse lugar já em 1940 [4].

Metabolicamente, a NPT representa um produto intermediário da via biossintética da Biopterina (BH<sub>4</sub>), ocorrendo a sua síntese por um processo, aparentemente, não enzimático nos monócitos/macrófagos, que são, na espécie humana, as células produtoras de NPT, particularmente quando se encontram activadas pelo interferão gama, proveniente dos linfócitos T (Fig. 2) [2, 3].

É de realçar que, efectivamente, apenas os monócitos/macrófagos têm a possibilidade de produzir NPT, uma vez que os linfócitos possuem um conjunto enzimático diferente que impede a formação da NPT (Fig. 3).

O condicionamento enzimático do macrófago depende da falta de uma enzima da via do Trifosfato de Guanosina (TPG) - Biopterina, a sintetase de 6-piruviltetrahydropterina; esta falta, ou ausência de actividade da enzima deve-se, talvez, a mutações genéticas da célula [7].

A existência da sintetase de 6-piruviltetrahydropterina noutras células, nomeadamente nos linfócitos T,

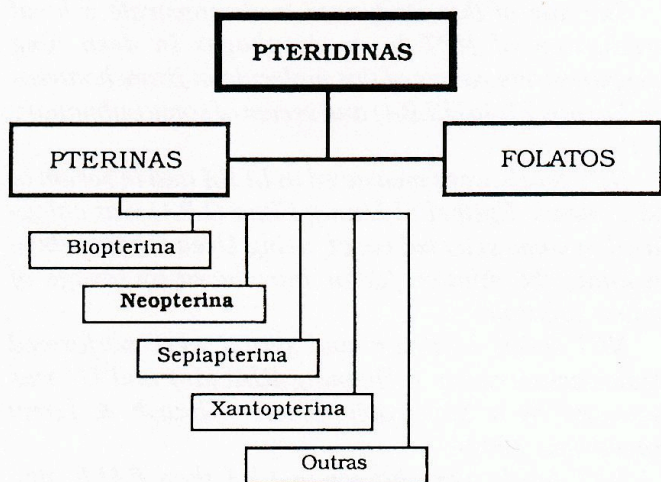


FIG. 1

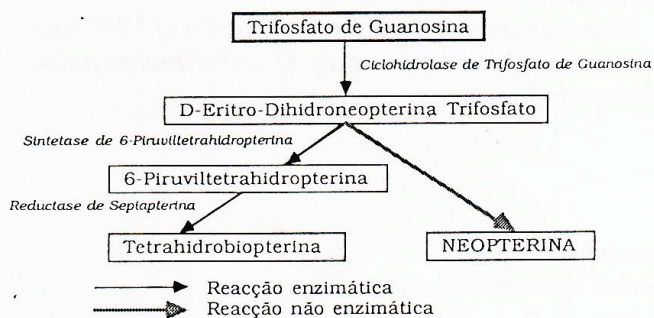


FIG. 2

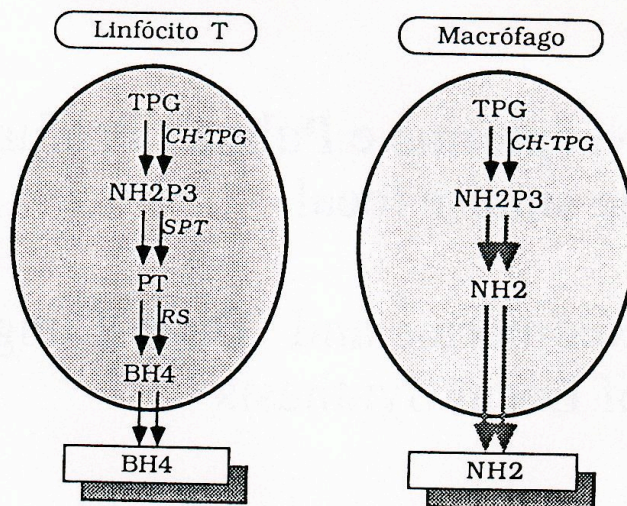


FIG. 3

permite a progressão da via de síntese da Biopterina (BH<sub>4</sub>), e a transformação de Trifosfato D-Eritro-Dihidroneopterina (NH<sub>2</sub>P<sub>3</sub>) em BH<sub>4</sub>. A BH<sub>4</sub> exerce um “feedback” negativo sobre a ciclohidrolase do trifosfato de guanosina, limitando a produção de biopterina nos linfócitos T [1].

Assim, é de esperar um aumento substancial da síntese de dihidroneopterina e de neopterina sempre que haja aumento da produção de NH<sub>2</sub>P<sub>3</sub> no macrófago, uma vez que não existe o factor inibitório exercido pela presença de BH<sub>4</sub>.

A comprovação de que são os macrófagos os produtores de NPT deve-se, essencialmente, a estudos feitos em culturas celulares [3, 7, 8]. Nestas experiências, em que vários tipos celulares foram estudados, nomeadamente linfócitos T e macrófagos, foram doseadas não só a neopterina, como também a biopterina, a enzima ciclohidrolase do trifosfato de guanosina e o trifosfato de guanosina; verificou-se que eram os macrófagos estimulados com sobrenadantes de culturas de linfócitos T activados os principais produtores de NPT, não se conseguindo dosear outro tipo de pterinas nos macrófagos. Nestes estudos verificou-se, ainda, que os linfócitos T produziam apenas BH<sub>4</sub>.

Desta forma, a NPT pode ser considerada como um marcador da activação do eixo linfócito T/macrófago e, portanto, da resposta imunitária celular (Fig. 4).

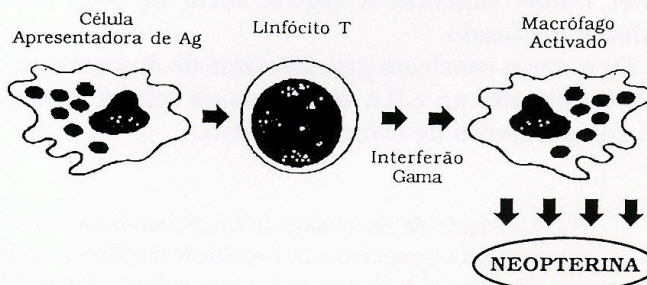


FIG. 4



## OBJECTIVOS

Nos estudos, anteriormente levados a cabo em portadores de sarcoidose pulmonar, pudemos verificar que a NPT constitui um bom marcador da actividade da doença, embora tivessem sido mais significativas as alterações da NPT encontradas no soro do que as encontradas no Líquido de Lavagem Broncoalveolar (LLBA) [5].

Sendo a sarcoidose uma doença com um componente alveolítico, onde predominam a linfocitose e a activação macrofágica, seria de esperar que a NPT pudesse mostrar alterações mais significativas no pulmão profundo (através da análise do LLBA), do que no soro. Este facto, em aparente contradição com as alterações da NPT verificadas no LLBA de sarcoidóticos, levou-nos a realizar um trabalho que permitisse evidenciar, ou não, a síntese local da NPT pelos macrófagos do pulmão profundo. Para tal compararam-se os níveis desta molécula no LLBA e no soro, em variadas patologias pulmonares.

No sentido de ultrapassar a dificuldade imposta pela diluição desconhecida do LLBA, procedeu-se à determinação matemática do Líquido de Revestimento Alveolar (LRA) de alguns casos seleccionados, usando a Ureia (Ur) como marcador da referida diluição.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo realizou-se num grupo de 68 indivíduos portadores de patologia pulmonar diversa, nomeadamente sarcoidose, pneumoconiose e tuberculose. Neste grupo, 23 doentes eram do sexo feminino e 45 do sexo masculino, e tinham uma idade média de  $43,6 \pm 15,9$  anos. Dos indivíduos dos quais se conseguiu apurar o hábito tabágico, apenas se encontraram 11 fumadores, sendo todos eles considerados fumadores moderados, com uma carga tabágica entre 2 e 3 maços-ano.

Para o doseamento de neopterina utilizou-se um "kit" comercial - "Henning RI Acid", baseado num processo radioimunológico. Esta metodologia foi aplicada tanto no soro, como no LLBA.

O doseamento da ureia fez-se num espectrofotómetro com fluxo contínuo "Baush e Lomb Spectronic 2000".

A determinação do líquido de revestimento alveolar foi feita por cálculos matemáticos através da seguinte fórmula:

$$\text{LRA (ml)} = \frac{[\text{mg}] \text{ no LLBA} \times \text{Vol LLBA (ml)}}{[\text{mg}] \text{ no soro}}$$

## RESULTADOS

A concentração da NPT encontrada nos 68 LLBAs estudados foi de  $1,19 \pm 3,65$  nmol/l, em contraste com os  $15,9 \pm 15,1$  nmol/l nos 45 soros analisados.

Desta forma, a relação das médias da concentração da NPT no LLBA e no soro era de 0,075, equivalente a uma enorme desproporção entre a quantidade de NPT do soro e do LLBA.

Quando se analisaram as relações individuais (caso a caso) da NPT do LLBA com a NPT do soro, obteve-se uma relação de  $0,112 \pm 0,288$ , traduzindo uma quantidade relativa de NPT do LLBA cerca de 9 vezes (em média) inferior à do soro. No entanto, a visualização gráfica destas relações caso a caso mostrava que, pelo menos em 2 indivíduos, ela ultrapassava o valor de 1, só explicável pela síntese local (pulmonar) da NPT (Fig. 5).

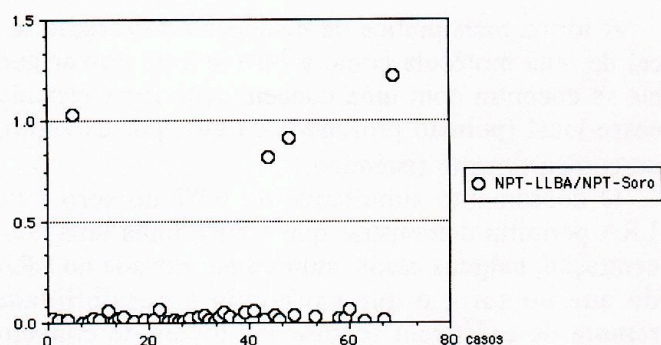


FIG. 5

Aliás, a variabilidade da concentração da NPT no LLBA era muito superior à do soro, conforme atestam os coeficientes de variação encontrados nos dois líquidos de 307% e 95%, respectivamente.

Esta variabilidade, já conhecida e discutida com profundidade [6] pensamos dever-se não só ao facto do macrófago alveolar ser mais solicitado a responder metabolicamente do que o monócito, mas também à influência do soro fisiológico utilizado para a Lavagem Broncoalveolar (LBA) na diluição do LRA.

Por isso, determinou-se o volume do LRA em 11 casos seleccionados dos anteriores, utilizando a Ur como marcador da diluição do LRA. Estes casos caracterizaram-se, em geral, por apresentarem uma relação baixa da NPT do LLBA em relação à do soro ( $0,019 \pm 0,013$ ) e, logo, serem supostamente casos em que não poderia pensar-se em haver uma produção local de NPT.

A idade média destes indivíduos seleccionados ( $40,2 \pm 15,0$  anos) não se afastava significativamente da do grupo em geral, nem o hábito tabágico era diferente.

Encontrou-se um volume médio do LRA de  $0,91 \pm 0,23$  ml sendo a concentração de NPT no LRA de  $15,03 \pm 10,07$  nmol/l, (a NPT no LLBA destes casos era de  $0,17 \pm 0,12$  nmol/l).



A relação média da NPT do LRA com a do soro era de  $1,68 \pm 1,42$ , claramente superior à unidade e, portanto, correspondendo a síntese local de NPT.

A inspeção gráfica desta relação mostrou que em um número elevado de casos a relação era superior à unidade (síntese indiscutível de NPT no pulmão profundo) (Fig. 6), e muito distante da relação encontrada nos mesmos casos para a NPT do LLBA e do soro, chegando mesmo a atingir valores superiores a 5 (Fig. 7).

A análise da correlação entre a NPT no LRA e as células do mesmo líquido (macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares neutrófilos) não apresentou qualquer valor significativo, corroborando a independência da NPT do número de células do LRA.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:

A forma mais prática de evidenciar a excreção local de uma molécula como a NPT é a de provar que ela se encontra com uma concentração mais elevada nesse local (pulmão profundo) do que, por exemplo, no compartimento sistémico.

O doseamento simultâneo da NPT no soro e no LRA permitiu demonstrar que a NPT tinha uma concentração, nalguns casos, muito mais elevada no LRA do que no soro, o que excluindo a possibilidade remota de existirem fenómenos locais de concentração molecular (por uma permeabilidade selectiva da barreira capiloalveolar, ou por mecanismos de sequestro bioquímico local) será uma prova definitiva da sua síntese e excreção locais.

Assim, a demonstração da produção significativa da NPT no pulmão profundo implica um interesse aumentado pelo doseamento desta molécula no LLBA, ou melhor no LRA de patologia pulmonar seleccionada, em complemento dos estudos no soro.

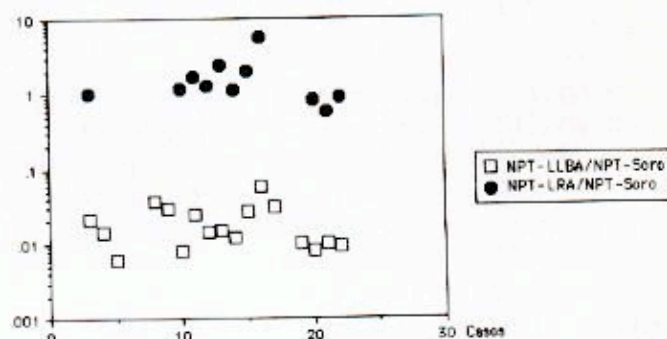


FIG. 6

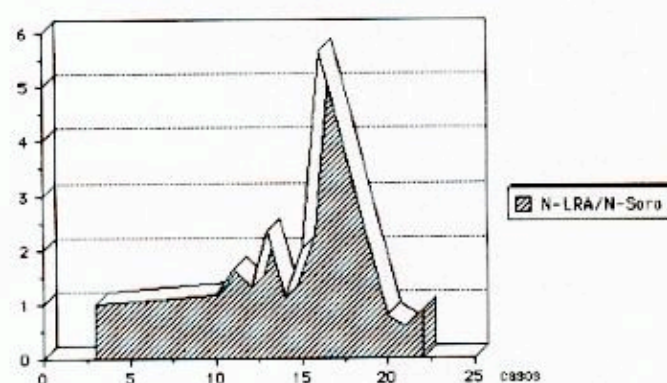


FIG. 7

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] DHONDT J.-L.; DARRAS A.; MULLIEZ P.; HAYTE J.-M.; CRINQUETTE J.: Unconjugated Pteridines in Bronchoalveolar Lavage as Indicators of Alveolar Macrophage Activation. CHEST: 95, 348-351, 1989.
- [2] FUCHS D.; HAUSEN A.; REIBGNEGGER G.; WERNER E.R.; DIERICH P.; WACHTER H.: Neopterin as a Marker for Activated Cell-Mediated Immunity: Application in HIV Infection. IMMUNOL TODAY: 9, 150-155, 1988.
- [3] HUBER CH.; BATCHELOR J.R.; FUCHS D.; HAUSEN A.: Immune Response-Associated Production of Neopterin. Release from Macrophages Primarily under Control of Interferon-g. J EXP MED: 160, 310-316, 1984.
- [4] HYLAND K.; HOWELLS D.W.: Analysis and Clinical Significance of Pterins. J CHROMATOGR: 429, 95-121, 1988.
- [5] MOTA PINTO A.; SANTOS ROSA M.A.; LEITE C.P.; ROBALO CORDEIRO A.J.A.: Estudos de Neopterin na Sarcoidose. VIA PNEUMOL: 2: 117-120, 1989.
- [6] SANTOS ROSA M. A.: Avaliação Analítica do Líquido de Revestimento Alveolar (Contribuição de um Estudo Imunoquímico): Prova Complementar de Doutorado Académico - Coimbra, 1989.
- [7] SCHOEDON G.; TROPPEMAYR J.; FONTANA A.; HUBER C.; CURTIUS H.-C.; NIEDERWIESER A.: Biosynthesis and Metabolism of Pterins in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Leukemia Lines of Man and Mouse. EUR J BIOCHEM: 166, 303-310, 1987.
- [8] VENET A.; HANCE A.J.; SALTINI C.; ROBINSON B. W. S.; CRYSTAL R.G.: Enhanced Alveolar Macrophage-Mediated Antigen-Induced T Lymphocyte Proliferation in Sarcoidosis. J CLIN INVEST: 75, 293-301, 1985.