



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

TRABALHO FINAL DO MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

VÁLTER ALEXANDRE MARTINS FERNANDES

Células Linfoides Inatas do Tipo 2 na Asma com Inflamação T-2

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE IMUNOLOGIA CLÍNICA

Trabalho realizado sob a orientação de:

Prof. Doutor CELSO PEREIRA
Dr^a EMÍLIA FARIA

Abril | 2021

Células Linfoides Inatas do Tipo 2 na Asma com Inflamação T-2

Válter Alexandre Martins Fernandes¹, Emília Maria Antunes Gomes de Faria ², António Celso Dias Pais Pereira ^{1,2}

1. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

2. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal.

António Celso Dias Pais Pereira

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Azinhaga de Santa Comba

3000-354, Coimbra

celsopereira.pt@gmail.com

I. Índice

I. Índice	página 3
II. Lista de Abreviaturas/Siglas	página 5
III. Resumo/Abstract	página 7
IV. Introdução	página 9
V. Materiais e métodos	página 11
VI. Células linfoides inatas	página 12
1. Aspectos gerais	página 12
2. Células linfoides inatas do tipo 2	página 13
VII. Asma	página 17
1. Aspectos gerais	página 17
2. Asma com inflamação T-2 ^{High}	página 19
2.1. Citocinas do tipo 2 na fisiopatologia da asma	página 20
2.2. Eosinofilia na asma	página 21
3. ILC-2 na asma T-2	página 23
3.1. Implicações	página 23
3.2. Ativação das ILC-2 na asma	página 24
3.3. Interação com outras células	página 25
3.3.1. Interação ILC-2 – eosinófilo	página 25
3.3.2. Interação ILC-2 – DC e célula Th2	página 26
3.3.3. Interação ILC-2 – célula T reguladora	página 26
3.3.4. Interação ILC-2 – macrófago	página 27
3.3.5. Interação ILC-2 – basófilo e mastócito	página 28
3.3.6. Interação ILC-2 – célula supressora mieloide – derivada	28
4. Alterações estruturais da barreira epitelial	página 28
4.1. Remodelação da via aérea	página 30
5. Asma grave e ILC-2	página 31
IX. Discussão	página 33
X. Bibliografia	página 36

II. Lista de Abreviaturas e Siglas

- APCs – células apresentadoras de antígeno (do inglês, *antigen presentig cells*).
- DC – célula dendrítica (do inglês, *dendritic cell*).
- ICOS – co-estimulador de indução de células T (do inglês, *Inducible T-cell co-stimulator*)
- IgE – imunoglobulina E.
- ILC – células linfoides inatas (do inglês, *innate lymphoide cells*).
- ILC-2 – células linfoides inatas do tipo 2 (do inglês, *innate lymphoide cells type 2*).
- LBA – lavado broncoalveolar.
- LTD₄ - leucotrienos D4.
- MDSCs – células supressoras mieloide-derivadas (do inglês, *myeloid-derived supressor cells*).
- MHC-II – complexo major de histocompatibilidade 2 (do inglês, *major histocompatibility complex 2*).
- PD-1 – proteína de morte celular programada 1 (do inglês, *programmed cell death protein-1*).
- PGD₂ - Prostaglandina D2.
- PMN-MDSCs - células supressoras mieloide-derivadas polimorfonucleares (do inglês, *polymorphonuclear myeloid-derived supressor cells*).
- T-2 – Tipo 2.
- TSLP – linfopietina estromal do timo (do inglês, *Thymic stromal lymphopietin*).

III. Resumo/Abstract

1. Resumo

A asma é uma patologia com um impacto relevante na saúde pública. Apresenta uma prevalência e incidência crescentes, em todas as sociedades desenvolvidas. Apesar de estar presente em todas as faixas etárias, tende a incidir mais sob os grupos pediátricos e adultos jovens. Trata-se de uma doença muito heterogênea, sustentada por inúmeros mecanismos patogénicos e, por conseguinte, com múltiplos fenótipos e endótipos. Durante a última década, a identificação de um grupo celular pertencente ao sistema imunitário – as células linfoides inatas (*innate lymphoid cells* – ILCs) mostrou-se preponderante para uma melhor explicação e compreensão de inúmeros perfis inflamatórios em doenças crónicas, alérgicas e oncológicas. As ILCs são residentes em estruturas imediatamente abaixo de algumas das barreiras epiteliais, nomeadamente da mucosa das vias aéreas, do trato gastrointestinal e da pele, entre outras. Todas as ILCs apresentam uma morfologia semelhante à das células linfocitárias, não sendo, porém, identificáveis quaisquer marcadores de linhagem celular à sua superfície. Subdividem-se em, pelo menos, 3 grandes subgrupos: as ILC-1, as ILC-2 e as ILC-3. Na asma e mais precisamente no doente com asma eosinofílica, a contribuição das ILC-2 tem sido um objeto constante de estudo na atualidade. De facto, algumas alarminas (IL-25, IL-33 e TSLP) libertadas na sequência de uma agressão à célula epitelial são potentes ativadoras das ILC-2, que por sua vez se caracterizam por um perfil de citocinas muito semelhante ao das células Th2, células estas sobre-expostas na mucosa de muitos asmáticos. Uma vez que elas são consideradas absolutamente críticas na interface entre o meio ambiente e a mucosa brônquica, o conhecimento das ILCs surge-nos como fundamental para um melhor esclarecimento do mecanismo patogénico eletivo subjacente a cada fenótipo, endótipo e grau de gravidade. Neste contexto, a melhor caracterização destas células poderá direcionar-nos ao encontro de novos alvos terapêuticos, permitindo desta forma uma otimização do controlo inflamatório e clínico da asma. Com este trabalho pretende-se uma revisão atualizada da biologia celular envolvida, dos fatores críticos de ativação e da articulação e modulação entre as células residentes da mucosa e outras células efetoras da inflamação, nomeadamente as células dendríticas, diferentes populações linfocitárias e as células eosinofílicas.

Palavras-chave: ASMA, EOSINÓFILO, ILC-2, *REMODELLING*, TH2.

2. Abstract

Asthma is a condition with a relevant impact on public health. It's incidence and prevalence are increasing, in all developed societies. Despite being present in all age groups, it tends to focus more on pediatric groups and young adults. It is a very heterogeneous disease, sustained by numerous pathogenic mechanisms and, therefore, with multiple phenotypes and endotypes. During the last decade, the identification of a cell group belonging to the immune system - the innate lymphoid cells (ILCs) has proved to be preponderant for a better explanation and understanding of innumerable inflammatory profiles in chronic, allergic and oncological diseases. ILCs reside in structures immediately below some of the epithelial barriers, namely the mucosa of the airways, gastrointestinal tract and skin, among others. All ILCs have a similar morphology to lymphocyte cells, but no markers of cell lineage on their surface are identifiable. They are subdivided into at least 3 large subgroups: ILC-1, ILC-2 and ILC-3. In asthma and more precisely in the patient with eosinophilic asthma, ILC-2 contribution has been a constant object of study nowadays. In fact, some alarmins (IL-25, IL-33 and TSLP) released following an attack on the epithelial cell are potent activators of ILC-2, which in turn are characterized by a cytokine profile very similar to Th2 cells, the last ones overexposed in the mucosa of the asthmatic patient. Since they are considered absolutely critical at the interface between the environment and the bronchial mucosa, the knowledge of ILCs appears to us to be fundamental for a better clarification of the elective pathogenic mechanism underlying each phenotype, endotype and degree of severity. In this context, a better characterization of these cells can lead us to find new therapeutic targets, thus allowing an optimization of the inflammatory and clinical control of asthma. With this work, we intended to do an updated review of the cell biology involved, of the mandatory activation factors and of the articulation and modulation between cells residing in the mucosa and other effector cells of the inflammation, namely the dendritic cells, different lymphocytic cells and as eosinophilic cells.

Keywords: ASTHMA, EOSINOPHIL, ILC-2, REMODELLING, TH2.

IV. Introdução

A asma é uma doença *major*^{1,2} cuja prevalência tem vindo a aumentar ao longo das últimas décadas.³ Trata-se de uma patologia extremamente complexa, que afeta as vias respiratórias, com picos de incidência na infância e em idades jovens,⁴ sendo mesmo uma das doenças mais comuns entre as crianças.^{1,2} Caracteriza-se clinicamente pela presença de sinais e sintomas respiratórios como dispneia, tosse, sibilância e aperto no peito, em doentes com história e perfil evolutivo compatíveis, e nos quais podem objetivar-se limitações variáveis do fluxo na via aérea.⁴ São inúmeros os mecanismos fisiopatológicos que a sustentam, razão pela qual estes quadros clínicos se exibem de forma tão heterogénea.³ Sabe-se que a asma, e principalmente as suas formas de manifestação mais graves, tem-se mostrado um importante problema de saúde pública, com o qual continuamos a debater-nos na atualidade.⁵ Isto porque os indivíduos portadores das formas mais graves da doença asmática encontram-se não só em risco de desenvolver alterações estruturais brônquicas permanentes, como apresentam também maior vulnerabilidade para experienciar eventos agudos mais frequentes e com manifesto compromisso na sua qualidade de vida.⁶

Considerou-se, durante muitos anos, que as manifestações clínicas desta doença traduziam uma resposta predominantemente adaptativa do sistema imunitário, facto que se sabe hoje não ser totalmente verdade.⁵ Ao longo da última década, o conhecimento cada vez mais completo e consistente relativo a uma linhagem celular recentemente identificada, a das ILCs, culminou na atualização e reformulação desses conceitos, de forma que se passou a considerar que, na verdade, também o sistema imunitário inato tem um papel fundamental na cascata inflamatória subjacente à polarização T-2 da resposta imunitária, que está na base da maior parte dos casos de doença asmática. As ILCs são células do sistema imunitário inato que não expressam marcadores de linhagem específicos para células T ou B.⁷ Elas têm a capacidade de atuar mediante a presença de sinais de *stress* como a libertação de citocinas, quimiocinas, neuropéptidos e mediadores lipídicos, que são secretados pelo estroma das mucosas ou por outras células da linhagem mieloide.⁸ Uma vez ativadas, produzem perfis citocínicos sobreponíveis aos das células Th1, Th2 e Th17.⁹

Durante a última década, as ILC-2 emergiram como novos intervenientes na homeostasia dos tecidos¹⁰ e nos processos fisiopatológicos de algumas doenças com perfil inflamatório T-2 como: a asma, a rinite alérgica, a dermatite atópica ou até mesmo a esofagite eosinofílica, entre outras.¹¹

Os recentes avanços no conhecimento da inflamação T-2 ocorreram em paralelo com a clarificação da intervenção das ILCs em inúmeros processos clínicos. De facto, estas células, oficialmente descritas em humanos no ano de 2010 ¹², têm demonstrado um relevante contributo em patologias inflamatórias, nas quais os distúrbios ou disfunções das barreiras mucosas epiteliais são parte interessada nos mecanismos patogénicos. Na asma, o epitélio brônquico não só constitui uma interface com o meio externo, alvo de contacto com alérgenos, antígenos microbianos ou poluentes, mas também é um interveniente ativo no processo patogénico e condicionante do infiltrado celular subjacente. Assim, abordar-se-ão estas interações fisiopatológicas recentemente identificadas e mais bem conhecidas, incidindo na exploração da asma e as suas principais variantes, das células linfoides inatas e em particular as do tipo 2, da forma como as mesmas interagem com a mucosa da via aérea e conseqüentemente da sua relação com a inflamação e alteração brônquicas presente nesta patologia. A par disto, esta revisão pretende vincar ainda a relação existente entre as ILC-2 e os principais fenótipos da asma, bem como promover um melhor esclarecimento e atualização de evidência acerca do contributo que estas células possam ter para a gravidade da doença e na própria resposta ao tratamento. Isto porque se considera que apenas uma constante consolidação de conhecimentos na área, com a análise de dados com relevância científico-clínica inquestionável, poderá contribuir para um maior sucesso terapêutico. Estes pressupostos são, portanto, fundamentais para garantir uma otimização de todo o plano de tratamento, incrementando a qualidade de vida do asmático e simultaneamente propiciando ganhos de eficiência em saúde pública, face aos dados epidemiológicos atuais e ao inevitável que se perspetiva nos próximos anos.

V. Materiais e Métodos

Na pesquisa da literatura foram utilizadas as bases de dados *Pubmed* e *WorldWideScience*. Para a obtenção de resultados de pesquisa foram introduzidos os seguintes termos: *asthma phenotypes; severe asthma; asthma and innate lymphoid cells 2 ; innate lymphoid cells and asthma severity; innate lymphoid cells and ICOS-ligand; asthma physiopathology, IL-13 and asthma, IL-5 and asthma, IL-4 and asthma, airway remodeling and eosinophilic asthma.*

Da pesquisa bibliográfica foram excluídos artigos com data de publicação anterior a 2015, uma vez que, sendo as ILC células de descrição formal relativamente recente, a escolha de material publicado numa data mais próxima à da sua identificação aumentaria o risco de desatualização. No entanto, pela sua absoluta importância foram excepcionalmente incluídas publicações anteriores a esse ano. Além disso, artigos publicados em língua não inglesa ou não portuguesa foram também excluídos pelo não domínio linguístico.

Ao todo foram analisados 77 artigos, dos quais 4 foram desde logo excluídos por não conterem informação relevante para a finalidade deste artigo de revisão.

A par da leitura dos artigos encontrados nas plataformas anteriormente mencionadas, foram também analisados e utilizados outros materiais científicos, no formato de livros e plataformas científicas disponíveis na web, com indiscutível credibilidade.

VI. Células Linfoides Inatas

1. Aspectos Gerais

Formalmente descritas em 2010, por *Moro et al.*,¹² as ILCs constituem uma superfamília celular do sistema imunitário, com importância na regulação de múltiplas facetas da imunologia cada vez mais intrigante. A sua intervenção na defesa do hospedeiro, na promoção da homeostasia metabólica, na reparação tecidual e em diversos perfis inflamatórios,¹³ tem sido constantemente mencionada por inúmeros estudos, em modelos animais⁹ e em humanos¹⁴. Estas células assemelham-se às células linfocitárias, todavia, ao contrário dos linfócitos, não sintetizam nem exibem marcadores de superfície específicos para esta linhagem, sejam os mesmos marcadores de células T (CD3, CD4 e $\alpha\beta/\gamma\delta$ TCR) ou marcadores de células B (CD19, CD20).¹⁵ Ao analisá-las sob o ponto de vista do seu desenvolvimento, verificamos que todas as ILCs derivam de uma célula progenitora linfocitária comum, que a par de ser precursora das ILCs, é também precursora dos linfócitos.¹⁴ Além desta, que é a célula precursora primordial, temos também identificadas pelo menos duas outras células precursoras de ILCs, com capacidade para originar qualquer uma das suas subpopulações, sendo elas a célula pluripotente progenitora linfóide $\alpha 4\beta 7^+$ (*α LP*) e a progenitora de ILC TCF1⁺ (*EILP*).¹⁴ Existem ainda outros intermediários celulares, igualmente precoces do ponto de vista do desenvolvimento, mas que não mantêm, contudo, a capacidade de se diferenciar em todos os subtipos de ILCs, sendo exemplos as que expressam *promyelocytic leukaemia zinc finger* (*PLZF*) e as *common helper innate lymphoid progenitor* (*CHILP*). A progressiva diferenciação destas células é um processo complexo e que conta com a intervenção de moléculas como o *Id2* (que atua por supressão do fator de transcrição *bHLH*), o *NFIL3* e *Tox*.¹⁶

As ILCs podem ser encontradas num número relativamente vasto de tecidos linfóides e não linfóides, mas predominam junto às principais barreiras mucosas.¹⁷ Assim como as células linfocitárias T e B, iniciam o seu desenvolvimento no fígado fetal e na medula óssea.¹⁸ Neste grande grupo celular incluem-se as células NK, as *lymphoid tissue inducer cells* (LTi) e as células produtoras de citocinas *helper-like* ILCs.

As *helper-like* ILCs, de agora em diante mencionadas apenas como ILCs por constituírem o grupo de maior relevância imunológica, subdividem-se em 3 subgrupos, numa ramificação que tem por base os fatores de transcrição mais ativos e, conseqüentemente, o perfil de citocinas produzidas: ILC-1, ILC-2 e ILC-3.¹⁹ As ILC-1 estão presentes em tecidos como as glândulas salivares, o fígado, o intestino e o

sistema reprodutor feminino. Elas expressam *T-bet* e produzem IFN- γ e TNF α . Este subgrupo celular partilha algumas características em comum com o das células NK, sendo que o fator de transcrição *Eomes*, apenas presente nestas últimas, é essencial para o seu normal desenvolvimento, e acaba por ser uma diferença importante entre ambas.¹⁹

As ILC-3 são células maioritariamente encontradas ao longo do trato gastrointestinal. Nos humanos, podem subdividir-se consoante a expressão de *NKp44*. Elas expressam constitutivamente *ROR γ T*²⁰ e o recetor do ácido retinóico¹⁶, e caracterizam-se pela secreção de citocinas como as IL-22 e IL-17²⁰, um perfil sobreponível ao das células Th17.¹²

Por sua vez, as ILC-2, inicialmente identificadas como as principais células inatas envolvidas na resposta do hospedeiro à infeção por microrganismos helmintos, expressam o fator de transcrição *GATA-3* e produzem, predominantemente, citocinas como as IL-4, IL-5 e IL-13, sendo desta forma responsáveis por induzir respostas imunitárias tipo 2 relativamente potentes.^{16,20} Elas têm ainda a capacidade de modular o fenótipo e a função das células Th2.¹²

Apesar de apresentarem uma constituição e função basais, quase todas as ILCs já mostraram sinais de alguma plasticidade celular e heterogeneidade “tecido-dependente”.^{12,21}

2. Células linfoides inatas do tipo 2

As ILC-2, muitas vezes referidas como as células sentinela da resposta primária à infeção por parasitas do grupo dos helmintos,^{13,16} são a subpopulação de células linfoides inatas mais estudada em humanos.²² Elas orquestram interações moleculares inatas que precedem outras mais complexas e específicas de antigénio, mediadas por células da imunidade adaptativa.²² A evidência científica tem mostrado que, principalmente a partir da 2.^a semana de vida, o predomínio intrauterino de ILC-3 no tecido linfóide do timo parece dar lugar a uma marcada presença das ILC-2, assumindo-se inclusive que estas possam tornar-se o subtipo celular de ILCs mais importante durante a vida adulta.²³ As ILC-2 estão presentes em maiores quantidades nos pulmões, na pele, no intestino delgado e no tecido adiposo,²⁰ em oposição a outras localizações como o timo, baço e sangue periférico, onde são extremamente raras.²⁰

Fenotipicamente, são células linhagem-negativas, CD127⁺ e CRTH-2⁺, que não apresentam recetores antigénicos. No entanto, expressam múltiplas moléculas co-

estimuladoras, cruciais para o controlo e interface com a imunidade adaptativa, como são exemplos: ICOS, ICOS-L, *death receptor 3* (DR3), *tumor necrosis factor receptor 2* (TNFR2) e *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor* (GITR).²⁴ Além destes, sabe-se que as moléculas de PD-1, primariamente expressas em células T, se apresentam sobre-expressas em algumas ILC-2 pulmonares.¹³

Numa investigação em 2001 comprovou-se que a administração de IL-25, uma interleucina estruturalmente relacionada com a IL-17, em modelos animais, parecia induzir uma expressão de IL-4, IL-5, IL-13, uma secreção de IgE, IgA, IgG1, e também uma eosinofilia, mesmo na presença de défices genéticos conhecidos de células Th2.²⁵ Concluiu-se assim que o que se observava, ainda numa época “pré-ILCs”, era uma produção de respostas imunitárias “Th2” muito evidentes, mas de uma forma independente de linfócito.¹⁶ Mais tarde, em 2010, após a sua descoberta, estabeleceu-se que esta produção citocínica sem participação ou contributo das células Th2 seria resultado desta população de ILC-2, que têm, elas próprias, a capacidade de produzir consideráveis quantidades de citocinas tipo 2 (IL-5, IL-13 e, com menor expressão, IL-4),²⁶ em resposta à prévia interação com estímulos facilitadores de resposta, como são a libertação das IL-25 e IL-33.²⁴ Alguns estudos concluíram mesmo que as ILC-2 fossem a única fonte de IL-13 no pulmão de indivíduos saudáveis, com uma produção independente das células B e T.²⁷

As citocinas produzidas e libertadas pelas ILC-2 têm a capacidade de ativar células mieloides como os eosinófilos e as células dendríticas através de: cadeia β comum, cadeia IL-5R α , cadeia IL-9R α , IL-13R1, IL-13R2, cadeia γ comum e cadeia α CM-CSFR. Sendo que qualquer uma destas células (e ainda os mastócitos, os basófilos e os macrófagos) expressam estes recetores, tornando-se assim potenciais alvos para estes mediadores químicos libertados pelas ILC-2.²⁸ Além de atuarem em outras células, de forma parácrina, uma pequena quantidade do *pool* citocínico libertado pelas ILC-2, onde se inclui também a IL-9, determina de forma autócrina uma autoativação, contribuindo para sustentar e potenciar a sua própria produção e libertação, num mecanismo de *feedback* positivo.²⁸

As ILC-2 têm a capacidade de direta e indiretamente promover quer o recrutamento, quer a sobrevivência dos eosinófilos.²⁶ Além disso, sabe-se que, curiosamente, através da atuação sinérgica das citocinas 4 e 13 ou 4 e IFN γ , é possível modular o fenótipo exibido pelos eosinófilos, o que sugere uma plasticidade eosinofílica ILC-2-dependente.²⁸

Além das interações já mencionadas, sabe-se que as ILC-2 são também reguladas por mecanismos neuro-imunes e neuro-endócrinos. Reconhece-se a importância de substâncias como o ligando *NMU*, que interage com o seu recetor

NMUR1, sobre-expresso nas ILC-2, e promove uma resposta inflamatória tipo 2 nos tecidos. Também as catecolaminas participam na modulação das ILC-2, através da interação com os seus recetores beta 2 adrenérgicos e inclusive o *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), produzido e secretado localmente pelas *pulmonar neuroendocrine cells* (PNECs) parece modular a atividade das ILC-2.²⁹

A ICOS é uma proteína da superfamília CD28.³⁰ Juntamente com o seu ligando, ICOS-L, funciona como um coreceptor ativador.¹³ Estão altamente expressos em células T ativadas e células T reguladoras, e parecem estar envolvidos na função e sobrevivência das mesmas.³⁰ A interação entre a ICOS e o ICOS-L já tinha demonstrado poder contribuir também para a regulação da hiper-reatividade brônquica (AHR), a produção de IgE e a diferenciação de células B, em modelos animais.¹⁵ Estudos efetuados mais recentemente permitiram identificar que tanto as ILC-2 murinas quanto as ILC-2 humanas vêm a apresentar uma sobre-expressão de ICOS e do seu ligando,³⁰ que têm a capacidade de interagir entre si, através de ligações *trans* e/ou *cis*,³¹ modulando a sua própria atividade. Com a utilização de modelos animais com ratos portadores de um défice genético desta proteína, concluiu-se que para além da redução da AHR e da inflamação dependentes de IL-33, também as contagens de ILC-2 se mostravam consistentemente inferiores. Estes resultados contribuíram para sustentar e corroborar a hipótese de que a ICOS seria necessária para a indução de AHR, para a inflamação da via aérea e para a própria sobrevivência das ILC-2.³⁰

A PD-1 (CD-279) é uma proteína que pertence à família CD28.³² Tem a capacidade de, logo após a sua interação com um dos seus ligandos (PD-L1 ou PD-L2), reproduzir uma resposta de sinalização intracelular que culmina numa inibição e exaustão dos linfócitos T. Resultados *ex-vivo* em ratos mostraram existir uma forte correlação entre os níveis de expressão de PD-1 e a ativação e funcionamento das ILC-2.²⁴ Desta forma, é sabido que tanto PD-1 quanto os seus ligandos influenciam a biologia destas células, sendo expressas quer pelas suas formas maduras, quer pelos seus precursores e suprimindo o seu funcionamento via inibição da fosforilação de *STAT-5*. Estudos mais recentes revelaram existir uma comunicação entre as ILC-2 e as células Th2 na dependência da interação entre o PD-L1 expresso pelas ILC-2 e o PD-1 exibido pelas células T *helper*. Além disto, sabe-se também que a indução da expressão de PD-1 ou PD-L1 nas ILC-2 por parte de outras células locais, potencia a resposta inflamatória e a sua polarização no sentido T2.³²

Com base em estudos recentes, as ILC-2 permitiram corroborar o facto da memória imunológica não ser uma propriedade exclusiva das células do sistema imunitário adaptativo.²⁰ Demonstrou-se que algumas ILC-2 têm a capacidade de persistir para além do período inicial de inflamação induzida por alérgenos⁷, possuindo

aptidões de memória baseada numa ativação prévia. Vêm desta forma a possibilitar respostas biológicas mais fortes perante um estímulo e um gradiente idênticos, em estádios subsequentes. ²⁰ Um dos estudos envolvidos nesta análise demonstrou que tanto as ILC-2 induzidas após injeção intranasal de alergénio, como a própria IL-33, respondem de forma mais rápida e vigorosa ao referido estímulo do que as suas homónimas *naïve*. ³³ Sabe-se que, à semelhança das células T e B, também as ILC-2 adquirem capacidades memória-*like* através de alterações nos níveis de expressão de uma série de genes específicos. ³³ Genes como os que codificam proteínas da família *Bcl2* (antiapoptóticos – *Bcl2a1b* e *Bcl2a1d*), gene da IL-2 (envolvida na expansão e sobrevivência de células T *helper* e geração de células T citotóxicas de memória) e gene que codifica a proteína homónima *TNFSF18* (citocina expressa pelas células endoteliais que também promove a sobrevivência das células T) são alguns dos que aparentam estar sobre-expressos nas ILC-2 de memória, quando comparadas com os seus equivalentes *naïve*. ²⁰

VII. Asma

1. Aspetos Gerais

A asma é uma doença inflamatória e crónica das vias aéreas que cursa com sintomatologia respiratória, limitação da atividade física e períodos de agudização que podem requerer tratamento hospitalar urgente.⁴ Trata-se de uma patologia claramente consumidora de recursos económicos diretos e indiretos, com óbvias implicações na qualidade de vida dos doentes. A sua prevalência tem vindo a aumentar consideravelmente ao longo das últimas três décadas, com os seus números a duplicarem a cada 10 anos.³⁴

Em indivíduos suscetíveis, esta inflamação pode cursar com episódios recorrentes de dispneia, tosse, aperto no peito e sibilância, que podem surgir de forma individual ou combinada e que se associam a uma limitação variável do fluxo aéreo, geralmente reversível, seja de forma espontânea ou farmacológica.³⁵ Nas suas formas de manifestação intermitente e ocasional, o controlo com agonistas beta-2 de curta duração de ação (SABAs) é eficaz e suficiente na maioria das vezes. Pelo contrário, nos outros patamares de gravidade da doença exige-se um tratamento crónico diário com recurso a um arsenal farmacológico com anti-inflamatórios e outras moléculas broncodilatadoras, num plano ajustado a cada estadio.³⁶

Sendo uma patologia extremamente heterogénea e complexa,^{3,35,37} a asma assenta numa base etiológica múltipla, potenciada pela interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. A gravidade, a história natural e até mesmo a resposta ao tratamento são de igual forma muito variáveis.³ O microambiente inflamatório, com extravasamento de plasma para o interstício, parece ser o principal e mais importante mecanismo fisiopatológico causador da constrição brônquica,³⁸ não obstante este facto, também a AHR a estímulos não específicos,³⁸ bem como as alterações estruturais que culminam em fenómenos de *remodelling*, são mecanismos com extrema relevância na fisiopatologia da asma, sendo este último uma possível justificação para que, em certos casos, a limitação do fluxo aéreo se torne persistente e irreversível com a evolução do quadro clínico.³⁸

Durante muitos anos, a asma foi considerada, de forma transversal, uma doença alérgica com preponderância de eosinófilos,³⁹ com resposta abrangente a corticosteroides controladores do processo inflamatório.⁴⁰ Mais tarde, a prevalência de formas da doença com perfis celulares distintos, isto é, doentes cujos processos patogénicos de base não pressupunham a marcada intervenção e contributo dos eosinófilos, contribuiu para que se considerasse de imperativa importância na abordagem ao doente asmático que os mesmos pudessem ser agrupados. Assim,

obtinham-se um conjunto de doentes com os mesmos perfis clínicos, culminando desta forma naquilo que são os fenótipos da asma, e imunoinflamatórios, constituindo desta forma os diferentes endótipos da doença. No seu conjunto, esta divisão deveria, idealmente, auxiliar a decisão terapêutica, tornando-a o mais ajustada e individualizada possível.⁶

O processo fisiopatológico da asma envolve várias células do sistema imunitário, e inclui desde intervenientes que pertencem à imunidade inata, até células da imunidade adaptativa, como são os linfócitos T-CD4⁺.⁴¹ Assim, uma agressão inicial do epitélio determina uma consequente ativação das células ciliadas, que por sua vez induzem uma resposta química em cascata que promove a criação de um microambiente inflamatório e consentâneo a uma inflamação de maior magnitude. Esta inflamação, como já mencionado anteriormente, pode seguir um de dois endótipos *major*, uma inflamação T-2^{high}, caracterizada por uma ampla produção de citocinas de perfil 2, as IL-4, IL-5 e IL-13, ou uma inflamação com baixo perfil T-2 (ou não-T-2).

Na Figura 1 apresentam-se alguns dos diferentes perfis inflamatórios presentes na asma, enquadrados em 2 grandes grupos consoante o contributo dos eosinófilos no processo patogénico. Assim, os endótipos eosinofílicos podem ser alérgicos ou não alérgicos, enquanto os perfis com baixa preponderância eosinofílica se podem dividir em variantes com escassa população de células (a paucigranulocítica) ou com preponderância de neutrófilos, manifestando-se esta última geralmente de forma grave.

42

Curiosamente, quer a variante alérgica, quer a não alérgica das asma eosinofílicas têm mecanismos imunopatológicos sobreponíveis. Porém, nas formas não dependentes de alérgeno, a participação de células Th2 é mais reduzida. Por outro lado, os endótipos não eosinofílicos são maioritariamente neutrofilicos, estando neste caso envolvidas as células T CD4⁺ efectoras produtoras de IL-17, como é o caso das Th17, potentes recrutadoras de neutrófilos. Um outro subgrupo de doentes não eosinofílicos não apresenta níveis significativos de eosinófilos nem de neutrófilos no seu *background* histopatológico, estando estas formas provavelmente associadas a disfunção do músculo liso da via aérea e apresentando estes doentes um curso da doença relativamente benigno.¹¹

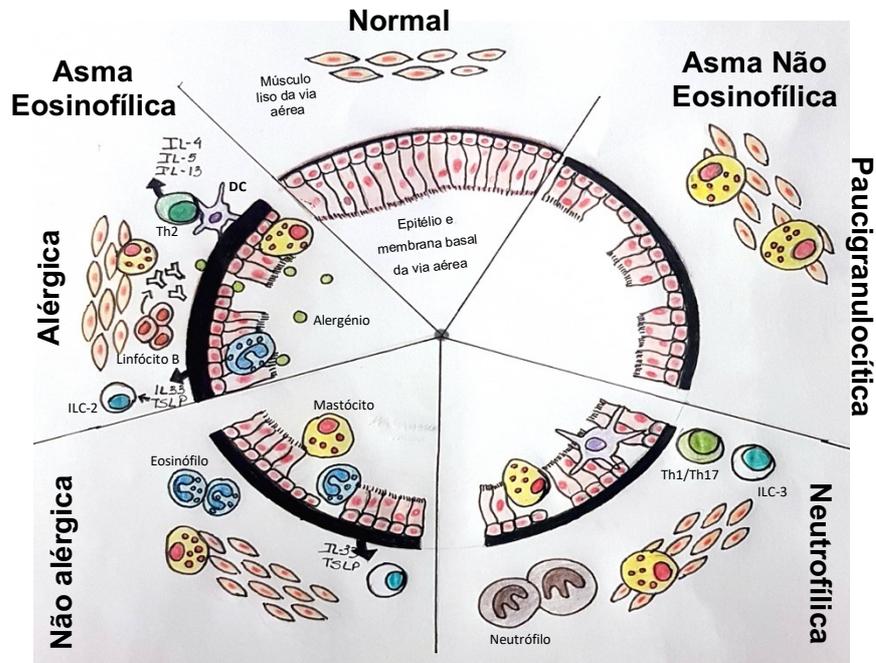


Figura 1. Asma eosinofílica vs asma não eosinofílica. Resumem-se os principais subgrupos de doentes com base na interseção de endótipos e fenótipos, bem como os intervenientes celulares que predominam em cada um. Imagem adaptada de WW Busse, 2019 ⁴³.

2. Asma com inflamação T-2^{High}

O modelo clássico da asma associou a doença a uma preponderante e quase exclusiva contribuição de células Th2, ^{40,44} às quais se associam a inflamação e a AHR mediadas pela atuação de IgEs específicas. Esta descrição não a define, contudo, na sua complexidade e diferentes expressões clínicas, uma vez que a restringe aos doentes com asma alérgica eosinofílica. ⁴⁵ De uma forma genérica, também conhecida como forma de início precoce (*early-onset* asma alérgica), pelo facto de estas representarem a esmagadora maioria das formas alérgicas de asma, ⁴⁰ esta variante é de longe a forma mais prevalente de doença asmática ³⁸ e o fenótipo mais comum em análise de *clusters*. ³ Este subfenótipo da doença afeta geralmente indivíduos com história documentada de atopia e elevados níveis de produção de IgE. ⁴⁴ Pelo facto de serem maioritariamente induzidas por alérgenos, a sua evicção deverá fazer parte da abordagem terapêutica, ainda que com algumas limitações para os aeroalérgenos para os quais a evicção é muito difícil. ⁴⁴

A asma eosinofílica não alérgica é na grande maioria das vezes uma forma de asma de início tardio (*late-onset*), ⁴⁴ caracterizada essencialmente pela baixa produção de IgE. A diferente contribuição das células Th2, veiculadas estritamente a processos facilitadores de *homing*, tráfico e ativação de eosinófilos e ILC-2 vem, pois, a determinar uma marcada eosinofilia na via aérea, pelo que estes doentes apresentam um maior número de eosinófilos na expetoração do que os doentes com formas de início precoce.

40

Em qualquer um dos fenótipos T-2^{High}, alérgico ou não alérgico, o processo imunoinflamatório da parede brônquica estará na dependência direta da agressão epitelial, acabando o mecanismo subjacente por ser, ele próprio, indutor de disfunção sobre o epitélio. No caso do fenótipo alérgico clássico, mediado por IgE, o alergénio solúvel determinará a produção de substâncias específicas, ⁴⁶ que, por sua vez, vão despoletar as respostas imunitárias inata e adaptativa. ⁴⁷ Já nas formas eosinofílicas não alérgicas, caracterizadas também por um perfil citocínico do tipo 2, os mecanismos que promovem uma continuada ativação epitelial, geradores de processos oxidativos muito potentes, vêm a ser preponderantes na indução da atividade funcional da população celular subjacente, com uma clara modulação de ILC-2 e células dendríticas de linhagem mieloide, com perfis citocínicos favorecedores da cronicidade inflamatória.

2.1. Citocinas do tipo 2 na fisiopatologia da doença

Fisiologicamente, um perfil de citocinas tipo 2 é responsável por modular a resposta do organismo à infeção por parasitas. Contudo, em condições patológicas, estes mediadores passam a associar-se a uma panóplia de doenças marcadas por uma resposta inflamatória exuberante, como são exemplos: a asma, a rinite alérgica, a dermatite atópica e até algumas formas de cancro ³⁶. Deste perfil fazem parte, essencialmente as IL-4, IL-5 e IL-13.

Clonada pela primeira vez a partir de um modelo animal, em 1986, a IL-4 ficou inicialmente conhecida como um fator indutor de IgG1. ³⁶ O seu papel na doença asmática parece estar essencialmente relacionado com a promoção da proliferação e sobrevivência dos linfócitos, por intermédio da sua ligação ao seu recetor tipo 1 (IL-4R tipo 1), ⁴⁸ e com a estimulação da secreção de IgEs específicas, após indução de *switching* neste sentido, mecanismo que ocorre, particularmente, nas formas alérgicas da asma eosinofílica. ⁴⁷

Por sua vez, a IL-13, clonada em 1989 ³⁶, parece ter um papel ainda mais importante nos mecanismos subjacentes ao *remodelling* da via aérea. Assim, esta

citocina está envolvida na indução da AHR, da hiperprodução de muco e da fibrose subepitelial.⁴⁷ Através de processos mediados por *STAT-6*, a IL-13 modula a expressão de genes epiteliais, de entre os quais se incluem o gene da mucina, *MUC5AC*, e da periostina. Daqui resultam as alterações observáveis quer a nível da quantidade de muco que é produzido, quer a nível da reatividade das paredes da via aérea. Esta interleucina também hiper-sensibiliza a musculatura lisa dos brônquios à ação de agonistas naturais da contração (como a acetilcolina e a histamina), através da sobre-expressão e ativação RhoA-Rock, da fosforilação de cadeias leves de miosina e do aumento da libertação de cálcio.⁴⁸

A IL-5 é uma glicoproteína homodimérica produzida e libertada pelas células Th2, ILC-2 e células epiteliais da mucosa respiratória, após contacto do hospedeiro com microrganismos como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxocara canis*, entre outros, ou, mais frequentemente, durante uma resposta imunoinflamatória alérgica por exposição a alérgenos. Enquanto a sua produção fisiológica parece regular os mecanismos de proliferação e sobrevivência das células B, é sabido que, quando sobre-expressas, parecem aumentar as contagens de eosinófilos.⁴⁹ Assim, a secreção desta interleucina induz a diferenciação e o recrutamento das células eosinofílicas⁷, promovendo, indiretamente, de entre outros efeitos, a deposição proteica na matriz extracelular subepitelial, da qual resulta a fibrose subepitelial.²⁹

2.2. Eosinofilia na asma

O eosinófilo é uma célula efetora do sistema imunitário inato⁴⁵ e é também a principal célula de resposta inflamatória no pulmão, contribuindo essencialmente para dois fenómenos *major*: a remodelação da via aérea e a AHR.⁵⁰ Sabe-se que eles exibem efeitos pleiotrópicos em diferentes outras populações celulares envolvidas nos quadros de inflamação.⁴⁵ Primeiramente descritas por *Paul Ehrlich*, há cerca de 150 anos,⁵⁰ estas células possuem grânulos no seu interior que armazenam componentes citotóxicos³⁸ altamente nocivos para o epitélio das vias aéreas, de entre os quais se destacam as proteínas catiónicas: MBP, EPO, ECP⁴⁷ e a EDN⁴², cuja desgranulação irá promover a inflamação, a diversos níveis. Além disso, os eosinófilos produzem e libertam leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄)⁴² e MMP-9, também eles envolvidos nos processos de remodelação brônquica.⁴⁷ O TGF-β, igualmente sintetizado pelas células eosinofílicas, será responsável por, entre outras ações, promover o quimiotactismo, o recrutamento de fibroblastos e a ativação dos fibroblastos locais no sentido de promover a sua diferenciação em miofibroblastos ou, eventualmente, células musculares lisas.⁴²

Como já foi anteriormente referido, a célula eosinofílica é uma espécie de *hallmark* celular da maioria das formas T-2/T-2^{high} da asma, comumente referidas como formas eosinofílicas. Assim é, portanto, factual que a maioria destes doentes se apresenta com marcada eosinofilia.⁵⁰ Este achado na via aérea dos asmáticos pode resultar do recrutamento de células maduras em circulação no sangue periférico, induzido pela produção local de mediadores de quimiotaxia, ou da diferenciação *in situ* dos eosinófilos, esta última por atuação maioritária da citocina IL-5, estando as restantes citocinas do tipo 2 mais envolvidas no recrutamento das formas maduras e não diferenciadas para o pulmão – o chamado *homing* pulmonar dos eosinófilos.⁵¹ O tráfego das células eosinofílicas é também induzido pela libertação de eotaxinas, um grupo de quimiocinas produzidas pelas células do estroma,⁵² no qual se incluem a eotaxina-1 (CCL11), a eotaxina-2 (CCL24) e a eotaxina-3 (CCL26).⁵³ Além de se considerar um possível preditor da gravidade da doença, a eosinofilia é também apontada como um parâmetro preditor do risco de exacerbações.⁵⁴

Os eosinófilos em circulação face à estimulação imunobiológica da mucosa e submucosa brônquicas, vão ter de executar uma migração transendotelial para a via aérea.⁴² Para isso contam com a intervenção de moléculas de adesão específicas de eosinófilos, como são exemplos a VLA-4, uma integrina exposta na membrana dos eosinófilos, após indução pela eotaxina-1, e o PSGL-1, também expresso por estas células. Qualquer uma destas moléculas vai interagir com o seu ligando, VLA-4/VCAM-1 e PSGL-1/P-selectina, promovendo a passagem da célula eosinofílica através do endotélio vascular.⁵⁰ A somar a estes contributos, algumas evidências sugerem que o LTD₄ possa também facilitar esta transposição.³⁸

3. ILC-2 na asma T-2

3.1. Implicações

A asma eosinofílica ficou conhecida no passado como uma variante da doença marcada pela produção de um perfil 2 de citocinas na dependência quase exclusiva das células Th2¹². Sabe-se hoje, porém, à luz da evidência científica mais atual, que a proliferação e produção de citocinas tipo 2 por parte das ILC-2, mediada pela libertação de alarminas, é essencial para o recrutamento e manutenção dos eosinófilos,⁵² *hallmark* citológico destas formas da doença. Além disso, são também importantes para modular o funcionamento de outras células e/ou mediadores que, de igual modo, contribuem para a gênese fisiopatológica da asma.¹² Na verdade, desde que foram formalmente descritas e identificadas como células capazes de induzir respostas T-2, a participação das ILC-2 na asma tem sido objeto constante de estudo e investigação³², com alguns autores a proporem mesmo que estas células possam constituir os marcadores biológicos mais específicos em determinadas doenças pulmonares em humanos, de entre as quais se destaca a asma.³² Nos processos que envolvem preponderantemente a inflamação T-2, como é o caso da asma eosinofílica, sabe-se que as ILC-2 atuam como sensores que reagem a múltiplos antígenos. Além disso, como foi anteriormente sumariado, elas não reconhecem diretamente o antígeno, ou partes dele, sendo apenas estimuladas por outros mediadores⁵⁵, de uma forma direta praticamente antígeno-independente⁵⁶, conferindo menor especificidade à resposta. Em diversas análises realizadas no âmbito de estudos científicos foi verificado que a quantidade de ILC-2 na expetoração⁵⁷, sangue periférico⁵¹ e no fluido bronco-alveolar⁵⁸ dos doentes asmáticos era maior do que a sua quantidade nos indivíduos saudáveis (grupo controlo)^{51,57,59}. Também os achados relacionados com um estudo que avaliou o efeito de partículas poluentes aerossolizadas de baixo peso molecular (PM-2.5), permitiram fortalecer a evidência de que as ILC-2 têm um papel essencial na posterior sensibilização dos indivíduos a múltiplos inalatórios.⁵⁵ *Chen et al.*¹⁰ demonstraram que a contagem de ILC-2 produtoras de citocinas T-2 aumentava consideravelmente 24 horas após o contacto com o alérgeno, sugerindo um tráfego destas células para o pulmão, induzido pela sensibilização.

Alguns dos estudos que pretendiam compreender de que forma o contributo das ILC-2 na asma se modificava consoante estivessemos perante uma variante alérgica ou não alérgica, concluíram que as mesmas parecem contribuir para ambas as formas eosinofílicas, independentemente da atopia de base e sem diferenças muito notáveis

entre elas.¹¹ Por outro lado, outros estudos que compararam a quantidade de ILC-2 na expetoração de doentes com asma eosinofílica com o número destas células na expetoração de doentes com asma não eosinofílica, puderam concluir que as ILC-2 estão consideravelmente mais aumentadas nos indivíduos com a variante eosinofílica, existindo mesmo uma boa correlação entre os números absolutos de ILC-2 e a eosinofilia aérea.¹⁰ Neste contexto, o contributo das ILC-2 nas variantes paucigranulocítica e neutrofílica da asma será naturalmente residual.¹⁰ Outro dado muito relevante consiste na comprovação de que a persistência de células progenitoras eosinofílicas na via aérea está associada a formas com contagens mais elevadas de eosinófilos, na dependência direta de ILC-2.⁵⁰

3.2. Ativação das ILC-2 na asma

É sabido que as células Th2 produzem os seus mediadores de forma predominantemente dependente do contacto com as APCs. No caso das ILC-2, a situação é diferente¹¹. O processo inicia-se logo após o contacto das células da barreira epitelial da via aérea com um alérgeno¹⁵ ou outras partículas, nomeadamente víricas¹⁰, como são exemplos a exposição ao *rhinovírus* e ao *vírus sincicial respiratório*, ou ainda poluentes. Este contacto é favorecido, muitas das vezes, pela presença de defeitos ao longo da superfície destas mesmas mucosas.⁶⁰ Em resposta a essa exposição, estas células libertam citocinas específicas que, por sua vez, vão induzir uma ativação das ILC-2.¹⁵ As interleucinas 33 e 25 são duas das mais importantes indutoras de resposta por parte das ILC-2, e os seus recetores estão altamente expressos nessas células. A IL-33, produzida e libertada por células epiteliais, fibroblastos e células do endotélio, irá, depois de interagir com um dos seus recetores, IL-1RL1 e IL-1RAP, ativar quer o fator de transcrição *AP-1*, através da via *MAPK*, quer o *NF-Kb*, via *TRAF6*. Por sua vez, a IL-25, que é maioritariamente produzida e libertada pela pequena população de *brush cells* da via aérea, deverá ativar os mesmos alvos moleculares logo após interação com os seus recetores, IL-17RA e IL-17RB.⁷ Além destas duas citocinas, também as IL-2, IL-7, IL-9 e TSLP atuam, através de vias de sinalização que incluem *STAT1*, *STAT3* e *STAT5*, como sinais co-estimuladores importantes na ativação e funcionamento das ILC-2.²¹

A importância do TSLP, implicado na imunidade adaptativa e na ativação das ILC-2, foi demonstrada em estudos em humanos e em modelos animais¹⁵, estando o mesmo mais relacionado com a sobrevivência das ILCs do que propriamente com uma indução de produção citocínica.³⁹ A contribuição de mediadores lipídicos como os leucotrienos e as prostaglandinas para a ativação destas células está também

documentada. As ILC-2 expressam quer CRTH2 (recetor para a PGD₂), quer CysLT1R (recetor para os LTD₄) que, quando ativos, estimulam a ativação da via do *NFAT*.²¹

A produção das IL- 4, 5 e 13 pelas células Th2 associa-se, de forma bem documentada, com a ativação de três fatores de transcrição principais, o *NFAT*, o *NF-kB* e o *AP-1*, na sequência de vias de sinalização que incluem interações com o TCR de células T.²¹ Pelo contrário, as ILC-2, não possuindo na sua maioria este recetor, não as sintetizam a partir deste estímulo. Assim, sabe-se que apenas uma combinação importante de fatores químicos de sinalização, no caso mediadores citocínicos e lipídicos, permite uma eficaz ativação dos 3 fatores de transcrição *major*, com a produção suficiente de citocinas tipo 2, incluindo a IL-4.²¹ A participação das interleucinas indutoras de polarização T-2 em ILCs-2 na asma foi avaliada por diferentes tipos de estudos, de entre os quais se incluem as análises genéticas com estudos de *Genome Wide Association* (GWA) que sinalizaram a existência de polimorfismos nas proximidades de alelos que codificam o TSLP, a IL-33 e o IL1RL1,⁵⁸ e que pareciam relacionar-se com a coexistência da patologia. Estudos subsequentes permitiram confirmar a presença de quantidades aumentadas das referidas interleucinas na via aérea de doentes asmáticos.⁵⁸

A TGF- β é uma citocina pleiotrópica que participa na manutenção da homeostasia imunitária e regula diversos mecanismos biológicos, de entre os quais se destaca a diferenciação e o funcionamento das ILC-2.⁶¹ A sua participação nestas vias foi corroborada por estudos que demonstraram que a deficiência intrínseca de TGF- β na medula óssea parece afetar a biodisponibilidade destas células.⁶¹ Além disso, sabe-se também que esta citocina tem a capacidade de promover uma sobre-expressão de *ST2* (IL1RL1), de uma forma parcialmente *MEK1/2*-dependente (isto é, através da via das MAP cinases)²⁶, potenciando assim a interação *ST2*/IL-33.

3.3. Interação com outras células

3.3.1. Interação ILC-2 – Eosinófilo

A interação entre as ILC-2 e os eosinófilos é essencial nas formas eosinofílicas da asma. A IL-5 produzida e libertada pelas ILC-2 é crucial para a ativação, recrutamento e sobrevivência dos eosinófilos. Além disso, a literatura sustenta ainda a hipótese de que a par da sua desgranulação, essencial para os mecanismos subjacentes à doença, a célula eosinofílica vem também a ativar outras células intervenientes na inflamação T-2, como as ILC-2, as células epiteliais, as células

endoteliais ou até mesmo populações de DCs submucosas que autoperpetuam o perfil T-2^{high}.⁵²

3.3.2. Interação ILC-2 – DC e Célula Th2

Na resposta inflamatória alérgica, as ILC-2 têm efeito coadjuvante, por intermédio de contacto direto, com as DCs, para sinergicamente influenciarem a polarização da resposta das células Th2.¹³ Elas atuam por modulação da apresentação antigénica, num processo aparentemente mediado pela interação OX40L/OX40,⁶² e, com menor relevância, MHC-II/TCR.⁷ Foi demonstrado em modelos animais que uma expressão mais limitada à superfície celular de moléculas OX40L nas ILC-2 parece associar-se a uma deficiente indução da resposta imunitária Th2⁶². Além disso, verificou-se também que as ILC-2 parecem estar envolvidas na rápida ativação das células Th2 com fenótipos de memória, num episódio de reexposição antigénico/alergénico. Constatou-se que, uma vez ativadas, as ILC-2 induzem a produção de CCL17 (por interação com as DC), que por sua vez promove o recrutamento de células Th2 de memória. Este mecanismo foi corroborado por estudos em modelos animais que demonstraram que a quantidade de células Th2 recrutadas após uma reexposição, era consideravelmente inferior nos ratinhos que apresentavam depleção de ILC-2, quando comparados com os que apresentavam uma normal biodisponibilidade destas células.²²

Dados mais recentes sustentam que a intervenção da IL-13 na robustez e eficiência da cooperação é absolutamente fundamental na interação multicelular DC/ILC-2/Th2.²²

3.3.3. Interação ILC-2 – célula T reguladora

No pulmão de indivíduos saudáveis, ambas as quantidades de ILC-2 e de células T reguladoras são diminutas.³² Estas últimas estão envolvidas em mecanismos de tolerância imunológica³¹ e podem ser classificadas como T reguladoras induzidas (iTreg) ou T reguladoras naturais (nTreg), consoante a principal localização⁴¹ e o mecanismo de desenvolvimento.³¹ As células Treg suprimem a atividade de outros alvos celulares por diversos meios, de entre os quais se destacam a libertação de citocinas com atividade supressora, a inibição por contacto direto e o sequestro de IL-2.⁴¹ Estudos *in vitro* e *in vivo* permitiram confirmar a existência de uma interação entre as ILC-2 e as células iTreg.⁴¹ Curiosamente estas mostraram ter a capacidade de

suprimir a atividade das ILC-2, num mecanismo de inibição maioritariamente por contacto célula a célula ^{31,38,41}. Uma vez que as ILC-2 não apresentam recetores antigénicos específicos para células T, ⁴¹ suspeitou-se que esta supressão fosse mediada pela interação ICOS/ICOS-L. ³² Este mecanismo veio a ser confirmado por estudos subsequentes que demonstraram que após a administração de anticorpos anti-ICOS-L, a supressão de citocinas T-2 diminuía consideravelmente em co-culturas com ILC-2 e iTreg. ⁴¹ Ao analisar mais atentamente esta interação, verificou-se que a ligação do ICOS-L presente nas ILC-2 com a molécula ICOS expressa pelas iTreg, aparentava quebrar o estímulo à sobrevivência dependente das interações *cis* e *trans* entre as duas moléculas constitutivas da própria célula, por competição direta com o sítio de ligação comum. ³¹

3.3.4. Interação ILC-2 – Macrófago

A interação ILC-2 – Macrófago ocorre bidireccionalmente. Isto é, além dos macrófagos ativados poderem induzir a ativação e o funcionamento das ILC-2, estas últimas também contribuem para a determinação do fenótipo exibido pelos macrófagos. ⁵⁷ Assim sendo, sabe-se que elas estimulam uma polarização no sentido M2 das células macrófágicas, consideradas não favorecedoras dos estádios inflamatórios. Em condições normais, esta morfo-fisiologia adquirida é necessária para a produção de VEGF e TGF- β , mas também da interleucina anti-inflamatória IL-10, ambos com funções na reparação e homeostasia dos tecidos. No entanto, em casos de ativação crónica, como na asma, a produção contínua de citocinas dependente, entre outras células, das ILC-2, promove a manutenção permanente deste fenótipo, M2, vindo a promover uma deposição de colagénio e demais alterações estruturais típicas desta doença. ⁵² Curiosamente, esta polarização no sentido M2 dos macrófagos apenas pareceu ocorrer, em estudos, quando a cultura ocorre juntamente com ILCs. ⁵⁷ Não obstante a importância da interação mediada por interleucinas, sabe-se que a expressão de elevadas quantidades de PD-L1 e CD40-L nos macrófagos também auxilia a comunicação entre estas células e as ILC-2, que expressam iguais quantidades das respetivas moléculas de ligação, sob a forma de contacto célula-célula. ⁵⁷

3.3.5. Interação ILC-2 – Basófilo e Mastócito

A interação entre as ILC-2 e os basófilos é estabelecida de forma bidirecional, com as ILC-2 a promoverem a sua desgranulação, e com a IL-4 produzida pelos basófilos a ter a capacidade de ativar as ILC-2 pulmonares.⁷ A PGD₂ e os LTD₄, ambos derivados do ácido araquidónico e libertados pelos mastócitos, promovem o tráfego das ILC-2 para o ambiente inflamatório e estimulam a produção de citocinas T-2 por elas próprias.⁷

3.3.6. Comunicação ILC-2 – célula supressora mieloide-derivada

As células supressoras mieloide-derivadas (MDSCs) são uma população de células precursoras mieloides imaturas, ativadas de forma patológica e implicadas na regulação imunológica de diversas doenças.⁶⁴ Apesar da sua contribuição na patogénese da doença pulmonar oncológica estar bem documentada, a compreensão da sua relevância em processos infecciosos e/ou inflamatórios carece ainda de maior elucidação. Pensa-se, contudo, que a MDSC possa ter funções preponderantes na modulação da patogénese da asma por potenciar a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e suprimir a atividade de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-12.⁶³

Sabe-se, com base em evidência científica, que uma subpopulação destas células, a das PMN-MDSCs, interage com as ILC-2, suprimindo a sua atividade, num mecanismo dependente do contacto célula-célula.⁶⁴

4. Alterações da barreira epitelial

O epitélio da via aérea tem claras implicações no funcionamento do sistema imunitário. Desde logo, ao exibir a função de barreira passiva, conseguida à custa da sua estrutura, mas também ao produzir e transportar ativamente moléculas neutralizadoras de patógenos e ao libertar diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.⁶⁵ Na via aérea de indivíduos saudáveis, as *tight junctions* (TJs) das zónulas de oclusão e zónulas de adesão constituem redes proteicas extremamente complexas. Elas são de tal forma eficientes que impedem o transporte paracelular de diversas moléculas, incluindo microrganismos e alérgenos,⁶⁵ contribuindo dessa forma para a função de barreira passiva atribuída ao epitélio. É em 1988 que é descrita, pela primeira vez, a disfunção da barreira epitelial em doentes com asma.⁶⁶ A análise de biópsias

pulmonares de doentes asmáticos tem revelado mucosas disruptivas, com áreas consideráveis de “descamação” e marcada fragilização das TJs associada a uma diminuição considerável da expressão de proteínas essenciais para a formação destes complexos, à sua superfície, como são a α e a β catenina, a ZO-1, a E-caderina⁶⁶ e a ocludina.⁵³

Alguns estudos de *genome wide association* (GWA) identificaram genes e *loci* associados à suscetibilidade para a asma que são expressos pelas células epiteliais, evidenciando a sua preponderância nos mecanismos patobiológicos subjacentes à doença.⁵³

As ILC-2 estão envolvidas no aumento da permeabilidade e diminuição da expressão de proteínas das TJs epiteliais, num processo mediado, essencialmente, pela IL-33. Isto porque se mostrou ser possível reproduzir esta destruição na ausência das células B e T, mas não na ausência das ILC-2.⁶⁶ A infeção por alguns vírus respiratórios, como o *rhinovirus* e o *vírus sincicial respiratório*, também demonstrou poder condicionar diretamente a permeabilidade do epitélio, num mecanismo dependente de NADP-oxidase e proteína cinase D, respetivamente.⁵³

A par das alterações estruturais transversais às células do epitélio brônquico, também a modulação da produção de muco, pelas células de *goblet*, adquire uma imprescindível importância na fisiopatologia da asma. O aumento da camada de gel mucoso que cobre o epitélio da via aérea promove a obstrução brônquica e prejudica os mecanismos de *clearance* mucociliar.⁵³ Esta alteração é mediada pela IL-13 e está intimamente relacionada com o aumento do número de células de *goblet* associado à transdiferenciação das células ciliadas. Além deste mecanismo, também a modificação da composição do muco, por ação da amfíregulina, uma glicoproteína da família *epidermal growth factor* (EGF), é induzida pelas ILC-2.⁶⁰

O compromisso da barreira epitelial, que atua como primeira linha de defesa, expõe, como já mencionado, o pulmão à ação de agentes externos, facilitando a penetração de alérgenos ou outros antígenos que determinam sensibilização ou resposta imunitária. Este binómio ILC-2 e célula epitelial parece ser crítico nos processos disruptivos conducentes aos fenómenos de *remodelling* da via aérea.⁶⁵

4.1. Remodelação da via aérea

A remodelação da estrutura da via aérea, que inclui as modificações estruturais celulares e extracelulares (matriz extracelular) observadas em doentes com asma, é considerada, *per si*, um evento crítico na doença asmática.³⁴ Qualquer um dos seus mecanismos, isto é, a hipertrofia e/ou hiperplasia do músculo liso, a hiperplasia/metaplasia das células de *goblet*, a hipertrofia das glândulas submucosas, a fibrose subepitelial, o aumento da vascularização da submucosa³⁵, a aparente inibição da morte celular programada das células do epitélio aéreo ou a própria disrupção da barreira epitelial, pode ocorrer de forma isolada ou em associação múltipla.

A fibrose subepitelial é resultado da deposição de proteínas na matriz extracelular, nomeadamente proteínas de colagénio (colagénios I, III e V) ou outras como a elastina, a fibronectina e a laminina.⁶⁷ Esta deposição é muito dependente da atividade de células M2 ativadas com a libertação de TGF β e IL-13, esta última também libertada pelas ILC-2.⁵²

Os miofibroblastos estão envolvidos nos mecanismos que culminam na diminuição do lúmen da via aérea. À semelhança dos fibroblastos, produzem componentes da matriz extracelular. Os miofibroblastos expressam a isoforma específica do miócito da *α -smooth muscle actin* (α -SMA), o que possibilita a contratilidade e o espasmo da parede brônquica. Contrariamente ao fibroblasto brônquico, o miofibroblasto é uma célula relativamente grande e metabolicamente muito ativa, sendo uma fonte abundante de mediadores inflamatórios que perpetuam o mecanismo patogénico da doença. Em condições normais, estas células têm um tempo de semivida curto, seguindo precocemente para vias de morte celular programada. Na asma, contudo, perpetuam-se evadindo à apoptose, e participam ativamente nos fenómenos de remodelação da parede brônquica.⁶⁷ Além dos mediadores como o TGF- β , o *connective tissue growth factor* (CTGF) e o *platelet derived growth factor* (PDGF), também a IL-4 e essencialmente a IL-13, produzidas e libertadas pelas ILC-2, induzem uma transição fibroblasto-miofibroblasto dependente da supressão da expressão do gene da ciclooxigenase e redução da síntese de prostaglandina E2, bem como vias que envolvem a *c-Jun NH2-terminal kinase*.⁶⁷

O processo de remodelação tecidual não é específico da doença asmática, nem do pulmão. Alterações histológicas semelhantes àquelas que encontramos nos doentes asmáticos são também encontradas em pacientes portadores de outras doenças, nomeadamente da esofagite eosinofílica. Embora sejam, naturalmente, patologias

distintas, o mecanismo patogénico subjacente é idêntico, sendo igualmente suportado numa inflamação T-2. Assim sendo, à semelhança daquilo que acontece no esófago, pensa-se que também na asma eosinofílica, a eosinofilia crónica que lhe é característica seja responsável por estas modificações.⁶⁸

Os dados mais atuais da literatura sustentam a importância das citocinas tipo 2 nas alterações estruturais de *remodelling* que ocorrem na parede brônquica. Destas, a IL-13 e o aporte autócrino resultante da ativação das ILC-2 parece ser absolutamente determinante.³⁴

5. Asma grave

A asma grave é uma entidade extremamente complexa, reconhecendo-se, no entanto, que a interação entre os eosinófilos e o epitélio da via aérea³⁹, bem como o balanço entre as células Treg e a imunidade T-2⁴¹ e a maturação eosinofílica *in situ*⁵⁰, possam ter um papel importante na perpetuação da inflamação e na resistência à terapêutica.³⁹ Estas formas de asma caracterizam-se pela persistência de clínica e da inflamação, com pelo menos duas exacerbações por ano, não obstante a manutenção de uma terapêutica otimizada para o estadió correspondente.¹¹ Elas são por isso de difícil tratamento e, por conseguinte, sobrecarregam os sistemas de saúde com custos anuais extremamente desproporcionais⁴⁴, além das inúmeras implicações em custos indiretos e na qualidade de vida dos doentes.

Estudos em gémeos permitiram estimar que até 25% da variabilidade fenotípica relacionada com a severidade da asma possa ser atribuída a fatores genéticos. O mais recente estudo de GWA baseado na análise desta variação detetou, inclusive, uma associação importante com alguns *loci*, nos quais se incluem alelos com os genes *GATA3*, *MUC5AC* (gene que codifica a proteína mucina 5AC) e *KIAA1109* (gene que codifica a proteína homónima)⁶⁹. Outros contributos para esta variabilidade fenotípica são dados por fatores ambientais, fatores comportamentais e comorbilidades⁶⁹, sendo as formas isoladas de asma grave manifestamente mais raras⁴⁴. A obesidade, a polipose nasal, o refluxo gastroesofágico e a osteopenia/osteoporose são alguns exemplos de doenças que podem coexistir e contribuir para a maior morbidade nestes doentes, estejam a sua instalação e gravidade relacionadas com o próprio processo fisiopatológico da doença ou com alterações secundárias à terapêutica instituída.⁴⁴

A heterogeneidade desta entidade é de tal forma importante e a sua estratificação de tal forma complexa⁷⁰ que, com base numa extensa análise feita aos doentes que participaram no *Severe Asthma Research Program* (SARP), um projeto Norte-Americano que pretendia focar-se na avaliação de características moleculares e

clínicas que diferenciam as formas ligeiras da asma, das suas formas mais graves ⁶, foram identificados 5 principais *clusters* de doentes: a *early-onset* asma alérgica ligeira, a *early-onset* asma alérgica moderada, a *late-onset* asma eosinofílica não alérgica, a asma *early-onset* eosinofílica alérgica grave e *late-onset* asma neutrofílica não alérgica grave. ³

Apesar dos avanços científicos já alcançados no âmbito do tratamento da asma, a quantidade de doentes com o diagnóstico de asma grave continua elevada ⁷⁰ e mesmo que, em termos percentuais, os indivíduos com formas graves de asma correspondam apenas a cerca de 5-10% do total de portadores da doença, são responsáveis por cerca de 50% dos seus custos totais anuais. ⁷¹

Uma questão interessante acerca do papel das ILC-2 na asma diz respeito à compreensão da importância que elas possam ter nas formas graves da doença. No entanto, nesta vertente, as evidências científicas disponíveis são um pouco contraditórias. Alguns estudos demonstraram que, à semelhança das células Th2, também as ILC-2 respondem à corticoterapia ¹¹, com supressão da produção citocínica dependente de vias de sinalização que envolvem a via *STAT*. ⁵ Num dos primeiros estudos subsequentes à identificação das ILC-2, a quantificação destas células no sangue periférico não evidenciou diferenças entre doentes com asma grave e ligeira. ²⁹

Contudo, a sensibilidade e resposta aos glucocorticoides nas ILC-2 tem vindo a ser questionada pela comunidade científica, suspeitando-se mesmo que esta possa ser menos potente do que a sua atividade inibitória nas células linfocitárias. Este facto poderá justificar a estreita relação que se encontrou existir entre as ILC-2 e algumas formas não controladas da doença, em estudos subsequentes. ⁷² Em contraponto aos primeiros resultados anteriormente descritos, *Smith et al* ¹⁰ demonstraram que a contagem de ILC-2 produtoras de citocinas do tipo 2 estaria consideravelmente aumentada no sangue e expetoração de doentes com asma grave, submetidos a terapêutica com altas doses de glucocorticoide. Noutro trabalho de investigação, foi ainda possível demonstrar, a partir de amostras de LBA, que em doentes com formas graves, as ILC-2 constituíam um dos fulcros da limitação à terapêutica por desenvolverem uma resistência aos corticoides aparentemente na dependência de TSLP ^{11,29,38}, provavelmente através da via de sinalização *STAT-5*. ³⁸ Uma outra fonte bibliográfica sustenta ainda que as ILC-2 poderão ser das principais células envolvidas na indução da eosinofiloiose *in situ*, no local da inflamação da parede brônquica, que se pensa estar relacionada com as formas mais graves da doença. ⁵¹

IX. Discussão

Da extensa revisão da literatura nesta temática, é possível elencar alguns pontos fundamentais. Desde logo, a ideia de que a asma é uma doença bastante comum e com uma prevalência e incidência crescentes, mas variáveis consoante a região do mundo, em parte devido a fatores de risco como os ocupacionais e os ambientais, que acabam por ser, também eles, bastante mutáveis. Além disso, a prevalência das formas graves da doença, refratárias muitas vezes às terapêuticas atualmente disponíveis, e que mantêm elevados os índices de morbilidade, é um indicador fulcral e com capacidade de prever, em parte, o impacto que esta patologia tem na saúde pública de um país. ¹⁻⁵

À luz do conhecimento atual podemos confirmar inquestionavelmente que as ILC-2 são células absolutamente nucleares no espectro do perfil eosinofílico da asma, tanto nas formas com expressão alérgica mediada por IgE como nas formas eosinofílicas não alérgicas. De facto, a interação entre ambas as populações celulares é fundamental para manter não só esse gradiente citocínico na parede brônquica, mas também a persistência e o incremento da população de eosinófilos residentes. ^{10,32,50,52}

Também o conhecimento da forma como comunicam com outros elementos celulares do microambiente inflamatório, como as APCs ^{13,22}, as células Treg ^{31,32,41} e as próprias células Th2 ^{22,62}, ajuda-nos a compreender a fisiopatologia da doença de uma forma mais abrangente.

Um dado muito importante acerca desta revisão prende-se com a associação entre as ILC-2 e as formas graves da doença asmática. Embora com algumas discrepâncias, a verdade é que alguns estudos sustentaram o pressuposto de que as ILC-2 parecem ser potentes moduladoras das variantes da doença que se manifestam de forma mais grave, resistentes, na sua maioria, à terapêutica. Esta descoberta é extremamente útil dos pontos de vista clínico e científico, uma vez que são as formas graves aquelas que motivam a incessante procura por novos alvos celulares e/ou moleculares e, conseqüentemente, novos tratamentos. ^{10,11,29,38,72}

O caminho a percorrer na tentativa de reduzir e inverter o paradigma atual ainda é longo. Todos os contributos são úteis e necessários. O conhecimento das ILC-2 e da forma como elas atuam na asma eosinofílica, não é exceção. Trata-se de um aspeto de importantíssima relevância tanto na caracterização biológica da própria célula, como dos mediadores por ela produzidos e recetores de superfície (Figura 2), que poderão constituir alvos críticos e potenciais para novas abordagens que determinem um melhor controlo da doença.

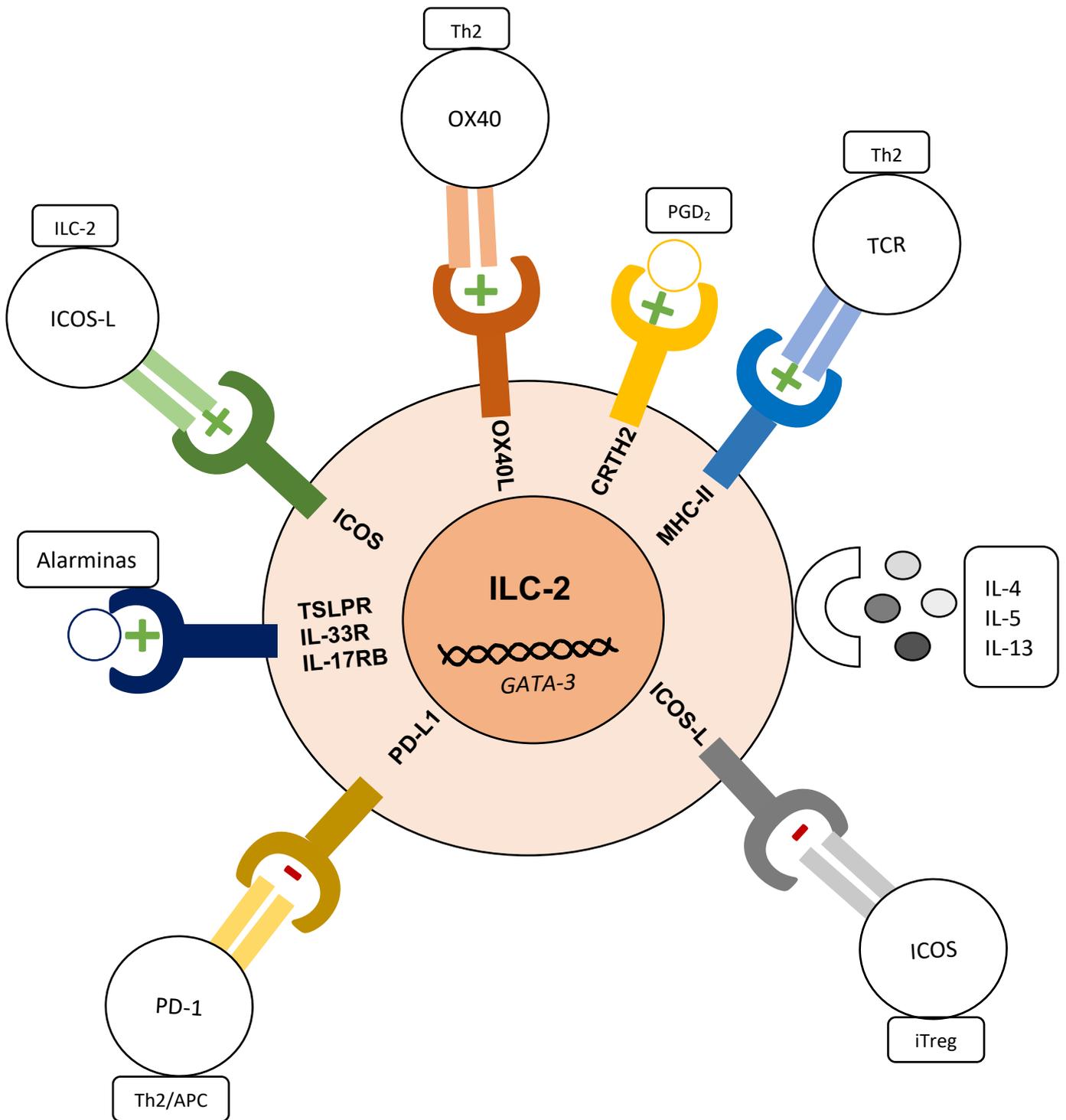


Figura 2. Resumem-se as principais moléculas coestimuladoras (+) e supressoras (-) da função das ILC-2, bem como o principal fator de transcrição e perfil citocínico libertado. Adaptado de A Lei, 2019⁷³.

No entanto, a investigação de novas abordagens farmacológicas na asma terá de atender à especificidade da resposta, minimizando o risco de imunossupressão generalizada, tanto mais que muitos dos mediadores biológicos são ubiqüitários e essenciais à homeostasia de inúmeros outros órgãos e sistemas. A implicação das ILC-2 na asma permite-nos considerá-las potenciais alvos de modulação. Uma vez que foram comprovadamente mencionadas como elementos celulares com elevado e precoce contributo citocínico na fisiopatologia da asma, o bloqueio e/ou ativação de mediadores que estimulam e/ou suprimem as suas atividade e sobrevivência revela-se promissor.²⁴

As interleucinas IL-33 e IL-25, bem como o TSLP, são alvos terapêuticos em investigação dada a sua importância nas cascatas de sinalização que culminam na ativação das ILC-2. Além disso, uma vez que a interação PD-1/PD-L1 demonstrou também modular a função destas células, a utilização de agonistas do PD-1 tem sido explorada como abordagem supressora de função.⁷⁴

O fator de transcrição GATA-3 é um dos fatores mais fulcrais para o normal funcionamento das ILC-2. O bloqueio da sua atividade, através da utilização de moléculas *antisense* que promovem a clivagem e conseqüente inativação do seu mRNA tem mostrado bons resultados na atenuação da resposta imunitária na asma em ensaios clínicos. Além disso, também a utilização de anticorpos monoclonais contra o recetor da prostaglandina D2 (CRTH2) resultou numa diminuição da contagem de ILC-2 em modelos animais e o uso de pequenas moléculas antagonistas deste recetor permitiu-nos obter resultados promissores em ensaios clínicos em humanos.⁷⁴

Em suma, as ILC-2 são um elo crítico, com enorme preponderância na fisiopatologia da asma com perfil inflamatório T-2. Desta revisão resulta a necessidade de implementar novas linhas de investigação que possam caracterizar novos aspetos na imunobiologia destas células. Estes pressupostos poderão enquadrar novas vias de abordagem da asma com expressão eosinofílica, elencando com potenciais alvos que permitam um melhor controlo clínico e estratégias mais eficazes e seguras que delimitem os fenómenos de *remodelling*. A ser possível, seguramente, constituirá uma inovação que permitirá uma verdadeira revolução na gestão global do tratamento do doente asmático.

X. Bibliografia

1. WHO. WHO methods and data sources for country-level causes of death. *Glob Heal Estim Tech Pap.* 2018;3:1–83.
2. Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017;390(10100):1211–59.
3. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(1):1–12.
4. Reddel H, Bacharier L, Bateman E, et al. Pocket guide for asthma management and prevention. *Glob Initiat Asthma.* 2020;46.
5. Yu QN, Guo YB, Li X, et al. ILC2 frequency and activity are inhibited by glucocorticoid treatment via STAT pathway in patients with asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2018;73(9):1860–70.
6. Fitzpatrick AM, Moore WC. Severe Asthma Phenotypes – How Should They Guide Evaluation and Treatment? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017; 5(4): 901–908
7. Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: Major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(11):665–78.
8. Mjösberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(5):1265–76.
9. Simoni Y, Fehlings M, Kløverpris HN, et al. Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity.* 2017;46(1):148–61.
10. Cayrol C, Girard JP. Innate lymphoid cells in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(5):1739–41.
11. Jonckheere AC, Bullens DMA, Seys SF. Innate lymphoid cells in asthma: Pathophysiological insights from murine models to human asthma phenotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2019;19(1):53–60.
12. Salter BM, Aw M, Sehmi R. The role of type 2 innate lymphoid cells in eosinophilic asthma. *J Leukoc Biol.* 2019;106(4):889–901.
13. Schwartz C, Khan AR, Floudas A, et al. ILC2s regulate adaptive Th2 cell functions via PD-L1 checkpoint control. *J Exp Med.* 2017;214(9):2507–21.
14. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol.* 2019;56:100–6.
15. Karta MR, Broid DH, Doherty TA. Insights into Group 2 Innate Lymphoid Cells in

- Human Airway Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016 January; 16(1): 8.
16. Mohammadi H, Sharafkandi N, Hemmatzadeh M, et al. The role of innate lymphoid cells in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4512–29.
 17. Minton K. Innate lymphoid cells: Circulating precursor for human ILCs. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):216–7.
 18. Krabbendam L, Bal SM, Spits H, Golebski K. New insights into the function, development, and plasticity of type 2 innate lymphoid cells. *Immunol Rev.* 2018;286(1):74–85.
 19. Yokoyama A. *Advances in Asthma: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment.* Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2019.
 20. Martinez-Gonzalez I, Mathä L, Steer CA, Takei F. Immunological Memory of Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Trends Immunol.* 2017;38(6):423–31.
 21. Kato A. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Diseases. *Chest.* 2019;156(1):141–9.
 22. Halim TYF, Hwang YY, Scanlon ST, et al. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat Immunol.* 2016;17(1):57–64.
 23. Cupedo T. ILC2: at home in the thymus. *Eur J Immunol.* 2018;48(9):1441–4.
 24. Helou DG, Shafiei-Jahani P, Lo R, et al. PD-1 pathway regulates ILC2 metabolism and PD-1 agonist treatment ameliorates airway hyperreactivity. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–15.
 25. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2013;14(6):536–42.
 26. Larose MC, Archambault AS, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Regulation of eosinophil and group 2 innate lymphoid cell trafficking in asthma. *Front Med.* 2017;4:1–12.
 27. Saluzzo S, Gorki AD, Rana BMJ, et al. First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Rep.* 2017;18(8):1893–905.
 28. Mortha A, Burrows K. Cytokine networks between innate lymphoid cells and myeloid cells. *Front Immunol.* 2018;9:191.
 29. Doherty TA, Broide DH. Airway innate lymphoid cells in the induction and regulation of allergy. *Allergol Int.* 2019;68(1):9–16.
 30. Maazi H, Patel N, Sankaranarayanan I, et al. ICOS:ICOS-Ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis and induction of airway hyperreactivity. 2015;42(3):538–551.
 31. Aron JL, Akbari O. Regulatory T cells and type 2 innate lymphoid cell-dependent asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2017;72(8):1148–55.

32. Mindt BC, Fritz JH, Duerr CU. Group 2 innate lymphoid cells in pulmonary immunity and tissue homeostasis. *Front Immunol.* 2018;9:1–17.
33. Martinez-Gonzalez I, Mathä L, Steer CA, Ghaedi M, Poon GFT, Takei F. Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity.* 2016;45(1):198–208.
34. Fang L, Sun Q, Roth M. Immunologic and non-immunologic mechanisms leading to airway remodeling in asthma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
35. Mims JW. Asthma: Definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5:S2–6.
36. May RD, Fung M. Strategies targeting the IL-4/IL-13 axes in disease. *Cytokine.* 2015;75(1):89–116.
37. Robinson D, Humbert M, Buhl R, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(2):161–75.
38. Boonpiyathad T, Sözener ZC, Satitsuksanoa P, Akdis CA. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin Immunol.* 2019;46:101333.
39. Choi Y, Kim YM, Lee HR, et al. Eosinophil extracellular traps activate type 2 innate lymphoid cells through stimulating airway epithelium in severe asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2020;75(1):95–103.
40. Huang C, Li F, Wang J, Tian Z. Innate-like Lymphocytes and Innate Lymphoid Cells in Asthma. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;59(3):359–70.
41. Rigas D, Lewis G, Aron JL, et al. ILC2 Suppression by Regulatory T Cells Attenuates Airway Hyperreactivity and Requires ICOS:ICOS-Ligand Interaction. 2017;139(5):1468–77.
42. Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
43. Busse WW. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. *Allergol Int.* 2019;68(2):158–66.
44. Jones TL, Neville DM, Chauhan AJ. Diagnosis and treatment of severe asthma: A phenotype-based approach. *Clin Med J R Coll Physicians London.* 2018;18:s36–40.
45. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019; 56(2): 219–233.
46. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev.* 2017;278(1):162–72.
47. Khalaf K, Paoletti G, Puggioni F, et al. Asthma from immune pathogenesis to

- precision medicine. *Semin Immunol.* 2019;46:1–8.
48. Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine.* 2015;75(1):68–78.
 49. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):288–94.
 50. Bakakos, Loukides, Bakakos. Severe Eosinophilic Asthma. *J Clin Med.* 2019;8(9):1375.
 51. Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, et al. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):75-86.e8.
 52. Messing M, Jan-Abu SC, McNagny K. Group 2 innate lymphoid cells: Central players in a recurring theme of repair and regeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4).
 53. Calvén J, Ax E, Rådinger M. The airway epithelium—a central player in asthma pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):1–29.
 54. Sadik S, Lu Y, Zhu S, Cai J, Mi LL. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s): The spotlight in asthma pathogenesis and lung tissue injury. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2021;49(2):208–16.
 55. Lu X, Fu H, Han F, et al. Lipoxin A4 regulates PM2.5-induced severe allergic asthma in mice via the Th1/Th2 balance of group 2 innate lymphoid cells. *J Thorac Dis.* 2018;10(3):1449–59.
 56. Kaphingst KA, Persky S, Lachance C, et al. Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med.* 2010;14(4):384–99.
 57. Kim J, Chang Y, Bae B, et al. Innate immune crosstalk in asthmatic airways: Innate lymphoid cells coordinate polarization of lung macrophages. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(5):1769-1782.e11.
 58. Kabata H, Moro K, Koyasu S, Asano K. Group 2 innate lymphoid cells and asthma. *Allergol Int.* 2015;64(3):227–34.
 59. Yu QN, Tan WP, Fan XL, et al. Increased Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Correlated with Eosinophilic Granulocytes in Patients with Allergic Airway Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;176(2):124–32.
 60. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity.* 2015;43(1):29–40.
 61. Wang L, Tang J, Yang X, et al. TGF- β induces ST2 and programs ILC2 development. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–15.
 62. Schuijs MJ, Hammad H, Lambrecht BN. Professional and ‘Amateur’ Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. *Trends Immunol.* 2019;40(1):22–34.

63. Kolahian S, Öz HH, Zhou B, Griessinger CM, Rieber N, Hartl D. The emerging role of myeloid-derived suppressor cells in lung diseases. *Eur Respir J*. 2016;47(3):967–77.
64. Cao Y, He Y, Wang X, et al. Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells attenuate allergic airway inflammation by negatively regulating group 2 innate lymphoid cells. *Immunology*. 2019;156(4):402–12.
65. Frey A, Lunding LP, Ehlers JC, Weckmann M, Zissler UM, Wegmann M. More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020;11:1–22.
66. Sugita K, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, et al. Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):300-310.e11.
67. Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Paw M, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(21):3943–61.
68. Nhu QM, Aceves SS. Tissue remodeling in chronic eosinophilic esophageal inflammation: Parallels in asthma and therapeutic perspectives. *Front Med*. 2017;4:1–10.
69. Agache I. Severe asthma phenotypes and endotypes. *Semin Immunol*. 2019;46:101301.
70. Kisiel MA, Zhou X, Sundh J, et al. Data-driven questionnaire-based cluster analysis of asthma in Swedish adults. *npj Prim Care Respir Med*. 2020;30(1).
71. Cheng S-L. Immunologic Pathophysiology and Airway Remodeling Mechanism in Severe Asthma: Focused on IgE-Mediated Pathways. *Diagnostics*. 2021;11(1):83.
72. Cosmi L, Liotta F, Maggi L, Annunziato F. Role of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(10).
73. Lei A, Zhou J. Cell-surface molecule-mediated cell–cell interactions in the regulation of ILC2-driven allergic inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(22):4503–10.
74. Helfrich S, Mindt BC, Fritz JH, Duerr CU. Group 2 innate lymphoid cells in respiratory allergic inflammation. *Front Immunol*. 2019;10:1–12.