



ARTIGO ORIGINAL

The impact of cystic fibrosis on the immunologic profile of pediatric patients[☆]

Daniela M. Bernardi^{a,*}, Antonio F. Ribeiro^b, Tais N. Mazzola^c, Maria M.S. Vilela^d
e Valdemiro C. Sgarbieri^e

^a Mestre, Nutrição e Alimentos. Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

^b Doutor, Saúde da Criança e do Adolescente, Centro de Investigação em Pediatria, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

^c Mestre, Saúde da Criança e do Adolescente, Centro de Investigação em Pediatria, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

^d Doutor, Biologia (Imunologia), Centro de Investigação em Pediatria, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

^e Doutor, Nutrição. Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil

Recebido em 18 de junho de 2012; aceito em 22 de agosto de 2012

KEYWORDS

Cystic fibrosis;
Reactive oxygen
species;
Glutathione;
Cytokines;
Immunoglobulins

Abstract

Objective: To compare the immunologic state of 44 pediatric patients with cystic fibrosis (CF) with a control group consisting of 16 healthy individuals.

Methods: CF patients aged 3 to 12 years with moderate to good clinical score were selected for the study. Erythrocytic glutathione, production of reactive oxygen species, cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6, IL-10) in peripheral blood mononuclear cells cultures under spontaneous and BCG- or PHA-stimulated conditions, serum concentrations of TGF- β 2, IgA, IgG, IgM, IgE, and salivary IgA were evaluated.

Results: The spontaneous production of TNF- α , IL-6, and IL-10, the PHA-stimulated production of IL-6, and the serum TGF- β 2, IgA, and IgG were increased in samples from CF patients. Healthy subjects had a higher production of TNF- α in response to BCG.

Conclusion: Although CF patients appeared clinically stable, the results of their peripheral blood examinations demonstrated an impact on the immune system.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda.
All rights reserved.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.02.007>

[☆] Como citar este artigo: Bernardi DM, Ribeiro AF, Mazzola TN, Vilela MM, Sgarbieri VC. The impact of cystic fibrosis on the immunologic profile of pediatric patients. J Pediatr (Rio J). 2013;89:40-47.

*Autor para correspondência.

E-mail: dani_miotto@yahoo.com.br (D.M. Bernardi).

PALAVRAS-CHAVE

Fibrose cística;
Espécies reativas de oxigênio;
Glutaciona;
Citocinas;
Imunoglobulinas

O impacto da fibrose cística no perfil imunológico de pacientes pediátricos**Resumo**

Objetivo: Comparar o estado imunológico de 44 pacientes pediátricos com fibrose cística (FC) a um grupo-controle formado por 16 indivíduos saudáveis.

Métodos: Foram selecionados para o estudo pacientes com FC com idade entre 3 e 12 anos, apresentando um escore clínico moderado e bom. Foram avaliados a glutaciona eritrocitária, a produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6, IL-10) em culturas de células mononucleares do sangue periférico em condições espontâneas e estimuladas por BCG ou PHA, a concentração sérica de TGF- β 2, IgA, IgG, IgM, IgE e IgA salivar.

Resultados: A produção espontânea de TNF- α , IL-6 e IL-10, a produção de IL-6 estimulada por PHA e TGF- β 2, IgA e IgG séricas aumentaram em amostras de pacientes com FC. Indivíduos saudáveis tiveram uma produção mais elevada de TNF- α em resposta a BCG.

Conclusão: Apesar de os pacientes com FC parecerem clinicamente estáveis, os resultados de seus exames de sangue periférico mostraram que houve um impacto sobre o sistema imunológico.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

Introdução

A fibrose cística (FC) é a doença mendeliana grave mais comum na infância; possui uma natureza autossômica recessiva e é mais comum em caucasianos. O gene da FC codifica uma proteína com 1.480 resíduos de aminoácidos, identificados como Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística (CFTR). Esta proteína está presente principalmente em células epiteliais das vias aéreas, no trato gastrointestinal, nas glândulas sudoríparas e no sistema geniturinário. A CFTR atua como um canal de cloreto encontrado na membrana apical das células epiteliais, possuindo ainda outras funções reguladoras importantes. As mutações no gene podem levar à ausência ou mau funcionamento da CFTR, contribuindo com o desenvolvimento da FC.^{1,2}

Há um consenso de que os neutrófilos e a existência de mutação no gene CFTR desempenham um papel na inflamação característica da FC. O aumento na reabsorção de sódio nas células epiteliais causa uma produção elevada de ATP (trifosfato de adenosina) e, consequentemente, um aumento de peróxido de hidrogênio intracelular e espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais. Assim, existe a possibilidade de a produção de ROS ser responsável pelo início e manutenção do processo inflamatório, em que a produção excessiva de ROS ativa a via do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e aumenta a transcrição de citocinas pró-inflamatórias que poderão aumentar a produção de ROS, perpetuando o ciclo repetitivo.^{3,4}

O defeito na neutralização de ROS também pode ser responsável pelo estresse oxidativo na FC. A CFTR também está envolvida no transporte de glutaciona (GSH) para as células epiteliais e, assim, existe a possibilidade de o transporte de GSH ser deficiente nas células epiteliais de pacientes com FC. A GSH também previne a degradação do inibidor de NF- κ B (I- κ B) e, portanto, baixos níveis de GSH intracelular poderão promover a ativação do NF- κ B, aumentando ainda mais a concentração de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo, consequentemente, a produção das citocinas anti-inflamatórias.^{3,4}

Vários estudos mostraram que a inflamação não possui apenas um efeito local, mas também sistêmico, e a melhoria do quadro clínico dos pacientes resulta principalmente de um melhor entendimento do curso natural da doença, principalmente da inflamação. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a resposta inflamatória e o perfil imunológico de pacientes com FC com idade entre três e 12 anos e um escore clínico entre moderado e bom.

Métodos

Este estudo transversal foi realizado entre janeiro de 2009 e março de 2010. Os critérios de inclusão de pacientes com FC foram: diagnóstico de FC confirmado por dois exames mostrando elevadas concentrações de sódio e cloreto e/ou identificação de dois alelos mutantes no gene CFTR, pacientes entre três e 12 anos vacinados com a BCG e escore de Shwachman entre moderado e bom.

Com relação ao grupo-controle saudável, os critérios de inclusão foram: idade entre 3 e 12 anos, ausência de manifestações clínicas da doença, nenhum histórico familiar de doença crônica e ter recebido a vacina BCG. Os critérios de exclusão do grupo controle foram: uso de anti-inflamatórios, queixa de febre ou qualquer lesão uma semana antes da coleta de sangue.

Os pais ou responsáveis legais das crianças foram informados dos objetivos e métodos utilizados na pesquisa, estando cientes dos procedimentos e desconfortos aos quais as crianças seriam submetidas, e, dispostos de livre arbítrio e sem serem submetidos à coerção, foram solicitados a assinar o Termo de Consentimento. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (nº 538/2008).

A pesquisa foi realizada com pacientes do Ambulatório de Fibrose Cística, Hospital de Clínicas da UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil. Dentre os pacientes, 52 satisfizeram os critérios de inclusão e 44 concordaram em participar. No que

diz respeito ao grupo de crianças saudáveis, elas também foram recrutadas em Campinas, São Paulo. Foram convidadas a participar da pesquisa 21 crianças, porém apenas 16 estavam atendiam os critérios de inclusão estabelecidos.

Coleta de sangue e saliva

As coletas de amostras foram realizadas pelo Departamento de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas da UNICAMP. Foram coletados 18 mililitros de sangue venoso periférico apenas uma vez, por meio de técnicas padronizadas em tubos adequados para cada procedimento, após, no mínimo, quatro horas de jejum. Um milímetro de saliva foi coletado com pipeta de Pasteur de plástico e estéril. Foi solicitado aos pacientes que fizessem a higiene oral, enxaguando com água pura. Após a coleta, alíquotas de saliva foram centrifugadas a 1G por 7 minutos e armazenadas a -80°C até a análise.

Hemograma completo

A contagem geral e diferencial de células sanguíneas foi realizada por meio do dispositivo de Diagnóstico da Roche, Cobas-Argos 5 Diff, no Departamento de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Glutathione reduzida em eritrócitos

O teste foi realizado utilizando-se uma pequena modificação no método descrito por Beutler.⁵ Duzentos microlitros (200 µL) de sangue periférico EDTA foram lisados com 1,8 mL de água destilada. Então, 2 mL de solução de ácido metafosfórico a 1,67 por cento foram adicionados e a mistura foi filtrada. Foram adicionados 4 mL de solução Na_2HPO_4 0,3 mol em 1 mL do filtrado claro e lidos a 412 nm em um espectrofotômetro Beckman. Uma segunda leitura de densidade óptica foi feita após o acréscimo de 100 mL de solução de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) aos filtrados. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos

As medições foram realizadas pela técnica modificada de Emmendorffer et al.⁶ e Richardson et al.⁷ Foi utilizada dihidrorodamina 123 (DHR 123) para quantificar a produção de ROS estimulada por Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) pelos granulócitos do sangue periférico. Após a lise dos eritrócitos, os eventos foram adquiridos em um citômetro de fluxo Epics XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA). Foram utilizados dispersores frontal e lateral para controlar os granulócitos. A produção basal de ROS foi determinada como o percentual de eventos fluorescentes sem estímulo de PMA. A produção de ROS estimulada por PMA foi mensurada pela razão da fluorescência média dos granulócitos estimulados por PMA pela fluorescência média dos granulócitos não estimulados.

Concentração de citocina no sobrenadante da cultura

A análise da produção de citocina foi realizada pela cultura de células mononucleares do sangue periférico

(CMSP), modificadas a partir do protocolo de Gaines et al.⁸ Bacilos de Calmette-Guérin (BCG) liofilizados (ampolas de vacina Moreau Rio de Janeiro) foram recém-reconstituídos com o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) e utilizados a 5×10^5 UFC/mL. Fito-hemaglutinina (PHA, Sigma, EUA) foi utilizada como controle positivo a 7,5 µg/mL. As CMSP foram diluídas a 2×10^6 células/mL em RPMI complementado e incubadas por 48 horas (37 °C) em placas para cultura de tecidos com 96 poços de fundo redondo com BCG, PHA ou só o meio. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -80 °C para Teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). comerciais (DuoSet, Sistemas RD, EUA) foram utilizados para mensurar o interferon-gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as concentrações de interleucinas (IL-10, IL-8 e IL-6), conforme recomendado pelo fabricante. Todas as amostras e os pontos das curvas padronizadas foram mensurados em duplicidade. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Concentração do fator transformador do crescimento $\beta 2$ em soro sanguíneo

A dosagem de fator transformador do crescimento $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) foi realizada pelo teste ELISA (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Imunoglobulinas séricas (IgA, IgG, IgM e IgE) e IgA salivar

A determinação da concentração sérica das imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgE) e de IgA salivar foi realizada por nefelometria.

Análises estatísticas

Todos os resultados foram avaliados utilizando o software SPSS® para Windows (Versão 7.5.1, EUA) e as análises dos dados por meio de testes Student, Mann-Whitney e Spearman. A relevância foi definida como o valor de $p < 0,05$. O software GraphPad Prism (Versão 4.0, GraphPad Software, EUA) foi utilizado para representar a GSH, a produção de ROS e os dados gráficos das citocinas e imunoglobulinas.

Resultados

Participaram deste estudo 44 crianças com FC e 16 indivíduos saudáveis pareados por idade. A Tabela 1 mostra as características dos pacientes com FC e dos indivíduos saudáveis.

Conforme ilustrado na Tabela 1, os pacientes com FC e os indivíduos saudáveis foram pareados por idade. Com relação à colonização das vias aéreas dos pacientes, houve uma prevalência elevada de colonização por *S. pneumoniae*, uma presença relativamente elevada de *H. influenzae* e baixa incidência de *M. catarrhalis*.

A média dos valores da quantidade de leucócitos e eritrócitos nos grupos de controle de pacientes com FC e de pacientes saudáveis é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 Caracterização do grupo de pacientes com fibrose cística e do grupo-controle saudável.

Variáveis do estudo	Pacientes com FC (n = 44)	Indivíduos saudáveis (n = 16)
Idade (meses)	101,18 ± 38,4 ^a	99,63 ± 31,6 ^a
Sexo (feminino/masculino)	22/22	12/4
Escore de Shwachman	75 (40-85) ^b	-
Insuficiência pancreática	44	-
Doença hepática	17	-
Diabetes	3	-
ΔF508 homozigoto	14	-
ΔF508 heterozigoto / R1162X	2	-
	1	-
ΔF508 heterozigoto / N1303K	1	-
ΔF508 heterozigoto / G542X	23	-
	4	-
ΔF508 heterozigoto/ Desconhecido	34	-
	16	-
Staphylococcus aureus	11	-
Pseudomonas aeruginosa		
Pseudomonas aeruginosa mucoide	3	
Burkholderia cepacia		

CFTR, regulador de condutância transmembranar de fibrose cística.

^aDados paramétricos: significa ± o desvio-padrão.

^bDados não paramétricos: média (mínimo-máximo).

Tabela 2 Glóbulos brancos e glóbulos vermelhos em pacientes com fibrose cística e no grupo de indivíduos saudáveis.

Variáveis	Pacientes com FC	Indivíduos saudáveis	p*
GB (x10 ³ /mm ³)	9,91 (5,45-22,38)	6,39 (1,79-8,66)	< 0,001
LINFO (x10 ³)	3,89 (2,27-6,67)	2,79 (1,92-4,99)	0,006
MONO (x10 ³)	0,65 (0,11-3,44)	0,42 (0,24-0,91)	0,003
NEU (x10 ³)	4,82 (2,18-11,28)	3,13 (1,44-5,06)	0,001
GV (x10 ⁶ /mm ³)	4,91 (4,18-5,74)	4,82 (4,17-5,24)	0,087
HCT (%)	39,5 (34,1-45,3)	40,55 (34,1-45)	0,366
CH (g/dL)	13,05 (11,4-15,2)	13,35 (11,1-14,8)	0,503
HCM (pg)	27,1 (20,8-29,9)	28,4 (24,2-30,7)	0,011
CHCM (g/dL)	33,4 (29,7-35,3)	33 (30,5-34,5)	0,375
VCM (fL)	80,75 (69-88,1)	85,1 (79,2-89,7)	< 0,001

Dados expressos em média (mínimo - máximo).

CH, concentração de hemoglobina; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; GB, glóbulos brancos; GV, glóbulos vermelhos; HCM, hemoglobina corpuscular média; HCT, hematócrito; LINFO, linfócitos; MONO, monócitos; NEU, neutrófilos; VCM, volume corpuscular médio.

*Teste de Mann-Whitney

A quantidade de leucócitos totais foi maior no grupo de pacientes com FC. A hemoglobina corpuscular média (HCM) e o volume corpuscular médio (VCM) foram ambos menores nas crianças com FC.

A glutatona nos eritrócitos, a produção basal de ROS e a produção de ROS estimulada por PMA são mostradas na Figura 1. A GSH eritrocitária, a produção basal de ROS e a produção de ROS estimulada por PMA não diferem entre os grupos de pacientes saudáveis e os de com FC.

A Figura 2 mostra a concentração das citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6 e IL-10) nos sobrenadantes das culturas de CMSP, TGF- β 2 e imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e IgE) de pacientes com FC em comparação a crianças saudáveis.

Os pacientes com FC apresentaram uma produção espontânea significativamente maior de IL-6, TNF- α , IFN- γ e

IL-10 que os indivíduos saudáveis. A produção de IL-6 estimulada por PHA também foi maior em pacientes com FC. As crianças saudáveis apresentaram uma maior produção de TNF- α em CMSP estimuladas por BCG em comparação a pacientes com FC. No que diz respeito a outras condições de cultura, não houve diferença entre os dois grupos estudados. A concentração de TGF- β 2 no soro sanguíneo dos pacientes com FC foi maior que em crianças saudáveis.

As concentrações de IgA e IgM foram maiores em pacientes com FC, em comparação a indivíduos saudáveis. No que diz respeito a IgG e IgE, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

A IgA salivar não mudou entre os dois grupos, com média de 7 mg/dL (de 1,3 a 52,5 mg/dL) para pacientes com FC e 7,8 mg/dL (de 1,8 a 14,8 mg/dL) para crianças saudáveis.

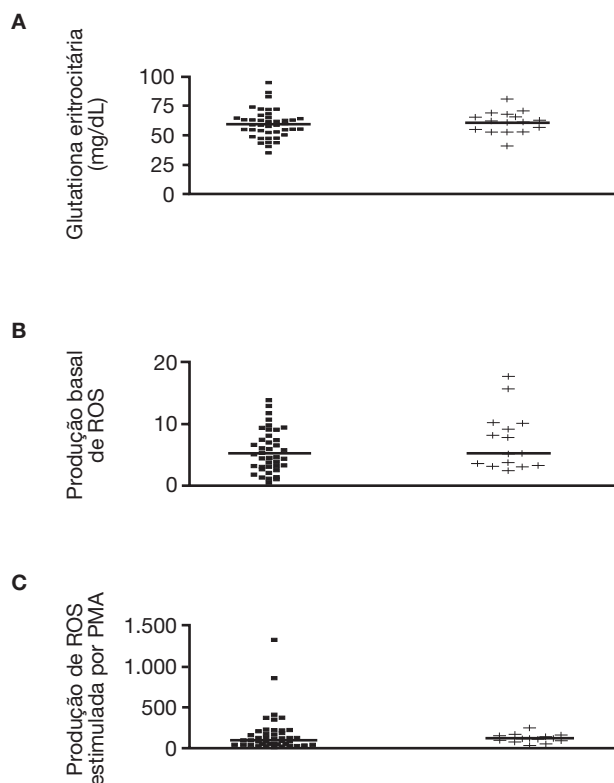


Figura 1 GSH nos eritrócitos, produção basal de ROS e produção de ROS estimulada por PMA de pacientes com FC (■) e crianças saudáveis (+). (A) Concentração de GSH nos eritrócitos (mg/dL), em pacientes com FC (■) $n = 42$ e normais (+) $n = 16$; (B) % (percentual) de produção basal de ROS, em pacientes com FC (■) $n = 44$ e normais (+) $n = 16$ (C); produção de ROS estimulada por PMA, em pacientes com FC $n = 44$ e normais (+) $n = 16$. Em todas as análises, $p > 0,05$. FC, fibrose cística; GSH, glutathiona; PMA, forbol 12-miristato 13-acetato; ROS, espécies reativas de oxigênio.

Houve uma correlação positiva entre o Escore de Shwachman e a produção de IL-6 em CMSP estimuladas por BCG ($p = 0,04$) e entre a produção de IFN- γ em CMSP estimuladas por BCG ($p = 0,03$) e as concentrações de IgA salivar ($p = 0,02$). Houve uma correlação negativa entre o Escore de Shwachman, a concentração de IgM em soro ($p = 0,04$) e a concentração de IgG em soro ($p = 0,004$).

Discussão

Analisando a produção de ROS por granulócitos periféricos, verificamos que pacientes com FC não mostraram diferenças na produção basal ou estimulada em relação ao grupo de crianças saudáveis. Diferentemente desses dados, os níveis de ROS de duas linhas celulares epiteliais do pulmão humano com FC estavam elevados em comparação a dois controles sem FC.⁹ O aumento da oxidação no epitélio respiratório resulta diretamente do não funcionamento da CFTR ou, indiretamente, da infiltração de células inflamatórias que produzem uma grande quantidade de peróxido de hidrogênio, bem como de um sistema antioxidante deficiente incapaz de controlar a produção de ROS.³

Em nosso estudo, observamos que a concentração de glutathiona em eritrócitos periféricos de pacientes com FC não foi diferente do grupo de indivíduos saudáveis. Outros autores divulgaram dados semelhantes, juntamente com uma relação inversa entre a GSH eritrocitária e a função pulmonar em pacientes adultos com FC.¹⁰ A mesma correlação foi identificada entre GSH linfocitária e a função pulmonar de crianças com FC.¹¹ Na porção apical do epitélio respiratório, foi observada uma redução de GSH e a CFTR foi responsável pelo transporte anormal desse tripeptídeo, o que pode indicar o envolvimento da CFTR na manutenção do estado redox das vias aéreas.¹²

Esse desequilíbrio entre agente oxidante/antioxidante associado ao metabolismo prejudicado das citocinas intracelulares de Ca^{+2} e pró-inflamatórias ativa os receptores do tipo toll (TLR) nas células epiteliais. A consequência é a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1), resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, levando ao agrupamento de neutrófilos e macrófagos na região, aumentando a produção de ROS.³

Conforme mostrado neste relatório, a produção de TNF- α estimulada por BCG em culturas de CMSP foi menor nos indivíduos com FC. Entretanto, a produção espontânea de células desta citocina foi maior nos pacientes com FC. Esses resultados podem indicar fraca memória celular para BCG em pacientes com FC. Por outro lado, a concentração sérica de TNF e - α em adultos e adolescentes com FC foi maior que em indivíduos normais.¹³

A concentração de TNF- α no fluido do lavado broncoalveolar e no escarro de crianças e adultos com FC foi elevada em comparação a indivíduos saudáveis¹⁴⁻¹⁷. Crianças com FC cronicamente infectadas com tiveram maiores níveis de TNF- α em seu escarro.¹⁸

O IFN- γ está intimamente envolvido no processo inflamatório e na função pulmonar dos pacientes com FC. Os resultados mostrados aqui revelam que há uma diferença com relação à produção espontânea de IFN- γ entre indivíduos normais e pacientes com FC, e que há uma correlação positiva entre o Escore de Shwachman e a produção de IFN- γ em CMSP estimuladas por BCG. Em um estudo realizado por Moser et al.,¹⁹ baixas quantidades de IFN- γ e altas quantidades de IL-4 foram observadas em CMSP de pacientes com FC infectados cronicamente por , quando comparadas a pacientes adultos não infectados. Na biópsia brônquica de pacientes com FC, uma maior concentração de IFN- γ foi associada a uma doença menos agressiva, ao passo que uma menor expressão foi associada a pacientes que apresentavam doença pulmonar aguda com exacerbações frequentes.²⁰ Portanto, pacientes com FC com alta concentração de IFN- γ e resposta predominante de células T auxiliares tipo 1 (T_H1) possuem melhor função pulmonar.

No estudo mencionado neste trabalho, nenhuma diferença na produção de IL-8 a partir de culturas de CMSP foi demonstrada entre pacientes com FC e indivíduos saudáveis. Uma alta concentração de IL-8 foi identificada no fluido do lavado broncoalveolar de pacientes com FC, mesmo quando não havia infecção.¹⁴ Contudo, outros estudos identificaram concentrações elevadas significativas apenas em pacientes que mostraram menor função pulmonar.²¹ A concentração de IL-8 no escarro também aumentou conforme mostrado em vários estudos.¹⁶⁻¹⁸

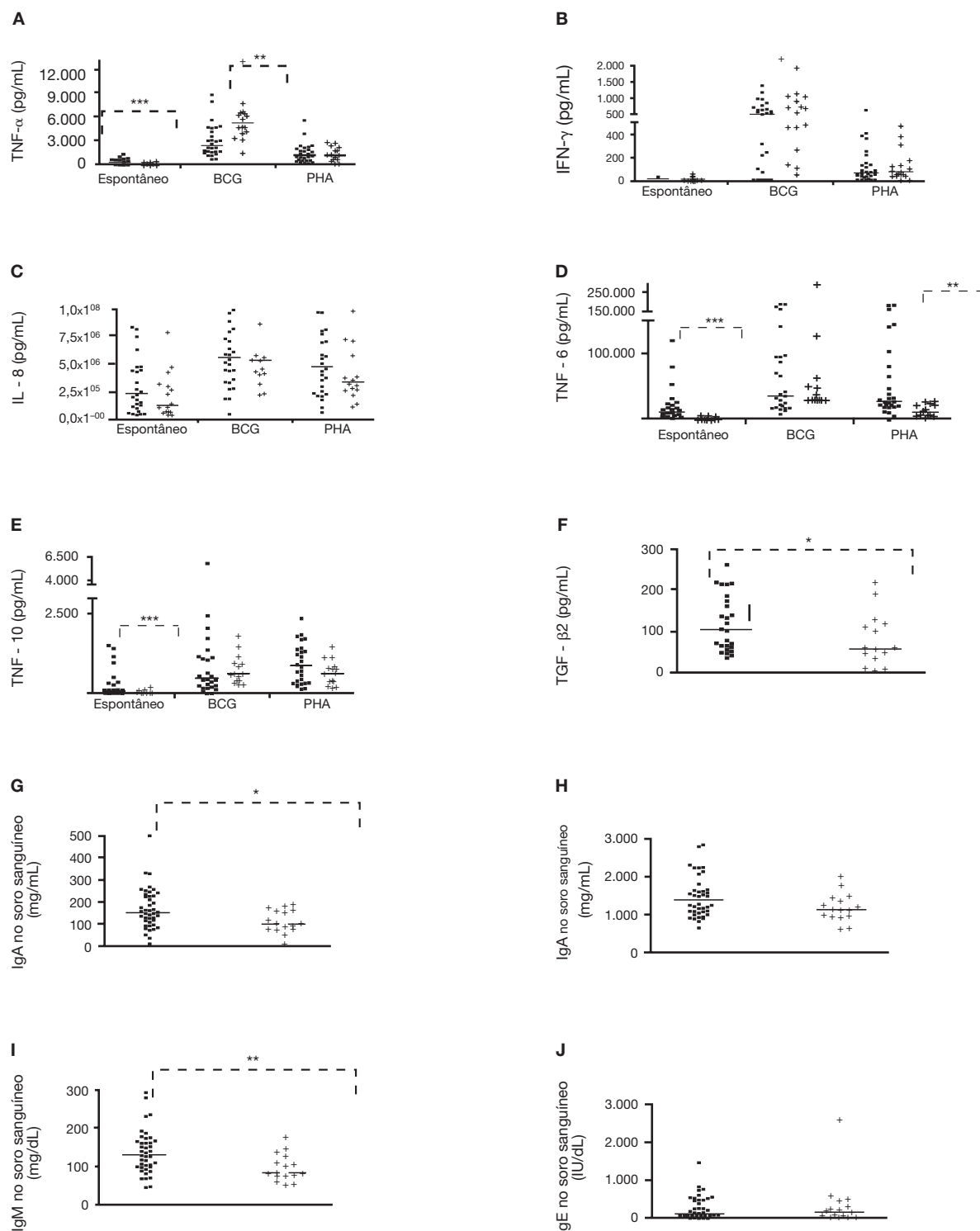


Figura 2 Concentração de citocina no sobrenadante da cultura de CMSP (TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-6 e IL-10) e concentração sérica de TGF- β 2 e imunoglobulina (IgA, IgG, IgM e IgE) em pacientes com FC (■) e crianças saudáveis (✚). A produção de citocina no sobrenadante da cultura de CMSP foi realizada em culturas não estimuladas (espontâneas), estimuladas por BCG ou PHA, por 48 horas. (A) Produção de TNF- α (pg/mL); (B) produção de IFN- γ (pg/mL); (C) produção de IL-8 (pg/mL); (D) produção de IL-6 (pg/mL); (E) produção de IL-10 (pg/mL); (F) concentração de TGF- β 2 (pg/mL) no soro sanguíneo; (G) concentração sérica de IgA (mg/dL); (H) concentração sérica de IgG (mg/dL); (I) concentração sérica de IgM (mg/dL); (J) concentração sérica de IgE (IU/dL). O teste estatístico foi o Mann-Whitney em * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. BCG: bacilos de Calmette-Guérin; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; IFN- γ , interferon- γ ; IgA, IgG, IgM, IgE, imunoglobulinas; PHA, fito-hemaglutinina; IL-10, IL-8 e IL-6, interleucinas; TGF- β 2, fator transformador do crescimento- β 2; TNF- α , fator de necrose tumoral- α .

Nossos resultados revelaram que, em culturas de CMSP em pacientes com FC, houve maior produção espontânea de IL-6, bem como em resposta ao PHA, e houve uma correlação positiva entre o Escore de Shwachman e a produção de IL-6 em CMSP estimuladas por BCG. Durante a exacerbação e o período de estabilidade clínica, a concentração sérica de IL-6 em pacientes adultos com FC aumentou, e somente após o tratamento com antibióticos os níveis séricos de IL-6 voltaram ao normal.²² A concentração de IL-6 no fluido do lavado broncoalveolar aumentou em pacientes com FC infectados com *M. tuberculosis*, similar ao que ocorreu com indivíduos normais não infectados.¹⁵ No escarro, os níveis de IL-6 foram significativamente mais baixos em pacientes com FC em comparação a indivíduos saudáveis.¹⁶ As IL-6 têm efeitos inflamatórios e anti-inflamatórios.²³

Em nosso estudo, encontramos maior produção de IL-10 em condições espontâneas e condições estimuladas por PHA em culturas de CMSP de pacientes com FC. O baixo nível de IL-10 também foi observado em culturas de CMSP de indivíduos com FC, na presença do toxoide tetânico em comparação a indivíduos saudáveis.²⁴ Bonfield et al., em 1995,¹⁵ foram os primeiros a mostrar que os níveis de IL-10 no fluido do lavado broncoalveolar de pacientes com FC eram significativamente menores em indivíduos saudáveis.

No estudo aqui relatado, os níveis de TGF- β 2 no soro sanguíneo de pacientes com FC estavam acima daqueles apontados em indivíduos saudáveis. Na biópsia brônquica de pacientes com FC, também foi encontrada uma maior expressão de TGF- β 1 em pacientes com doença pulmonar leve, ao passo que a concentração foi relativamente mais baixa em pacientes com frequente exacerbação.²⁰ Com relação a níveis plasmáticos de TGF- β 1, níveis normais foram encontrados em pacientes com função hepática normal e níveis baixos em pacientes com doenças hepáticas.²⁵

A maior produção celular espontânea de IL-10 e a maior concentração de TGF- β 2 no soro de pacientes com FC em relação a crianças normais poderiam ser uma resposta de adaptação ao estado inflamatório que ocorre nessa doença, uma vez que essas duas citocinas são consideradas moduladores de inflamação importantes. No que diz respeito a esses resultados, as taxas normais de produção de ROS por granulócitos e a concentração de glutathione em eritrócitos em pacientes com FC são justificáveis.

Nossas conclusões revelaram que os níveis de IgA salivar em pacientes com FC não diferiram daqueles em pacientes saudáveis, e houve uma correlação positiva entre o Escore de Shwachman e as concentrações de IgA salivar. Alguns pesquisadores relataram níveis elevados de IgA sérica e níveis normais de IgA salivar,²⁶ ao passo que outros documentaram um maior nível de IgA salivar e sérica em pacientes com FC, em comparação a indivíduos saudáveis.²⁷

A maioria dos pacientes com FC avaliados nesta pesquisa mostrou níveis séricos de IgA, IgG e IgM dentro dos parâmetros de normalidade, contudo, em comparação a indivíduos saudáveis, foi verificado que a concentração de IgA e IgM séricas foi maior em pacientes com FC e, também, que houve uma correlação negativa entre o Escore Shwachman e a concentração de IgM e IgG no soro. Alguns autores mostraram maiores concentrações de IgA, IgG, IgM séricas em pacientes com FC que em indivíduos normais ou asmáticos;

além disso, os níveis de IgG e suas subclasses apresentaram correlação com os níveis de IgA.²⁸

Em um estudo com 419 pacientes com FC, foi apontado que os pacientes com menos de 10 anos de idade apresentaram redução de IgG, contudo, indivíduos mais velhos apresentaram níveis normais ou mais elevados. Os autores concluíram que, com a evolução da doença pulmonar, esses pacientes se tornam mais suscetíveis a desenvolver hipergamaglobulinemia.²⁹ Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo prospectivo de cinco anos, no qual a hipogamaglobulinemia G foi associada ao peso ideal para a idade, um número menor de internações por exacerbações pulmonares, menos colonização por *M. tuberculosis*, e, conseqüentemente, menor redução da função pulmonar com o passar do tempo.³⁰

Pacientes com FC sofrem de colonização das vias aéreas e infecção por uma diversidade de organismos, nos quais as respostas imunes do hospedeiro levam a inflamação crônica e insuficiência respiratória.³¹ e micobactéria não tuberculosa (MNT) estão entre esses patógenos oportunistas.³² Os pacientes com FC, neste estudo, apresentaram uma prevalência elevada de colonização por *M. tuberculosis* (77%) e *M. avium* (36%), e vários desses já foram colonizados por mucoide. A infecção por afeta a longevidade de pacientes com FC.³³ Inicialmente, a infecção ocorre em períodos diferentes e é não-mucoide. Com o tempo, a *M. tuberculosis* se torna mucoide e pode levar à formação de biofilme, com resistência elevada à ação de antibióticos e respostas imunes inatas.³⁴

Nossos resultados mostraram que pacientes com FC possuem diversas alterações pequenas, porém significativas, em comparação a crianças saudáveis, como uma quantidade maior de leucócitos totais, maior produção espontânea de interleucinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , IFN- γ , bem como mediadores anti-inflamatórios IL-10 e TGF- β 2. Esses mediadores são importantes para impedir a entrada do patógeno na corrente sanguínea e que ele se espalhe, por meio do sangue, para os órgãos de todo o corpo. As maiores concentrações séricas de IgA e IgM entre nossos pacientes com FC podem ser devidas a essa resposta imune adaptativa que tem falhado em controlar adequadamente a infecção pulmonar e a evolução da doença pulmonar crônica. Adicionalmente, os fatores de risco exatos para infecção por micobactéria não tuberculosa continuam, em grande parte, desconhecidos. A capacidade de controlar a infecção por intracelular depende da imunidade celular e da geração de uma forte resposta das células T auxiliares tipo 1 (T_H1) ao TNF- α ou IL-1 β .³⁵ A menor produção de TNF- α a partir de cultura de CMSP estimuladas por BCG observada em pacientes com FC pode estar associada ao maior risco de infecção por micobactéria não tuberculosa. Entender esses aspectos será essencial para o desenvolvimento de melhores terapias para FC.³⁶ É necessária pesquisa adicional para esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na inflamação da FC e seu impacto sobre os resultados clínicos.

Conclusão

Foi verificada maior produção espontânea de TNF- α , IL-6, IL-10 e concentração de IL-6 estimulada por PHA em culturas de CMSP de pacientes com FC, bem como maior con-

centração de TGF- β 2, IgA e IgM em seu soro. Por outro lado, indivíduos saudáveis tiveram um aumento na produção de TNF- α estimulada por BCG. Portanto, concluímos que, mesmo em pacientes com FC clinicamente estáveis, ocorre um maior estímulo do sistema imunológico (imunidade humoral e celular) em comparação a indivíduos saudáveis.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373:1891-904.
- Cheung JC, Kim Chiaw P, Pasyk S, Bear CE. Molecular basis for the ATPase activity of CFTR. *Arch Biochem Biophys*. 2008;476:95-100.
- Rottner M, Freyssinet JM, Martínez MC. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res*. 2009;10:23.
- Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 2012;18:509-19.
- Beutler E, editor. *Red Cell Metabolism*. New York: Churchill Livingstone; 1986. p. 126.
- Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods*. 1990;131:269-75.
- Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods*. 1998;219:187-93.
- Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1996;195:63-72.
- Boncoeur E, Criq VS, Bonvin E, Roque T, Henrion-Caude A, Gruenert DC, et al. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:432-46.
- Mangione S, Patel DD, Levin BR, Fiel SB. Erythrocytic glutathione in cystic fibrosis. A possible marker of pulmonary dysfunction. *Chest*. 1994;105:1470-3.
- Lands LC, Grey V, Smountas AA, Kramer VG, McKenna D. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. *Chest*. 1999;116:201-5.
- Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol*. 1999;277:L113-8.
- Norman D, Elborn JS, Cordon SM, Rayner RJ, Wiseman MS, Hiller EJ, et al. Plasma tumour necrosis factor alpha in cystic fibrosis. *Thorax*. 1991;46:91-5.
- Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1995;20:63-70.
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:2111-8.
- Osika E, Cavallion JM, Chadelat K, Boule M, Fitting C, Tournier G, et al. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J*. 1999;14:339-46.
- Karpati F, Hjelte FL, Wretling B. TNF-alpha and IL-8 in consecutive sputum samples from cystic fibrosis patients during antibiotic treatment. *Scand J Infect Dis*. 2000;32:75-9.
- Pukhalsky AL, Kapranov NI, Kalashnikova EA, Shmarina GV, Shabalova LA, Kokarotseva SN, et al. Inflammatory markers in cystic fibrosis patients with lung *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mediators Inflamm*. 1999;8:159-67.
- Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Høiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS*. 2000;108:329-35.
- Wojnarowski C, Frischer T, Hofbauer E, Grabner C, Mosgoeller W, Eichler I, et al. Cytokine expression in bronchial biopsies of cystic fibrosis patients with and without acute exacerbation. *Eur Respir J*. 1999;14:1136-44.
- Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE, Leigh MW. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1997;175:638-47.
- Nixon LS, Yung B, Bell SC, Elborn JS, Shale DJ. Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1764-9.
- Nichols D, Chmiel J, Berger M. Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;34:146-62.
- Moss RB, Bocian RC, Hsu YP, Dong YJ, Kemna M, Wei T, et al. Reduced IL-10 secretion by CD4+ T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Clin Exp Immunol*. 1996;106:374-88.
- Rosensweig JN, Omori M, Page K, Potter CJ, Perlman EJ, Thorgeirsson SS, et al. Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr Res*. 1998;44:402-9.
- South MA, Warwick WJ, Wolheim FA, Good RA. The IgA system. 3. IgA levels in the serum and saliva of pediatric patients-evidence for a local immunological system. *J Pediatr*. 1967;71: 645-53.
- Gugler E, Pallavicini JC, Swedlow H, Zipkin I, Agnese PA. Immunological studies of submaxillary saliva from patients with cystic fibrosis and from normal children. *J Pediatr*. 1968;73:548-59.
- Hodson ME, Morris L, Batten JC. Serum immunoglobulins and immunoglobulin G subclasses in cystic fibrosis related to the clinical state of the patient. *Eur Respir J*. 1988;1:701-5.
- Matthews WJ Jr, Williams M, Oliphint B, Geha R, Colten HR. Hypogammaglobulinemia in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1980;302:245-9.
- Wheeler WB, Williams M, Matthews WJ Jr, Colten HR. Progression of cystic fibrosis lung disease as a function of serum immunoglobulin G levels: a 5-year longitudinal study. *J Pediatr*. 1984;104:695-9.
- Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology*. 2007;153:917-23.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367-416.
- Kremer TM, Zwerdling RG, Michelson PH, O'Sullivan P. Intensive care management of the patient with cystic fibrosis. *J Intensive Care Med*. 2008;23:159-77.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-22.
- Ottenhoff TH. New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. *Trends Microbiol*. 2012;20:419-28.
- Pier GB. The challenges and promises of new therapies for cystic fibrosis. *J Exp Med*. 2012;209:1235-9.