

Perfil de citocinas e tipificação de HLA em pacientes com polipose nasossinusal tolerantes e intolerantes a aspirina

Cytokines profile and HLA typing in tolerant and non-tolerant patients to aspirin with nasossinusal polyposis

Helena M. G. Becker¹, Roberto E. S. Guimarães¹,
Evaldo Nascimento², Celso G. Becker, Denise Utsch
Gonçalves³, Paulo F. T. B. Crosara⁴

Palavras-chave: pólipo nasal, aspirina, citocinas, antígenos HLA.
Key words: nasal polyps, aspirin, cytokines, HLA antigen.

Resumo / Summary

A infiltração eosinofílica do pólipo nasossinusal (PNS) associado à intolerância aspirínica (IA) é característica relevante. Diversos mediadores participam da migração dos eosinófilos para os tecidos. A IA decorre do aumento da síntese de leucotrienos em indivíduos geneticamente susceptíveis. **Objetivo:** Analisar o perfil de citocinas e a tipificação de HLA-A, B e DR em pacientes com PNS tolerantes e intolerantes à aspirina. **Forma de estudo:** Estudo de coorte transversal. **Material e método:** selecionando-se 45 pacientes: 15 portadores de PNS eosinofílica tolerantes à aspirina (grupo TA); 15 de PNS eosinofílica associada à intolerância aspirínica, manifestada por broncoespasmo (grupo IA) e 15 sem PNS, que apresentavam desvio de septo nasal (grupo controle). O perfil de citocinas (IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IFN- γ e TNF- α) foi pesquisado nos fragmentos de pólipo nasal ou de mucosa de concha média (grupo controle) através da reação reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR). A tipificação de HLA-A, B e DR foi realizada através de teste sorológico de microcitotoxicidade ou por amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados:** A expressão de RNAm para as interleucinas 4, 5, 6, 8, 10, IFN- γ e TNF- α foi semelhante nos três grupos. A expressão de RNAm para IL-2 associou-se com a IA. Os pacientes portadores dos antígenos A11, B49, DR15 e DR13 apresentaram uma maior probabilidade de desenvolver polipose nasossinusal não relacionada à IA, enquanto os portadores de DR17 apresentaram uma maior probabilidade de desenvolver polipose nasossinusal associada à intolerância aspirínica (Triade Aspirínica). **Conclusão:** A polipose nasossinusal associada à intolerância aspirínica (Triade Aspirínica) mostrou associação significativa com HLA- DR17 e IL-2, sugerindo um perfil de citocinas TH₁.

The eosinophilic infiltration in the nasossinusal polyp associated with intolerance to aspirin is predominant feature. Several mediators play a role in the migration of the eosinophils to the tissues. The IA may be due to overexpression of leukotrienes in genetically susceptible subjects. **Aim:** The purpose of this study was to evaluate the cytokine pattern and HLA-A, B and DR typing in subjects with PNS tolerant and intolerant to aspirin. **Study design:** A transverse cohort study. **Material and method:** was conducted on 45 patients: 15 patients suffering from eosinophilic PNS and aspirin tolerance (group TA); 15 from eosinophilic PNS associated with aspirin intolerance, the latter manifested by bronchospasm (group IA), and 15 without PNS who had nasal septum deviation (control group). Cytokine pattern (IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IFN- γ and TNF- α) was evaluated in samples from the nasal polyp or middle turbinate mucosa (control group) of the patients using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). HLA-A, B and DR typing was performed using the serum microcytotoxicity test or by DNA amplification using polymerase chain reaction (PCR). **Results:** mRNA expression for interleukines 4, 5, 6, 8, 10, IFN- γ and TNF- α was similar in the three groups. mRNA expression for IL-2 was associated with IA. Patients with antigens A11, B49, DR15 and DR13 had a higher likelihood of developing PNS not-related to intolerance to Aspirin, whereas patients with DR17 had a higher likelihood of developing PNS associated with intolerance to Aspirin (Aspirin Triad). **Conclusion:** PNS associated with intolerance to Aspirin (Aspirin Triad) shows a significant association with HLA- DR17 and IL-2, suggesting a TH₁-lymphocyte-activation pattern.

¹ Professor(a) Adjunto(a) do Departamento de Otorrinolaringologia, Oftalmologia e Fonoaudiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

² Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Acadêmica de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Residente de Otorrinolaringologia, Minas Gerais.

⁴ Médico Otorrinolaringologista, Doutorando em Oftalmologia pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Instituição à qual o trabalho está vinculado: Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia da Faculdade de Medicina - UFMG

Autora responsável pela correspondência: Helena Maria Gonçalves Becker - Av. Pasteur 88, 4º andar Belo Horizonte MG 30150-290

Tel/Fax (0xx31) 3222-2891 - E-mail: hbecker@medicina.ufmg.br

Trabalho apresentado no 36º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia (SBORL) em Florianópolis/SC, no período de 19 a 23 de novembro de 2002.

Artigo recebido em 24 de fevereiro de 2003. Artigo aceito em 13 de maio de 2003.

INTRODUÇÃO

A tríade aspirínica – polipose nasossinusal, asma e intolerância aspirínica (IA) foi inicialmente descrita por Widal e Samter^{1,2}. A IA manifesta-se principalmente por broncoespasmo, ocorrendo também após ingestão de outros antiinflamatórios não esteróides (AINE), inibidores de ciclooxigenase (COX)-1, corantes e aditivos alimentares e álcool.

A intolerância à aspirina e a outros AINE associada à PNS não é mediada por IgE e manifesta-se três a quatro vezes mais freqüentemente por broncoespasmo do que por urticária/angioedema, o oposto do encontrado na população em geral^{3,4}.

A Tríade Aspirínica é relativamente comum, afetando 2-3% de todos os adultos asmáticos. A prevalência elevou-se de 8 para 28% quando foi realizado o teste de provocação oral à aspirina e nos pacientes com asma de difícil controle e que geralmente requer terapia com corticosteróide. A tríade mantém um curso evolutivo apesar de se evitar aspirina e mesmo com o uso de drogas que induzem a reação cruzada^{3,5}.

Considerando-se os pacientes portadores de PNS, a prevalência da IA varia de 5% a 35%, podendo ser observada em até 80% dos casos agudos e recidivantes⁵⁻⁷.

A teoria mais aceita na fisiopatologia da intolerância aspirínica sugere que, em pessoas sensíveis, a aspirina e os AINE apresentariam uma ação farmacológica inibitória sobre a atividade da prostaglandina sintetase-ciclooxigenase (COX), inibindo as COX-1 e COX-2 em todas as células, resultando em interrupção da síntese da prostaglandina (PG) E₂ e seus efeitos moduladores nas células inflamatórias e na superprodução de cisteinil-leucotrienos (Cis-LT) pelo direcionamento para a via da lipooxigenase (LOX). Os leucotrienos são substâncias broncoconstritoras e quimiotáticas. Evidências indicaram que os AINE inibidores altamente seletivos de COX-2 foram bem tolerados por esses pacientes, revelando que é a inibição da COX-1 que desencadeia o broncoespasmo em pacientes susceptíveis. A enzima terminal na produção de Cis-LT, a LTC₄-sintase, é expressada em mastócitos e, principalmente, em eosinófilos da maioria dos pacientes com asma induzida por aspirina (AIA). Uma variante alélica da LTC₄-sintase que aumenta a transcrição enzimática parece estar associada com a AIA. A infiltração eosinofílica da mucosa respiratória parece ser a manifestação central da AIA, e os eosinófilos são os principais produtores de LT. A liberação de proteína catiônica eosinofílica (ECP) aumenta com a provocação por aspirina. A expressão de IL-5 na via respiratória, conhecida envolvida no recrutamento, ativação, maturação e na perpetuação de eosinófilos, apresenta-se aumentada na AIA^{8,9}.

O desenvolvimento e a diferenciação dos eosinófilos na medula óssea envolveram as citocinas GM-CSF, IL-3 e IL-5. Esta última foi mais importante na diferenciação e produção dos eosinófilos, bem como na liberação de eosinófilos já

desenvolvidos da medula para a circulação. Os fatores quimiotáticos para eosinófilos em direção aos sítios de inflamação são múltiplos e incluem mediadores lipídicos, componentes do complemento, citocinas e quimiocinas¹⁰.

As citocinas desempenham papel fundamental na regulação dos processos biológicos, tais como: no crescimento e ativação celular, quimiotaxia, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e na morfogênese. A resposta imune pode ser avaliada de acordo com o perfil de citocinas secretadas pelos linfócitos CD4+. Assim, na resposta imune do tipo Th1 estão envolvidas as citocinas IL-2, IL-12 e IFN- γ e na do tipo Th2 há secreção de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10. As células Th1 participam das reações de citotoxicidade, inflamação e estão envolvidas na defesa do hospedeiro contra doenças virais, microbianas e neoplásicas. As células "Th2" atuam principalmente na resposta imune humoral, produzindo anticorpos em reações atópicas e para a defesa do hospedeiro contra doenças parasitárias.

Na comparação entre a expressão de citocinas em pólipos alérgicos e não alérgicos¹¹, observou-se a existência de diferentes mecanismos envolvidos no acúmulo de eosinófilos nesses pacientes. Na alergia, os mecanismos de acúmulo de eosinófilos envolveriam a produção das citocinas IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF, tipo Th2. Na PNS eosinofílica não alérgica e na associação com IA, haveria a produção de IL-3 e GM-CSF e IFN- γ independente de IL-4, IL-5, sendo o IFN- γ a citocina mais distinguível nesses grupos, o que sugere a hipótese da predominância de Th1. Assim, a IL-4 e a IL-5 teriam sua importância restrita ao processo alérgico^{3,12}. No entanto, posteriormente Min et al.¹³, Bachert et al.¹⁴ e Lee et al.¹⁵ não observaram diferenças significativas entre as concentrações de IL-4, IL-5 e IFN- γ em pólipos alérgicos e não alérgicos, sugerindo que a alergia não representava um papel importante na patogênese do pólipo nasal.

A teoria que melhor explicou o acúmulo de eosinófilos nos pólipos nasais foi bem descrita por Jankowski¹⁶: os eosinófilos podiam secretar várias citocinas, especialmente IL-3, IL-5 e GM-CSF. Estas citocinas prolongavam a sobrevivência do eosinófilo *in vitro*, aumentavam várias funções metabólicas e estavam também envolvidas na migração dessas células para os tecidos. Com o acúmulo de eosinófilos na lâmina própria, ocorria a liberação de uma grande variedade de citocinas, proteínas derivadas de grânulos básicos (MBP, ECP, EDN, EPX) e mediadores lipídicos, tendo como consequência a inflamação e o edema. Posteriormente, a IL-5 foi apontada por diversos autores como a principal citocina responsável pela eosinofilia nos pólipos nasais, independentemente de processo alérgico, afirmando que o atraso da apoptose dos eosinófilos no estroma dos pólipos era mediado por IL-5 e não por GM-CSF, o que enfatiza o estímulo autócrino da IL-5 na sua ativação e sobrevivência dentro do tecido^{13-15,17,18}.

A abundância de eosinófilos nos pólipos nasais parece ser explicada pelo aumento da migração dos eosinófilos para

os tecidos e pelo aumento da sobrevivência dessas células, mas o mecanismo patológico no qual esses eosinófilos contribuem para a lesão tecidual, o processo inflamatório e formação dos pólipos, ainda não está bem esclarecido. A utilização de diferentes técnicas de exames: hibridização *in situ*, imunohistoquímica, ELISA e RT-PCR no estudo de biópsias de pólipos nasais, sem haver uma padronização de nomenclatura, principalmente da etiologia da PNS, levou a diferentes conclusões quanto à participação dessas citocinas, o que tornou difícil uma comparação¹⁴.

Utilizando RT-PCR e Southern Blot na análise de pólipos nasais de pacientes com IA, Simon et al.¹⁷ detectaram RNAm para IL-5, IL-1 β , I α em todos os pólipos, sendo o RNAm para IL-3 e IFN- γ detectados somente em alguns casos.

Já Min et al.¹³ analisaram pólipos alérgicos e não alérgicos, também por PCR, e não encontraram diferença na expressão de RNAm e na média da densidade do raio da banda positiva para IL-4, IL-5 e IFN- γ . No entanto a expressão de RNAm para IL-4 e IL-5 foi mais freqüente nos pólipos não alérgicos que na mucosa de concha nasal.

As citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TGF- β e IFN- γ e foram detectadas em pólipos alérgicos e não alérgicos e ocasionalmente na mucosa nasal¹⁵. Os autores concluíram que todas essas citocinas estudadas participavam da patogênese do pólipo nasal, independentemente da presença ou ausência de alergia, e que a eosinofilia dependeria de IL-4 e IL-5, mas que a expressão dessas duas citocinas deveria ser explicada por outro mecanismo imunológico e não por resposta imune do tipo 1.

Avaliações imunogenéticas em seres humanos sugerem que a susceptibilidade a doenças genéticas está relacionada com antígenos HLA. Resultados conflitantes na associação entre antígenos HLA classe I e II foram relatados por Luxenberger et al.¹⁹ os quais não encontraram associação positiva entre os antígenos A1, B8 e IA. Entretanto, observaram uma associação estatisticamente significativa entre o antígeno A74 e PNS.

Mullarkey et al.²⁰ detectaram um aumento significativo da freqüências de HLA-DQw2 em pacientes com AIA, mas Lympany et al.²¹ não confirmaram essa associação, mas observaram um aumento na freqüência do alelo DPB1*1401. A seguir, Dekker et al.²² detectaram uma forte associação entre AIA e HLA-DPB1*0301, o qual difere do DPB1*1401 por apenas um aminoácido, o que sugere que estes alelos apresentam uma função semelhante. Molnar-Gabor et al.²³, utilizando PCR, demonstraram que pacientes com HLA-DR7-DQA1*0201 e DQB1*0202 apresentaram risco duas a três vezes maior de desenvolverem a PNS e observaram, também, uma relação estatisticamente significativa entre IA e HLA-DR7, sugerindo que a IA e PNS representava uma forma particular de PNS.

O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de citocinas (RT-PCR) e a freqüência dos antígenos HLA de classe I e II em pacientes com polipose nasossinusal eosinofílica tolerantes e intolerantes à aspirina.

MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionados 45 pacientes adultos, não alérgicos, do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UFMG: Grupo IA – 15 pacientes com IA (intolerantes à aspirina) portadores de PNS eosinofílica e história clínica de IA manifestada por broncoespasmo; sendo 9 pacientes do sexo feminino, com idade variando de 19 a 58 anos e média de 37,27 anos; Grupo TA – 15 pacientes com TA (tolerantes à aspirina) portadores de PNS eosinofílica e ausência de IA; sendo 8 pacientes do sexo feminino, com idade variando de 27 a 69 anos e média de 44,6 anos. Grupo controle – 15 pacientes sem PNS, sem eosinofilia da mucosa nasal e ausência de IA, portadores de desvio do septo nasal de etiologia traumática; sendo 2 pacientes do sexo feminino, com idade variando de 17 a 69 anos e média de 39,87 anos.

Todos os pacientes assinaram o consentimento pós-informado para este estudo, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa médica.

A presença de alergia nasal foi excluída por história clínica e teste cutâneo. A presença de PNS foi confirmada por endoscopia nasossinusal. A eosinofilia do pólipo nasal (>30%)²⁴ foi observada após biópsia e coloração do fragmento com HE.

A intolerância aspirínica, manifestada por broncoespasmo foi diagnosticada por história clínica nos pacientes do grupo IA. O teste de provocação oral à aspirina foi realizado nos pacientes com história pregressa negativa de IA (grupos TA e controle) para se confirmar a ausência de IA. Considerou-se positiva a redução do volume expiratório forçado em um segundo igual ou superior a 20%. Para a realização do teste de provocação à aspirina, observou-se a não utilização de broncodilatador nas 72 horas precedentes.

Antes de submeter os pacientes ao teste cutâneo, as biópsias nasais para a histopatologia e perfil de citocinas, observou-se a não utilização de corticóide tópico ou sistêmico e anti-histamínicos por pelo menos 30 dias.

O perfil de citocinas foi pesquisado no fragmento de mucosa de concha média (grupo controle) ou pólipo nasal (grupos IA e TA), submetidos a preparo para obtenção de RNA e posterior análise por eletroforese por meio da reação reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR), analisando as transcrições: IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IFN- γ ; TNF- α e β -actina (Tabela 1).

A tipificação de HLA-A, B e DR foi realizada por meio de teste sorológico (leucócitos purificados) de microcitotoxicidade para HLA A e B e por amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase pelo método usando iniciadores específicos (SSP-PCR) para HLA DR. As freqüências gênicas de alelos HLA-A, B e DR publicada em indivíduos de uma população miscigenada de Belo Horizonte e do Rio de Janeiro^{25,26} foram usadas como controle.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na transcrição reversa-PCR para citocinas.

Primers	5'específico	3'específico
IL-2	ACTCACCAGGATGCTCACAT	AGGTAATCCATCTGTTCAGA
IL-4	CCTCTGTTCTTCCTGCTAGCATGTGCC	CAACGTAATCTGTTGGCTTCCTTCAC
IL-5	ATGAGGATGCTTCTGCATTTG	TCAACTTTCTATTATCCACTCGGTGTTTCATTAC
IL-6	ATGTAGCCGCCCCACACAGA	CATCCATCTTTTTTCAGCCAT
IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG	TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAACCTTCTC
IL-10	ATGCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA	TCTCAAGGGGCTGGGTGAGCTATCCCA
IFN- γ	AGTTATATCTTGGCTTTTCA	ACCGAATAATTAGTCAGCTT
TNF- α	TCTCGAACCCGAGTGACAA	TATCTCTCAGCTCCACGCCA
β - actina	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	CTCCTTAATGTCACGCAGTATTC

Pacientes	IA								Pacientes	TA								Pacientes	Controles								
	Citocinas									Citocinas									Citocinas								
	A	B	C	D	E	F	G	H		A	B	C	D	E	F	G	H		A	B	C	D	E	F	G	H	
1									16									31									
2									17										32								
3									18										33								
4									19										34								
5									20										35								
6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	21										36								
7									22										37								
8									23										38	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
9									24										39	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10									25										40								
11									26										41								
12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	27										42								
13									28										43								
14									29										44								
15	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR		45								
%	100	75	66,7	75	66,7	50	91,7	58,3		78,6	78,6	64,3	64,3	57,1	85,7	50	85,7		84,6	69,2	76,9	69,2	69,2	61,5	69,2	61,5	

Figura 1. Sumário da expressão de citocinas: A - TNF- α , B - IL-6, C - IL-8, D - IL-10, E - INF- γ , F - IL-4, G - IL-2, H - IL-5, por células presentes nos polípos dos pacientes dos grupos IA e TA e na mucosa nasal dos pacientes do grupo Controle. Produto de amplificação positiva indicado nos retângulos escuros. NR = não realizados. % indica o número de células positivas.

Nas análises estatísticas utilizou-se o teste Qui-Quadrado de Pearson, fixando-se em 5% o nível de significância.

RESULTADOS

A expressão de citocinas nos pólipos foi analisada em 12 pacientes do grupo IA, 14 pacientes do grupo TA e na mucosa da concha média de 13 pacientes do grupo controle (Figura 1). As perdas ocorreram durante a conservação e processamento das biópsias.

Comparando-se a expressão das citocinas (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ , IL-4, IL-2 e IL-5) não se evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os três

grupos. No entanto, no nível de 7%, houve diferença na expressão de IL-2 ($p = 0,072$) (Tabela 2), decorrente da diferença entre os grupos TA e IA ($p = 0,022$), em que a IL-2 estava presente em 92% dos casos do grupo IA e em 50% dos TA. A análise entre os grupos IA e controle e TA e controle não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Os antígenos não identificados foram excluídos. Compararam-se as freqüências de: HLA-A entre os grupos IA ($n = 25$), TA ($n = 30$) e controle ($n = 190$); HLA-B entre os grupos IA ($n = 28$), TA ($n = 29$) e controle ($n = 190$) e HLA-DR entre os grupos IA ($n = 29$), TA ($n = 27$) e controle ($n = 349$) (Tabela 3). Todas as diferenças estatísticas encontradas abaixo do nível de 10% foram analisadas e observou-se que:

Tabela 2. Comparação entre a proporção de pacientes e a expressão das citocinas nos grupos IA, TA e do grupo controle.

Variável	IA, TA e controle Valor p
TNF- α	0,250
IL-6	0,855
IL-8	0,756
IL-10	0,840
INF- γ	0,788
IL-4	0,139
IL-2	0,072
IL-5	0,245

Tabela 3. Comparação das freqüências de antígenos HLA-A, B e DR nos grupos IA, TA e do grupo controle.

HLA-A	Grupos IA, TA e controle Valor p	HLA - B	Grupos IA, TA e controle Valor p	HLA - DR	Grupos IA, TA e controle Valor p
1	0,366	7	0,10	1	0,848
2	0,572	8	0,571	15	0,023
3	0,678	14	0,403	17	0,079
11	0,003	15	0,290	4	0,955
23	0,329	18	0,573	11	0,100
30	0,756	35	0,820	13	0,034
33	0,453	42	0,315	7	0,447
68	0,719	44	0,703	8	0,863
	49	0,008			
	51	0,879			

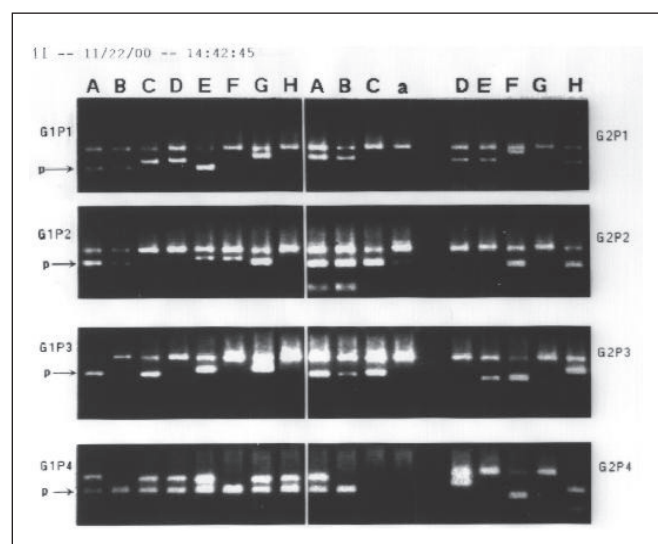


Figura 2. Reação reversa em cadeia da polimerase (RT-PCR) representando os produtos das expressões das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B), IL-8 (C), L-10 (D), INF- γ (E), IL-4 (F), IL-2 (G), IL-5 (H) e a = actina, por células presentes nos pólipos de pacientes (P1,2,3,4) dos grupos (G1,2) I-IA e II-TA. Fragmentos corados com brometo de etídio em agarose a 2%. RT- Transcriptase reversa

- Na freqüência do antígeno A11, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos IA e TA ($p=0,337$) e entre o grupo IA e o controle ($p=0,100$). No entanto, houve diferença entre o grupo TA e o controle ($p=0,001$; OR=7,40; IC=1,95 – 28,11), na qual o antígeno A11 estava presente em 17% dos casos no grupo TA e em somente 3% dos casos no grupo controle.
- Na freqüência do antígeno B49, não houve diferença nas comparações entre os grupos IA e TA ($p=0,337$) e entre o grupo IA e controle ($p>0,10$). No entanto, houve diferença significativa entre o grupo TA e o controle ($p = 0,002$; OR=7,44; IC=1,69-32,58), no qual o antígeno B49 estava presente em 13% no grupo TA e em somente 2% no grupo controle.

A Figura 2 ilustra a tipificação de antígenos HLA-DR de dois pacientes por PCR. Analisando-se as associações estatisticamente significantes ($p<0,10$) envolvendo o HLA-DR 15, 13 e 17, encontrou-se que: a) Houve uma diferença entre o grupo TA e o controle ($p = 0,023$; OR=3,94; IC=1,32-11,82), na qual o antígeno HLA-DR15 estava presente em cerca de 19% dos casos no grupo TA e em somente 5% dos casos no grupo controle. b) Houve uma diferença entre o grupo TA e o controle ($p = 0,009$; OR=3,24; IC=1,25-8,38), na qual o antígeno HLA-DR13 estava presente em cerca de 26% dos casos no grupo TA e em somente 10% dos casos no grupo controle. c) Houve uma diferença entre o grupo IA e controle ($p = 0,035$; OR=2,99; IC=1,02-8,75), na qual o antígeno DR17 estava presente em cerca de 17% dos casos no grupo IA e em somente 7% dos casos no grupo controle.

DISCUSSÃO

Utilizando RT-PCR, a expressão de RNAm para IL-5 foi observada em todos os pólipos alérgicos e não alérgicos e na associação com IA e não foi observada na mucosa da concha nasal^{15,17}. No presente estudo, a freqüência da expressão de RNAm para IL-5 foi semelhante nos grupos IA (58,3%), grupo TA (85,7%) e grupo controle (61,5%) e, diferentemente da literatura, não se observou a expressão de IL-5 em todos os pólipos.

A expressão de RNAm para IL-4, para INF- γ , para IL-6 e IL-8 foi observada em todos os pólipos alérgicos e não alérgicos^{13,15} e não foi detectada na associação com IA¹⁷. No presente estudo, a freqüência da expressão de RNAm para IL-4 foi semelhante nos grupos IA (50%), TA (85,7%) e controle (61,5%); a freqüência da expressão de RNAm para INF- γ foi semelhante nos grupos IA (66,7%), TA (57,1%) e controle (69,2%) e as freqüências da expressão de IL-6 e IL-8 não foram diferentes entre os grupos IA, TA e controle, nem tampouco se observou a sua expressão em todos os pacientes de um mesmo grupo.

Na presente observação, a única citocina, expressa por todos os pacientes portadores de IA foi o TNF- α , achado também observado por Simon et al.¹⁷.

A frequência de expressão de RNAm para IL-10 não é comumente descrita na literatura mundial, utilizando-se RT-PCR. Essa expressão não foi diferente entre os grupos IA, TA e controle.

Uma associação positiva entre a expressão de IL-2 no grupo IA e em relação ao grupo TA foi observada neste estudo. Weller¹⁰ relatou que os eosinófilos expressam receptores de IL-2 e que esta citocina mediava a resposta migratória dos eosinófilos. Os achados deste estudo sugerem o envolvimento de uma resposta do tipo Th1 na associação com IA semelhante ao descrito por Schapowal³ e Hamilos¹¹ e que a IL-2 pode ter um papel importante na PNS associada a IA.

Aumento significativo das frequências de HLA-A, B e DR em pacientes com AIA e PNS são controversos²¹⁻²³. Nos pacientes deste estudo, não se observou diferenças estatisticamente significativas na tipificação de HLA-A, B e DR quando se comparou os grupos IA e TA. No entanto, observou-se uma associação positiva entre o grupo TA e os antígenos A11 ($p=0,001$), B49 ($p=0,002$), DR15 ($p=0,023$), DR13 ($p=0,009$) e entre o grupo IA e o antígeno DR17 ($p=0,035$) em relação ao grupo controle (população brasileira). Os pacientes portadores dos antígenos A11, B49, DR15 e DR13 tiveram uma maior probabilidade de apresentar PNS não relacionada a IA enquanto os portadores de DR17 tiveram uma maior probabilidade de apresentar PNS e IA (tríade aspirínica). Essas associações não foram descritas na literatura.

A importância de se estudar mediadores envolvidos na patogênese da PNS e a tentativa de elucidar a existência de um aumento nas frequências de HLA (susceptibilidade genética) em um determinado grupo de pacientes portadores de PNS (intolerantes à aspirina) baseia-se nos seguintes fatos: embora a literatura mundial considere que rinosinusite crônica seja uma doença única definida como "doença inflamatória do nariz e seios paranasais que persiste e causa sintomas por mais de 3 meses, com espessamento da mucosa e pólipos nasais como último estágio da inflamação crônica"²⁷, diversas etiologias associam-se a esta definição. Infecção crônica, rinosinusite fúngica, intolerância aspirínica, discinesias mucociliares, imunodeficiências, fibrose cística, com infiltração eosinofílica ou não da mucosa, podem ser citadas como exemplo. Em pacientes com pólipos não eosinofílicos, como na fibrose cística, doença autossômica recessiva, a inflamação crônica da mucosa decorre do espessamento do muco devido às mutações no gen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) e o conseqüente edema dessa mucosa seguido da formação de pólipos. A ingestão de aspirina e anti-inflamatórios é sabidamente o gatilho para se desencadear a migração de eosinófilos (principais produtores de leucotrienos) para a mucosa respiratória em pacientes geneticamente suscetíveis, que apresentam um aumento da expressão de

LTC4 sintase, enzima terminal na produção de leucotrienos broncoativos. Os fungos, detectados no muco nasal de quase todos os pacientes com rinosinusite crônica e também em indivíduos saudáveis, são apontados como os responsáveis pela migração de eosinófilos através da mucosa para o muco, na tentativa de destruí-los após a liberação dos conteúdos protéicos de seus grânulos²⁷. Como explicar que os mesmos fungos são capazes de atrair eosinófilos para a mucosa nasal em alguns pacientes já que indivíduos saudáveis também têm fungos no nariz? Teriam os eosinófilos daqueles pacientes alguma alteração (predisposição genética?) que os faça migrar para a mucosa nasal (atraídos pelos fungos) e, a partir de então, se instale uma resposta inflamatória eosinofílica auto-sustentada? Por que a rinosinusite fúngica eosinofílica é muitas vezes unilateral? Por que as crianças apresentam tão baixa prevalência de polipose nasossinusal? Não há um único fator etiológico que possa explicar a patogênese da polipose nasossinusal como uma doença única; a inflamação continua sendo o principal fator, independente da etiologia. A importância deste estudo baseou-se na tentativa de se conhecer a participação de alguns mediadores inflamatórios em um grupo específico de pacientes com rinosinusite crônica (com polipose nasossinusal e intolerância aspirínica) e tentar detectar um padrão genético de resposta imunológica (HLA) nestes pacientes.

CONCLUSÃO

A expressão de RNAm para as interleucinas 4, 5, 6, 8, 10, IFN- γ e TNF- α foi semelhante nos pólipos nasais de pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica tolerantes e intolerantes à aspirina. A expressão de mRNA para IL-2 associou-se com a intolerância à aspirina, sugerindo um perfil TH1.

Os pacientes portadores dos antígenos A11, B49, DR15 e DR13 apresentam uma maior probabilidade de desenvolver polipose nasossinusal não relacionada à IA, enquanto os portadores de DR17 apresentam uma maior probabilidade de desenvolver polipose nasossinusal associada à intolerância aspirínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Widal F, Abrami P, Lermoyez J. Anaphylaxie et idiosyncrasie. Presses Med 1922;18:189-93.
2. Samter M, Beers RF. Concerning the nature of intolerance to aspirin. J Allergy 1967 Nov;40(5):281-93.
3. Schapowal AG, Simon HU, Schmitz-Schumann M. Phenomenology, pathogenesis, diagnosis and treatment of aspirin-sensitive rhinosinusitis. Acta Otorhinolaringol Belg 1995;49(3):235-50.
4. Settiane GA. Epidemiology of nasal polyps. Allergy Asthma Proc 1996;17(5) Sep/Oct:181-236.
5. Kramer MF, Rasp G. Nasal polyposis: eosinophils and interleukin-5. Allergy 1999;54:669-80.
6. Schiavino D, Nucera E, Milani A, Ninno MD, Buonomo A, Sun J, Patriarca JSG. The aspirin disease. Thorax 2000;55 Oct (Supl 2):66-9.

-
7. Moneret-Vautrin DA. La physiopathologie de l'intolérance à l'aspirine. In: Freche CL, Fontane JP, Peynegre. La polypose naso-sinusienne. Paris: Europeenne; 2000. p. 39-45.
 8. Sanak M, Szczeklik A. Genetics of aspirin induced asthma. *Thorax* 2000;55 Oct. (Supl 2):45-7.
 9. Szczeklik A, Nizankowska E, Mastalerz L, Szabo Z. Analgesics and asthma. *Am J Ther* 2002;9(3):233-43.
 10. Weller PF Human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:283-87.
 11. Hamilos DL. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96(4):537-44.
 12. Voegels RL. Polipose nasal: estudo da correlação entre as interleucinas 1, 3, 4 e 5 e a molécula de adesão VCAM-1 com a presença ou não de alergia. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP, 1998. 100p. (Tese, Doutorado em Otorrinolaringologia).
 13. Min YG, Lee CH, Rhee CS, Kim KH, Kim CS, Koh YY, Min KU, Anderson PL. Inflammatory cytokine expression on nasal polyps developed in allergic and infectious rhinitis. *Acta Otolaryngol Stockh* 1997;117(2):302-6.
 14. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Cuvelier C, Van Cauwenberge P. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol* 2000;14(5):279-90.
 15. Lee CH, Rhee CS, Min YG. Cytokine gene expression in nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107(8):665-70.
 16. Jankowski R. Eosinophils in the pathophysiology of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol Stockh* 1996;116(2):160-3.
 17. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997;158(8):3902-8.
 18. Rudack C, Bachert C. Cytokines and chemokines in paranasal sinus diseases. *Laryngorhinootologie* 1999;78(9):481-90.
 19. Luxenberger W, Posh U, Berghold A, Hofmann T, Lang-Loidolt D. HLA patterns in patients with nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257(3):137-9.
 20. Mullarkey MF, Thomas PS, Hansen JA, Webb DR, Nisperos B. Association of aspirin-sensitive asthma with HLA-DQw2. *Am Rev Respir Dis* 1986;133(2):261-3.
 21. Lympany PA, Welsh KI, Christie PE, Schmitz-Schumann M, Kenemy D, Lee TH. An analysis with sequence-specific oligonucleotide probes of the association between aspirin-induced asthma and antigens of the HLA system. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(1):114-23.
 22. Dekker JW, Nizankowska E, Schmitz-Schumann M, Pile K, Bochenek G, Dyczek A, Cookson WOCM, Szczeklik A. Aspirin-induced asthma and HLA-DR1 and HLA-DPB1 genotypes. *Clin Exp Allergy* 1997;27(5):574-7.
 23. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. HLA -DRB1, -DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis. *Laryngoscope* 2000;110(3):422-45.
 24. Ingels K, Durdurez JP, Cuvelier C, Cauwenberge PV. Nasal biopsy is superior to nasal smear for finding eosinophils in nonallergic rhinitis. *Allergy* 1997;52(3):338-41.
 25. Willians A, Meenagh A, Darke C, Acosta, A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E, Middleton D. Analysis of the distribution of HLA-B alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2001;62:645-50.
 26. Middleton D, Willians A, Meenagh A, Daar AS, Gorodezky C, Hammond M, Nascimento E, Briceno I, Perez MP. Analysis of the distribution of HLA-A alleles in populations from five continents. *Hum Immunol* 2000;61:1048-52.
 27. Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, Beham A, Stammberger H. Eosinophilic fungal rhinosinusitis: a common disorder in Europe? *Laryngoscope* 2003;113(2):264-9.