



ARTIGO ORIGINAL

Contagem de eosinófilos circulantes e níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica em asmáticos

Peripheral blood eosinophils and serum level of eosinophil cationic protein in asthmatics

Orlei Kantor Junior¹, Nelson Augusto Rosário Filho²

Resumo

Objetivo: Determinar o número de eosinófilos em sangue periférico e níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica em asmáticos e a relação entre eosinófilos e a liberação deste mediador químico.

Métodos: Foram estudados 26 asmáticos atópicos, com idade entre 7 e 16 anos, divididos em dois grupos pela gravidade da asma. A contagem de eosinófilos se obteve multiplicando-se o número de leucócitos pelo Sistema de Coulter pelo percentual de eosinófilos em esfregaços de sangue. Os níveis de proteína catiônica eosinofílica foram determinados por método fluoroenzimático, CAP System de Pharmacia Diagnostics.

Resultados: Os asmáticos apresentaram eosinofilia significativa ($810 \pm 103/\text{mcl}$) comparados a indivíduos normais ($158 \pm 30/\text{mcl}$). Os valores médios de proteína catiônica eosinofílica em asmáticos ($20,7 \pm 5,1 \text{ mcg/l}$) também eram significativamente mais elevados que em normais ($6,8 \pm 1,2 \text{ mcg/l}$). Os níveis de proteína catiônica eosinofílica eram mais altos em asmáticos com doença mais grave ($p < 0,001$) e correlacionavam-se com o número de eosinófilos.

Conclusão: Os níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica podem ser úteis na avaliação do processo inflamatório alérgico e provavelmente refletem a ativação dos eosinófilos.

J. pediatr. (Rio J.). 1997; 73(1): 11-15: asma, eosinófilos, eosinofilia, proteínas sanguíneas.

Introdução

O aumento do número de eosinófilos (EOS) no escarro, no lavado broncoalveolar e no sangue periférico é característica dos pacientes asmáticos¹⁻³.

Vários autores estabeleceram que havia uma relação inversa entre eosinofilia periférica e função pulmonar ou hiper-reatividade brônquica^{2,4-7}. Atualmente os eosinófilos são considerados as principais células encontradas na reação tardia da asma e na inflamação crônica das vias aéreas^{1,4,8-10}.

Abstract

Objective: Determine the number of circulating eosinophils and serum eosinophil cationic protein levels in asthmatics, and the relationship between them.

Methods: We studied 26 atopic asthmatics aged 7-16 years divided in two groups according to severity of asthma. Eosinophil counts were obtained by multiplying leukocyte number by eosinophil percent. Serum eosinophil cationic protein levels were determined by fluoroenzymatic method, CAP System, Pharmacia Diagnostics.

Results: Asthmatics had eosinophil counts ($810 \pm 103/\text{mcl}$) significantly higher than non atopic children ($158 \pm 30/\text{mcl}$). Mean eosinophil cationic protein levels were higher in severe asthmatics ($p < 0,001$) and correlated with eosinophil counts.

Conclusions: Serum eosinophil cationic protein levels could be useful in assessing the allergic inflammation and probably reflect the activation of eosinophils.

J. pediatr. (Rio J.). 1997; 73(1): 11-15: asthma, eosinophils, eosinophilia, blood proteins.

Vadas e cols.¹¹ foram os primeiros a demonstrar que havia diferenças de densidade entre os eosinófilos. Gartner¹², por meio de sedimentação, com Percoll, separou eosinófilos com densidades superiores a 1.084 g/ml que designou eosinófilos normodensos e inferiores a 1.084 g/ml designados eosinófilos hipodensos ou "ativados". Estes apresentam características morfo-funcionais diferentes, podendo ser ativados e liberar de seus grânulos substâncias alcalinas^{9,13-17}.

Com os estudos de Gleich e cols.^{3,15,16,18,19} e Venge e cols.^{20,21} foram possíveis as determinações da proteína alcalina principal (MBP) e da proteína catiônica eosinofílica (ECP) respectivamente. Estas proteínas de pH básico, aproximadamente 11, liberadas dos eosinófilos hipoden-

1 Médico pneumopediatra do Hospital de Clínicas - PAG UFPR - Curitiba.
2. Professor Adjunto do Depto. de Pediatria da UFPR - Curitiba.

soos promovem intensa reação inflamatória nas vias aéreas^{14,15,22,23}.

No lavado broncoalveolar de asmáticos, além do aumento do número de eosinófilos, há também os níveis séricos de ECP e MBP, quando comparados a grupos-controles^{1,8,21,24}.

Determinamos o número de EOS em sangue periférico e os níveis séricos de ECP em asmáticos com o intuito de demonstrar a relação entre eosinofilia e a liberação deste mediador.

Material e Métodos

Estudamos 26 pacientes asmáticos, com idades entre 7 e 16 anos, seguindo os critérios do Consenso Internacional sobre Asma, do Departamento de Saúde Pública Americana (N.I.H.)²⁵. Foram submetidos a anamnese alergológica, testes de função pulmonar (Espirômetro tipo selo d'água - Warren e Collins Inc.), prova broncodilatadora (Salbutamol 400 mcg - GLAXO) e teste cutâneo alérgico de leitura imediata por técnica de puntura (MERCK). Todos os pacientes apresentaram broncorreversibilidade das vias aéreas superior a 10% com o uso de salbutamol e pápula maior que 3 mm ao *D. pteronyssinus* quando submetidos ao teste alérgico.

Subdividimos os asmáticos em dois grupos segundo a gravidade, denominados grupo asma I e II, baseados nos critérios preconizados por Aas²⁶. Nos pacientes do grupo asma I (12/26), os sintomas são caracterizados por crises de sibilâncias esporádicas e de leve intensidade, reversíveis com o uso de broncodilatadores e com testes de função pulmonar aparentemente normais. No grupo asma II (14/26), prevalecem crises de sibilâncias intensas e prolongadas, que necessitam geralmente terapêutica com corticóides e com testes de função pulmonar alterados.

O sangue heparinizado foi coletado entre 8 e 9h (Sistema Vacutainer B.D. Ind. Cirúrgicas Ltda.) para realização dos hemogramas pelo sistema Coulter (Coulter Electronics Ltda.). A contagem diferencial de células foi realizada em esfregaço de sangue, corado por May-Grünwald e Giemsa. Sangue não-heparinizado foi coletado e deixado retrair o coágulo durante 60 minutos em temperatura ambiente. O soro foi colocado em tubos plásticos (Ependorf - Corning Inc.) e congelado a -80° C, para posterior utilização. As dosagens dos níveis séricos de ECP foram realizadas pelo método fluoroenzimático (FEIA/CAP System - Pharmacia)²⁰.

O método utiliza pequenas cápsulas ("CAP") contendo malha de celulose com anti-ECP onde são colocados soros padrões e de pacientes. A fluorescência é medida (Fluorocount-96) e as concentrações nas amostras são calculadas por meio de curva de referência (VN= 5,8 mcg/l ou 1,8 a 18 mcg/l).

Os mesmos procedimentos foram também realizados em 11 indivíduos normais, que não apresentavam dados

clínicos ou laboratoriais de doença alérgica ou parasitária procedentes de uma escola de Curitiba (grupo controle). Foram realizados 3 exames parasitológicos nas fezes do grupo de asmáticos e normais e excluídos os parasitados.

Os pacientes foram selecionados do ambulatório de Alergia e Imunologia do HC UFPR e previamente foram retiradas, por 4 semanas, medicações que pudessem alterar o estudo (corticóides, cromoglicato, etc.), assim como foram retirados broncodilatadores 12 horas antes dos testes de função pulmonar.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio dos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (H) e Mann-Whitney (U), para avaliação das diferenças entre as médias e Spearman para as correlações. Foi calculada a mediana para os valores de ECP. Adotou-se como nível de significância (alfa) o valor 5%. Níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Resultados

Os asmáticos (n= 26) apresentaram a média de 810 ± 103,0 eos/mcl (limites: 65-1802) e os indivíduos normais (n= 11) 158 ± 30,3 eos/mcl (52-399). Houve diferença significativa entre as médias (Mann-Whitney p < 0,01).

Os valores médios de ECP nos asmáticos foi de 20,7 ± 5,1 mcg/l (4,9-114,1) e os indivíduos normais 6,8 ± 1,2 mcg/l (2,6-15,9). Houve diferença significativa entre as médias (Mann-Whitney p < 0,01). Os resultados das médias de contagens de eosinófilos e dosagens de ECP em ambos os grupos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das contagens de eosinófilos periféricos (EOS) e dos níveis da proteína catiônica eosinofílica (ECP) em asmáticos e normais

Grupos	n	EOS / mcl*	ECP (mcg/l)*
Normal	11	158 ± 30,3 (52 - 399)	6,8 ± 1,2 (2,6 - 15,9)
Asma	26	810 ± 103,0 (65 - 1802)	20,7 ± 5,1 (4,9 - 114,1)

* U = p < 0,01; () limites.

Média ± EPM

Quando subdividimos os asmáticos em dois grupos, segundo a gravidade da doença, observamos que as médias do número de eosinófilos não apresentaram diferenças significantes,

As médias de ECP foram significativamente diferentes em relação aos dois grupos e também em relação ao grupo de indivíduos normais (Kruskal-Wallis= 13,9 p= 0,0009) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados dos níveis da proteína catiônica eosinofílica (ECP) nos grupos estudados

Grupos	n	ECP (mcg/l)
Normal	11	6,8 ± 1,2 (2,6 - 15,9) * 52
Asma I	12	12,38 ± 1,9 (4,9 - 28,9) * 10,2
Asma II	14	27,9 ± 9,0 (6,6 - 114,1) * 15,6

H = 13,9 p = 0,0009. (Normal # Asma I # Asma II)
Média ± EPM * Mediana () limites

O número de eosinófilos estava significativamente correlacionado à dosagem de ECP nos asmáticos (r = 0,62 p < 0,01) (Figura 1).

Discussão

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas^{8,9,15}. No entanto, o clínico não tem acesso a exames que não sejam invasivos, que identifiquem o processo

inflamatório, sua gravidade, e a variação com a progressão da doença. Com a avaliação dos níveis de ECP no soro, estabeleceu-se um parâmetro objetivo como marcador da inflamação na asma. Estudos utilizando cobaias e humanos demonstraram que a ECP e a eosinofilia podem ser utilizadas como marcadores da atividade inflamatória e da gravidade da asma^{2,5,10,17,21,24,27}. O aumento do número de eosinófilos em sangue se correlaciona inversamente ao volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEFL) e com a hiper-reatividade brônquica à histamina ou à metacolina em pacientes com asma^{2,5,6,16,21,28}. Eosinofilia também se relaciona com o aumento das proteínas alcalinas, tanto no sangue periférico como no lavado broncoalveolar^{1,7,8,18,29,30}.

Encontramos as médias de EOS compatíveis com os dados encontrados na literatura. Griffin e cols.²⁸, estudando 23 pacientes asmáticos, encontraram a média de 704 eos/mcl nos asmáticos e 160 eos/mcl no seu grupo controle. Bousquet e cols.⁸, em um estudo com 43 pacientes asmáticos, encontraram limites entre 95 e 1423 eos/mcl nos asmáticos e 34 a 198 eos/mcl no grupo controle.

Na avaliação dos níveis de proteína catiônica eosinofílica, encontramos médias semelhantes aos encontrados em literatura e também uma grande dispersão nos valores. Sugai e cols.²⁷, em um estudo com 68 crianças com asma, encontraram a média de 23,7 ± 21,4 mcg/l para os asmáticos e 5,8 ± 2,3 mcg/l para os normais.

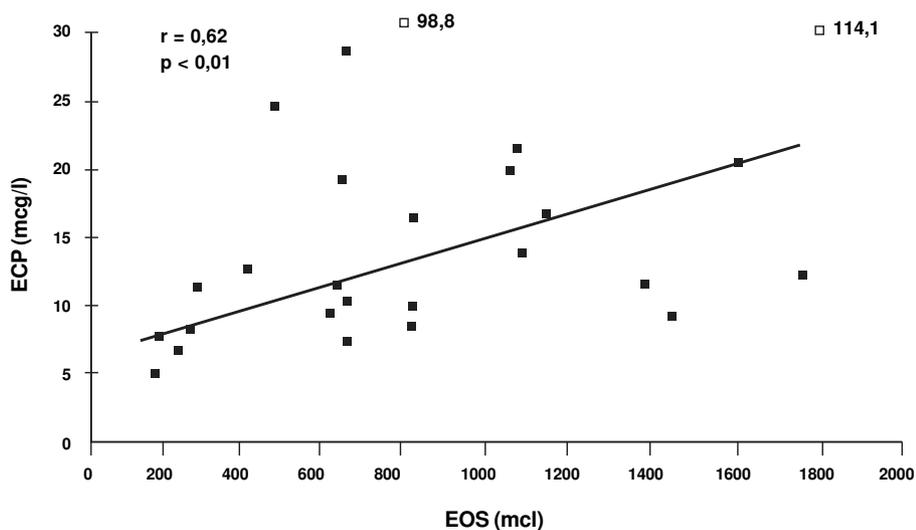


Figura 1 - Correlação entre número de eosinófilos e níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica em asmáticos

Griffin e cols.²⁸ encontraram valores médios de 28 mcg/l (10-78) para asmáticos e 7,7 mcg/l (3-19) para normais.

Se considerarmos os limites de normalidade (1,8 a 18 mcg/l), todos os indivíduos normais (100%) estariam abaixo e sete pacientes asmáticos (30,4%) estariam acima do limite superior. A utilização em nosso estudo de um grupo de asmáticos estáveis clinicamente poderia justificar os níveis pouco elevados de ECP. Mesmo assim, houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes de maior e menor gravidade (grupos asma I e II). Um cuidado adicional tomado foi o controle do tempo de retração do coágulo para preparação do soro, que não excedeu a 60 minutos, pois a ECP continuava a ser liberada, alterando os resultados.

Obtivemos uma correlação de 62% entre EOS e ECP no grupo de pacientes asmáticos. Griffin e cols.²⁸ encontraram uma correlação de 48% ($r = 0,48$ $p < 0,006$) em um grupo de 23 asmáticos estudados. Encontraram também correlação entre a ECP e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1). Zimmerman⁷ encontrou resultados semelhantes e observou que havia diminuição do marcador com a terapêutica por meio de esteróides inalados. O mesmo autor preconizou que valores superiores a 40 mcg/l de ECP poderiam sugerir asma moderada ou grave.

Atualmente, níveis de ECP estão sendo estudados em outras doenças como fibrose cística, pneumonia por *M. pneumoniae* e bronquiolite, que também podem ativar o eosinófilo.

Concluindo, podemos sugerir que a determinação dos níveis de ECP no sangue como um marcador da atividade inflamatória na asma, pode ser para o clínico, um modo objetivo, prático e pouco invasivo na avaliação destes pacientes.

Referências bibliográficas

- Adelroth E, Rosenhall L, Johansson SA, Linden M, Venge A. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. The effects of antiasthmatic treatment with budesonide or terbutaline. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:91-9.
- Britton J, Tattersfield AE. Does measurement of bronchial hyperreactivity help the clinical diagnosis of asthma? *Eur J Resp Dis* 1986; 68:233-88.
- Gleich GJ, Loegering DA, Mann KG, Maldonado JE. Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J Clin Invest* 1976; 57:633-40.
- Hakanson L, Carlson M, Stalenheim G, Venge P. Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:743-50.
- Horn BR, Robin ED, Theodore J, Vankessel A. Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975; 292:1552-5.
- Woolcock AJ, Peat JK. Epidemiology of bronchial hyper-responsiveness. *Clin Rev Allergy* 1989; 7:1247-56.
- Zimmerman B. Clinical experience with the measurement of ECP: Usefulness in the management of children with asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:2-12.
- Bousquet J, Chanel P, Lacoste JY, Barneon G. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323:1033-9.
- Busse, WW, Sedgwick JB. Eosinophils in asthma. *Ann Allergy* 1992; 68:286-290.
- Durham SR, Loegering DA, Dunnette S, Gleich GJ, Kay AB. Blood eosinophils and eosinophil derived proteins in allergic, asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 84:93136.
- Vadas MA, David JR, Butherworth A, Pisani NT, Siogok TA. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1979;122:1228-36.
- Gartner I. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidonecoat silica gel (Percoll). *Immunology* 1980; 40:133-36.
- Capron M, Leprevost C, Prin L, Tomassani M, Torpier G et al. Immunoglobulin mediated activation of eosinophils. In: Morley J, Coultitz I. *Eosinophils in Asthma*, ed. Academic Press Inc 1989;49-60.
- Fukuda T, Gleich GJ. Heterogeneity of human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:369-73.
- Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:422-33.
- Gleich GJ, Flavahan NA, Fujisawa T, Vanhoutte PM. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: A model for bronchial hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:776-81.
- Motojima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig thacheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:801-5.
- Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wasson DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of eosinophil major basic protein. *J Immunol* 1979; 123:2925-30.
- Gleich GJ, Loegering DA, Maldonado JE. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J Exp Med* 1973; 137:1459-71.
- Venge P, Rroxin LE, Olsson I. Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein. *Br J Haematol* 1977; 37:331-5.
- Venge P, Dahal R, Peterson CGB. Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effects of anti-asthmatic medication. *Int Arch allergy Appl Immunol* 1988; 87:306-12.
- Ackerman SJ, Kephart GM, Habermann TM, Greipp PR, Gleich GJ. Localization of eosinophil granule major basic protein in human basophils. *J Exp Med* 1983; 158:946-61.
- Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 1980; 42:35-43.

24. Lundgren JD, Davey RT, Lundgren B et al. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:689-98.
25. International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma. US Department of Health and Human Services 1992.
26. Aas K. Heterogeneity of bronchial asthma. *Allergy* 1981; 36:3-14.
27. Sugai T, Sakiyama Y, Matumoto S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:275-81.
28. Griffin E, Hakansson L, Formgren H, Jorgensen K, Peterson C, Venge P. Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:548-57.
29. Olsson I, Venge P. Cationic proteins of human granulocytes. *Blood* 1974; 44:253-46.
30. Kauffman HF, Berends C, Dijkhuizen B, De Monchy JGR, Gerritsen J. Hypodense eosinophils and neutrophils in asthma? *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:11745-50.

Endereço para correspondência:

Dr. Orlei Kantor Junior
Rua da Paz, 393 - ap. 152
CEP 80060-160 - Curitiba - PR