



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

FABIO MANUEL CALEÇA EMIDIO

IMUNOESTIMULAÇÃO NA INFEÇÃO RECORRENTE

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE IMUNOLOGIA CLINICA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

PROF. DOUTOR CELSO PEREIRA

PROF. DOUTOR FREDERICO REGATEIRO

FEVEREIRO DE 2016

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

IMUNOESTIMULAÇÃO NA INFEÇÃO RECORRENTE

Artigo de Revisão

Fábio Manuel Caleça Emídio

Aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina
Universidade de Coimbra, nº 2010137192

Índice

Resumo.....	5
Palavras-Chave	6
Abstract.....	7
Keywords	8
Índice de Abreviaturas	9
I. Introdução.....	10
II. Materiais e métodos.....	12
III. Infecção Recorrente	13
Epidemiologia.....	14
Definição de Recorrência.....	15
Abordagem Diagnóstica.....	16
Fatores de Risco para IRTR.....	18
População Pediátrica.....	19
Estratégias de Tratamento.....	22
IV. Imunoestimulação. Fundamentos Gerais.....	24
Resposta Imunitária Inata vs Adaptativa	24
Sistema imunitário associado às mucosas - MALT.....	26
Elementos Celulares.....	30
Th1	31
Th2	32
Th17	32
Th9	33
Th22	33

Linfócitos Intraepiteliais (IELs).....	34
Células dendríticas	35
Células T reguladoras	36
Células B.....	36
Elementos humorais.....	36
TGF- β	36
Il-10.....	37
IL-12	37
IL-2	37
Interferões	38
IgA	39
Sistema imune Orofaríngeo – CONALT	40
Tolerância Oral	43
V. Imunoestimulantes. Fundamentos Gerais	45
Mecanismos	47
Efeitos locais e Sistêmicos.....	50
Tipos de Imunomoduladores bacterianos	53
Indicações potenciais	63
Efeitos Adversos	63
Impacto Económico	64
VI. Caso clínico.....	65
VII. Conclusão.....	69
Agradecimentos.....	69
Referências bibliográficas	70

Resumo

As infecções dos tratos respiratórios superior e inferior em crianças são eventos frequentes que, quando recorrentes ou crônicas, podem condicionar dificuldades terapêuticas, constituindo um problema com enorme impacto em saúde pública e na qualidade de vida de crianças e cuidadores. Nos países desenvolvidos, cerca de 25% das crianças com idades inferiores a 1 ano e 18% das crianças com idades dos 1-4 apresentam clínica de infecção recorrente do trato respiratório (IRTR). Infecções otológicas, naso-sinusiais, do cavum, rinfaringites ou otites médias agudas, representam as patologias mais frequentes, em crianças dos 6 meses aos 6 anos. A infecção recorrente é assim causa de morbidade significativa, estando na origem de um aumento de resistências a antibióticos. Constitui um encargo relevante, em custos diretos e indiretos.

Os lisados bacterianos são um grupo de fármacos, surgidos na década de 70, utilizados no tratamento da infecção recorrente respiratória, com evidência clínica comprovada na eficiência do sistema imunitário, atuando por via específica e não específica, nos mecanismos celulares e humorais. As preparações, mono ou polivalentes bacterianas, usadas no tratamento das infecções recorrentes respiratórias contêm diferentes formulações de estirpes bacterianas, responsáveis pela etiologia infecciosa.

Neste artigo de revisão pretende-se avaliar o papel do uso de lisados bacterianos na prevenção e tratamento da infecção, particularmente do trato respiratório, na população pediátrica, descrevendo os avanços no conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e profilaxia, controle e melhoria clínica. Apesar de resultados recentes encorajadores, são necessários mais estudos, projetados de forma a obter um maior nível de evidência relativamente a utilização de lisados com tratamento profilático de infecções respiratórias.

Palavras-Chave

(termos MeSH): adjuvantes imunológicos, infecções do trato respiratório, imunização, lisados bacterianos, lisados bacterianos mecânicos polivalentes, resposta imunitária, imunoestimulação.

Abstract

Infections of the upper and lower respiratory tract in children are frequent events. When recurring or chronic can lead to therapeutic difficulties, constituting a problem with an enormous impact in public health and quality of life of children and care takers. In developed countries, about 25% of children under the age of 1 year and 18% of children ages 1-4 present clinical signs and symptoms of recurrent respiratory tract infections (RRTI). Infections of the ear, nose and throat (ENT), rhinopharyngitis, or acute otitis media, represent the most frequent pathologies in children from 6 months to 6 years old. RRTIs are a significant cause of morbidity, that as led to an increase in resistance to antibiotics, therefore constituting a socio-economic burden, with both direct and indirect costs.

Bacterial lysates are a group of drugs that emerged in the 70s, used in the treatment of recurrent respiratory tract infection, which present clinical evidence in the effectiveness of the immune system, acting in a specific and non-specific way on cellular and humoral mechanisms. The monovalent or polyvalent bacterial preparations used in the treatment of recurrent respiratory tract infections, contain different bacterial strains that are often responsible for the infectious etiology.

This review article aims to assess the role of the use of bacterial lysates in the prevention and treatment of infection of the respiratory tract in children, describing the advances in knowledge of the immunological mechanisms involved in this possible gain of protection, prevention, prophylaxis and management and clinical improvement. Despite recent encouraging results, further studies are needed, better designed to obtain a higher level of evidence regarding use of lysates with prophylactic treatment of respiratory infections.

Keywords

(MeSH terms): immunological adjuvants, respiratory tract infections, immunization, bacterial lysates, Polivalent mechanical bacterial lysate, imune response, immunostimulation

Índice de Abreviaturas

ACOS Asthma-COPD Overlap Syndrome

APCs Antigen presenting Cells

BALT Bronchus-associated Lymphoid
Tissue

CONALT Craneal-Oral-Nasal-associated
Lymphoid Tissue

DCs Dendritic Cells

ECs Epithelial Cells

ENT Ear Nose Throat

EPOS European Position Paper on
Rhinosinusitis and Nasal Polyps

GALT Gut-associated Lymphoid Tissue

IATR Infecção Aguda do Trato
Respiratório

IELs Intraepithelial Lymphocytes

IFN Interferon

ILF Isolated Lymphoid Follicles

IRAK Interleukin Receptor Associate
Kinase

IRTR Infecção Recorrente do Trato
Respiratório

LP Lamina Propria

M cells Microfold Cells

MALT Mucosal-associated Lymphoid
Tissue

mDCs Myeloid Dendritic Cells

MESH Medical Subject Headings

MHC Major Histocompatibility Complex

NALT Nasal-associated Lymphoid Tissue

NK Natural Killer

NLRs Nucleotide binding oligomerization
domain (NOD)-like receptors

PAMP Pathogen associated molecular
pattern

pDCs Plasmocytic Dendritic Cells

PRRs Pattern Recognition Receptor

ROR Retinoic Acid Receptor

RRTI Recurrent Respiratory Tract
Infections

SALT Skin-associated Lymphoid Tissue

TGF Transforming Growth Factor

Thf T helper follicular Cells

TLR Toll Like Receptor

Treg T regulator Lymphocytes

WHO World Health Organization

I. Introdução

As infecções do trato respiratório constituem atualmente um dos mais prevalentes distúrbios indutores de morbidade e mortalidade humanas, assim como de gastos económicos para as sociedades, independentemente dos avanços da medicina moderna. Concomitantemente, a infecção recorrente do trato respiratório constitui um problema de saúde *major* na atualidade. Relaciona-se com frequência a resistências a antibióticos, em pacientes com função imunitária humoral ou celular normais, mas aparentemente com relativa fragilidade da função de defesa, ou em situações de imunodeficiência primária/secundária, na medida que resulta muitas vezes num uso excessivo e pouco criterioso destes fármacos.

Uma estratégia de tratamento para este problema passa pela estimulação não específica da resposta imunitária ou pelo aumento dos mecanismos de defesa inatos, através do uso de extratos imunoestimulantes, de que são exemplo os lisados bacterianos. Estes determinam um aumento das defesas contra infecção, simultaneamente por mecanismos dependentes do sistema imune inato e adaptativo. Desta forma, a dualidade da sua atividade mimetiza a resposta imunitária desencadeada pela invasão de um microrganismo patogénico, mas sem risco patológico ou deletério.

Desde o aparecimento do conceito de imunoestimulação bacteriana na década de 70, vários fármacos foram desenvolvidos, sobretudo para tratamento da infecção recorrente respiratória, que afeta preponderantemente a população em idade pré-escolar.

Diferentes estudos mostraram que a administração oral destes fármacos em crianças e/ou adultos com infecção recorrente possibilitou uma redução do número, duração e severidade de episódios. No entanto a utilização destes imunomoduladores em pacientes suscetíveis constitui ainda matéria de debate, devido à existência de estudos contraditórios, conduzidos

com preparações e condições clínicas distintas que tornam difíceis a comparação de resultados.

Este artigo de revisão pretende avaliar a pertinência da prescrição de lisados bacterianos na prevenção e tratamento da infecção recorrente do trato respiratório, na população pediátrica. Nas últimas décadas foram feitos avanços no conhecimento dos mecanismos imunológicos possivelmente envolvidos no ganho de proteção e melhoria clínica, que poderão elucidar e fundamentar o papel deste grupo de fármacos, enquanto alternativa à abordagem terapêutica convencional.

II. Materiais e métodos

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica em Julho de 2015 de meta-análises, revisões sistemáticas, ensaios clínicos aleatorizados e controlados, e normas de orientação clínica, nas bases de dados da Pubmed, língua portuguesa e inglesa, Science Direct, Clinical Key, B-On, utilizando as palavras-chave (termos MeSH): *immunological adjuvants, respiratory tract infections, immunization, bacterial lysates, Polivalent mechanical bacterial lysate, immune response, immunostimulation*.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: todos os estudos relacionados com imunoestimulação por lisados bacterianos, incluindo possíveis mecanismos de ação e mecanismos imunitários conhecidos.

III. Infecção Recorrente

As infecções dos tratos respiratórios superior e inferior em crianças são eventos muito prevalentes que constituem um problema de saúde mundial. Apesar destas infecções serem normalmente pouco severas e autolimitadas, podem complicar-se com sinusite, otite média e infecções broncopulmonares. Quando recorrentes ou crônicas podem determinar dificuldades terapêuticas e, naturalmente, induzir uma panóplia de co-morbilidades.¹

Na população pediátrica, as infecções respiratórias constituem a causa mais comum de consulta médica e hospitalização, estando associadas a morbidade e mortalidade significativas.² As crianças com infecção respiratória recorrente constituem um verdadeiro desafio clínico, sendo necessário discriminar entre os que apresentam causas simples de infecção (infecções virais recorrentes, sibilância ou asma), possivelmente relacionadas com exposição aumentada a fatores de risco ambientais, das que apresentam causas subjacentes mais sérias, nomeadamente as bronquiectasias ou disfunção imunitária.²

Desta forma, no caso de suspeita de deficiência imunitária, dever-se-á realizar inicialmente um doseamento sérico de imunoglobulinas (IgG/IgM/IgA), fórmula leucocitária, contagem plaquetar, proteinograma electroforético, entre outros procedimentos laboratoriais básicos, para excluir eventual imunodeficiência primária. Estudos posteriores devem avaliar a existência de uma possível anomalia anatómica, alergia ou doença genética, que se manifeste sobretudo no trato respiratório, como seja a fibrose cística.³⁴

Geralmente, a criança com infecção recorrente do trato respiratório (IRTR), tem habitualmente, uma clínica relativamente benigna, mas que pela sua recorrência determina enormes implicações na qualidade de vida. A IRTR representa essencialmente a consequência de uma exposição aumentada a agentes infecciosos, devido a fatores ambientais, durante o

primeiro ano de vida. Frequentemente estas crianças não são acometidas por infeções recorrentes de outros sistemas (gastrointestinal, sistema nervoso central, urogenital ou pele).²

Epidemiologia

Nos países desenvolvidos, cerca de 25% das crianças com idades inferiores a 1 ano e 18% das crianças com idades compreendidas entre 1 a 4 anos, apresentam clinica de IRTR. Infeções dos ouvidos, nariz e orofaringe, traduzidas clinicamente desde rinofaringites a otites médias agudas, constituem as patologias mais comuns em crianças dos 6 meses aos 6 anos. O número médio de episódios infecciosos dos tratos respiratórios superior e inferior, em crianças saudáveis com idade inferior a 5 anos, é de 6 a 8 episódios por ano, número que quase duplica em crianças que frequentam creches e infantários.³

De acordo com um estudo realizado em 1998 pela *World Health Organization* (WHO), as infeções agudas do trato respiratório inferior causam 19% de todas as mortes em crianças com idades inferior a 5 anos, e só no ano de 2000, cerca de 1.9 milhões de mortes em crianças (95% IC 1.6-2.2 milhões), 70% em África e Sudeste Asiático.⁵

As infeções recorrentes são causa não apenas de morbilidade significativa, mas também de absentismo escolar e da atividade profissional pelos cuidadores, contribuindo de forma significativa para o impacto socioeconómico de doença. Consequentemente torna-se evidente e determinante a necessidade de procurar uma redução do número de episódios de IRTR através da estimulação do sistema imune.³

Apesar dos agentes etiológicos responsáveis por IRTR, nem sempre poderem ser prontamente identificados no decurso de um episódio agudo, os agentes virais constituem maioritariamente a causa principal. Os mais frequentes são o *vírus sincial respiratório*, *rinovírus*, *adenovírus*, *parainfluenza* e *influenza*. Quanto aos agentes bacterianos

normalmente envolvidos nessas infecções, incluem *Acinetobacter spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes grupo A*, entre outros.^{1,2,5,6}

Se como referido, a maioria das infecções agudas do trato respiratório (IATR) é causada por vírus, muitas vezes vêm a sobre-infetar com agentes bacterianos. Neste contexto, os clínicos têm tendência a prescrever antibióticos para o tratamento destas infecções, embora apenas uma pequena proporção de crianças beneficie com este tipo de terapêutica. A sobreprescrição conduz a um aumento das resistências bacterianas aos antibióticos prescritos mais habitualmente.⁷ Para além disto a etiologia frequentemente viral destas infecções, não justifica, obviamente, o uso de antibioticoterapia no plano inicial do tratamento.²

De forma a ultrapassar este fenómeno, vários autores, em inúmeros estudos e sustentados em meta-análises, propuseram uma alteração da estratégia de tratamento, com a mudança de uma mera abordagem de intervenção da doença aguda, para a profilaxia da recorrência utilizando vacinas ou agentes imunomoduladores.⁸

Definição de Recorrência

Não é possível encontrar consenso na definição de IRTR na literatura.

A frequência normal de infeção do trato respiratório é de cerca de 6 a 8 episódios em períodos sazonais de Outono ou Inverno, durante a infância (crianças de 1-5 anos); e de 2 a 4 nas crianças dos 6 aos 12 anos.²

No caso da otite média, o *standard* de referência para a definição de recorrência, é de 3 episódios em 6 meses, ou de 4 nos últimos 12 meses. Em contraste, a rinite recorrente é geralmente definida como mais de 5 episódios por ano, e a faringite ou tonsilite recorrentes como mais de 3 episódios em 12 meses.⁹⁻¹¹

Qualquer definição de recorrência é restritiva e arbitrária, pelo que o correto diagnóstico deverá passar por uma avaliação clínica correta (história e exame objetivo), sugestivos de infecção recorrente, ou pela exclusão de potencial imunodeficiência primária ou secundária.²

O *Gruppo di Studio di Immunologia della Società Italiana de Pediatria*, propôs já em 1998, que o diagnóstico de infecção recorrente poderá ser realizado, desde que esteja presente um dos seguintes critérios²:

- ≥ 6 infecções respiratórias por ano;
- ≥ 1 infecção respiratória por mês, que envolva as vias respiratórias superiores de Setembro a Abril;
- ≥ 3 infecções respiratórias por ano, envolvendo as vias respiratórias inferiores.

As infecções recorrentes do trato respiratório podem também ser caracterizadas por, pelo menos, três episódios de febre, existência de inflamação locoregional, tosse, asma e sibilância, sem compromisso severo da função respiratória.¹²

Abordagem Diagnóstica

A tosse crónica consiste no sintoma mais comum e frequente de IRTR. Desta forma o algoritmo diagnóstico deverá passar pela exclusão de todas as causas de tosse crónica - alergia, asma em idade pré-escolar, deficiência de $\alpha 1$ -antitripsina, anomalias congénitas, refluxo gastroesofágico ou a aspiração recorrente de gotejamento pós-nasal, que constituem a causa mais frequente de tosse crónica nas crianças. Infecção recorrente numa mesma localização anatómica poderá sugerir anomalia congénita ou aspiração de corpo estranho. A hipótese de fibrose cística deverá ser considerada, em crianças com infecção recorrente acompanhada de malabsorção e pólipos nasais, independentemente de rastreio neonatal negativo.^{2,13}

Defeitos no sistema imunitário, como a deficiência seletiva em IgA, são conhecidos pela associação com infecção recorrente por bactérias e vírus. Do ponto de vista epidemiológico, foi demonstrado que mais de 50% das crianças com três ou mais episódios por ano, durante os últimos dois anos, apresentavam déficit de uma das subclasses de IgG, e que 17% exibiam déficit de IgA.⁸

A frequência de infecção respiratória nas crianças deverá ser avaliada, conjuntamente com outras características importantes, nomeadamente²:

- Curso das infecções;
- Evolução do estado geral;
- Duração; presença de febre;
- Complicações possíveis;
- Resposta a terapêutica sintomática;
- Resposta a antibioticoterapia;
- Isolamento do patógeno responsável.

Segundo *de Vries; Slatter & Gennery*,^{4,14}, o algoritmo diagnóstico para crianças com IRTR passa por:

- Observação clínica minuciosa dos ouvidos, nariz e garganta, com exclusão de hipertrofia das adenoides;
- Telerradiografia torácica e/ou do cavum;
- Realização de Testes Prick e quando necessário determinação dos níveis de IgE específicos;
- Determinação dos níveis totais de IgE sérico;
- Determinação dos níveis séricos de IgG, IgA, e IgM;

- Hemograma com fórmula leucocitária;
- Culturas microbiológicas e testes serológicos;
- Pesquisa serológica de vírus;
- Em pacientes selecionados: níveis de subclasses de IgG; produção de anticorpos específicos contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, tétano e difteria, 4 semanas após vacinação de crianças não previamente expostas aos antígenos das vacinas; níveis das componentes C3 e C4 e testes funcionais do sistema do complemento (CH₅₀, AP₅₀).

Fatores de Risco para IRTR

A prevalência aumentada de infecção recorrente na população pediátrica pode ser atribuída a vários fatores, nomeadamente ao aumento da exposição a agentes infecciosos, durante os primeiros anos de vida, especialmente em contacto próximo com outras na creche, infantário ou escola; a relativa imaturidade do sistema imunitário; fatores sociais e ambientais desfavoráveis, agregados familiares com graus de especificidade, poluição *indoor* e *outdoor*, tabagismo, condições de salubridade da habitação.²

Assim sendo, os fatores de risco que mais contribuem para o aumento da frequência da infecção respiratória nas crianças passam por²:

• Creche e infantário	• Socialização precoce
• Agregado familiar	• Historia familiar de atopia
• Irmãos em idade escolar	• Prematuridade
• Baixo peso	• Interrupção precoce da amamentação
• Fatores climáticos e ambientais (poluição dentro e fora de casa)	• Humidade na residência de habitação
• Animais de estimação (gatos e cães)	• Hábitos tabágicos dos pais, durante e após gravidez
• Alterações anatómicas das vias áreas superiores ou inferiores	• Alergias/Atopias
• Refluxo Gastro-esofágico	• Sexo Masculino
• Más condições socioeconómicas e malnutrição	• Treino intenso e Stress Físico
• Plano de Vacinação desatualizado	

População Pediátrica

Com frequência, as crianças com IRTR não têm objetivamente uma alteração ou uma deficiência concreta do seu sistema imunitário, pelo que a grande maioria não tem subjacente imunodeficiência primária, embora possam apresentar baixos níveis de alguns parâmetros laboratoriais, nomeadamente dos diferentes isotipos de imunoglobulinas, e mais raramente, de outros parâmetros imunológicos como a capacidade fagocítica. Contudo muitas destas

alterações apresentam um papel questionável, uma vez que é transitório e dependente do estadio de maturação face ao relativo aumento da suscetibilidade à infeção.²

A primeira linha de defesa do trato respiratório consiste na barreira mecânica formada pelas células epiteliais, a mucosa e o próprio filme mucoide subjacente, aos quais se associam os mecanismos de defesa imunitários clássicos (ex. IgA secretora e macrófagos residentes). Contudo, nos adultos, a camada de muco protetora encontra-se enriquecida com proteínas que exercem efeitos antibacterianos - defensinas, lisozimas, IgA; algumas citocinas e secretoglobinas, mas em crianças estes mecanismos apenas se encontram completamente desenvolvidos e em pleno estadio de maturação, após os 5-7 anos de idade.²

Nesta faixa etária é patente uma expressão reduzida de *Toll Like Receptor* (TLR) do tipo TLR2 e TLR 4 nas membranas celulares epiteliais. A sua função passa essencialmente pelo reconhecimento de estruturas moleculares bacterianas patogénicas (PAMPs), que permitem a ativação da resposta imune inata inflamatória e que claramente influenciam a resposta imune adquirida. Naturalmente, esta resposta, permitirá aumentar as defesas contra bactérias e fungos, no sistema respiratório. Desta forma, o aparente défice funcional fisiológico dos TLRs em crianças, diminui o reconhecimento dos microrganismos patogénicos, prejudicando a indução de uma resposta inata mais precoce. Na população pediátrica encontram-se ainda diminuídas as lectinas.³

Os mecanismos de defesa inata são dependentes da atividade de linfócitos, macrófagos e células dendríticas. No seu conjunto, veem a congregar-se no sistema imune associado a mucosas (MALT). Durante o processo de crescimento, a proliferação e atividade destas células, aumenta graças à exposição progressivamente maior a organismos patogénicos. Os lisados bacterianos administrados oralmente são absorvidos no intestino, causando estimulação do *Gut associated lymphoid tissue* (GALT) e, subsequentemente, com indução de resposta imunitária a nível da mucosa de outros órgãos, como o *Bronchus-associated*

lymphoid tissue (BALT).¹⁵ Daí a importância destes sistemas no desenvolvimento da resposta imunitária. Uma resposta inata, relativamente pouco potente e eficiente, resultará de reduzida produção de citocinas pró-inflamatórias e resposta reduzida de macrófagos (quimiotaxia, adesão, migração e lise). A resposta humoral nas vias aéreas, por sua vez, reside essencialmente na contínua produção de IgA (sobretudo nas vias superiores) cujas concentrações aumentam na infância. Este processo encontra-se naturalmente intensificado nos meses de Outono e Inverno.³

Várias alterações no sistema imunitário, nomeadamente da sua função, têm vindo a ser demonstradas em crianças com IRTR²:

- Defeitos funcionais e em muitos casos transitórios do recetor Fcγ IIIa (CD16) nas células Natural Killer (NK);
- Defeitos no *interleukin receptor-associate kinase 4* (IRAK);
- Redução da produção de IL-12;
- Polimorfismos nos genes CCR2, CCR5, e do gene da lectina de ligação à manose;
- Mutações nas sequências codificadoras TLR-4;
- Deficiência na remoção dos neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos alveolares;
- Fagocitose patológica e produção de intermediários de espécies reativas de oxigénio, por células polimorfonucleares;
- Diminuição da quimiotaxia dos neutrófilos;
- Diminuição do número de CD4+, CD8+, CD19+ e células NK;
- Alteração na produção de citocinas por linfócitos (aumento de IL-4, IL-10, diminuição da IFN-γ e IL-12), diminuição de IgM, IgA, IgG, L-ficolin;
- Defeito da produção de anticorpos pós-infeção.

É possível que as alterações não específicas da imunidade, observadas em crianças com IRTR, possam ser maioritariamente consequência de infecções virais repetidas capazes de influenciar a resposta imune, produção de citocinas e fagocitose, determinando uma maior disfunção imunitária induzida por estes agentes biológicos pelo que será favorecedora da recorrência.²

Apesar de não ser objeto deste trabalho, as infecções recorrentes do sistemas respiratório e genitourinário, em pacientes idosos, ocorrem frequentemente na dependência de um processo generalizado de imunosenescência, no qual uma redução global do número e atividade das células imunitárias contribui para a prevalência superior de infecção nesta população.¹⁶

As exacerbações do síndrome de sobreposição asma e DPOC (ACOS), traqueobronquite e sinusite crónica, constituem na principal problemática a nível de adultos e idosos.^{13,17} A análise da literatura sugere que o uso de lisados bacterianos no tratamento das exacerbações da DPOC consiste numa abordagem potencialmente eficaz. Contudo, a maioria dos ensaios clínicos realizados até hoje foram de baixa qualidade, e sobretudo, mal desenhados.¹⁸

Estratégias de Tratamento

Várias estratégias têm sido implementadas, para permitir uma redução da incidência de infeções respiratórias recorrentes. São exemplos a administração de vitamina A, vitamina C ou Zinco. Abordagens recentes reforçam o benefício da amamentação exclusiva durante os primeiros 6 meses de vida.^{19, 2}

A tonsilectomia consiste na remoção das tonsilas palatinas e por vezes das adenoides, deixando intactas as tonsilas tubares e lingual. Embora empiricamente se tenha revelado ao longo de décadas um tratamento eficaz, a percentagem de crianças e adultos, sujeitos a tonsilectomia, tem decrescido nos últimos anos, mantendo-se controverso o seu efeito

benéfico.²⁰ Estudos recentes mostram que o nível de evidência associado à eficácia da tonsilectomia, na redução do número de episódios de odinofagia, é muito baixo (efeito de massa modesto), exceto em crianças com sintomas de enorme severidade e frequência.²¹ Conseqüentemente podemos enquadrar esta abordagem no contexto de estratégias terapêuticas, neste caso cirúrgica, muitas vezes desnecessárias.

O interesse nas terapêuticas preventivas aumentou nos últimos anos graças ao aumento das resistências a antibióticos. Desta forma uma abordagem preventiva poderia contribuir para a diminuição da prescrição abusiva de antibióticos, o que se torna mais relevante se considerarmos a causa mais frequentemente viral destas infecções, que invalida a sua prescrição.

IV. Imunoestimulação. Fundamentos Gerais

Resposta Imunitária Inata vs Adaptativa

A resposta imune pode ser tradicionalmente dividida em dois componentes chave: a resposta inata – primária, célere mas não específica, e que intervém como primeira linha de defesa contra uma infeção; e a resposta adaptativa - desenvolvida na sequência de alguns dias e específica para o antigénio externo, resultando numa memória imunitária a longo termo.

A resposta imune adaptativa ou específica, protege o hospedeiro contra uma infeção subsequente com o mesmo antigénio ou outros organismos patogénicos imunologicamente semelhantes, constituindo o principio base da vacinação.

A resposta imune inata é mediada por: *células Natural Killer (NK)*, que reconhecem e destroem células infetadas; complemento, ativado a partir de elementos das paredes celulares bacterianas; fagócitos – macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs), que ingerem microrganismos e outras partículas. Algumas das citocinas envolvidas na resposta imune inata são:

- Interferões (INFs) α , β , γ - nas infeções virais;
- IL-12 e INF- γ - infeções por agentes intracelulares;
- IL-1, IL-6, IL-4, TNF- α - infeções por bactérias extracelulares, protozoários e hemintas, entre outros.

Para além disso, são determinantes as células constitucionais do epitélio das mucosas - células dendríticas (DCs), linfócitos T reguladores (Treg), Células B (praticamente ausentes), Linfócitos intraepiteliais (IELs), células M.

A ativação da resposta imune adaptativa tem por base as células apresentadoras de antígenos (APCs), como algumas populações de DCs, e diferentes populações de linfócitos T e B. Os linfócitos T podem ser divididos genericamente em linfócitos CD4 (helper) e CD8 (citotóxicos), responsáveis por respostas mediadas por células. Os linfócitos T helper CD4 podem por sua vez ser divididos em dois grandes tipos: Th1, que originam predominantemente respostas mediadas por células, e Th2, que medeiam sobretudo a resposta humoral. Os linfócitos B por sua vez produzem anticorpos específicos para o agente imunizador, sob cooperação com linfócitos CD4. As interações entre APCs, células T e linfócitos B envolvem antígenos *Major histocompatibility Complex* (MHC) de classe II, e MHC classe I para interações entre linfócitos T CD8 citotóxicos e os antígenos específicos.²²

As citocinas de produção celular constituem fatores ativadores e diferenciadores para os diferentes tipos de linhagens de células. O primeiro passo na indução de uma resposta dependente de anticorpos passa pela ativação de linfócitos T CD4⁺, que ao reconhecerem o antígeno apresentado por células dendríticas ou fagócitos secreta citocinas que promovem a sua maturação. Na presença de IL-12, os linfócitos Th1 diferenciam-se, passando por sua vez a secretar IL-2 e INF- γ . Os linfócitos Th2 por sua vez diferenciam-se na presença preponderante de IL-4, vindo a produzir e secretar também a própria IL-4, e IL-5. Estas duas citocinas são fundamentais na diferenciação e maturação de linfócitos B produtores de anticorpos. Outra classe de Linfócitos T CD4 (Treg) desempenham um papel essencial na regulação da resposta adaptativa imune.²³

A resposta imune inata é capaz de responder de forma distinta a diferentes tipos de organismos patogénicos. As subseqüentes respostas diferenciadas ajudam na determinação da

resposta adaptativa. *Pattern recognition receptors* (PRRs) codificados na *germline*, reconhecem PAMPs, como os TLRs, *Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs), entre outros. Todos estes contribuem para a ativação imune ao induzir citocinas pro-inflamatórias, que por sua vez, modulam a resposta adaptativa. Claramente, um melhor esclarecimento de como funcionam estes mecanismos, tem óbvias implicações no desenvolvimento e aplicação terapêutica de adjuvantes.²³

Sistema imunitário associado às mucosas - MALT

Um expressivo número de órgãos e tecidos, com constituições morfológicas e funções distintas, participam na resposta imune. Podem, portanto, ser distinguidos quanto à sua função em órgãos linfoides primários e secundários. O timo e a medula óssea constituem órgãos linfoides primários ou centrais, na medida em que neles ocorre o processo de maturação e diferenciação linfocitários. Os vasos linfáticos, baço, e os diversos tecidos linfoides associados a mucosas (MALT), constituem órgãos linfoides secundários ou periféricos, onde são reconhecidas estruturas antigénicas e que exercem interação preferencial e consistente com os linfócitos.²²

Os compartimentos envolvidos no sistema imune associado as mucosas podem ser divididos em locais de indução - onde antígenos provenientes das superfícies mucosas estimulam células T Naïve e linfócitos B; e locais efetores – onde células efetoras após extravasamento e diferenciação, contribuem para a formação de IgA secretora. Os locais de indução são constituídos pelo MALT, bem como por gânglios linfáticos locais. Já o locais efetores consistem em compartimentos diferenciados histologicamente, incluindo a lâmina própria (LP), o estroma de glândulas exócrinas e o epitélio de superfície.²⁴

O sistema MALT pode ser classificado segundo as regiões anatómicas onde se localizam.^{15,25}

- NALT (Nasal-Associated Lymphoid Tissue)
- CONALT (Cranial-Oral-Nasal-associated Lymphoid Tissue)
- BALT (Bronchus-associated Lymphoid Tissue)
- GALT (Gut-associated Lymphoid Tissue)
- SALT (Skin-associated Lymphoid Tissue)
- Tecido linfoide do sistema genito-urinário.

As membranas mucosas que delimitam os sistemas cutâneo, digestivo, respiratório e urogenital, apresentam uma área total de cerca de 400 m². Formam, assim, a principal porta de entrada da maioria dos organismos patogénicos no organismo. O Mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) é constituído por um grupo organizado de tecidos linfoides, que estruturalmente pode variar desde *clusters* de células linfocíticas livres, encontrados na lâmina própria das estruturas vilosas intestinais, até estruturas melhor organizadas, de que são exemplo as tonsilas e o apêndice, bem como as placas de Peyer na submucosa intestinal.²²

Todas as estruturas associadas ao MALT assemelham-se a gânglios linfáticos, com zonas de células T variáveis entre folículos de células B, que por sua vez contêm uma variedade de células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas (DCs) e macrófagos. Contudo a ausência de linfáticos aferentes é característica destas estruturas, uma vez que contactam diretamente com antígenos exógenos. Este contacto é feito a partir das superfícies mucosas, através de um epitélio folicular característico que contém células “*microfold*” ou “*membrane*” (*M cells*).²⁴

A importância do MALT prende-se com um aspeto funcional, relacionado com as grandes populações de células plasmáticas produtoras de anticorpos, presentes nestes tecidos em

números superiores aos encontrados no baço, nódulos linfáticos e medula óssea combinados.²²

O GALT (*Gut associated Lymphoid tissue*) consiste, atualmente, no tecido linfoide melhor estudado. Contém placas de Peyer, o apêndice e folículos linfoides isolados (ILFs), considerados locais de indução para os linfócitos B e T da mucosa.²⁴ Este tecido apresenta a capacidade de endocitar antígenos diretamente do lúmen intestinal, desencadeando uma reação imune com produção de anticorpos que podem ser exportados para o lúmen, de forma a combater microrganismos.²²

Mesmo sem apresentar seleção negativa para antígenos alimentares, os linfócitos da mucosa intestinal, não induzem, em condições fisiológicas, uma resposta imune a estes alimentos. A exposição oral aos antígenos alimentares leva a um estado de não reatividade específica e ativa para estes antígenos. Este mecanismo de tolerância imunitária reveste-se da maior importância no que toca a tolerabilidade a antígeno alimentares, mas também a patógenos e parasitas.

O sistema imunitário associado às mucosas é constituído essencialmente por três compartimentos principais (**Fig. 1**): a camada epitelial, a lâmina própria e o MALT, que no trato intestinal é designado especificamente por GALT.²⁶

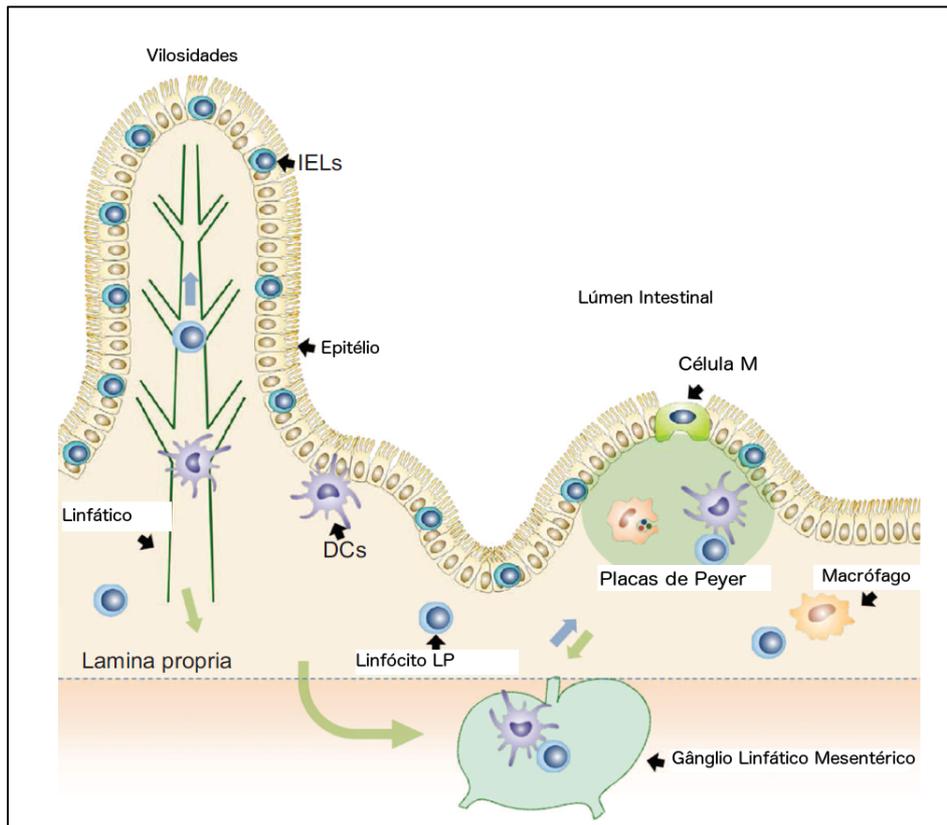


Figura 1. Esquema Geral do GALT

Adaptado de RQ WU et al, "The mucosal immune system in oral cavity - an orchestra of T-Cell diversity"²⁶

O GALT inclui as Placas de Peyer e folículos linfoides isolados. A camada epitelial e a lamina própria constituem a primeira linha de defesa contra os antígenos estranhos enquanto o MALT desempenha o papel de ativação da resposta imune adaptativa. As células T são abundantes no sistema gastrointestinal. Num adulto saudável estima-se estarem presentes cerca de 1 linfócito intraepitelial (IEL) por cada 5-20 células epiteliais. Esta percentagem varia consoante a condição do hospedeiro. Células apresentadoras de antígenos (APCs) capturam antígenos da camada epitelial e nas células M das placas de Peyer, migrando em seguida para os folículos linfoides, lâmina própria e nódulos mesentéricos, onde expõem estes antígenos às células T naïve. Após ocorrer um reconhecimento antigénico, as células T ativam-se e diferenciam-se em células efetoras.²⁶

Estudos iniciais, demonstraram que as placas de Peyer e gânglios linfáticos mesentéricos, são determinantes para os precursores das células plasmocíticas produtoras de IgA intestinal. A diferenciação das células B produtoras de IgA secretora ocorre durante a sua dispersão para os locais efetores. Desta forma a percentagem de linfócitos B diferenciados com IgA citoplasmático é de apenas 2% nas Placas de Peyer, aumentando para 50% no Gânglios mesentéricos, 75% no ducto torácico e finalmente 90% na lâmina própria intestinal devido a maturação terminal de células plasmocíticas.²⁴

Elementos Celulares

O ambiente citocínico da mucosa é maioritariamente produzido por células epiteliais (ECs), macrófagos, células dendríticas (DCs) e células T. *Transforming Growth factor* (TGF)- β , e interleucinas IL-6, IL-10 e IL-12 estão entre as mais representativas. Após ativação do TCR, as células T naïve proliferam e diferenciam-se em diferentes subpopulações Th, dependendo do microambiente citocínico (**Fig. 2**). Estas subpopulações irão posteriormente determinar uma resposta inflamatória ou reguladora. Nas últimas décadas, para além das Th1 e Th2, que constituem os dois grandes tipos de células T, foram identificadas outras populações celulares, nomeadamente: Th17, Th22, Th9, células T helper folicular (T_{fh}) e células T reguladoras (Treg). Estas caracterizam-se pela produção de diferentes citocinas efetoras, bem como a expressão de distintos fatores de transcrição.²⁶

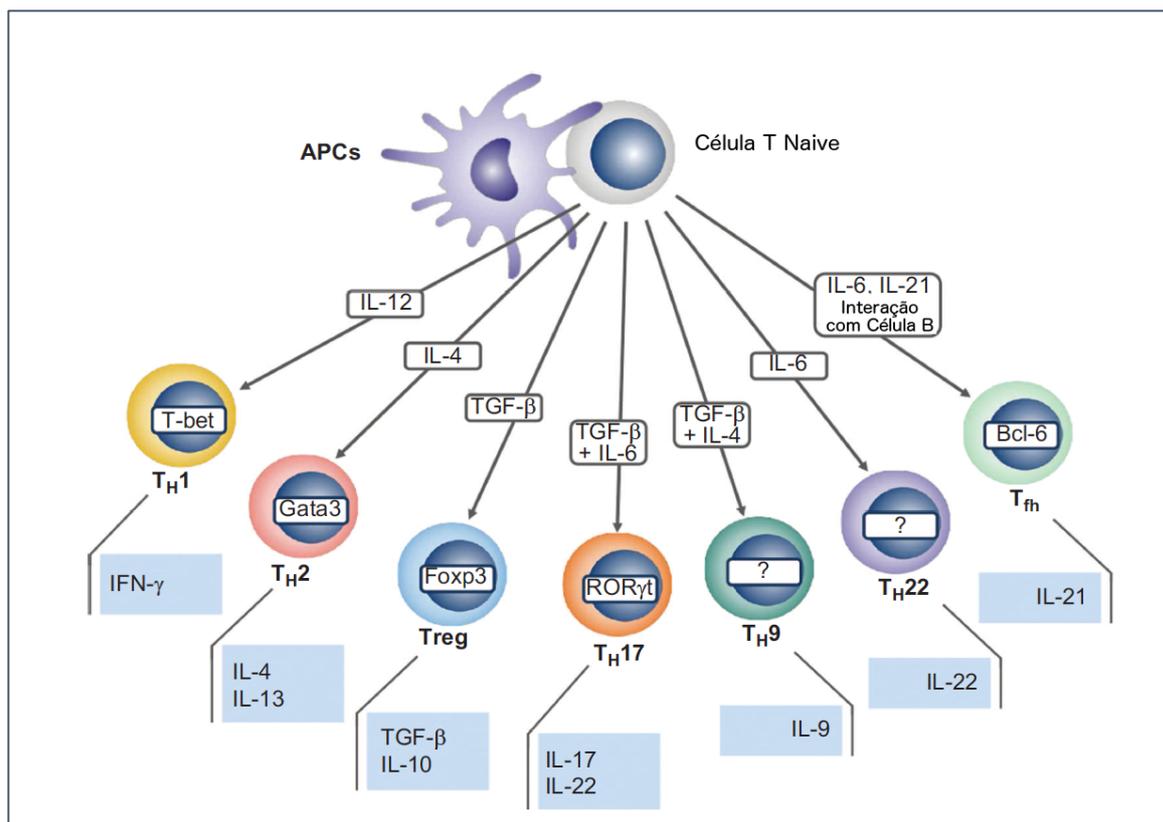


Figura 2. Populações de Células Th e perfil citocínico

Adaptado de RQ WU et al, “The mucosal immune system in oral cavity – an orchestra of T-Cell diversity”²⁶

Th1

Face a uma infecção por bactérias intracelulares ou vírus, são produzidas grandes quantidades de IL-12 e IFN- γ por macrófagos, DCs e NKs. Estas citocinas induzem diferenciação Th1 por ativação do STAT1 (*signal transducer and activator of transcription*) e *Janus Kinase-STAT pathways*. Durante a diferenciação será estimulada a produção de IFN- γ por ativação do fator de transcrição T-bet via STAT1. O IFN- γ consiste na citocina efetora *major* das células Th1, recrutando neutrófilos e promovendo o reconhecimento antigénico e fagocitose de microrganismos intracelulares. Estas células promovem o recrutamento de linfócitos citotóxicos e de células NK, necessárias na resposta imune mediada por células. Também se encontram ligadas ao desenvolvimento de autoimunidade, existindo estudos que

correlacionam a resposta Th1 descontrolada a bactérias, com doença inflamatória intestinal em ratos e gastrite autoimune.²⁶

Th2

As células Th2 são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos e macrófagos através da secreção de IL-4 e IL-13 e pela estimulação da secreção de muco por células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório, que protege o epitélio de partículas e colonização bacteriana. São ainda responsáveis pela proteção contra parasitas helmínticos, pelo recrutamento de mastócitos e basófilos, e pela indução de produção de anticorpos pelos linfócitos B. A sua diferenciação é iniciada via sinalização conjunta com TCR e IL-4, subsequente transdução do STAT6 e expressão do GATA3. O GATA 3 é um ativador de IL-4 e IL-13. Estão, naturalmente, implicadas diretamente na patogénese alérgica de mediação IgE, com produção e expressão preponderante de IL-4, IL-5 e IL-13.²⁶

Th17

As células Th17 são uma linhagem de células T CD4⁺ produtoras de IL-17, que lhes confere potente atividade pró-inflamatória e estão, classicamente, envolvidas nas defesas contra infeção por fungos. Estas células são reguladas por dois fatores de transcrição específicos para este fenótipo, o *retinoic acid receptor-related orphan receptor* (ROR) α e o ROR γ t. Para além disto verificou-se que a TGF- β e a IL-6 promovem a sua diferenciação *in vitro* e *in vivo*. Doenças autoimunes como a esclerose múltipla, artrite reumatoide e fenótipos graves de asma parecem estar associadas a esta subpopulação celular. A TGF- β parece ser crucial na regulação do balanço entre Th17 e Treg, pela ativação de ambos Foxp3 e ROR γ t, juntamente com outros fatores como o E2A (membro da família de proteínas *hélix-loop-hélix*) e ácido retinoico.²⁶

Th9

As células Th9 recentemente descritas, são induzidas por efeito de TGF- β e IL-4, apresentando funções semelhantes às células Th2, embora distintas pela produção preferencial de IL-9. Crê-se que esta população está envolvida na inflamação da vias aéreas devido ao facto de se ter identificado IL-9 em células T, localizadas na mucosa brônquica de indivíduos com asma. A expressão do gene de IL-9 poderá ser regulada de forma epigenética, sendo a sua expressão ativada por TGF- β e inativada por IFN- γ . Desta forma a IL-9 causa inflamação e hiperresponsividade das vias respiratórias. Contudo a sua importância biológica não está completamente esclarecida na inflamação da via aérea.²⁶

Th22

As células Th22 foram inicialmente identificadas no sangue periférico como um grupo de células T memória CD4⁺ CCR6⁺. Após estimulação, expressam CCR4 e CCR10 e segregam IL-22, produzindo muito raramente IFN- γ e IL-17. Apresentam uma expressão quase indetetável de T-bet, GATA3 e ROR γ t, ao contrário das Th1 e Th17, ambas produtoras de IL-22. As Th22 podem ser induzidas *in vitro* por IL-6 e TNF. As mDCs podem também induzir a sua proliferação. Pensa-se que estas células estão envolvidas no desenvolvimento de imunidade da pele, uma vez que a maioria expressa CCR4 e CCR10. A IL-22 é importante no combate de patogénios extracelulares por sinergia com outras citocinas pró-inflamatórias. Para além disso, a maioria da células epiteliais apresenta recetores para a IL-22, podendo esta citocina iniciar e promover respostas epiteliais. Desta forma crê-se que a IL-22, produzida por Th22 e Th17, é importante na patogénese da psoríase pela indução de hiperplasia, diferenciação anormal e expressão do gene da psoríase nos queratinócitos. Contudo parece conferir um efeito protetor na doença inflamatória intestinal.²⁶ Em patologia naso-sinusal a

sua intervenção parece ter enorme importância, nomeadamente em doentes com colonização ou infeção por *Stafilococcus*.

Linfócitos Intraepiteliais (IELs)

Os IELs constituem uma população celular presente na primeira linha de defesa do sistema imunitário das mucosas. As duas populações mais frequentes de IELs são de fenótipo $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$. Os precursores das células T $\gamma\delta$ derivam essencialmente de timócitos. Em contraste com as células T $\alpha\beta$, maioritariamente presentes nos tecidos linfoides, migram diretamente para os tecidos periféricos (ex. camadas cutânea, trato gastrointestinal e genital), antes do nascimento e durante o período neonatal. Desta forma, considera-se que as células T $\gamma\delta$ contribuem para a proteção imunitária em estádios muito precoces, logo após o nascimento. Este subtipo celular executa a sua função imunitária de uma forma semelhante à resposta imunitária inata. Embora os $\gamma\delta$ respondam a antígenos apresentados pelas MHC, não se encontram exclusivamente restritas a estas moléculas. A ativação de TCRs é desencadeado após contacto com moléculas MHC-like (CD1d), moléculas relacionadas com os MHC (MR1 e CD1c), bem como com moléculas não relacionadas com MHCs (como os PAMPs e *danger-associated molecular patterns*). As células $\gamma\delta$ expressam ainda TLRs e recetores para NK, incluindo TLR2, TLR3, TLR4 e NKG2D. Desta forma, presume-se que estas células são capazes de detetar *stress* celular e combate direto a antígenos. Uma percentagem considerável expressa o coreceptor CD8 $\alpha\alpha$ no trato gastrointestinal. Foi demonstrada a sua capacidade de realizar funções regulatórias ou pró-inflamatórias, através produção de IFN- γ e TNF- α em resposta a infeção, promovendo a resposta inflamatória em modelos animais. A sua função reguladora, a nível intestinal, aparenta estar relacionada com a produção de IL-10 e TGF- β . Estas citocinas suprimem a produção de IFN- γ pelas células T efectoras. As células IEL $\gamma\delta$ protegem ainda a integridade epitelial ao produzir TGF- β , bem como o fator de crescimento dos queratinócitos.

Um segundo subtipo extremamente importante de IEL é o $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\alpha^+$. Estas células expressam o coreceptor $\text{CD8}\alpha\alpha$ *homodimers*. A presença deste recetor está na origem do fenótipo ativado, embora $\text{CD8}\alpha\alpha$ exerça um efeito supressivo na ativação dos TCRs. Vários estudos demonstraram que as IELs $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\alpha^+$ estão associadas à tolerância antigénica intestinal, regulação imune e função antimicrobiana. Estas são derivadas de timócitos $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^-$ duplo negativos. O $\text{TGF-}\beta$ controla o desenvolvimentos destas subpopulações $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\alpha^+$ intestinais, induzindo também a expressão de $\text{CD8}\alpha$ em células T periféricas CD4^+ para produção de IELs $\text{CD4}^+ \text{CD8}\alpha^+$. Embora a função dos IELs $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\alpha^+$ permaneça largamente desconhecida, aparentam possuir funções imunoreguladoras através da produção de $\text{TGF-}\beta$, o gene ativador de linfócitos Th3, entre outras moléculas como o antigénio associado aos linfócitos T citotóxicos, *programed cell death 1* e outros recetores inibidores de células NK.²⁶

Células dendríticas

As células dendríticas (DCs) desempenham um papel fundamental nas resposta imunitária, e representam uma população muito heterogénea quer em circulação quer residente nos tecidos. No humano existem essencialmente dois grandes grupos celulares circulantes: células dendríticas mieloides (mDCs) e células dendríticas plasmocíticas (pDCs). Ambas apresentam diferentes TLRs e expressão distinta de citocinas, mediante estimulação microbiana. As mDCs expressam seletivamente TLR2-6 e 8, sendo responsáveis pela resposta a infeção viral através da produção de grandes quantidades de IL-12. As pDCs expressam constitutivamente TLR7 e 9 associados a endossomas, sendo responsáveis pela produção de interferões do tipo I.²⁰

As células dendríticas residentes da mucosa oral expressam moléculas co-estimuladoras como a B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) e outros marcadores mieloides como o CD11b.

Expressam também o receptor de IgE de alta afinidade (FcεRI) na presença de outros recetores de Fcγ; pelo aumento de expressão de MHC classe I e II e moléculas coestimuladoras; atividade estimuladora; recetores TLR tipo 2, 4, 7 e 9.^{27,28}

Células T reguladoras

As células T reguladoras (Treg) constituem uma população heterogénea. As mais relevantes na regulação imune são CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. São determinantes no estabelecimento de tolerância da mucosa oral, como será descrito adiante. São induzidas por exposição a alérgeno e inibidoras da inflamação alérgica, nomeadamente pela diminuição da produção de IgE (mediada por IL-10) e aumento da produção de IgG4 e IgA (mediada por TGF-β).^{27,28}

Células B

Embora existentes na mucosa oral, estas estão praticamente ausentes no epitélio e na camada papilar da mucosa.^{27,28}

Elementos humorais

Para além da intervenção celular a imunidade humoral é importantíssima na imunoestimulação, intervindo um conjunto variado de citocinas, imunoglobulinas e outras proteínas. Pretende-se enfatizar os que são críticos nesta temática.

TGF-β

As células presentes nas mucosas produzem grandes quantidades de TGF-β, que assume um papel fundamental na diferenciação de células T, manutenção do balanço imunitário no

trato gastrointestinal e produção de IgA, que promove a integridade da mucosa. Está ainda associada à indução de células Treg, inibidoras da atividade de várias células imunitárias, como as células T e macrófagos.²⁶

IL-10

Produzida por células das mucosas, trata-se de uma citocina inibitória importante, pela inibição da ativação de macrófagos e DCs. Suprime ainda a produção de IL12 por macrófagos ativados, inibindo a diferenciação Th2.²⁶

IL-12

A sinalização através do receptor da IL-12 induz a fosforização, dimerização e translocação nuclear de vários fatores de transcrição nucleares associados ao STAT (1,3,4,5). Contudo a resposta predominante da maioria das respostas biológicas a IL-12 são mediadas pelo STAT4. A IL-12 é maioritariamente produzida por células hematopoiéticas fagocíticas ativadas (monócitos, macrófagos, neutrófilos) e células dendríticas. Esta citocina é um potente indutor da produção de IFN- γ por linfócitos T, NK, entre outros tipos de células, estando também demonstrada como um indutor potente da diferenciação de linfócitos Th1. Um grande número de estudos em modelo animal, usando animais geneticamente deficientes ou anticorpos, evidenciaram que a IL-12, graças ao seu potencial indutor de Th1, é necessária na resistência contra infecções bacterianas ou de parasitas intracelulares. Mostrou-se também relevante no estabelecimento de autoimunidade órgão-específica.²⁹

IL-2

Estudos *in vitro* demonstraram que a IL-2 é um fator de crescimento, ativador e facilitador de apoptose celular de linfócitos T ativados. Está associada ao desenvolvimento e manutenção

de imunotolerância. Estudos animais demonstraram que ratinhos com défices em IL-2 e/ou do seu recetor exibem marcadores de autoimunidade. A sua atividade enquanto mediador de morte celular intrínseca consiste num fator chave para a apoptose de células T periféricas autoreativas. Contudo estudos *in vivo* recentes apontam para a existência de um controlo da autoimunidade mediado por IL-2, através da produção de células Treg CD4⁺ CD25⁺. Neste contexto a IL-2 é essencial para a expansão de células Treg no timo e no tecido imunitário periférico neonatal. Desta forma, para além da função essencial como principal fator de crescimento para linfócitos T ativados por estimulação antigénica, os novos achados redefinem o seu papel como indutor major da produção de células Treg supressivas.³⁰

Interferões

Os interferões de tipo I (IFNs) são uma família de citocinas especializadas que coordenam a resposta imunitária a vírus e outras infeções intracelulares.³¹ Estes afetam claramente a libertação de citocinas pró-inflamatórias ou óxido nítrico por células dendríticas e macrófagos, a capacidade do IFN de tipo II (IFN- γ) de ativar fagócitos, a diferenciação de células T helper e o controlo inato de patógenos não-virais. O papel dos IFNs de tipo I no sistema imunitário foi apenas caracterizado em detalhe para o IFN- α e IFN- β . A sua ação é mediada pelo recetor IFN (um membro da família de citocinas helicoidais de classe II), que apresenta uma cadeia α (IFNAR-1) e uma cadeia β (IFNAR-2). Análises mutacionais em ratinhos evidenciaram que para a indução da resposta de alguns genes das IFNs e/ou atividade antiviral total dos IFNs α e β são necessários ambas as subunidades do recetor, como o *Janus Kinases* Jak1 e Tyk2, o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT1), e também em certa medida o fator regulador do interferão 1 (IRF-1), sendo a Jak2 dispensável. A atividade potente dos IFNs α e β contra infeções vírias é baseado primariamente na expressão de genes indutivos de proteção (ex. *encoding 2-5 oligoadenylate syntetase, double stranded RNA-activated protein kinase, guanylate-binding protein e MxA protein*) que conferem resistência

celular, inibem replicação e disseminação viral, sendo que também apresentam certos efeitos imonumodeladores. São conhecidas várias outras funções dos IFNs α e β no sistema imunitário, como a modulação da produção de anticorpos, o aumento da citotoxicidade de células T e NK, a inibição das células T supressoras e a diferenciação preferencial das células T helper em Th1.³²

IgA

A produção de ácido retinóico pelas células dendríticas nas placas de Peyer constitui um dos fatores chave condutores da conversão de células B IgM⁺ para IgA. O APRIL (*proliferation-inducing ligand*), também conhecido como *tumor necrosis factor ligand superfamily member 13* (TNFSF13), estimula a *class switch recombination* para IgA nas células B, e sustenta-se que é crítico para a produção *in vivo*. Ambos APRIL e TGF- β , outra citocina sinalizadora da produção de IgA, são produzidas por DCs, macrófagos, células T ativadas e células epiteliais. A IgA produzida pelos plasmócitos é transportada pela componente secretora, que existe como um recetor na superfície basal das células mucosas.

A IgA especificamente transportada é libertada nas superfícies mucosas por este sistema, sendo identificável pela adição da componente secretora à sua estrutura. A IgA secretora (sIgA) direcionada para a mistura de antígenos administrados consiste na primeira linha de defesa da resposta imune específica contra uma infeção. A IgA liga-se aos antígenos bacterianos, prevenindo a sua ligação às superfícies mucosas. Esta ligação seria o primeiro passo essencial numa infeção invasiva, apresentando ainda a capacidade de opsonizar corpúsculos bacterianos, assim permitindo a sua fagocitose e subsequente morte mediada por fagócitos profissionais, como os granulócitos. Crê-se que a produção mediada por antígenos de IgA constitui a atividade protetora mais importante contra as infeções do trato respiratório, vindo a ser preponderante no contacto decorrente e futuro com o mesmo antígeno.¹⁸

Sistema imune Orofaríngeo – CONALT

Os gânglios linfáticos da cabeça e pescoço, embora parte do sistema imunitário associado as mucosas, não podem ser designados por estruturas MALT na medida em que não obtêm os antígenos diretamente a partir das superfícies mucosas por intermédio de células M.²⁴ Contudo o acrónimo CONALT é frequentemente utilizado para se referir a estas estruturas.

As tonsilas constituem órgãos linfóides secundários, sendo encontradas em quatro localizações²⁰:

- Lingual, na base da língua;
- Palatinas entre os arcos glossopalatinos e faringopalatinos;
- Faríngeas (também designadas por adenóides), no teto da nasofaringe;
- Tonsilas tubares, junto a abertura das trompas de Eustáquio.

Tratam-se de estruturas nodulares constituídas por células reticulares e fibras, misturadas com células linfocíticas, macrófagos, granulócitos e mastócitos. Nestas, as células B encontram-se organizadas em centros foliculares e germinais; estes últimos rodeados por regiões que evidenciam atividade de células T. As tonsilas permitem assim a defesa contra uma série de antígenos que penetram no organismo por via epitelial nasal ou oral.^{22,20}

As amígdalas constituem um dos primeiros pontos de contacto do sistema imunitário com alérgenos alimentares ou aéreos. Durante a inspiração, os aeroalérgenos inalados podem alcançar uma velocidade de cerca 100km/h e atingir a superfície das adenóides. De forma muito semelhante, a ingestão de alimentos “esmaga-os” entre as paredes da orofaringe e a tonsila lingual, processo potenciado pela própria superfície críptica destas estruturas. A sua localização anatómica e estrutura histológica, constituem uma evidência de que as tonsilas

desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de tolerância oral, embora até hoje não tenha sido completamente elucidado.²⁰

O sistema imune orofaríngeo associado às mucosas é semelhante ao gastrointestinal e respiratório, apresentando diferenças estruturais importantes (**Fig. 3**).

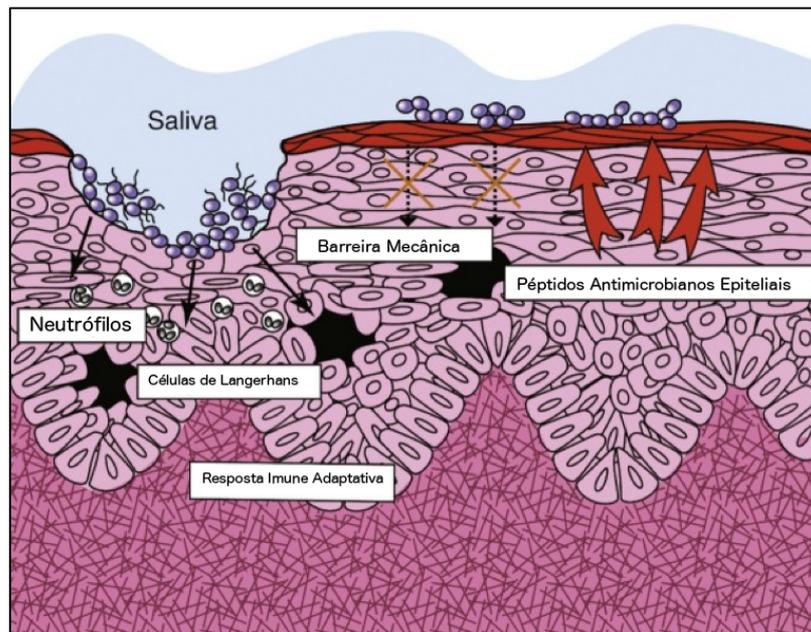


Figura 1. Estruturas e Células Imunitárias na mucosa Oral

Adaptado de RQ WU et al, “The mucosal immune system in oral cavity - an orchestra of T cell diversity”²⁶

A mucosa orofaríngea é formada por epitélio estratificado, sendo a lâmina própria constituída por tecido conectivo laxo que contém vasos sanguíneos e linfáticos. Forma-se assim uma barreira mecânica mais compacta que no sistema gastrointestinal, embora também permeável e com pontos de fragilidade únicos (ex. peças dentárias, que se estendem através da mucosa). Um modelo proposto admite que os compartimentos orofaríngeos são um tipo de MALT especializado, constituído por mucosa oral, glândulas salivares e o anel de Waldeyer (tonsilas palatinas e adenoides). Outros modelos sugerem que, à semelhança do sistema imune gastrointestinal, o sistema imunitário orofaríngeo é composto por locais de indução

(onde os linfócitos seriam ativados mediante apresentação antigénica) e locais efetores (para onde migram os linfócitos já ativados exercendo resposta imunitária). Desta forma os locais indutores incluiriam o MALT (sobretudo tonsilas e glândulas salivares), folículos linfoides e nódulos linfáticos, enquanto que os locais efetores seriam o epitélio, lamina própria e glândulas salivares. Os linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria encarregam-se da eliminação dos antígenos estranhos. Após reconhecimento antigénico, as células dendríticas, de Langerhans e macrófagos residentes da lâmina própria ou epitélio, migram para o MALT e nódulos linfáticos, ativando a proliferação e diferenciação de células T. A nível das criptas das tonsilas palatinas foi identificada um tipo de célula muito semelhante às células M das placas de Peyer, que poderá exercer função de apresentação antigénica. É conhecido que a mucosa oral é coberta por saliva rica em imunoglobulinas, sobretudo a IgA secretora e péptidos antimicrobianos, como as defensinas, entre outras secretadas pelas glândulas salivares.²⁶

Entre os grupos celulares presentes na mucosa orofaríngea, as células dendríticas são as mais estudadas. Estudos realizados em ratinhos permitiram verificar que diferentes subtipos de DCs CD11c⁺ bem como de LCs residem no epitélio da mucosa oral, sublingual e gengival. Estas são células apresentadoras de antígenos a células T. As populações de células T, como as IELs são as menos estudadas na mucosa orofaríngea. Em pacientes com dermatite herpetiforme as células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ residem no epitélio da mucosa oral. No entanto as IELs CD8 $\alpha\alpha$ apenas foram identificadas recentemente.²⁶

Tolerância Oral

A tolerância oral associada a mucosas é definida como a tolerância induzida por esta mucosa, distinto de tolerância oral propriamente dita, que é aquela que é induzida pelo sistema imunitário gastrointestinal.²⁶ A tolerância oral associada a mucosas, induzida pela imunoterapia sublingual a alergénios, constitui um modelo exemplar e uma via de administração potencial para extratos bacterianos terapêuticos para o tratamento da infeção respiratória recorrente.

Os tratamentos com antiácidos podem induzir sensibilização alérgica, sugerindo a existência de um potencial mecanismo de tolerância a alergénios, anatomicamente localizados acima do estômago (ácido gástrico e proteases digestivas). As tonsilas integram o único tecido linfoide exposto a antigénios ambientais, antes da degradação pelo sistema digestivo, pelo que constituem um microambiente ideal para a existência de tolerância imunitária a aeroalergénios e antigénios alimentares. De forma a avaliar esta hipótese, um estudo realizado por *Palomares et al*²⁰, investigou tonsilas palatinas e linguais normais, após tonsilectomia, de forma a determinar as populações celulares e os mecanismos que ocorrem *in vivo*, na produção da resposta imunitária. Os resultados permitiram identificar um perfil celular diferente do existente no sangue periférico, sendo a frequência das células Treg CD4⁺FOXP3⁺ cerca de 3 vezes superior. Estas células expressam marcadores celulares de superfície clássicos das células Treg, mas não a cadeia alfa do recetor Il-7 (CD127), que permite a diferenciação entre células regulatórias humanas de células T ativadas. Para além disso, evidenciavam um *status* alérgico parcial, com baixa produção de citocinas, ausência de proliferação após estimulação com anti-CD3, e capacidade de supressão idêntica à de células Treg do sangue periférico. Desta forma as células Treg CD4⁺FOXP3⁺ funcionais representam um componente essencial nas tonsilas palatinas. Neste estudo foram ainda

investigadas 4 populações de células dendríticas, e a sua possível associação com a alta frequência de células Treg. As pDCs foram identificadas como as mais frequentes nas tonsilas palatinas humanas. Aproximadamente 40% das células Treg CD4⁺FOXP3⁺ coexistem *in vivo* com as pDCs nas áreas extrafoliculares de células T, a nível das tonsilas. Este facto sugere a possibilidade das células mDCs intervirem na homeostase tonsilar através da indução de proliferação e maturação de células Treg. Cerca de 13% destas células Treg encontravam-se em proliferação *in vivo*, pelo que as tonsilas constituem um nicho adequado para a sua expansão. Estes achados poderão ajudar a elucidar o mecanismo de indução de tolerância oral. As pDCs tonsilares estimuladas com IL-3, TLR7-L e TLR9-L, induzem células Treg CD4⁺FOXP3⁺ com capacidade supressora *in vitro*, para além de que as quantidades de ambas as populações são diretamente proporcionais. A confirmação de que é possível induzir células Treg específicas para determinado alérgénio com capacidade para suprimir antígenos, parece constituir um papel fundamental no desenvolvimento de imunotolerância em indivíduos saudáveis e não alérgicos. A depleção de células Treg CD4⁺FOXP3⁺ permitiu a proliferação tonsilar de células T induzidas por antígenos. A restituição dos seus níveis normais evidenciou novamente inibição da proliferação e células T. Confirmou-se ainda a existência de células Treg FOXP3⁺ específicas a nível tonsilar, o que permitiu provar a existência de células Treg FOXP3⁺ específicas para aeroalérgénios nessa localização anatómica.²⁰

V. Imunoestimulantes. Fundamentos Gerais

Os imunoestimulantes bacterianos podem conter bactérias inteiras inativadas por diferentes métodos, lisados ou outros componentes celulares, e está provada a eficácia no sistema imunitário. Atuam quer por via específica quer por via não específica, nos mecanismos celulares e humorais.¹⁵ Desde o aparecimento do conceito em 1970 vários fármacos foram desenvolvidos e comercializados sobretudo na prevenção da infecção respiratória recorrente.²¹

Agentes imunoestimulantes de origem bacteriana têm sido utilizados como tratamento adjuvante nestes doentes devido as suas propriedades imunomodadoras, particularmente versando o estímulo da resposta imune inata. Com efeito, preparações polivalentes bacterianas contêm diferentes formulações de estirpes bacterianas que são mais frequentemente responsáveis por infeções do trato respiratório.

Vários estudos demonstraram que os estimulantes imunitários bacterianos diminuem as infeções recorrentes em adultos e crianças, através da redução do número, duração e severidade dos episódios infecciosos. No entanto, o uso de imunomodadores em pacientes suscetíveis a infeção recorrente constitui um tema que não é objeto de consenso, devido à existência de resultados contraditórios. Estes resultados terão sido obtidos por estudos conduzidos com diferentes preparações e em diferentes condições clínicas. Subsistem ainda incertezas respeitantes aos mecanismos imunitários envolvidos no desenvolvimento de proteção e melhorias clínicas. Tudo isto contribui para que durante um período se tenha assistido a uma diminuição da prescrição e do uso de estimulantes bacterianos na prática clínica.³³

Um estudo realizado por *Esposito et al*³⁴ foi pioneiro na tentativa de elucidar a ação de um lisado, OM-85 BV, nas células dendríticas *in vivo*. Concluiu que a administração do fármaco não ativava as células dendríticas no sangue, ao contrário de um estudo realizado por *Zelle-*

Rieser et al., cujos estudos *in vitro* permitiram concluir que o OM-85 BV influenciava, claramente, a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos. Contudo outro estudo realizado por *Spisek et al.*, que visava a comparação do efeito *in vitro* de vários imunostimulantes, concluiu que o OM-85 BV não modificava as características das células dendríticas. No entanto os resultados contraditórios poderão ser explicados pela utilização de doses diferentes de OM-85 BV, duas vezes mais altos no primeiro estudo; pelo tempo de administração e tratamento, ou pela insignificância estatística da dimensão da amostra.

A imunostimulação das respostas imunitárias pode ser feita recorrendo²:

- Lisados bacterianos
- Bactérias (*Whole bacteria – heat killing*)
- Imunostimulação Química
- Vacinação

Os lisados bacterianos consistem numa família de fármacos “biológicos” introduzidos na década de 70 para tratamento e prevenção da infeção recorrente respiratória. Contudo, apenas na última década se começou a elucidar de forma consistente o seu mecanismo de ação. Consistem basicamente numa mistura de antígenos bacterianos de diferentes espécies. Estes antígenos podem ser obtidos após cultura em massa das diferentes estirpes bacterianas, recorrendo posteriormente a diferentes processos químicos ou mecânicos de lise celular e liofilização, após o que são misturados em proporções idênticas, juntamente com excipientes.^{16,12} Por vezes os extratos bacterianos são referidos como “vacinas orais”.

Atualmente mais de oito milhões de pacientes são tratados por ano com extratos bacterianos, sendo que cerca de 150 milhões já foram tratados desde o seu licenciamento.²

Mecanismos

Os lisados bacterianos polivalentes são utilizados como imunomoduladores no aumento da regulação da resposta imunitária contra agentes infecciosos. As superfícies mucosas dos sistemas gastrointestinal, respiratório, urogenital ou cutâneo integram a primeira barreira mecânica contra infecções virais, bacterianas e parasitoses. Desta forma quando um organismo patogénico ultrapassa a barreira epitelial é reconhecido por DCs residentes nos tecidos que, conjuntamente com as células epiteliais, induzem a quimiotaxia de fagócitos (macrófagos e neutrófilos). Estas células, por sua vez, podem interagir de duas formas com os antígenos bacterianos:

- **Diretamente**, através do reconhecimento imediato dos **PAMPS** (*Patogen associated molecular patterns*) de que são exemplos as endotoxinas (Gram negativos) e os peptidoglicanos (Gram positivos), ou pelos **PRR** (*Pattern Recognition Receptors*);
- **Indiretamente**, através da mediação de anticorpos ou do complemento.

Os fagócitos ativados vão assim sofrer um aumento da sua atividade citotóxica, permitindo a morte e eliminação do microrganismo invasor. As células dendríticas são pois uma ponte entre os dois tipos de resposta imunitária, inata e específica. Estas apresentam a função de capturar os agentes bacterianos, transportando-os para os nódulos linfáticos locoregionais, onde são posteriormente apresentados a linfócitos T. Durante este processo é induzido um aumento de moléculas de co-estimulação como o CD80, e CD86, produzindo citocinas que participam na ativação de células T e determinam a sua diferenciação em Th1 ou Th2.¹⁶ Os TLR 2 e 4 nas células dendríticas da mucosa oral estão envolvidos no desenvolvimento de

tolerância a endotoxinas, de que é exemplo a exposição repetida a LPS. Esta exposição leva a uma diminuição de TLR2 e 4 à superfície destas células, bem como a uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Assim, na presença de microrganismos comensais estas células são mantidas num estado imaturo, mas quando em contacto com patogénicos os APCs são recrutados e ativados para o local.^{27,28}

Os extratos bacterianos estimulam os mecanismos de resposta imunitária inata e específica através da ativação de uma resposta imunitária natural. As interações entre PAMPs e PRRs e TLRs resulta na ativação de células dendríticas, macrófagos, células NK, e produção de citocinas e quimiocinas, ativação da fagocitose e destruição rápida de patógenos. Por outro lado uma resposta inata melhora também estimula uma melhor resposta específica. As células T e B específicas para antígenos são geradas nas placas de Peyer, bem como um número considerável de linfoblastos, sobretudo IgA⁺ precursores dos plasmócitos produtores de IgA.^{27,28}

O efeito protetor dos imunomoduladores bacterianos está particularmente relacionado com as células memória e síntese de imunoglobulinas desencadeadas pelo contacto antígeno. A principal será a IgA, que desencadeia uma resposta imunitária rápida e específica, após contacto futuro com o mesmo antígeno.²

Os primeiros estudos *in vitro* consideravam a hipótese de que os efeitos clínicos dos lisados estavam diretamente relacionados a capacidade de desencadear uma resposta imune específica contra antígenos bacterianos. De facto desde meados do anos 70 se provou a indução da síntese de IgA específica contra estes antígenos na saliva de pacientes tratados com uma formulação oral de lisados.³⁵

Os extratos bacterianos aumentam a atividade das células NK, a produção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de moléculas de adesão nos fagócitos, e inibem a expressão de IL-12 pelos linfócitos do sangue periférico. Para além disto atuam sobre o metabolismo

oxidativo, com o aumento da produção do anião superóxido e óxido nítrico. A ativação e diferenciação das DCs é claramente influenciada, comprovado pelo aumento da expressão de CD83, CD86 e HLA II que constituem marcadores da maturação celular. Em estudo em modelo animal, os extratos bacterianos aumentaram a produção de IFN- γ e redução de IL-4, contribuindo de forma preferencial para o desenvolvimento de imunidade por Th1.²

Durante a década de 90 a descrição dos TLR e da sua função dentro do contexto alargado dos PRRs permitiu perceber como o sistema imune inato é estimulado por antígenos. Recentemente, foi possível observar efeitos relevantes em células B, células T e NK, através do uso de lisados polivalentes (*Polivalent Bacterial Lysate*).^{36,37,38}

R. Spisek et al.³⁸, num estudo realizado em 2004, investigou o efeito de vários imunomoduladores na maturação das células dendríticas derivadas de monócitos. Concluiu que três dos extratos testados exerciam um efeito estimulante muito elevado, em todos os aspetos avaliados – modificações fenotípicas associadas a maturação, capacidade de captura de antígenos diminuída e capacidade de estimulação das células T aumentada. O nível de ativação das células dendríticas era comparável ou superior à ativação causada por LPS. Além disso verificou-se que diferentes imunomoduladores apresentam níveis distintos de capacidade de ativação das células dendríticas, o que poderá ser explicado pelas diferenças na sua composição e diferentes tecnologias empregadas na sua produção.³⁸

A vacinação parenteral não permite aparentemente uma proteção ao nível das mucosas contra microrganismos patogénicos, ao contrário da imunização oral, intranasal ou sublingual, que promove a secreção local de imunoglobulinas antigénio-específicas, originando proteção local. As formulações orais parecem induzir uma disseminação de linfócitos desde o **GALT** até outros locais distantes do **MALT**, como o trato urinário, respiratório e glândulas secretoras, onde proliferam e se diferenciam em células efetoras. No geral, achados recentes permitem concluir que os lisados bacterianos exercem um efeito imunomodulador sobre a

resposta de diferentes células imunocompetentes, quer por ativação celular direta ou através da geração e ativação de células efetoras, e na rede intercelular de citocinas e vias de sinalização.¹⁶

Embora seja difícil efetuar uma determinação exata das concentrações luminais dos lisados bacterianos no intestino delgado, será necessário tomar precauções, para que a prescrição e a posologia destes fármacos seja feita em casos bem fundamentados e da forma correta. Isto visa diminuir o risco de desenvolvimento de doenças autoimunes, apesar desta associação não ter sido observada ou relatada ao longo das várias décadas de utilização.³⁸

Efeitos locais e Sistêmicos

Os efeitos locais e sistêmicos dos lisados bacterianos imunomoduladores foram *confirmados in vivo* mediante a avaliação da atividade inflamatória resultante da administração simultânea do extrato terapêutico e re-injeção de leucócitos autólogos marcados com radiofármaco (^{99m}Tc-HMPAO)³⁹. Na **Fig. 4** apresenta-se a aquisição qualitativa obtida em gama-câmara de um doente submetido a aplicação de uma solução aquosa de lisado (*Streptococcus pneumoniae* tipo 3 *Streptococcus pyogenes* grupo A *Branhamella catarrhalis* *Staphylococcus aureus* *Haemophilus influenzae* tipo B *Klebsiella pneumoniae*) na mucosa nasal. Neste doente, é possível comprovar que a atividade inflamatória na dependência do sistema imune associado à mucosa nasal progride ao longo do tempo (aquisições na 1^a, 3^a e 6^a hora) e simultaneamente envolvendo estruturas MALT adjacentes loco-regionais, resultantes de migração e infiltração celular de leucócitos circulantes. Paralelamente, observa-se, ainda, um envolvimento sistêmico paulatino com

acréscimos de atividade inflamatória com localizações a áreas dependentes do sistema imune central (medula óssea e tecido funcional tímico).

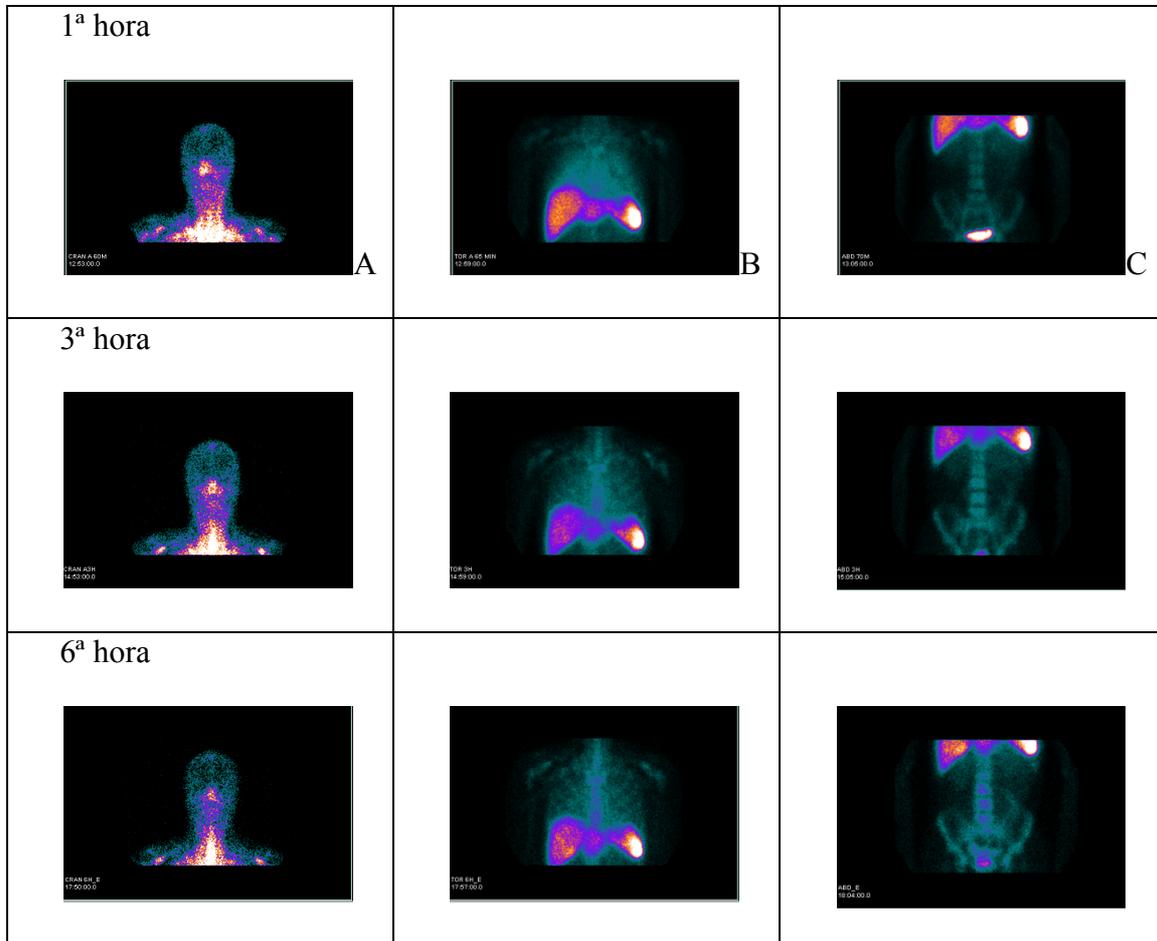


Figura 4. Avaliação qualitativa das aquisições cintigráficas estáticas obtidas em vista anterior craniana (A), torácica (B) e abdominal (C) nos tempos assinalados: 1ª, 3ª e 6ª hora após o início da administração do lisado aquoso na mucosa nasal.

Imagens cedidas pelo Prof Doutor Celso Pereira

Considera-se que os lisados bacterianos para além da resposta moduladora no sistema imune inato, na resposta IgG policlonal exercem efeito regulador mais central e seletivo que aquele que tem sido presumido e com eficácia clínica bem comprovada.^{1,39}

Naturalmente, a administração direta dos imunomoduladores em áreas fulcrais MALT, mucosas nasais, sublinguais, orais ou dependentes de absorção intestinal, parece claramente

constituir as vias potencias para uma resposta imune consentânea com os propósitos e os objetivos deste grupo terapêutico. Porém, mesmo a administração injetável por via subcutânea é capaz de indução dos mesmos efeitos sistêmicos e nos mesmos órgãos alvo, como foi comprovado na investigação realizada em Coimbra (Fig. 5), com um extrato aquoso contendo frações ribossômicas de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A) e *Haemophilus influenzae* e frações membranares de *Klebsiella pneumoniae*.³⁹

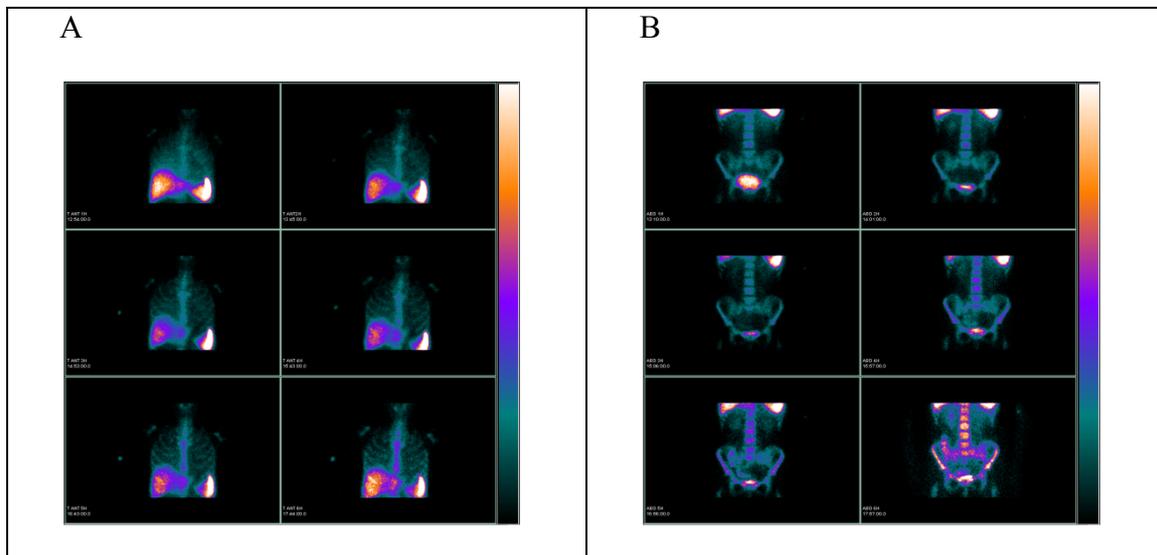


Figura 5. Avaliação qualitativa das aquisições cintigráficas estáticas obtidas em vista anterior torácica (A) e abdominal (B) nos tempos assinalados: 1^a, 3^a e 6^a hora após o início da administração do lisado aquoso por via injetável subcutânea no terço inferior externo da face externa do braço direito.

Imagens cedidas pelo Prof. Doutor Celso Pereira

Tipos de Imunomoduladores bacterianos

Os imunomoduladores bacterianos podem ser divididos em dois grandes grupos:²

1º Geração: Consistem em preparações com bactérias inteiras inativadas ou o seu lisado;

2º Geração: Contem apenas os componentes mais imunogénicos de bactérias (ex. ribossomas, proteoglicanos, etc)

Os lisados bacterianos polivalentes consistem numa mistura de antígenos preparados a partir de diferentes espécies de bactérias, tipicamente as mais comuns nos tratos respiratório superior e inferior. Cada uma das estirpes bacterianas é cultivada separadamente, colhida, inativada e lisada por um processo de lise mecânica ou química. Os lisados mecânicos consistem essencialmente em fragmentos bacterianos, sendo que os lisados podem ser constituídos apenas por proteínas de baixo peso molecular ou por uma mistura de corpúsculos bacterianos inativados e proteínas solúveis.³⁷

Métodos de lise bacteriana para obtenção de antígenos:²

- **“Sonication”** – Consiste na técnica mais popular para lisar pequenas quantidades de células bacterianas. Estas são lisadas por tensão de corte líquido por forças aplicadas em sentidos opostos (*“liquid shear”*) e cavitação;
- **Homogeneização** – Os homogeneizadores são os instrumentos mais comumente utilizados na lise de bactérias. As prensas conduzem a lise celular através de pressurização e posterior libertação súbita da suspensão celular. Posteriormente é criado uma tensão de corte líquido com capacidade de lise as células bacterianas;

- **Lise enzimática com lisossomas** – Esta técnica é baseada na digestão da camada de peptidoglicanos da parede celular por lisossomas. As bactérias *gram* negativas, contudo, apresentam uma membrana externamente à parede celular que necessita de ser permeabilizada para exposição da camada de peptidoglicanos. Para aumentar o nível de lise celular a solução pode ser “sonificada”;
- **“Freezing and grinding”** – Consiste no congelamento das células bacterianas diretamente em nitrogénio líquido e a sua transformação em pó, que é depois de novo submetido a nitrogénio líquido. Este pó pode ser armazenado indefinidamente a -80 C°, e o lisado bacteriano assim obtido é preparado através da adição a volumes de solução aquosa tampão.

De seguida reportam-se algumas formulações terapêuticas de extratos bacterianos de 2ª geração disponíveis no mercado farmacêutico de oficina, maioritariamente disponíveis em comprimidos e cápsulas, mas também alguns em formulações aquosos ou em comprimidos mastigáveis que vão reforçar uma absorção sublingual inicial, para além da posterior absorção e estimulação GALT.

1º Geração

- **Extratos de bactérias inteiras**

As vacinas bacterianas são preparadas a partir de culturas puras de estirpes bacterianas certificadas, providenciadas por coleções de culturas oficiais. As bactérias crescem em culturas com proteína de origem animal, após o que são inativadas por um método químico ou térmico. Após confirmada a inativação, os corpúsculos bacterianos são lavados, estabilizados e doseados segundo a concentração ideal para o tratamento, consoante a prescrição individual

de um especialista, para um paciente específico. Desta forma estas vacinas são consideradas como “*patient named products*” (PNP). Poderão conter cerca de 1.500 a 2.600 milhões de bactérias/ml.³³

A sua composição compreende bactérias *gram*⁺ e *gram*⁻ (Tabela 1), às quais se pode adicionar um reforço em termos de composição da preparação, para os microrganismos causadores da infeção em causa (ex: *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* na infeção urinária; *Streptococcus pneumoniae* na rinosinusite, traqueobronquite ou infeção brônquica; *Staphylococcus aureus* e *epidermis* nas infeções cutâneas).

A administração dos agentes bacterianos inteiros inativados confere uma maior capacidade imunogénica a estes compostos, e conseqüentemente uma maior eficácia na modelação das respostas imunitárias inata e adaptativa, na medida em que são administradas todas as estruturas antigénicas destes microrganismos, por oposição aos lisados que contêm apenas alguns dos componentes antigénicos mas não a sua totalidade.

Gram⁺	Gram⁻
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Fusobacterium novum</i>

Tabela 1: Bactérias *Gram*⁺ e *Gram*⁻

- **Preparações polivalentes bacterianas**

Contêm diferentes espécies de bactérias inativadas inteiras, com cerca de 10^9 bactérias/ml, mais frequentemente indutores de doença no trato respiratório: *S. Pneumoniae*, *K. Pneumoniae*, *M. Catarrhalis* e *H. Influenza*, entre outros. Um estudo realizado por *D. Alecsandru et al*³³, em 2011, concluiu que a administração de um destes compostos durante 6 meses levou a uma diminuição significativa da frequência de infecção dos tratos respiratórios superior e inferior nos pacientes tratados. As observações foram realizadas num período de 12 meses após administração inicial, em comparação com o número de IRTR no ano anterior. Este estudo concluiu ainda que a administração desta preparação levou a um aumento da capacidade proliferativa de células T $CD3^+ CD4^+$ e de células $CD3^+$ e $CD8^+$, específicas para os antígenos de *Influenza*, após 6 meses de tratamento. Uma vez que os doentes tratados estavam previamente vacinados para Influenza, num intervalo mínimo correspondendo aos dois últimos anos, considerou-se a hipótese de que a administração da preparação bacteriana, pode ter induzido um efeito estimulatório sobre a resposta imunitária celular, já presente nos pacientes contra estes antígenos. Este efeito poderá estar também relacionado com a existência de uma dependência entre a atividade dos linfócitos T $CD4^+$ na expansão das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ específicas para este antígeno, e com a indução de células T $CD4^+$ associadas com a efetividade da resposta imunitária em terapêuticas de imunização prolongadas.³³

2 ° Geração

Em seguida serão apresentados algumas formulações terapêuticas de lisados de 2ª geração disponíveis no mercado de farmácia de oficina que pelas suas particularidades e composições merecem uma seleção criteriosa para cada doente em particular. Naturalmente, a eficácia

clínica está assente em inúmeros estudos de dose-efeito, mas a potência e o efeito preventivo e profilático são claramente inferiores aos de 1ª geração.

- Extrato em solução oral, constituído por uma suspensão de antigénios bacterianos obtidos pela inativação química de *Streptococcus pneumoniae* tipo 3, *Streptococcus pyogenes* Group A, *Branhamella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Hemophylus influenza* tipo b e *Klebsiella pneumoniae*, entre outros. Os seus efeitos *in vivo* foram inicialmente demonstrados na década de 70. Desde então, foram realizados poucos estudos sobre a sua eficácia. Alguns estudos recentes demonstraram uma redução do número de infeções durante o período de observação, com uma média de 1,73 episódios/ano nos pacientes tratados, versus uma media de 2,63episodios/ano no grupo placebo - menos 34%. Nestes mesmos estudos, foi possível observar-se uma redução do número de episódios de infeção, da sua duração, tosse, uso de antibióticos e dias perdidos. Um estudo clinico de 2014, realizado por *F. Braido et al*³⁷, duplo-cego controlado, realizado em condições clinicas adequadas e com uma população estatisticamente relevante, concluiu que existe uma redução significativa do número de episódios infecciosos nos pacientes tratados (média de 0,86 episódios/8 meses) *versus* 1,43 episódios/8meses no grupo placebo. Note-se que a população recrutada apresentava originalmente uma média de 5,34 episódios/ano, o que corresponde a 3,56 episódios/8 meses. Contudo, estas diferenças poderiam ser explicadas pela hipótese da existência de diferentes “contextos epidemiológicos” entre o ano anterior, e o ano no qual se realizou o estudo (diferenças de temperatura, agressividade viral). No entanto, realizou-se um inquérito que mostrou resultados idênticos entre os principais vírus no período em estudo (influenza, rinovírus, adenovírus e VSR) e o ano anterior. Estes vírus apresentavam as mesmas taxas prevalência relativamente à época de maior infeção anterior. O estudo não encontrou uma

diferença estatística significativa no uso de antibióticos, AINEs, broncodilatadores, anti-histamínicos ou esteroides locais entre os grupos tratados e placebo, mas verificou uma tendência clara na redução do uso destes fármacos no grupo tratado.

- OM-85 BV: consiste num extrato disponível em cápsulas e saquetas para administração oral, que contém lisados resultantes da proteólise alcalina de oito tipos de bactérias patogénicas (*H. influenza*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *S. aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* e *M. Catarrhalis* - em partes iguais), mais frequentemente encontradas nas infeções respiratórias recorrentes.^{40,21} Enquanto imunomodulador evidenciou-se que o OM-85 BV atua não só a nível da resposta imune inata, recrutando macrófagos, aumentando a atividade dos neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias, como também a nível da resposta adquirida, regulada por linfócitos e síntese de imunoglobulinas.¹⁵ O OM-85 BV é o produto da proteólise alcalina das bactérias. No entanto este método pode causar desnaturação de proteínas, o que conseqüentemente se traduzirá por menor imunogenicidade dos antígenos bacterianos e menor resposta imunológica.⁶

Um estudo concluiu que o OM-85 BV permitiu reduzir de forma significativa e consistente o número de casos de infeção respiratória recorrente comparado com controlos (26,2% de diferença de risco)^{40,21} Relativamente ao regime de administração recomendado em vários países europeus, o OM-85 BV deve ser administrado em ciclos de 10 dias consecutivos por 3 meses consecutivos.³⁴ No entanto alguns dos melhores resultados clínicos obtidos ocorreram com administração do fármaco por 30 dias consecutivos em crianças com infeção recorrente respiratória.⁴¹ Um estudo realizado em 2014 por *Esposito et al*³⁴ concluiu que a administração de OM-85V não parece aumentar a resposta imune humoral ou mediada por células originada pela administração da vacina

inativada do vírus *Influenza*. No entanto, apresenta um efeito positivo na incidência de novos episódios de infecção respiratória recorrente em crianças com história de doença, com um bom perfil de segurança.³⁴ Um estudo realizado por *R. Spisek et al*³⁸ em 2004 concluiu que o OM-85 BV apresentava apenas um efeito marginal na ativação de células dendríticas, por oposição aos resultados obtidos noutra estudo realizado por *Zelle-Rieser et al*. No entanto esta discrepância poderá ser explicada pelo facto deste último estudo não considerar a viabilidade celular, ao contrário do estudo de *R. Spisek et al* que concluiu que a viabilidade das células detriticas 48 horas após estimulação era de apenas 10 %, em concentrações de OM-85BV superiores a 50 ug/ml³⁸. De referir no entanto que uma revisão sistemática realizada em 2007 por *Steurer-Stey et al*⁸, concluiu que o nível de evidencia a favor do OM-85BV na prevenção de IRTR em crianças é fraco, mas denotando, mesmo assim, uma tendência na redução do número dos episódios infecciosos, bem como da sua duração e menor necessidade de antibioticoterapia. Uma análise realizada por *Sopo et al* em 2011⁴² concluiu que o OM-85BV é o lisado mais eficaz. Contudo apresenta uma redução global das taxas de IRTR de 39% (por agregação de estudos de diferente qualidade metodológica). O OM-85 BV apresenta nível de evidencia A, nas guidelines da *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012 (EPOS)*⁴³

- Extrato bacteriano constituído por *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*. Esta preparação está disponível na forma de comprimidos que devem ser mastigados, o que favorece uma absorção mais larga e célere.

- LW50020 resulta de um extrato de lisados bacterianos com um perfil ligeiramente diferente: *S. Aureus*, *Streptococcus mitis*, *S. Pyogenes*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *M. Catarrhalis*, e *H. Influenzae*, sendo administrado por via oral.¹⁸ Em 2004, R. Spisek et al³⁸ concluiu que este fármaco seria o único que permitia a produção de quantidades significativas de de p70 IL-12.
- Um extrato composto por corpúsculos bacterianos inteiros ou lisados dos agentes mais frequentes de infecção do trato respiratório: *S. Pneumonia*, *M. Catarrhalis*, *S. Pyogenes grupo A*, *H. influenza tipo B*, *S. Aureus* e *K. Pneumoniae*.¹⁸
- Outro extrato obtido por filtração de “phage lysed” bactéria (*Escherichia coli* e *K. Pneumoniae*). Os componentes com peso molecular mais baixo que 10 000 µg são eliminados por filtração *milipore*. A solução é liofilizada, sendo administrado por via oral dissolvido em água.¹⁸
- PMBL (Polivant Mechanical Bacterial Lysate) consiste num lisado bacteriano obtido por lise mecânica a partir de uma grande variedade de bactérias, sobretudo das mais frequentes nos tratos respiratórios superior e inferior (*S. Aureus*, *S. viridans*, *S pyogenes*, *K pneumoniae*, *K ozaenae*, *H. influenza sertipo B*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae*). O método de lise mecânica é particularmente eficiente permitindo a lise de 80-100% das bactérias, sem alterar a estrutura dos antígenos, o que lhe confere propriedades antigénicas perfeitas. Desta forma permitirá a indução de uma resposta específica contra estes 7 tipos de bactérias mais frequentemente causadoras de infecção respiratória.⁶ A ativação do sistema imunitário pelo PMBL consiste no reconhecimento antigénico pelos TLR (Toll like receptors), que se expressam na superfície membranar das células

fagocíticas. Estes recetores interagem com as estruturas antigénicas podendo ocorrer uma resposta extracelular, mediante a ativação destes recetores pelo lipopolissacarídeo (LPS), lipopeptídeos/lipoproteínas (LP), ácido lipoténico (LTA) e peptidoglicanos (PG) bacterianos; ou intracelular, por intervenção de PAMPs ou CpG. Desta resposta resulta a ativação dos monócitos, que vêm a diferenciar-se em células dendríticas, com o consequente reforço imunitário. Assim os antígenos bacterianos presentes no PMBL são capazes de ativar células monocítico-macrofágicas na submucosa, que se diferenciam em células dendríticas apresentadoras de antígenos, migrando para locais de indução onde ocorre a ativação de células T *helper*. O PMBL pode ainda induzir a diferenciação de células B em plasmócitos geradores de anticorpos específicos contra os antígenos presentes. Isto é particularmente importante no caso da produção de IgA. Esta permite a opsonização e fagocitose posterior, de microrganismos que apresentem as mesmas estruturas antigénicas, sendo uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunitário contra microrganismos. Vários estudos puderam demonstrar que os lisados bacterianos induzem a produção de IgA específicas a nível da mucosa, resultando naturalmente numa proteção local contra infeção bacteriana.¹⁶ O PMBL aparentemente é capaz de induzir a maturação das células dendríticas de uma forma dose-dependente, permitindo não só a ativação das células dendríticas derivadas de monócitos por um mecanismo associado a TLRs, mas também das DCs circulantes e plasmocíticas através da mediação de citocinas. A combinação das várias estirpes bacterianas contidas no PMBL aparenta também ser mais eficaz que a administração de antígenos pertencentes a uma única estirpe isolada.⁴⁴ Um estudo realizado por *R. Ricci et al*⁴⁴ em 2014, parece suportar a hipótese, já anteriormente sugerida por estudos *ex-vivo*, de que o PMBL é capaz de induzir a ativação de uma resposta policlonal das células B do sistema imunitário. Desta forma realizou-se uma avaliação do perfil serológico dos pacientes (grupo ativo e

placebo), tendo-se verificado que os doentes do grupo ativo apresentavam taxas de conversão serológica significativamente inferiores aos indivíduos de controlo. Para além disto verificou-se que alguns doentes dos grupos de controlo vieram a desenvolver infeções por vírus *sincicial* respiratório e outras infeções raras (*Echo e Coxsachie vírus*) que não ocorreram no grupo de doentes em tratamento ativo. Mais curiosamente verificou-se ainda que as concentrações serológicas de anticorpos específicos para um número de “antigénios” memória (ex. parotidite infecciosa, *Toxoplasma G.*, etc) estavam marcadamente aumentados nos pacientes tratados, mas não nos controlos. Estes aspetos constituem evidência a favor de uma ativação policlonal de células B, que do ponto visto clinico, poderá conceder aos pacientes tratados proteção não só contra infeção respiratória mas também sistémica.

- Extrato bacteriano que contem RNA ribossómico de bactérias causadoras de Infeção respiratória recorrente como *K. Pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. Pyogenes* e *H.Influenzae*. Contém ainda proteoglicanos das membranas células de *K. Pneumoniae*. A atividade imunomoduladora da componente ribossómica deve-se sobretudo a presença de epitopos celulares altamente purificados, obtidos das frações celulares por lise bacteriana. Este fármaco pode ativar as DC através de *crosslinking* da TLR3.³⁸ Um estudo realizado por *Bousquet e Fiocchi*¹ em 2006, demonstrou que a imunomodulação com extrato ribossómico reduzia o numero, duração e severidade dos episódios infecciosos, assim como o uso de antibioticoterapia e subsequente probabilidade reduzida de desenvolvimento de resistências.²

Indicações potenciais

Excluídas as imunodeficiências primárias, poderão ser utilizados como indicação primária na prevenção do risco infeccioso (criança e adulto) nas patologias seguintes:

Rinossinusite;
Amigdaloadenoidite de repetição;
Infeção respiratória de repetição;
DPOC;
Asma neutrofílica;
Dermatite atópica colonizada;
Infeção urinária repetição;

Efeitos Adversos

Os extratos bacterianos apresentam excelente perfil de segurança e tolerabilidade em todos os estudos clínicos realizados. Os efeitos adversos ocorreram ocasionalmente, mas foram muito leves e de rápida resolução. A maioria são do foro gastrointestinal ou cutâneos, tendo sido reportados eczemas, urticária, diarreia, dor abdominal, cefaleias, rinite e tosse. No entanto não foram observados nem relatados na literatura outros efeitos adversos sérios. Para além disso não foi reportada nenhuma associação causal entre a toma de extratos bacterianos e o desenvolvimento de doenças autoimunes.²

Impacto Económico

Não existem estudos de custo-efetividade disponíveis relativamente ao uso de lisados ou extratos bacterianos no tratamento da IRTR em população pediátrica. Contudo um estudo italiano conduzido com 57 pacientes de idades superior a 75 anos, em tratamento com PMBL, e com o objetivo de prevenir exacerbações de bronquite crónica obstrutiva, concluiu que o custo geral do período de tratamento, comparado com o mesmo período no ano anterior, foi significativamente menor. A média do custo de antibioticoterapia, durante o período de Setembro a Fevereiro, no período de pré-tratamento, foi de cerca de 3459,60 euros, *versus* um valor de apenas 1499,40 euros (-57%) no mesmo período durante o tratamento. Adicionando ainda o custo do tratamento profilático com PMBL, o valor total ficaria a 2794,44 euros, menos 20% dos custos da antibioticoterapia realizada no ano anterior.⁶ Da análise dos estudos clínicos disponíveis em crianças admite-se que este benefício seja igualmente evidente, tanto mais que para além da melhoria da qualidade de vida das crianças tem claras implicações nos familiares e cuidadores.

As IRTR contabilizam cerca de 300-400 consultas de medicina geral e familiar por cada 1000 pacientes, anualmente, pelo que podemos constatar o grande potencial em termos de ganhos para os sistemas de saúde, de uma aposta na profilaxia da infeção com lisados bacterianos.

VI. Caso clínico

Criança do sexo masculino, com 2 anos de idade, residente em Coimbra, observado em primeira consulta em 22 de Novembro de 2011, por infeções respiratórias recorrentes e sibilância.

Breve Resenha Clínica

- Amamentação materna exclusiva: 4 meses
- Diversificação alimentar sem intercorrências
- Antecedentes familiares irrelevantes

Setembro 2010: ingressa no Infantário, 15 dias após surge quadro de febre, rinorreia, tosse, otalgia, tratado inicialmente com associação de paracetamol e ibuprofeno. Porém ocorre agravamento com febre, otalgia, sibilância, pelo que inicia tratamento com amoxicilina e ácido clavulâmico, e aerossol com salbutamol.

Apresenta melhoria clínica, mas persiste obstrução nasal, rinorreia, tosse ocasional

Em Outubro de 2010 nova infeção respiratória, tratada novamente de forma inicial com paracetamol e ibuprofeno.

Em Novembro do mesmo ano surge quadro de infeção respiratória e otite à direita, medicado com eritromicina, paracetamol e ibuprofeno. No entanto surge re-agravamento no final Novembro.

Em Dezembro de 2010 novo surto com infeção respiratória grave e necessidade de internamento de curta duração, medicado com amoxicilina + ácido clavulâmico, deflazacort (2 dias) e aerossol com salbutamol

Em Janeiro 2011 apresenta clínica de adenoidite e otite bilateral, com necessidade de antibioticoterapia com cefuroxime, paracetamol e ibuprofeno.

Mantém, queixas nasais: obstrução, “ressonador”, rinorreia, tosse noturna e de esforço associado a períodos febris frequentes a “cada 15 dias...”

Em Maio de 2011 descreve-se outro episódio de infecção respiratória arrastada, tratada com amoxicilina + ácido clavulâmico

Observa-se repercussão nas curvas percentil de crescimento em altura.

Nos meses de Junho-Agosto apresenta uma melhoria franca, apesar de “febre de 2 dias no início da praia” e rinorreia anterior abundante.

A 6 Setembro 2011 novo surto de infecção respiratória, com sibilância, tosse, adenoidite, com nova prescrição de amoxicilina + ácido clavulâmico.

A 29 Setembro 2011 apresenta clínica de otite à direita, com obstrução nasal, tosse seca e sibilância, medicado eritromicina e deflazacort e salbutamol aerossolizado.

A persistência de sintomas é evidente, com infecções recorrentes e novo ciclo antibiótico em Outubro e Novembro pelo que é referenciado pelos cuidados primários (MGF) a consulta de Imuno-Alergologia.

Consulta Imuno-Alergologia:

➤ Dados objetivos

Obstrução nasal

Rudeza expiratória

Deficiente progressão estado-ponderal

➤ Exames complementares

Hemograma com leucograma: linfocitose discreta, não relevante

VSG: 12mm/1ªH

PCR: negativo

IgG, IgA e IgM: normais

IgE: 15KU/L

Testes aeroalergénios: negativos

Em Dezembro 2011 define-se em consulta novo Plano terapêutico:

-Vacina antigripal

-Corticoterapia tópica brônquica e nasal

-Beta-2 agonista curta ação em SOS

-Paracetamol e ibuprofeno: períodos febris

- Reforço da corticoterapia brônquica inalada em períodos de agudização

-Imunomodulação bacteriana sublingual com extrato aquoso contendo bactérias inteiras (mortas por meio físico, calor) de *gram* positivos e negativos (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiela*, *Branhamella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Corynebacterium* , reforçado face à clínica com *Streptococcus e Haemophilus*), contendo 2600 milhões de bactérias por ml.

Iniciou tratamento no final Dezembro, e manutenção foi atingida após 9 dias consecutivos, mantendo posteriormente toma 3 vezes na semana, correspondendo cada dose a 0,15cc (17.3300 bactérias).

A 17 Janeiro 2012 foi observado em consulta, comprovando-se não terem existido intercorrências com o tratamento e apresentando-se clinicamente estabilizado. Salienta-se, no entanto, um episódio febril autolimitado (inferior a 24 horas) no início de Janeiro, mas não associando tosse (noturna ou de esforço). A obstrução nasal era insipiente à observação. Não tinha ocorrido novos recursos a atendimento urgente ou novas prescrições de antibióticos.

Em consulta de seguimento no dia 6 Março 2012, a criança apresentava-se clinicamente estabilizado, referindo apenas com episódio febril pontual (horas) em Fevereiro controlado com paracetamol, coincidente com surto viral no infantário que frequentava.

A evidenciar

- Entrada tardia no infantário condiciona, com frequência, maior suscetibilidade à infecção.
- Nos primeiros anos de vida os agentes infecciosos são os principais indutores de hiperreatividade brônquica, particularmente agentes víricos.
- A inflamação das vias áreas superiores (rino-adenoidite, otite, amigdalite ou laringite) condiciona a instalação de inflamação distal (sino-brônquica)
- A imunoestimulação inespecífica de forma persistente por via sublingual é promotora de modulação imune consistente, não só reduzindo o número de episódios de doença (virsais ou bacterianos), consumo de fármacos e melhora da qualidade de vida da criança e cuidadores.

VII. Conclusão

Apesar de resultados dos vários estudos analisados bastante encorajadores, serão necessários mais estudos, nomeadamente de ensaios clínicos, de forma a investigar de forma mais exaustiva os efeitos *in vivo* deste grupo de fármacos. Efetivamente ainda existe atualmente uma escassez de estudos, quer *in vitro*, quer *in vivo*, sendo que os ensaios clínicos existentes apresentam lacunas e deficiências de desenho, nomeadamente por não incluir um numero superior de pacientes, que devem ser selecionados de acordo com a sua doença e severidade, e melhor desenhados e controlados em duplo cego. Isto permitiria um maior nível de evidência relativamente à utilização dos extratos bacterianos de primeira geração, mais eficazes e com maior imunogenicidade e por isso mesmo reservados a situações de maior gravidade ou lisados de 2ª geração facilmente disponíveis, para profilaxia de infeções respiratórias recorrentes de maior benignidade. A enorme segurança e reduzida taxa de efeitos adversos representam condições essenciais para que seja implementada com maior abrangência este grupo de fármacos, tal como está preconizado em documentos normativos ou *guidelines* nacionais e internacionais^{43,45}

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Doutor Celso Pereira, e ao Prof. Doutor Frederico Regateiro, pela orientação prestada na realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão, por todo o apoio, suporte e carinho nesta jornada.

Referências bibliográficas

1. Bousquet J, Fiocchi A. Prevention of recurrent respiratory tract infections in children using a ribosomal immunotherapeutic agent: A clinical review. *Pediatr Drugs*. 2006;8(4):235–43.
2. Jesenak M, Ciljakova M, Rennerova Z, Babusikova E, Banovci P. Recurrent Respiratory Infections in Children – Definition, Diagnostic Approach, Treatment and Prevention. Em: Martić-Loeches I, editor. *Bronchitis*. Rijeka, Croatia: InTech open science; 2011. p. 119–48.
3. Feleszko W, Ruszczyński M, Zalewski BM. Non-specific immune stimulation in respiratory tract infections. Separating the wheat from the chaff. *Paediatr Respir Rev*. 2014;15(2):200–6.
4. Slatter MA, Gennery AR. Clinical Immunology Review Series: An approach to the patient with recurrent infections in childhood. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):389–96.
5. De Benedetto F, Sevieri G. Prevention of respiratory tract infections with bacterial lysate OM-85 bronchomunal in children and adults: a state of the art. *Multidiscip Respir Med*. 2013;8(1):33.
6. Cazzola M, Anapurapu S, Page CP. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis. *Pulm Pharmacol Ther*. Elsevier Ltd; 2012;25(1):62–8.
7. Gomes E. Eficácia e segurança dos imuno-estimulantes na prevenção das infecções agudas do trato respiratório nas crianças. *Acta Pediátrica Port*. 2013;44(6):339–42.
8. Steurer-Stey C, Lagler L, Straub DA, Steurer J, Bachmann LM. Oral purified bacterial extracts in acute respiratory tract infections in childhood: a systematic quantitative review. *Eur J Pediatr*. 2007;166(4):365–76.

9. Bellanti JA. Recurrent respiratory tract infection in paediatric patients. *Drugs*. 1997;54(1):1–4.
10. Graham MH. The epidemiology of acute respiratory infections in children and adults: a global perspective. *Epidemiol Rev*. 1990;12(1):149–78.
11. Teele, D.W., Klein, J.O., & Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis*. 1989;160(1):83–94.
12. Braido F, Tarantini F, Ghiglione V, Melioli G, Canonica GW. Bacterial lysate in the prevention of acute exacerbation of COPD and in respiratory recurrent infections. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2(3):335–45.
13. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (update 2015). 2015;135.
14. de Vries E. Immunological investigations in children with recurrent respiratory infections. *Paediatr Respir Rev*. 2001;2(1):32–6.
15. Rozy A, Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants--mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol Alergol Pol*. 2008;76(5):353–9.
16. Villa Elisa, Garelli Valentina , Braido Fulvio, Giovanni Melioli and GWC. May We Strengthen the Human Natural Defenses with. *WAO J*. 2010;3(August):S17–23.
17. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinology*. 2012;50(SUPPL. 23):4–305.
18. Cazzola M, Capuano A, Rogliani P, Matera MG. Bacterial lysates as a potentially effective approach in preventing acute exacerbation of COPD. *Curr Opin Pharmacol*. Elsevier Ltd; 2012;12(3):300–8.

19. Janneke M de Man-van Ginkel, Floor Gooskens, Marieke J Schuurmans EL and TBh on B of the RGSWG. To print this article, please use the print button in the bottom toolbar of the web reader. *J Clin Nurs*. 2010;19:3274–90.
20. Palomares O, Rückert B, Jartti T, Küçüksezer UC, Puhakka T, Gomez E, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):510–20, 520.e1–9.
21. Bitar M a., Saade R. The role of OM-85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. Elsevier Ireland Ltd; 2013;77(5):670–3.
22. Kindt, Thomas J 1939-, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Kuby immunology. 6th ed. New York : W.H. Freeman C, editor. New York; 2007. 43-56 p.
23. Kroger AT, Pickering LK, Wharton M, Mawle A, Hinman AR, Orenstein WA. 321 – Immunization. *Mand Douglas, Bennett’s Princ Pract Infect Dis*. 2015;3516–53.e5.
24. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):31–7.
25. Egawa G, Kabashima K. Skin as a Peripheral Lymphoid Organ: Revisiting the Concept of Skin-Associated Lymphoid Tissues. *J Invest Dermatol*. Nature Publishing Group; 2011;131(11):2178–85.
26. Wu R-Q, Zhang D-F, Tu E, Chen Q-M, Chen W. The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity. *Int J Oral Sci*. 2014;6(3):125–32.
27. Novak N, Bieber T, Allam JP. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011;66(6):733–9.
28. Incorvaia C, Frati F, Sensi L, Riario-Sforza GG, Marcucci F. Allergic inflammation and the oral mucosa. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2007;1(1):35–8.

29. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003;19(5):641–4.
30. Malek T. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J Leukoc Biol*. 2003;74(6):961–5.
31. Stetson DB, Medzhitov R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity*. 2006;25(3):373–81.
32. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(4):419–24.
33. Alecsandru D, Valor L, Sánchez-Ramón S, Gil J, Carbone J, Navarro J, et al. Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):100–7.
34. Esposito S, Marchisio P, Prada E, Daleno C, Porretti L, Carsetti R, et al. Impact of a mixed bacterial lysate (OM-85 BV) on the immunogenicity, safety and tolerability of inactivated influenza vaccine in children with recurrent respiratory tract infection. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2014;32(22):2546–52.
35. Clancy RL, Cripps AW, Husband AJ, Buckley D. Specific immune response in the respiratory tract after administration of an oral polyvalent bacterial vaccine. *Infect Immun*. 1983;39(2):491–6.
36. Morandi B, Agazzi A, D'Agostino A, Antonini F, Costa G, Sabatini F, et al. A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating phenotype in human dendritic cells. *Immunol Lett*. Elsevier B.V.; 2011;138(1):86–91.
37. Braido F, Melioli G, Candoli P, Cavalot A, Di Gioacchino M, Ferrero V, et al. The

- bacterial lysate Lantigen B reduces the number of acute episodes in patients with recurrent infections of the respiratory tract: The results of a double blind, placebo controlled, multicenter clinical trial. *Immunol Lett. Elsevier B.V.*; 2014;162(2):185–93.
38. Spisek R, Brazova J, Rozkova D, Zapletalova K, Sediva A, Bartunkova J. Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine*. 2004;22(21-22):2761–8.
 39. Pereira C. Dinâmica da inflamação alérgica e da imunoterapia específica. Contribuição para o seu estudo in vivo. Universidade de Coimbra; 2009.
 40. Schaad UB. OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review. *World J Pediatr*. 2010;6(1):5–12.
 41. Schaad U, Mutterlein R, Goffin H. Immunostimulation With OM-85 in Children With Recurrent Infections of the Upper Respiratory Tract*: A Double-Blind, Placebo-Controlled Multicenter Study. *Chest*. 2002;122(6):2042–9.
 42. Sopo SM, Onesimo R, Giorgio V, Fundaro C, Tabacco F, Calvani M. Efficacy of over-the-counter immunostimulants in the prevention of paediatric recurrent acute respiratory tract infections. Criticisms and pitfalls of available meta-analyses. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2011;43(5):157–61.
 43. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. 2012;
 44. Ricci R, Palmero C, Bazurro G, Riccio AM, Garelli V, Di Marco E, et al. The administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate in elderly patients with COPD results in serological signs of an efficient immune response associated with a reduced number of acute episodes. *Pulm Pharmacol Ther. Elsevier Ltd*; 2014;27(1):109–13.

45. Direção-Geral de Saúde. Abordagem e Controlo da Asma. Norma da Direção-Geral da Saúde. 2012;2:1–14.