



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



TRABALHO DE TESE

JAMILLE SOUZA FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DOS LINFÓCITOS E MONÓCITOS DE
PACIENTES COM ASMA GRAVE CONFORME A SUA
RESPOSTA AO TRATAMENTO**

Salvador - Bahia

2017

JAMILLE SOUZA FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DOS LINFÓCITOS E MONÓCITOS DE
PACIENTES COM ASMA GRAVE CONFORME A SUA
RESPOSTA AO TRATAMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro A. Cruz

Salvador - Bahia

2017

Ficha Catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

Fernandes, Jamille Souza
Caracterização dos linfócitos e monócitos de pacientes com
asma grave conforme a sua resposta ao tratamento / Jamille
Souza Fernandes. -- Salvador, Bahia, 2017.
95 f. : il

Orientadora: Luciana Santos Cardoso.
Coorientador: Álvaro A. Cruz.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Imunologia) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde,
2017.

1. asma grave. 2. linfócitos. 3. monócitos. 4. resposta
imune. I. Cardoso, Luciana Santos. II. Cruz, Álvaro A.. III.
Título.

Dedico este trabalho aos
meus pais e meus irmãos por todo amor,
apoio e confiança durante todo esse trajeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa conquista e por ter tornado a minha caminhada leve e prazerosa.

A Profa Luciana Cardoso. Agradecer a minha orientadora e amiga por ter trilhado junto comigo durante todo esse trajeto é pouco. Serei eternamente grata pela sua dedicação, atenção e paciência. Seus ensinamentos me fizeram crescer e tornar a profissional que eu sou hoje. Obrigada por tudo.

Ao Prof Álvaro Cruz pela dedicação durante todo o desenvolvimento do meu doutorado, sempre muito solícito a colaborar com as análises, correções e sugestões, além do apoio financeiro imprescindível a realização do projeto. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela confiança a mim depositada.

A Profa Ilma por toda ajuda e colaboração no início do projeto, e por sempre auxiliar nas análises e sugestões do trabalho durante todos esses anos. Obrigada Profa.

Aos colegas e amigos do laboratório Alergia e Helminthíases: Diego Mota, Tarcísio Vila Verde, Lorena Andrade, Jordana Batista, Eduardo Viana, Robson Paixão, Tarciano Nascimento agradeço por contribuir através de opiniões, sugestões, pelo companheirismo e amizade.

A toda equipe do ProAr, Paula Almeida, Gil Lima, Ana Tereza, Valmiar Bião, Aline Lima, e especialmente a Juliana Viana, por terem me auxiliado nas etapas pré-analíticas, no recrutamento dos pacientes, e por serem muito prestativos no que fosse preciso.

As minhas amigas Natayme Tartaglia, Cinthia Vila Nova, Patrícia Benedet, Verena Nery pela atenção, apoio, amizade e por estarem sempre presentes.

Ao Prof Edgar Carvalho pelos ensinamentos e colaboração.

Ao chefe do Serviço de Imunologia (SIM/HUPES-UFBA), Paulo Machado, e a todos os pesquisadores e funcionários sempre muito prestativos e atenciosos.

As funcionárias do PPGIm, especialmente a Dilcéia Reis, por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Aos pacientes por ter permitido a realização deste estudo.

Ao meu namorado, Samuel Sanchez, pelo carinho, compreensão e por ter me dado maior apoio em todos esses anos.

A tia Yolanda Marucci e as minhas cunhadas Cristiane Mota, Joana Gomes e Tatiana Marucci por serem muito carinhosas, por me acolherem como da família e por torcerem sempre por mim.

A toda minha família, meus pais Melquiades e Joana, irmãos Diego e Bruno, minha avó Maria de Lourdes pelo amor, força e por acreditar sempre em mim. E aos meus sobrinhos, Daniel e Douglas, por me mostrarem nos pequenos detalhes a simplicidade da vida.

RESUMO

Estima-se que aproximadamente 334 milhões de pessoas sofrem de asma no mundo, e 5-10% dos indivíduos asmáticos tem asma grave caracterizada por uma resposta insatisfatória ao tratamento habitual. A imunopatogênese da asma está associada a um aumento da resposta do tipo 2, porém evidências também sugerem contribuições das citocinas Th1 e Th17 na gravidade da doença. Existem poucos estudos demonstrando o perfil imunológico de indivíduos com asma grave classificados de acordo com a sua resposta ao tratamento com doses elevadas de corticosteroides inalados. O objetivo deste estudo foi caracterizar os fenótipos dos linfócitos e monócitos de indivíduos com asma grave conforme sua resposta ao tratamento. Neste estudo foram avaliados 19 indivíduos com asma grave refratária ao tratamento (AGR), 21 com asma grave bem controlada/parcialmente controlada (AGC), em comparação a 23 com asma leve a moderada (ALM) e 10 controles sem asma (CSA). Os linfócitos e monócitos foram obtidos de CMSP e as frequências das diferentes moléculas foram realizadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. A frequência de linfócitos T CD4 expressando CTLA-4 e TGF- β foi menor nos indivíduos com AGR em comparação aos indivíduos AGC e ALM. No grupo de indivíduos com AGR a frequência de células T CD4⁺CD25^{hi} foi menor em relação aos indivíduos com AGC. Nos indivíduos com AGR, a frequência de células T CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ e T CD4⁺IL-10⁺ foi menor quando comparada aos indivíduos com ALM. No entanto, a frequência das células T CD4 expressando IFN- γ e IL-17A foi maior nos grupos AGR e AGC em comparação ao grupo CSA. Quanto às subpopulações de monócitos, apesar de termos observado uma frequência maior dessas células expressando IL-10R e IL-10 nos grupos com asma grave (AGR e AGC), foi também observado que as subpopulações de monócitos de ambos os grupos expressavam mais as citocinas IL-13, IL-33 e TGF- β quando comparadas aos controles (ALM e CSA). Adicionalmente, a frequência das subpopulações de monócitos expressando os receptores IL-4R α e IL-13R α 2 foi maior no grupo de AGR quando comparada aos grupos controles (ALM e CSA) e ao grupo AGC, respectivamente. A gravidade da asma está associada a um aumento das citocinas do perfil Th1 e Th17 pelos linfócitos e a refratariedade ao tratamento associada a uma diminuição de regulação por essas células. Entretanto, os monócitos de pacientes com AGR e AGC têm um papel importante na gravidade da doença por apresentarem perfis distintos associados com a produção de citocinas e expressão de receptores envolvidos na resposta imune Th2 e no remodelamento tecidual.

Palavras-Chave: asma grave, linfócitos, monócitos e resposta imune.

ABSTRACT

It is estimated that about 334 million people suffer from asthma in the world, and 5-10% of the asthmatic individuals have severe asthma characterized by unsatisfactory response to treatment. The immunopathogenesis of asthma is associated with increased type-2 response, but there is evidence of contributions of Th1 and Th17 cytokines to disease severity. There are few studies demonstrating the immunological profile of individuals with severe asthma categorised by their response to treatment with higher doses of inhaled corticosteroids. Thus, the objective of this study was to characterize the phenotypes of the lymphocyte and monocyte of individuals with severe asthma classified according their response to treatment. In this study we evaluated 19 individuals with refractory severe asthma (RSA), 21 with severe asthma well controlled/partly controlled (CSA), 23 with mild to moderate asthma (MMA) and 10 controls with no asthma (CNA). Lymphocytes and monocytes were obtained from PBMC and the frequencies of the different molecules were performed using the technique of flow cytometry. The frequency of CD4⁺ T cells expressing CTLA-4 and TGF- β was lower in subjects with RSA in relation to individuals with CSA and MMA. In addition, in the group of individuals with RSA the frequency of CD4⁺CD25^{hi} T cells was lower in individuals with CSA. We also observed that in individuals with RSA, the frequency of CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ T and CD4⁺IL-10⁺ T cells was lower when compared to individuals with MMA. However, the frequency of CD4 T cells expressing IFN- γ and IL-17A was higher in the RSA and CSA groups in comparison to the CNA group. Concerning the monocyte subsets, although we observed a higher frequency of these cells expressing IL-10R and IL-10 in the severe asthma (RSA and CSA) groups, it was also observed that the monocyte subsets of both groups expressed more cytokines IL-13, IL-33 and TGF- β when compared to controls (MMA and CNA). In addition, the frequency of the monocyte subsets expressing the IL-4R α and IL-13R α 2 was higher in the RSA group when compared to the control (MMA and CNA) and CSA groups, respectively. The severity of asthma is associated with an increase in Th1 and Th17 cytokines by lymphocytes and refractoriness to treatment associated with decreased regulation by these cells. However, monocytes from patients with RSA and CSA present different profiles associated with cytokine production and expression of receptors involved in Th2 response and tissue remodeling.

Keywords: severe asthma, lymphocytes, monocytes and immune response

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	Sociedade Torácica Americana
CD	Do inglês “cluster of differentiation”
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
FOXP3	Fator de Transcrição da família <i>forkhead</i> expresso por linfócitos T reguladores de CD4 ⁺
GINA	Iniciativa Global contra Asma
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IL-	Interleucina
IFN- γ	Interferon-gama
LABA	Agonista beta-2 de longa ação
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
ME	Matriz extracelular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina fosfatada
PFE	Pico de fluxo expiratório
PROAR	Programa de Controle de Asma e Rinite Alérgica
PRONEX	Programa de Apoio a Núcleos de Excelência
RPMI	Do inglês “Roswell Park Memorial Institute medium”
TGF- β	Fator beta de transformação de crescimento
Th	T auxiliador “helper”
TNF	Fator de necrose tumoral
TLR	Receptor do tipo- <i>toll</i>

TSLP	Linfopoiatina estromal tímica
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

Figura 1: Resposta imune na asma. **Fonte:** Adaptado de Holgate e Polosa, 2008. Legenda: APC – célula apresentadora de antígeno; ILC2 – célula linfoide inata tipo 2; TCR – receptor de célula T; T reg – célula T regulatória.....24

Figura 2: Polarização dos monócitos/macrófagos. **Fonte:** Adaptado de Zanluqui *et al.*, 2015.....27

CAPÍTULO 1:

Figura 1: Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celular, identificando a população de linfócitos (a); Seleção da população dos linfócitos T a partir da marcação de CD3 (b), seguido da identificação dos linfócitos T CD4 (c).....36

Figura 2: Frequência da população de linfócitos T CD4 (a), e a frequência desses linfócitos expressando as moléculas co-estimulatórias CD28 (b) e CTLA (c) nos indivíduos com asma. *p<0,05, **p<0,005 (ANOVA).....38

Figura 3: Frequência dos linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} (a) expressando as moléculas FoxP3 (b) e IL-10 (c) nos indivíduos com asma. *p<0,05 (ANOVA)..... 39

Figura 4: Frequência dos linfócitos T CD4 expressando TGF- β (a), IL-10 (b), IL-5 (c), IL-13 (d), IL-17A (e) e IFN- γ (f) nos indivíduos com asma. *p<0,05, **p<0,005 (ANOVA).....40

CAPÍTULO 2:

Figura 1: Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celular identificando a população de monócitos (a); Subpopulações de monócitos a partir da expressão de CD14 e CD16 (b). Histograma de expressão de CD14 nas subpopulações de monócitos (c).....57

Figura 2: Frequência das subpopulações de monócitos: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) (a), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) (b) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (c) nos indivíduos com asma. *p<0,05 (ANOVA).....58

Figura 3: Frequência das subpopulações de monócitos expressando as moléculas regulatórias IL-10R (a-c) e IL-10 (d-f) nos indivíduos com asma. *p<0,05, **p<0,005 (ANOVA).....59

Figura 4: Frequência das subpopulações de monócitos expressando IL-4R α (a-c), IL-13R α 2 (d-f) e TSLPR (g-i) nos indivíduos com asma. *p<0,05, **p<0,005 (ANOVA).....60

Figura 5: Frequência das subpopulações de monócitos expressando as citocinas IL-13 (a-c), IL-33 (d-f), TGF- β (g-i) e TNF- α (j-l) nos indivíduos com asma. *p<0,05, **p<0,005 (ANOVA).....62

LISTA DE TABELA**CAPÍTULO 1:**

Tabela 1: Características da população de estudo.....37

RESUMO DOS RESULTADOS:

Tabela 1: Resumo dos resultados da avaliação fenotípica dos linfócitos T CD4 nos indivíduos com asma.....75

Tabela 2: Resumo dos resultados da avaliação fenotípica das subpopulações de monócitos nos indivíduos com asma.....75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA ASMA GRAVE	18
2.3 IMUNOPATOGÊNESE DA ASMA	19
2.3.1 Contribuição da resposta tipo 2 na patogênese da asma	19
2.3.2 Papel dos linfócitos Th1 e Th17 na patogênese da asma	21
2.3.3 Papel dos linfócitos T regulatórios na patogênese da asma	23
2.4 PARTICIPAÇÃO DOS MONÓCITOS NA PATOGÊNESE DA ASMA	24
2.4.1 Papel dos receptores associados à resposta imune tipo-2/reparo tecidual pelos monócitos na patogênese da asma	27
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	30
3.1 HIPÓTESE	30
3.2 OBJETIVO GERAL	30
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 CAPÍTULO 1: ALTERAÇÃO DA RESPOSTA REGULATÓRIA DE LINFÓCITOS T CD4 DE PACIENTES COM ASMA GRAVE REFROTÁRIA	31
4.1 INTRODUÇÃO	32
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.3 RESULTADOS	37
4.4 DISCUSSÃO	41
4.5 REFERÊNCIAS	47
5 CAPÍTULO 2: PERFIL FENOTÍPICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NA GRAVIDADE DA ASMA	52
5.1 INTRODUÇÃO	53
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	54
5.3 RESULTADOS	57
5.4 DISCUSSÃO	63
5.5 REFERÊNCIAS	70
6 CONCLUSÃO GERAL	74
7 RESUMO DOS RESULTADOS	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9 ANEXOS	93
9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	93
10 ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	95

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada geralmente por uma inflamação crônica das vias aéreas, definida pelo histórico de sintomas respiratórios tais como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse que variam ao longo do tempo, juntamente com limitação variável do fluxo aéreo (GINA, 2017). Estima-se que aproximadamente 334 milhões de pessoas no mundo são acometidas pela asma (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). Na maioria dos pacientes, a doença pode ser controlada pelo uso combinado de corticosteroides inalatórios e agonista adrenérgico β_2 de curta e longa ação, porém 5 a 10% dos indivíduos asmáticos tem asma grave, caracterizada por uma resposta insatisfatória ao tratamento habitual (ATS, 2000; LAMBRECHT e HAMMAD, 2015).

No Brasil, estima-se que 6,4 milhões de pessoas acima dos 18 anos sejam asmáticas, sendo a doença responsável por mais de 100 mil internações em hospitais públicos e 2.500 óbitos por ano no país (BRASIL, 2015). No Nordeste, 3,2% dos habitantes maiores de 18 anos foram diagnosticados com a doença em 2013 (MENEZES *et al.*, 2015). Em Salvador, a média da taxa de mortalidade por asma entre 2000 e 2009 foi de 1,542/100.000 habitantes (BRASIL, 2014).

A imunopatogênese da asma está ligada principalmente à exacerbação da resposta do tipo-2 (ROBINSON *et al.*, 1992; WENZEL *et al.*, 1999; BRIGHTLING, *et al.*, 2002), porém alguns estudos têm demonstrado que as respostas do tipo Th1 e Th17 têm sido associadas com a gravidade da asma. As células Th1 com a produção de IFN- γ estaria associado com a apoptose das células epiteliais e com a contração da musculatura lisa dos brônquios (FORD *et al.*, 2001; KLUNKER *et al.*, 2003) e as células Th17 com recrutamento neutrofílico e resistência ao tratamento (WOODRUFF *et al.*, 2001; MCKINLEY *et al.*, 2008; NANZER *et al.*, 2013). Adicionalmente, nos pacientes com asma grave as células T regulatórias estariam diminuídas no sangue e no escarro e teriam suas atividades supressoras prejudicadas quando comparados aos indivíduos sadios (MAMESSIER *et al.*, 2008).

Entre as células do sistema imune inato, os monócitos são células do sangue periférico com papéis importantes no processamento e apresentação antigênica ao sistema imunológico em vários modelos de doenças, incluindo a asma (GEISSMANN *et al.*, 2003; TACKE e RANDOLPH, 2006; MONIUSZKO, BODZENTA-LUKASZYK, KOWAL *et al.*, 2009). Dependendo do seu estado de diferenciação e sinais locais, os monócitos/macrófagos são capazes de secretar uma variedade de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas e anti-inflamatórias (AUFFRAY *et al.*, 2009). Os monócitos humanos foram classificados em três subpopulações de acordo com sua expressão das moléculas de superfície CD14 e CD16 em: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Entretanto, existem poucos estudos relatando o perfil dos monócitos na imunopatogênese dos indivíduos com asma grave, principalmente quando associados com a resposta ao tratamento.

Desta forma, o nosso objetivo foi avaliar os fenótipos dos linfócitos e monócitos de pacientes com asma grave conforme a sua resposta ao tratamento, através da expressão de marcadores de superfície e da expressão intracelular de citocinas. A caracterização e identificação fenotípica destas células auxiliarão no entendimento do mecanismo envolvido na patogênese da doença e pode favorecer o esclarecimento de questões essenciais para definição de estratégias de prevenção da asma.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas e que ocorre em pessoas de todas as idades (GINA, 2017). Estima-se que 334 milhões de pessoas têm asma no mundo, esse valor vem das análises mais recentes da Carga Global da Doença realizadas no período 2008-2010 (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). Além disso, aproximadamente 250.000 mortes atribuíveis à asma ocorrem anualmente em todo o mundo, e a maioria delas são evitáveis (PAWANKAR *et al* 2008). A asma era uma doença comum nos países de alta renda, no entanto, atualmente a maioria das pessoas afetadas está em países de baixa e média renda, e sua prevalência é estimada a crescer mais rapidamente nesses países (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). A prevalência de asma em adultos mais jovens entre 18 a 45 anos varia muito. Em geral, 4,3% dos adultos entrevistados na Pesquisa Mundial de Saúde da OMS (Organização Mundial de Saúde), em 2002-2003, relataram diagnóstico de asma por parte do médico, 4,5% relataram o diagnóstico realizado por um médico ou estavam sob tratamento para asma e 8,6% relataram que já tinham sofrido de sibilância nos 12 meses anteriores. A maior prevalência da asma nesses adultos jovens foi observada na Austrália, Norte e Oeste da Europa e Brasil (TO *et al* 2012).

No Brasil, a prevalência da asma oscila em 10% afetando 20 milhões de pessoas (GINA, 2010). Estima-se que 6,4 milhões de pessoas acima dos 18 anos sejam asmáticas neste país (BRASIL, 2015). Segundo os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) foram realizadas 105,5 mil internações pela doença, no período de janeiro a novembro de 2014, originando um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde. No Nordeste, 3,2% dos habitantes maiores de 18 anos foram diagnosticados com a doença em 2013 (MENEZES *et al.*, 2015). Em Salvador, a média da taxa de mortalidade por asma entre 2000 e 2009 foi de 1,542/100.000 habitantes (BRASIL, 2014).

2.2 CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA ASMA GRAVE

A classificação da gravidade da asma tem como papel principal a determinação da dose de medicamentos suficiente para que o paciente atinja o controle em curto prazo (IV DIRETRIZES BRASILEIRA PARA O MANEJO DA ASMA, 2006). A avaliação da gravidade desta doença pode ser feita pela análise da frequência e intensidade dos sintomas e função pulmonar. Adicionalmente, outros aspectos tais como a tolerância ao exercício, a medicação necessária para o controle dos sintomas, o número de visitas ao pronto-socorro, o número anual de cursos de corticosteroide sistêmico, o número de hospitalizações por asma são também utilizados para classificar a gravidade da doença (GINA, 2006). No entanto, como a gravidade não é uma característica fixa do paciente com asma, uma vez que pode se alterar no decorrer dos meses ou anos, uma avaliação periódica do paciente é fundamental para estabelecer o tratamento de acordo com o nível de controle dos sintomas da doença (IV DIRETRIZES BRASILEIRA PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

O principal objetivo do tratamento da asma é a manutenção do controle das manifestações clínicas e funcionais da doença por longos períodos. Seguindo os critérios da GINA o controle pode ser definido conforme parâmetros clínicos e funcionais em três níveis diferentes: asma controlada, asma parcialmente controlada e asma não controlada (GINA, 2006).

De acordo com as Diretrizes Brasileiras para Manejo da Asma, o tratamento desta doença consiste basicamente na combinação de corticosteroides inalatórios e agonistas beta-2 de longa ação (LABA). O corticosteroide inalatório é o medicamento essencial utilizado no tratamento da asma tanto em adultos como em crianças. Este medicamento reduz a frequência e gravidade das exacerbações, o número de atendimentos nos serviços de emergência e hospitalizações, melhora a qualidade de vida, a função pulmonar e a hiperresponsividade brônquica. O LABA é utilizado em associação aos corticosteroides inalatórios para promover o controle da asma. A associação de ambos medicamentos pode ser utilizada como terapia inicial na asma classificada como moderada ou grave.

No entanto, estima-se que 5-10% dos indivíduos com asma grave não tem uma resposta satisfatória ao tratamento mesmo com o uso de altas doses do medicamento (ATS, 2000; LAMBRECHT e HAMMAD, 2015). Esses pacientes podem clinicamente apresentar limitação crônica do fluxo de ar nas vias aéreas, produção de muco variando de ausente a abundante, perda rápida progressiva da função pulmonar e respostas variadas aos corticosteroides. Devido a isso, a Sociedade Torácica Americana (ATS) elaborou critérios para classificar os pacientes com asma grave refratária levando em consideração essas características clínicas. Foi estabelecido dois critérios maiores e sete critérios menores, sendo a asma refratária definida por um ou ambos os critérios maiores e pelo menos dois critérios menores (ATS, 2000). Os critérios maiores são: 1 - tratamento com corticoide oral contínuo ou $\geq 50\%$ do ano; 2 - uso contínuo de altas doses de CI (≥ 880 de fluticasona/ dia ou equivalente) e os critérios menores: 1. uso diário, além do corticoesteroides inalatórios, de LABA, anti-leucotrieno ou teofilina; 2. sintomas diários de asma, com uso de medicação de resgate; 3 - obstrução brônquica persistente ($VEF1 < 80$ ou variação de PFE $> 20\%$); 4. uma ou mais visitas a emergência no ano; 5. ≥ 3 cursos de corticóide oral/ ano; 6. deterioração rápida com redução $\leq 25\%$ da dose do inalatórios ou oral; 7. evento de asma quase fatal no ano anterior

2.3 IMUNOPATOGÊNESE DA ASMA

2.3.1 Contribuição da resposta tipo 2 na patogênese da asma

O processo inflamatório das vias aéreas na asma é multicelular envolvendo principalmente eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e células T $CD4^+$ (KAY, 2005). A imunopatogênese da asma, assim como de outras doenças atópicas, está ligada a exacerbação da resposta do tipo-2, com produção principalmente de IL-4, IL-5 e IL-13 (Figura 1). A IL-4 promove a diferenciação de células T para o subtipo Th2, contribui para a expressão do receptor de alta afinidade para IgE ($Fc\epsilon RI$) na superfície dos mastócitos e basófilos, e de baixa afinidade ($Fc\epsilon RI Ib$) na superfície das células B ativadas, eosinófilos, monócitos e macrófagos (YSSEL *et al.*, 1993).

A IL-4 e a IL-13 induzem e mantêm a troca de classe de imunoglobulina no linfócito B para o isotipo IgE. Essas citocinas induzem ainda a expressão de moléculas de adesão vascular nos eosinófilos e basófilos, além da produção de quimiocinas, o que facilita a migração de células inflamatórias da circulação para a lâmina própria, o epitélio e lúmen das vias aéreas (ZHU *et al.*, 1999). A IL-5, junto a IL-3 e ao GM-CSF, promovem a diferenciação de eosinófilos, a partir de precursores mielóides, além de atuar na ativação desta célula. O eosinófilo ativado expressa moléculas na superfície, como a E-selectina e o VLA-4, que estimulam a quimiotaxia destas células pela ligação a receptores no endotélio vascular (FOSTER *et al.*, 1996; HOLT *et al.*, 1999). A IL-4 é também produzida por mastócitos ativados, perpetuando o processo inflamatório (YSSEL *et al.*, 1993). Além disso, a IL-13 desempenha um papel importante na imunopatologia e na hiperresponsividade das vias aéreas vista na asma (HASHIMOTO *et al.*, 2004; WILLS-KARP, 2004; PARK *et al.*, 2005; FELESZKO *et al.*, 2006). A IL-13, sozinha, pode mediar as principais características fisiopatológicas da doença, tais como, hipersecreção de muco, fibrose subepitelial e hiperresponsividade brônquica (WILLS-KARP, 2004).

As células dendríticas situadas na submucosa e epitélio das vias aéreas são responsáveis pelo reconhecimento e processamento dos antígenos inalados (VON GARNIER *et al.*, 2005; HAMMAD e LAMBRECHT, 2006). Uma vez que a célula dendrítica captura o antígeno, a mesma recebe sinais para migrar para órgãos linfóides, onde ocorre a apresentação antigênica para os linfócitos T (HOLGATE, 2008). Em indivíduos atópicos, o primeiro contato com o alérgeno a resposta imune é desviada para o tipo-2, esse desvio ocorre devido a presença de citocinas derivadas do epitélio, a exemplo da IL-25, IL-33 e TSLP (FORT *et al.*, 2001; FALLON *et al.*, 2006). As células Th2, então, vão migrar para o epitélio das vias aéreas e para a mucosa subepitelial, onde vão produzir as citocinas tipo 2, IL-4, IL-5 e IL-13, que desempenham um papel importante na fisiopatologia da asma, contribuindo para a produção de muco, fibrose subepitelial, remodelamento brônquico, hiperreatividade das vias aéreas e síntese de IgE. Este anticorpo IgE vai se ligar nos receptores nos mastócitos e em contatos posteriores com o

alérgeno vão provocar a degranulação destas células e liberação dos mediadores inflamatórios como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos, além de citocinas (PLATTS-MILLS e WHEATLEY, 1996). Esta fase se caracteriza pela ativação de terminações nervosas vagais com produção de neurotransmissores (acetilcolina, substância P, neurocinina A) que vão resultar em broncoconstrição, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de plasma, hipersecreção de muco e inflamação.

Há uma produção de citocinas do tipo 2 também por células inatas, tais como os mastócitos, eosinófilos, basófilos e células linfoides inatas 2 (ILCs2) (BARLOW, 2014), que vão contribuir também com esse processo inflamatório observado na doença. Por essas células produzirem citocinas semelhantes as das células Th2, a resposta imune na asma, atualmente, é frequentemente associada a uma resposta imune do tipo 2 (LAMBRECHT e HAMMAD, 2015; ROBINSON *et al*, 2017).

Os eventos iniciais da fase aguda da asma iniciam-se aproximadamente 10 minutos após o contato com o alérgeno e duram cerca de duas horas. A fase tardia desta resposta se inicia 2 a 4 horas após o contato com o alérgeno e tem uma duração média de 24 horas, sendo essa fase caracterizada pela quimiotaxia de eosinófilos, neutrófilos, monócitos e linfócitos e pelo aumento da liberação de mediadores inflamatórios, como o TNF (FERREIRA, 2004). Segue-se a degeneração celular, com ruptura do epitélio ciliado, descamação para o lúmem, juntamente com o muco, seguido de remodelamento brônquico e fibrose subepitelial, com depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular por células endoteliais e miofibroblastos. Com o tempo este processo pode levar a um aumento do trabalho respiratório e limitação do fluxo aéreo, causando a fadiga e a falência respiratória progressiva podendo levar ao óbito por asfixia (LEMANSKE e BUSSE, 2003).

2.3.2 Papel dos linfócitos Th1 e Th17 na patogênese da asma

Vários estudos identificaram a participação de outros subtipos de linfócitos T CD4, além dos linfócitos Th2 na asma, uma vez que as células efetas

responsáveis pela inflamação na asma são também influenciadas por outras células T *helper*, incluindo as células Th1 (KAMINUMA *et al.*, 2009; PARK, *et al.*, 2009), Th17 (AL-RAMLI *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009) e T regulatórias (KARIMI *et al.*, 2009; MCGEE e AGRAWAL, 2009; NGUYEN *et al.*, 2009).

Inicialmente, a citocina do tipo Th1, o IFN- γ , foi considerada como uma citocina antialérgica com capacidade de neutralizar a IL-4 e por reduzir a proliferação de células Th2 (MAGGI *et al.*, 1992). Entretanto, outros estudos mostraram que o IFN- γ poderia contribuir na imunopatogênese da asma por ativar eosinófilos *in vitro* (VALERIUS *et al.*, 1990) ou estimular o recrutamento de células inflamatórias por induzir a expressão de ICAM-1 (LOOK *et al.*, 1992). Outros estudos têm mostrado que níveis de IFN- γ estaria associado a gravidade da asma (TRUYEN *et al.*, 2006) ou que administração de IFN- γ aumenta a hiperresponsividade das vias aéreas em modelo animal (KOBAYASHI *et al.*, 2011).

Adicionalmente, os linfócitos Th17 também são importantes na resposta imune da asma (AL-RAMLI *et al.*, 2009; BURGLER *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009). O principal papel dessa célula está na sua capacidade de recrutar e ativar os neutrófilos (PELLETIER *et al.*, 2010, OUYANG *et al.*, 2008). As células Th17 são produtoras de mediadores pró-inflamatórios tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, como também, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-26, o que torna essas células importantes no processo inflamatório (LANGRISH *et al.*, 2005; KREYMBORG *et al.*, 2007; STEINMAN, 2007).

Nos últimos anos, vários estudos tentaram encontrar uma associação entre as células Th17 e a asma (ALCORN *et al.*, 2010; DOE *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2010), sendo bem conhecido o papel de IL-17 no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas. Em pacientes asmáticos cuja inflamação é não atópica, não-dependente de IgE e não-eosinofílica, a neutrofilia das vias aéreas está correlacionada com a gravidade da asma, sugerindo um papel importante dos neutrófilos neste grupo de pacientes (LOUIS *et al.*, 2000; WOODRUFF *et al.*, 2001). Outros estudos também têm associado níveis elevados de IL-17 com a

resistência ao tratamento com corticosteróides tanto em modelo animal (MCKINLEY *et al.*, 2008) como em humano (NANZER *et al.*, 2013).

2.3.3 Papel dos linfócitos T regulatórios na patogênese da asma

As células T regulatórias (T reg) são importantes por prevenir à geração de resposta imune a auto-antígenos, a antígenos ambientais inócuos, a exemplo dos alérgenos, como também por limitar a resposta imune a patógenos (RYANNA *et al.*, 2009). As funções supressivas dessas células são mediadas por múltiplos mecanismos que envolvem a liberação de citocinas inibitórias, tais como IL-10, TGF- β , IL-35 (KITANI *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2004; COLLISON *et al.*, 2007; COLLISON *et al.*, 2010) ou modulação das células apresentadoras de antígeno (CTLA-4) (READ *et al.*, 2000).

Dependendo de como são derivadas, as T reg podem ser classificadas em dois principais tipos: naturais ou induzidas. As células T regulatórias naturais (nTreg) surge no timo como um subtipo de célula T madura e expressa a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25), podendo também expressar o fator de transcrição FoxP3 (HORI *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2004). Vários estudos têm demonstrado que as células T CD4⁺ com alta expressão de CD25 (T CD4⁺CD25^{hi}) têm potentes atividades supressoras na resposta imune por inibir a proliferação celular e a secreção de citocinas pelas células T (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2005). As células regulatória induzidas (iTreg), por sua vez, se desenvolvem da diferenciação das células T naive na periferia depois do contato com altas concentrações de antígeno (WEINER, 1997; AKDIS *et al.*, 1998; YSSEL *et al.*, 2001).

As células T reg secretoras de IL-10, também denominadas Tr1, parece ter relevância na homeostase no pulmão e na asma (HAWRYLOWICZ, 2005; O'GARRA *et al.*, 2008). Enquanto que as células T reg secretoras de TGF- β , também denominadas de Tr3, parecem ser mais relevantes no intestino (FARIA e WEINER, 2006; LI *et al.*, 2006), mas eles também possuem o potencial de causar patologia no pulmão através da capacidade do TGF- β promover cicatrização, fibrose e remodelamento tecidual (LI *et al.*, 2006). Alguns estudos têm

demonstrado números reduzidos de T CD4 expressando IL-10 em indivíduos com asma grave instável quando comparados com indivíduos com asma grave estável e asma leve (MATSUMOTO *et al.*, 2004) ou baixa expressão de CTLA-4 pelos linfócitos T CD4⁺ de indivíduos asmáticos em comparação com os controles (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

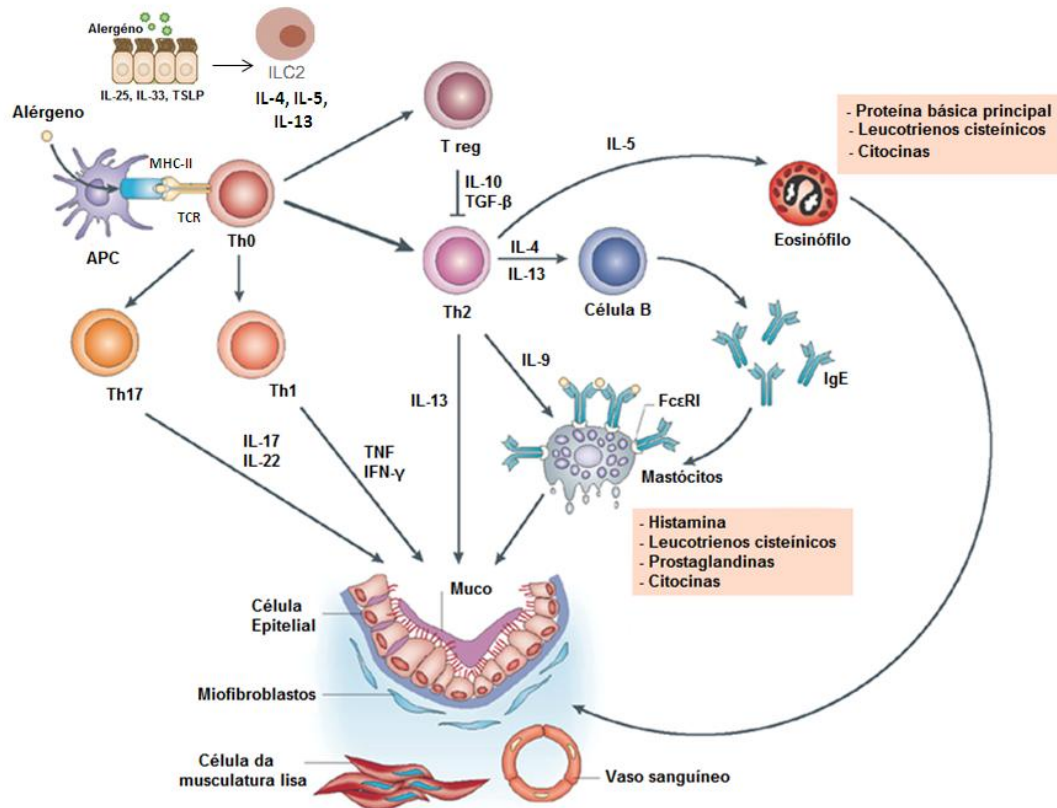


Figura 1: Resposta imune na asma.

Fonte: Adaptado de (HOLGATE e POLOSA, 2008). Legenda: APC – célula apresentadora de antígeno; ILC2 – célula linfóide inata tipo 2; TCR – receptor de célula T; T reg – célula T regulatória

2.4 PARTICIPAÇÃO DOS MONÓCITOS NA PATOGÊNESE DA ASMA

Existem poucos dados na literatura quanto a caracterização das subpopulações de monócitos e o papel destas células na imunopatogênese da asma. Os monócitos humanos têm sido segregados em duas subpopulações de acordo com a expressão de CD14 e CD16 (CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺) por mais

de duas décadas (PASSLICK *et al.*, 1989; FRANKENBERGER *et al.*, 1996; ANCUTA *et al.*, 2003; GEISSMANN *et al.*, 2003; GORDON e TAYLOR, 2005; TACKE e RANDOLPH, 2006; ZIEGLER-HEITBROCK, 2007; AUFRAY *et al.*, 2009). Entretanto, em 2010 uma nova nomenclatura foi aprovada e os monócitos humanos foram definidos em três subpopulações, a maior população dos monócitos humanos (90%) com alta expressão de CD14 e nenhuma expressão para CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻) são denominados de monócitos clássicos, enquanto a menor população (10%) de monócitos humanos é subdividida em intermediários, com alta expressão de CD14 e baixa para CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺) e em não-clássicos com alta expressão de CD16, mas com expressão relativamente baixa de CD14 (CD14⁺CD16⁺⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010).

Em um estudo de Wong *et al.* (2011) foram avaliadas as características dos monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos através do perfil de expressão gênica. Os autores observaram que os monócitos clássicos expressaram genes envolvidos na angiogênese, cicatrização e coagulação, implicando em funções de reparo tecidual, além da alta expressão de genes pró-inflamatórios; os monócitos intermediários com alta expressão de MHC de classe II, que indica funções de célula apresentadora de antígeno e estimulatórias de células T (WONG *et al.*, 2011), e os monócitos não-clássicos com genes envolvidos no rearranjo do citoesqueleto, o que pode ser responsável por sua alta motilidade observada *in vivo* (CROS *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm mostrado a expansão de monócitos CD16⁺ na asma (TOMITA *et al.*, 2002; VON BUBNOFF *et al.*, 2004), e outros observaram que a expansão foi especificamente nos monócitos intermediários nos pacientes com asma grave (MONIUSZKO, BODZENTA-LUKASZYK, KOWAL *et al.*, 2009; KOWAL *et al.*, 2012). Kowal *et al.* (2012) também observaram que o aumento da frequência dos monócitos intermediários foi correlacionado com o grau de hiperreatividade brônquica (KOWAL *et al.*, 2012). Além disso, Veremeyko *et al.* (2013) observaram que num ambiente de citocinas tipo Th2, IL-4 e IL-13, os monócitos intermediários exibiram propriedades de células tipo-M2 (macrófagos

alternativamente ativados), sugerindo seu papel importante na inflamação alérgica (VEREMEYKO *et al.*, 2013).

Existem duas principais vias de ativação dos macrófagos necessárias para suas atividades funcionais: clássica (M1) e alternativa (M2) (MILLS, 2012; WYNN, *et al.*, 2013) (Figura 2). A via clássica dá origem aos macrófagos M1 durante uma resposta imune a infecção e é induzida por patógenos intracelulares, componentes de paredes de células bacterianas (lipopolissacarídeo - LPS), lipoproteínas e citocinas tais como IFN- γ . Os macrófagos M1 expressam e secretam uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatória, a exemplo do TNF, e espécies reativas de oxigênio (tais como o óxido nítrico - NO) que são associadas com dano tecidual. No entanto, os macrófagos M2 são geralmente divididos em três subpopulações a depender do ambiente de citocinas: os que são induzidos principalmente por citocinas por IL-4 ou IL-13 (M2a); induzidos por imunocomplexos e agonistas TLRs e receptores IL-1 (M2b); e M2c (imunossupressivo) induzido por IL-10, TGF- β ou glicocorticoide (GORDON, 2003; BENOIT *et al.*, 2008). Os macrófagos M2 produzem fatores que são responsáveis por resposta anti-parasitária, como também componentes da matrix extracelular (ME), fatores angiogênicos e quimiotáticos e IL-10 (FUENTES *et al.*, 2010; MILLS, 2012). Portanto, possuem funções associadas a cicatrização de feridas, reparo tecidual, como também funções anti-inflamatórias e regulatórias (POLLARD, 2009; MORRIS *et al.*, 2011). Apesar dos macrófagos M2 serem considerados como antagonistas dos macrófagos M1, eles podem causar inflamação alérgica, auxiliar o crescimento de tecidos tumorais e ser reservatórios celulares de vários patógenos (SICA e MANTOVANI, 2012).

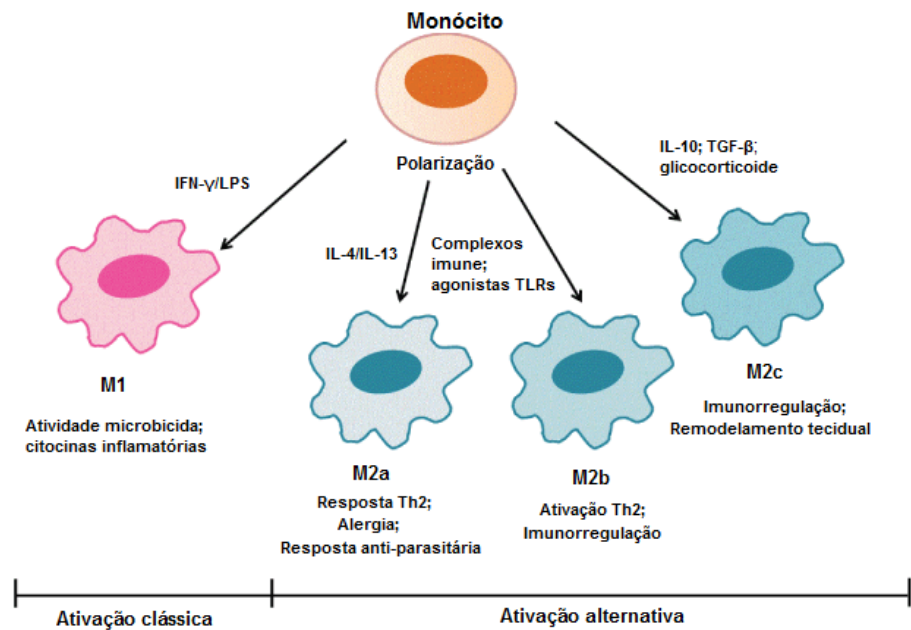


Figura 2: Polarização dos monócitos/macrófagos.

Fonte: Adaptado de (ZANLUQUI *et al.*, 2015).

2.4.1 Papel dos receptores associados à resposta imune tipo-2/reparo tecidual pelos monócitos na patogênese da asma

Estudos em modelo experimental de asma têm demonstrado que o receptor de IL-4 e as citocinas IL-4 e IL-13, tem papel importante na patologia da doença (KUPERMAN *et al.*, 2002; VENKAYYA *et al.*, 2002).

O receptor de IL-4 é expresso na maioria dos tipos de células, incluindo células hematopoiéticas, endotelial, muscular e neural (NELMS *et al.*, 1999). O IL-4R α pode combinar com a cadeia gama comum - γ c (IL-4R tipo I) ou com IL-13R α 1 (IL-4R tipo II) para ligar-se a IL-4 sozinho, ou a ambos IL-4 e IL-13, respectivamente (MILOUX *et al.*, 1997; LAPORTE *et al.*, 2008; GORDON e MARTINEZ, 2010; ALLEN e MAIZELS, 2011). A sinalização através deste receptor induz a transcrição do gene dependente de STAT6 que polariza a imunidade do hospedeiro para a resposta do tipo Th2 (MCKENZIE *et al.*, 1999; MURATA *et al.*, 1999; ANDREWS *et al.*, 2002). Os monócitos/macrófagos, no entanto, adquirem um fenótipo alternativamente ativado quando estimulados por essas citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-13), as quais induzem nessas células a expressão de arginase,

enzima responsável pela conversão de L-arginina em prolina. A prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e, portanto, pode contribuir no desenvolvimento da fibrose (HESSE *et al.*, 2001). Embora a arginase-1 (ARG1) seja um marcador clássico de macrófagos alternativamente ativados em camundongos, a sua expressão em monócitos/macrófagos humanos não é bem definida (ROUZAUT *et al.*, 1999; OCHOA *et al.*, 2001; MUNDER *et al.*, 2005; RAES *et al.*, 2005). Evidências sugerem que os macrófagos alternativamente ativados podem desempenhar um papel importante na asma por promover a síntese de colágeno e outros tecidos conectivos (VERCELLI 2003; ZIMMERMANN *et al.*, 2003; LOKE *et al.*, 2007), aumentar a secreção de muco (Vercelli, 2003) e atrair os eosinófilos (LOKE *et al.*, 2002; LOKE *et al.*, 2007).

O IL-13R α 2, por sua vez, liga-se a IL-13 exclusivamente e com maior afinidade que o complexo IL-4R α /IL-13R α 1 (DONALDSON *et al.*, 1998). O IL-13R α 2 está presente em duas formas, solúvel e de membrana, em modelo animal, e nos humanos este receptor está presente apenas na forma de membrana (O'TOOLE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). A forma solúvel deste receptor age como receptor *decoy* (reconhece com alta afinidade citocinas e fatores de crescimento, mas são estruturalmente incapazes de gerar sinalização (MANTOVANI *et al.*, 2001), e vários estudos têm demonstrado que administração da forma solúvel inibe a inflamação das vias aéreas mediada por IL-13 em modelo experimental de asma (ZHANG *et al.*, 1997; KAWAKAMI *et al.*, 2001; DAINES *et al.*, 2006). Entretanto, Fichtner-Feigl *et al.* (2006) demonstraram que a sinalização do IL-13R α 2 (na forma de membrana) está envolvido na indução da produção de TGF- β e fibrose tanto em humano como em modelo experimental (FICHTNER-FEIGL, STROBER *et al.*, 2006). Não há nenhum estudo que mostra o papel deste receptor em monócitos de indivíduos asmáticos, sendo o nosso trabalho o primeiro abordar a expressão do IL-13R α 2 nas subpopulações de monócitos em indivíduos com asma em resposta ao tratamento.

A linfopoetina estromal tímica (TSLP) é uma citocina pertencente a família das linfopoietinas, caracterizada inicialmente como fator estimulador da proliferação de linfócitos (FRIEND *et al.*, 1994), produzida principalmente por

células epiteliais, queratinócitos e células estromais (SOUMELIS *et al.*, 2002). Esta citocina é bem conhecida por seu papel na patogênese de doenças alérgicas e na asma tanto em modelo experimental e em humanos (SOUMELIS *et al.*, 2002; AL-SHAMI *et al.*, 2005; YING *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2005), principalmente por reforçar respostas do tipo Th2 (MOU *et al.*, 2009; KIMURA *et al.*, 2011; TOGBE, *et al.*, 2013; YADAVA *et al.*, 2014). Reche et al (2001) demonstraram que o TSLP em humanos estimula preferencialmente células mielóides, tais como os monócitos e células dendríticas, através do complexo de receptor heterodímero TSLPR e IL-7R α (RECHE *et al.*, 2001). Além disso, outro estudo demonstrou em modelo experimental que a sinalização do TSLP/TSLPR amplifica a diferenciação dos macrófagos alternativamente ativados, sugerindo sua participação na inflamação das vias aéreas alérgica (HAN *et al.*, 2013).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE

Os linfócitos e monócitos de pacientes com asma grave têm um perfil inflamatório e a refratariedade ao tratamento está associada a uma resposta mista Th1, Th2 e Th17.

3.2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o fenótipo dos linfócitos e monócitos de pacientes com asma grave conforme a sua resposta ao tratamento farmacológico

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a expressão das moléculas associadas à co-estimulação (CD28 e CTLA-4) e regulação (CD25, FoxP3, IL-10 e TGF- β) pelos linfócitos T CD4;
2. Avaliar a expressão das citocinas associadas à resposta Th2 (IL-5 e IL-13), Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17A) pelos linfócitos T CD4;
3. Determinar a frequência das subpopulações dos monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺), não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺);
4. Avaliar a expressão dos receptores de IL-10, IL-4, IL-13 e TSLP e das citocinas IL-10, TNF- α , TGF- β , IL-13 e IL-33 pelas subpopulações de monócitos.

4 CAPÍTULO 1: ALTERAÇÃO DA RESPOSTA REGULATÓRIA DE LINFÓCITOS T CD4 DE PACIENTES COM ASMA GRAVE REFRATÁRIA

Jamille Souza Fernandes^{1,2}, Maria Ilma Araujo^{2,3}, Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida^{1,2}, Lorena Santana Andrade³, Diego Mota Lopes^{1,2}, Edgar Marcelino Carvalho^{2,5}, Álvaro A. Cruz⁶, Luciana Santos Cardoso^{2,5,7}

¹ Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

² Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil;

³ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil;

⁴ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil;

⁵ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), CNPQ/MCT, Brasil

⁶ ProAr-Núcleo de Excelência em Asma, UFBA, Salvador, BA, Brasil;

⁷ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, 40170-115 Salvador, BA, Brasil.

Resumo

Introdução: Estima-se que 5-10% dos indivíduos asmáticos são refratários ao tratamento. A imunopatogênese da asma está frequentemente associada a um aumento da resposta do tipo Th2, porém evidências também sugerem contribuições das citocinas Th1 e Th17 na gravidade da doença. Existem poucos estudos demonstrando o perfil imunológico de indivíduos com asma grave em resposta ao tratamento. Deste modo, o nosso objetivo foi avaliar o perfil de linfócitos T CD4 de pacientes com asma grave de acordo com a sua resposta ao tratamento.

Métodos: Foram avaliados um total de 73 indivíduos, sendo 23 indivíduos com asma leve a moderada (ALM), 21 com asma grave bem controlada/parcialmente controlada (AGC), 19 com asma grave refratária ao tratamento (AGR), e 10 controles sem asma (CSA). As CMSPs foram obtidas através do gradiente Fycoll-Hypaque e a avaliação da frequência dos linfócitos e de seus marcadores de superfície e citocinas intracelulares foram realizadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. **Resultados:** Foi observado que a frequência de linfócitos T CD4 expressando CTLA-4 e TGF- β foi menor nos indivíduos com AGR em comparação aos indivíduos AGC e ALM ($p < 0,05$). Além disso, no grupo de indivíduos com AGR a frequência de células T CD4⁺CD25^{hi} foi menor em relação aos indivíduos AGC. Nós observamos também que nos indivíduos com AGR, a frequência de células T CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ e T CD4⁺IL-10⁺ foi menor quando comparado aos indivíduos com ALM. Adicionalmente, a frequência das células T CD4 expressando IFN- γ e IL-17A foi maior nos grupos AGR e AGC em comparação ao grupo CSA ($p < 0,05$). **Conclusões:** A gravidade da asma está associada a um aumento das citocinas do perfil Th1 e Th17 pelos linfócitos e a refratariedade ao tratamento associada a uma diminuição de regulação por essas células.

4.1 INTRODUÇÃO

A asma atinge aproximadamente 334 milhões de pessoas no mundo (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). No Brasil, estima-se que 6,4 milhões de pessoas acima dos 18 anos são acometidas pela asma, sendo a doença responsável por mais de 100 mil internações por ano em hospitais públicos no país (BRASIL, 2015). Na maioria dos pacientes, a doença pode ser controlada pelo uso combinado de corticosteroides inalatórios e agonista β 2 adrenérgico de curta e longa ação, entretanto 5 a 10% dos pacientes são refratários ao tratamento (ATS, 2000; LAMBRECHT e HAMMAD, 2015).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, em que células do sistema inato e adaptativo agem juntas com as células epiteliais, causando hiperreatividade brônquica, produção de muco, estreitamento e remodelamento das vias aéreas (GINA, 2006; LAMBRECHT e HAMMAD, 2015). A imunopatogênese da asma está ligada principalmente à exacerbação da resposta do tipo Th2, com produção principalmente de IL-4, IL-5 e IL-13 (ROBINSON *et al.*, 1992). Estas citocinas são responsáveis por recrutar e ativar células do sistema inato, tais como mastócitos (WENZEL, *et al.*, 1999; BRIGHTLING *et al.*, 2002) e eosinófilos (BOUSQUET *et al.*, 1990) e estimular a produção de IgE pelos linfócitos B (GASCAN *et al.*, 1991), contribuindo desta forma pelo processo inflamatório observado na doença. Além da resposta do tipo Th2, a resposta do tipo Th1 e Th17 têm sido associadas com a gravidade da asma. Estudos têm demonstrado que a resposta Th1, principalmente com a produção de IFN- γ , pode causar contração da musculatura lisa e apoptose de células epiteliais brônquicas (KLUNKER *et al.*, 2003; HOLGATE e POLOSA, 2008) e a resposta Th17, com a produção de IL-17A, contribui para o remodelamento brônquico (ZHAO *et al.*, 2012), além de ser associada com a resistência ao tratamento com corticoide (MCKINLEY *et al.*, 2008). As células T regulatórias, que são bastante conhecidas pela supressão da resposta imune, têm sido mostradas diminuídas no sangue e no escarro de indivíduos com asma grave refratária ao tratamento, além de

apresentar atividades supressoras prejudicadas (MAMESSIER *et al.*, 2008; CHAMBERS *et al.*, 2012).

Na literatura existem poucos estudos que abrange em um único trabalho o perfil fenotípico dos linfócitos T CD4 expressando desde moléculas de co-estimulação e regulação, como também citocinas do tipo Th2, Th1 e Th17 nos indivíduos com asma grave refratária e asma grave bem controlada/parcialmente controlada ao tratamento. Desta forma, o nosso objetivo foi avaliar o perfil dos linfócitos T CD4 de pacientes com asma grave de acordo com a sua resposta ao tratamento, através da expressão de marcadores de superfície e do perfil intracelular de citocinas. A caracterização e a identificação fenotípica desta célula auxiliarão no entendimento do mecanismo envolvido na patogênese da doença e pode favorecer o esclarecimento de questões essenciais para definição de estratégias de prevenção da asma.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Características da população estudada

Neste estudo foi avaliado um total de 73 indivíduos, dos quais 40 eram indivíduos com asma grave, sendo 19 com asma grave refratária ao tratamento (AGR) e 21 com asma grave bem controlada/parcialmente controlada ao tratamento (AGC) que foram acompanhados pelo Programa de Controle da Asma e de Rinite Alérgica na Bahia (PROAR), em Salvador, Bahia-Brasil. Os indivíduos com asma grave foram identificados tendo qualquer um dos seguintes critérios: (i) sintomas diários contínuos; (ii) limitação nas atividades diárias; (iii) sintomas noturnos maior que duas vezes por semanas; (iv) uso de broncodilatadores ≥ 2 vezes ao dia; (v) Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF1) ou Pico de Fluxo Expiratório $< 60\%$. Depois de realizada a identificação dos pacientes graves, os indivíduos com AGC foram identificados seguindo os critérios estabelecidos pela GINA que avalia o controle dos sintomas da asma (GINA, 2006) e os indivíduos com AGR foram identificados

segundo os critérios maiores e menores estabelecidos pela Sociedade Torácica Americana (ATS) (ATS, 2000). No momento da coleta de sangue todos esses indivíduos com asma grave estavam sob tratamento com a combinação de média ou alta dose de corticosteróides inalatórios (800mcg a 1600 de budesonida ou equivalente) e agonista beta 2 de longa ação (12, 24 ou 48 mcg de formoterol ou 100 mcg de salmeterol).

Em relação aos grupos controles, foram avaliados 23 indivíduos com asma leve a moderada (ALM) e 10 indivíduos controles sem asma (CSA). Ambos os grupos foram convidados a se voluntariar por meio da publicidade pública em postos de saúde e transporte público. Os indivíduos com ALM teve seu diagnóstico validado por um especialista na área, e não foram tratados com corticosteroides inalatórios.

Foram avaliados em todos os pacientes os níveis de IgE total (realizada por nefelometria pelo aparelho IMAGE – Beckman Coulter) e a positividade do teste cutâneo para as seguintes proteínas alergênicas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, epitélio de gato, epitélio de cachorro, *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, *Paspalum notatum*, *Cynodon dactylon* (Tabela 1). Entre os grupos não foram incluídos fumantes, gestantes, além de indivíduos com sorologia positiva para doença de Chagas, HIV, HTLV-1, vírus da hepatite do tipo B e C ou quaisquer outras condições que pudessem interferir na resposta imunológica.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira, da Universidade Federal da Bahia.

4.2.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e citometria de fluxo

Foi realizado a coleta de 20 mL de sangue de todos os pacientes e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do

gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de 3×10^5 células/mL em RPMI 1640, contendo 10% de soro humano AB⁺ normal inativado, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100 μ L/mL, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

Após a separação, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais para os marcadores de superfície e ficoeritrina (PE) e APC (“Allophycocyanin”) para citocinas intracelulares. Simplificando esta etapa, em suspensões de 3×10^5 células foram adicionados brefeldina A (10 μ g/mL; Sigma, St. Louis, MO), o qual impede a secreção das proteínas pelo complexo de Golgi, em placas de 96 poços por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂. Em seguida, foram realizadas marcações de superfície utilizando anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos (fluoresceína (FITC) e “cycrhome” (CY)) específicos para os linfócitos T CD4 e seus marcadores de co-estimulação e regulação: CD3 (clone OKT3, eBioscience), CD4 (clone OKT4, eBioscience), CD28 (clone CD28.2, eBioscience), CTLA-4 (clone 14D3, eBioscience) e CD25 (clone BC96, eBioscience). Após a marcação das moléculas de superfície, as placas foram lavadas com PBS azida sódica, fixadas com 200 μ l de formaldeído a 2% em PBS e mantidas a 4°C até o dia seguinte. Após esta etapa, as placas foram incubadas com 150 μ l/poço do tampão de permeabilização, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-citocinas conjugado com os fluorocromos ficoeritrina (PE) e APC (“Allophycocyanin”), seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Os anticorpos monoclonais anti-citocinas e fatores de transcrições avaliadas pelos linfócitos foram: IL-5 (clone TRFK5, eBioscience), IFN- γ (clone 45.B3, eBioscience), IL-17A (clone eBio64DEC17, eBioscience), FoxP3 (clone 236A/E7, eBioscience), IL-13 (clone PVM13-1, eBioscience), IL-10 (JES3-9D7, eBioscience) e TGF- β (clone 9016, R&D System). A aquisição foi realizada utilizando-se o aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), num total de 100.000 eventos.

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência da expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa “Flow

Jo”. As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, foi feita a seleção da população de linfócitos por janela nesta população. Foi delimitada uma região específica no gráfico correspondente a área de linfócitos (Figura 1a), em seguida foi selecionada a população dos linfócitos T a partir do marcador CD3 (Figura 1b), e dentro desta a população de linfócitos T CD4 (Figura 1c). Após esta seleção, nós avaliamos a expressão dos marcadores de superfície e citocinas intracelulares.

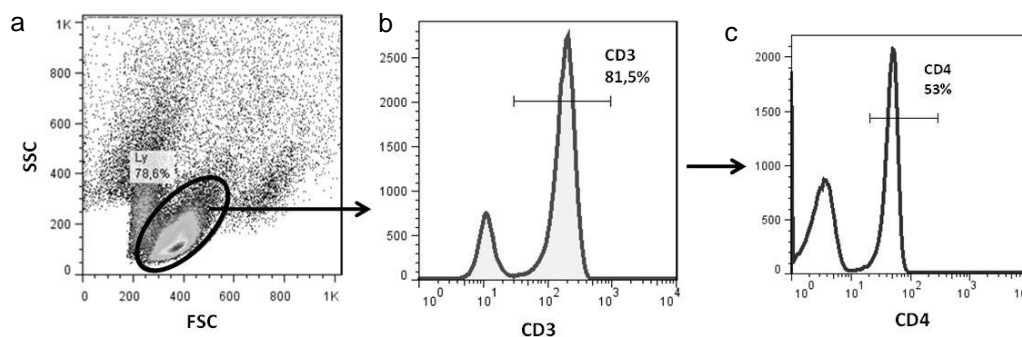


Figura 1: Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celular, identificando a população de linfócitos (a); Seleção da população dos linfócitos T a partir da marcação de CD3 (b), seguido da identificação dos linfócitos T CD4 (c).

4.2.3 Análise estatística

O programa Graphpad PRISM 5.0 (La Jolla, CA, USA) foi utilizado para realização dos gráficos e análises estatísticas. Antes da análise de cada dado foi realizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Desta forma, para comparação entre 2 ou mais grupos, testes paramétricos e não-paramétricos foram utilizados de acordo com a natureza dos dados gerados ANOVA (pós teste bonferroni) e Kruskal Wallis (pós teste de Dunn), respectivamente. Todos os testes foram bicaudais e a significância estatística foi estabelecida no intervalo de confiança de 95% e o valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Características da população do estudo

Foram avaliados no presente estudo 73 indivíduos, sendo 19 indivíduos com asma grave refratária (AGR), 21 indivíduos com asma grave bem controlada/parcialmente controlada (AGC), 23 indivíduos com asma leve a moderada (ALM) e 10 controles sem asma (CSA) (Tabela 1). Foi observado que a média da idade dos indivíduos com AGR (49±11) foi maior do que os indivíduos com ALM (39,3±13,1), $p < 0,05$. Em relação à distribuição de gênero foi observado que a frequência do gênero feminino nos indivíduos com AGC foi menor quando comparado aos outros três grupos ($p < 0,05$). Quanto ao teste cutâneo foi observado que a frequência de positividade para pelo menos um alérgeno foi menor nos indivíduos com CSA em relação aos três grupos de pacientes com asma. Não foi observada diferença nos níveis de IgE total entre os grupos.

Tabela 1: Características da população de estudo

	CSA (n=10)	ALM (n=23)	AGC (n=21)	AGR (n=19)	p
Idade (anos)* (média ± DP)	46,8 ± 11,1	39,3 ± 13,1	42,4 ± 11	49 ± 11	<0,05 ^a
Gênero Feminino n (%)**	10 (100)	18 (78,3)	11 (52,3)	16 (84,2)	<0,05 ^b
Teste cutâneo n (%)**	3 (30)	12 (52,2)	13 (61,9)	12 (63,1)	<0,05 ^c
IgE total (UI/mL)***	192(13,6-1337)	163(12,5-2548)	293,4(33,3-2166)	261,7(82-2784)	>0,05

*ANOVA; **Qui-quadrado; ***Kruskal-Wallis; ^aAGR vs ALM; ^bAGC vs CSA, ALM e AGR; ^cCSA vs ALM, AGC e AGR; CSA: controles sem asma; ALM: asma leve a moderada; AGC: asma grave bem controlada ou parcialmente controlada; AGR: asma grave refratária.

4.3.2 Frequência dos linfócitos T CD4+ e seus marcadores de co-estimulação nos indivíduos com asma

A frequência dos linfócitos T CD4 e seus marcadores de co-estimulação entre os grupos estão mostrados na Figura 2 e os resultado estão expressos em média ± desvio-padrão (DP). Não foi observada diferença significativa na frequência dos linfócitos T CD4 entre os grupos avaliados ($p > 0,05$) (Figura 2a).

Quanto aos marcadores de co-estimulação, CD28 e CTLA-4, foi observado que nos indivíduos com AGC a frequência de linfócitos T CD4 expressando CD28 foi menor ($62,3\% \pm 16,1$) comparado aos indivíduos CS ($75,8\% \pm 14$, $p < 0,05$) (Figura 2b). Por sua vez, nos indivíduos com AGC e ALM a frequência dessas células expressando CTLA-4 foi maior ($1,5\% \pm 0,9$ e $1,3\% \pm 0,7$, respectivamente) em relação aos indivíduos com AGR e CSA ($0,75\% \pm 0,4$ e $0,6\% \pm 0,2$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 2c).

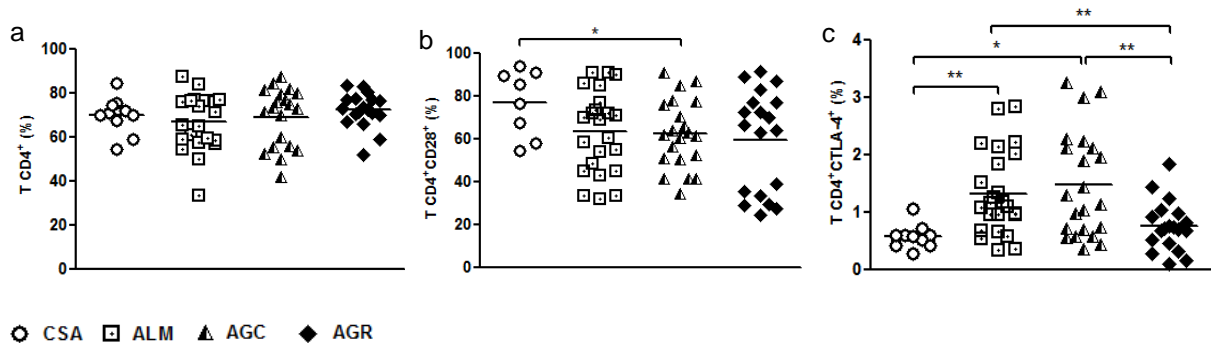


Figura 2: Frequência da população de linfócitos T CD4 (a), e a frequência desses linfócitos expressando as moléculas co-estimulatórias CD28 (b) e CTLA-4 (c) nos indivíduos com asma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (ANOVA)

4.3.3 Frequência dos linfócitos T CD4⁺ expressando moléculas de regulação nos indivíduos com asma

Neste estudo foram avaliadas as células T CD4⁺CD25^{hi} expressando as moléculas regulatórias IL-10 e FoxP3 nos indivíduos com asma e controle (Figura 3).

Nos indivíduos com AGC foi observado que a frequência das células T CD4⁺CD25^{hi} foi maior ($0,7\% \pm 0,2$) em comparação aos indivíduos com AGR e CSA ($0,5\% \pm 0,3$ e $0,4\% \pm 0,3$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 3a). Além disso, nos indivíduos com AGR foi observado que a frequência dos linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} expressando FoxP3 foi diminuída ($12,8\% \pm 9,3$) em comparação aos indivíduos com ALM ($17,7\% \pm 9,4$, $p < 0,05$) (Figura 3b). No entanto, não foi observada diferença na frequência dessas células expressando IL-10 entre os grupos (Figura 3c).

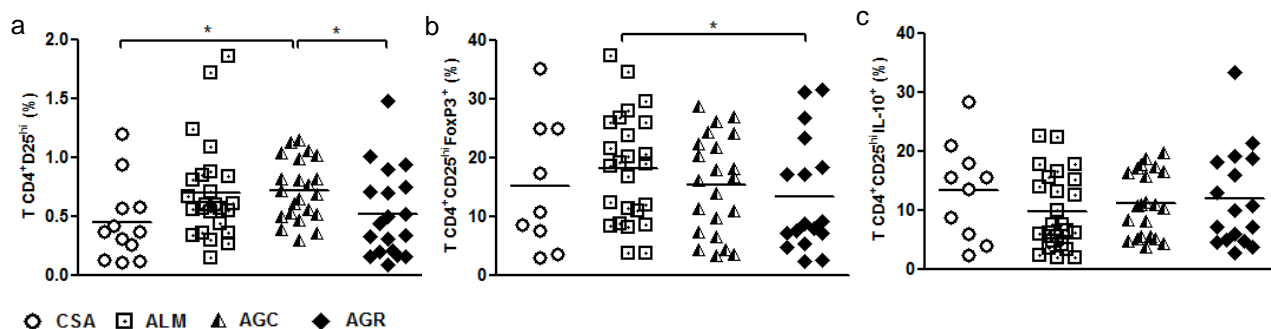


Figura 3: Frequência dos linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} (a) expressando as moléculas FoxP3 (b) e IL-10 (c) nos indivíduos com asma. * $p < 0,05$ (ANOVA)

4.3.4 Frequência dos linfócitos T CD4⁺ expressando citocinas associadas à resposta regulatória, Th2, Th1 e Th17 nos indivíduos com asma

Nos indivíduos com AGC e ALM foi observado que a frequência dos linfócitos T CD4 expressando TGF- β foi maior ($4,4\% \pm 3$ e $3,2\% \pm 2,6$, respectivamente) do que nos indivíduos com AGR e CSA ($1,7\% \pm 1,5$ e $1,1\% \pm 0,4$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 4a). Além disso, nos indivíduos com AGR foi observado que a frequência dessas células expressando IL-10 foi diminuída ($1,4\% \pm 0,9$) em comparação aos indivíduos com ALM ($2,3\% \pm 1,5$, $p < 0,05$) (Figura 4b).

Quanto as citocinas associadas a resposta tipo Th2 (IL-5 e IL-13) foi observado que nos indivíduos com ALM a frequência de linfócitos T CD4 expressando IL-5 foi aumentada ($2,9\% \pm 2$) em comparação aos indivíduos com CSA e AGR ($1,4\% \pm 0,8$ e $1,6\% \pm 0,9$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 4c). Entretanto, não foi observada diferença na frequência dos linfócitos T CD4 expressando IL-13 entre os grupos (Figura 4d). Quanto as citocinas IL-17A e IFN- γ foi observado que em ambos os grupos de asma grave, AGR e AGC, a frequência dos linfócitos T CD4 expressando estas citocinas foi maior (IL-17A: $3,9\% \pm 3$ e $4,8\% \pm 3,8$, respectivamente e IFN- γ : $2,3\% \pm 0,9$ e $2,3\% \pm 1,4$, respectivamente) em comparação aos indivíduos CSA (IL-17A: $1,7\% \pm 1$ e IFN- γ : $1,2\% \pm 0,6$; $p < 0,05$) (Figura 4e e 4f).

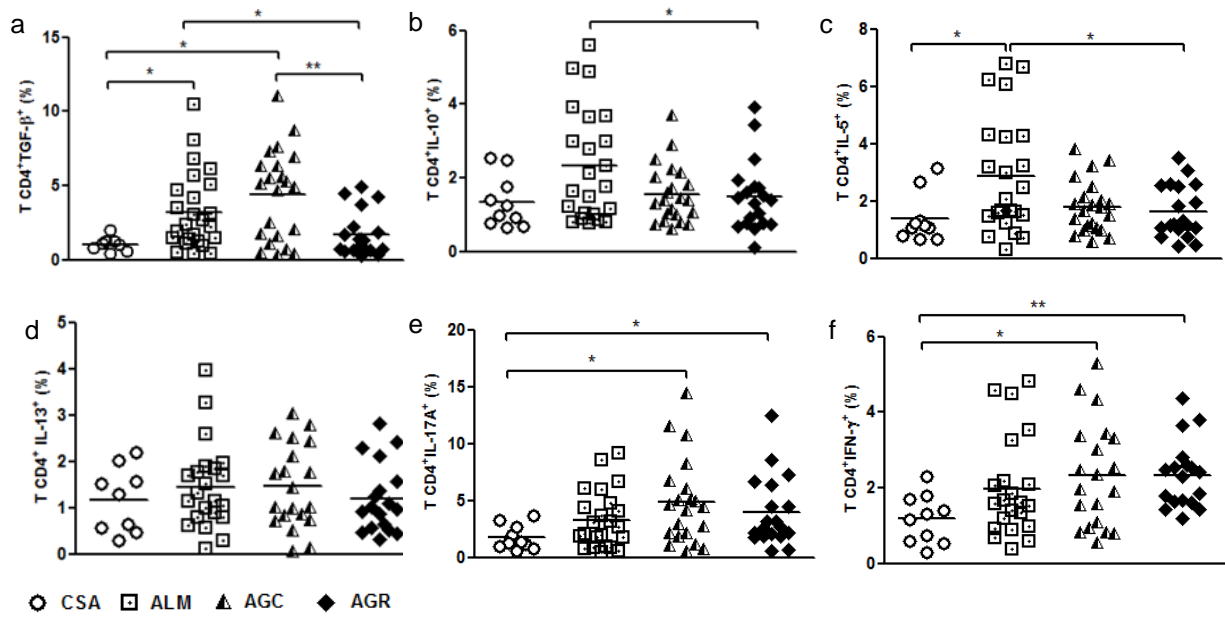


Figura 4: Frequência dos linfócitos T CD4 expressando TGF-β (a), IL-10 (b), IL-5 (c), IL-13 (d), IL-17A (e) e IFN-γ (f) nos indivíduos com asma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (ANOVA)

4.4 DISCUSSÃO

A asma é um sério problema de saúde pública no mundo que afeta todas as idades (GINA, 2017). Neste estudo foi observado que a média da idade dos indivíduos com AGR foi maior do que os indivíduos com ALM, isto pode ser explicado que após a quarta década de vida os diâmetros das pequenas vias aéreas declinam contribuindo para diminuição do fluxo expiratório visto com o envelhecimento (NIEWOEHNER e KLEINERMAN, 1974), além do que o próprio envelhecimento está associado com o aumento da rigidez da parede torácica e com o enfraquecimento dos músculos respiratórios (JANSSENS *et al.*, 1999). O gênero é outro fator de risco importante para desenvolvimento da asma. No nosso estudo foi observado que a frequência do gênero feminino, entre os asmáticos, foi maior nos indivíduos com AGR e ALM do que os indivíduos com AGC. Estudos têm demonstrado que a prevalência desta doença em adultos é maior em mulheres do que em homens, a razão para essa diferença relacionada ao gênero não está muito clara, mas uma possível explicação para isso se deve ao meio hormonal e exposição ambiental (JENKINS *et al.*, 2006; RAO *et al.*, 2013). Outra explicação se deve ao fato de que as mulheres procuram mais os serviços de saúde e, por isso, apresentam maior oportunidade de diagnóstico (BRASIL, 2015).

O perfil fenotípico dos linfócitos em indivíduos com asma grave, principalmente quando associado à resposta ao tratamento, necessita ser melhor caracterizado. Desta forma, a avaliação de moléculas associadas a co-estimulação, regulação e do perfil Th2, Th1 e Th17 é fundamental para o entendimento do perfil imunológico dos indivíduos refratários e controlados/parcialmente controlados ao tratamento, o qual auxiliará numa estratégia futura de prevenção para o desenvolvimento da gravidade da doença.

Primeiramente, a frequência dos linfócitos T CD4⁺ não diferiram entre os grupos de pacientes com asma e saudáveis, o que de certa forma é interessante, uma vez que a gravidade da doença não seria um fator que alteraria o número

destas células, e conseqüentemente não influenciaria na frequência das moléculas avaliadas.

É bem conhecido que os linfócitos são inicialmente ativados após o reconhecimento antigênico e a interação das moléculas co-estimulatórias. Entre as moléculas co-estimulatórias estão o CD28, que é um regulador positivo de ativação das células T, e o CTLA-4, o qual fornece sinais inibitórios, desempenhando um papel importante na regulação da resposta imune e na manutenção da tolerância periférica (GREENWALD *et al.*, 2005). No nosso estudo foi observado que nos indivíduos com AGC a frequência dos linfócitos T CD4 expressando CD28 foi menor em relação aos indivíduos CSA, sendo que nesses mesmos indivíduos (AGC) e nos indivíduos com ALM apresentaram uma frequência elevada de linfócitos T CD4 expressando CTLA-4 em comparação aos indivíduos com AGR e CSA. Estudo de Pietruczuk *et al.* (2012) observaram que a expressão de CTLA-4 em células T regulatórias foram diminuídas em indivíduos com asma grave em comparação aos indivíduos com asma moderada a leve (PIETRUCZUK *et al.*, 2012). Entretanto, estudo de Smyth *et al.* (2010) observou que a expressão de CTLA-4 nos linfócitos T CD4 foi elevada nos indivíduos com asma moderada a grave em relação ao grupo com asma leve e controles sadios (SMYTH *et al.*, 2010). Não existem dados na literatura demonstrando o papel desses marcadores de co-estimulação em indivíduos com asma grave associados com a resposta ao tratamento, contudo o nosso estudo sugere que os indivíduos com AGC têm uma capacidade maior de regular a resposta imune do que os indivíduos com AGR.

Além da molécula CTLA-4, as células T CD4⁺CD25^{hi} e outras moléculas como FoxP3 e IL-10 são importantes para a regulação da resposta imune. Evidências sugerem que o tratamento com glicocorticoide pode ser capaz de aumentar a produção de IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ (AKDIS *et al.*, 1998; HAWRYLOWICZ *et al.*, 2002; XYSTRAKIS *et al.*, 2006), como também de elevar a frequência das células T CD4⁺CD25^{hi} (HARTL *et al.*, 2007) e a expressão do fator de transcrição FoxP3 por essas células (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2004; PROVOOST *et al.*, 2009; BAKR *et al.*, 2013). Em nosso estudo

observamos que no grupo de indivíduos com AGC a frequência das células T CD4⁺CD25^{hi} foi maior em relação ao grupo com AGR e CSA. A frequência desses linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} entre os indivíduos asmáticos são bem divergentes na literatura, alguns autores observaram uma diminuição desses linfócitos em CMSP de pacientes com asma grave refratária (MAMESSIER *et al.*, 2008), com asma moderada a grave (SHI *et al.*, 2011) e no lavado broncoalveolar de crianças asmáticas (HARTL *et al.*, 2007) quando comparado aos controles, e outros não observaram diferenças na frequência desta célula em CMSP de pacientes asmáticos e controles (PROVOOST *et al.*, 2009) até mesmo sob tratamento com glicocorticóides (MONIUSZKO *et al.*, 2010). Nós encontramos que os indivíduos AGC têm uma frequência elevada desses linfócitos, o que reforça que os mesmos parecem ter uma capacidade maior de regular a resposta imune do que os indivíduos com AGR.

Quanto ao FoxP3, nós observamos que nos indivíduos com AGR a frequência dos linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} expressando FoxP3 foi diminuída em comparação aos indivíduos com ALM. Este dado corrobora com alguns estudos que observaram que tanto em indivíduos asmáticos (PROVOOST *et al.*, 2009) e nos asmáticos resistentes a corticosteroides (CHAMBERS *et al.*, 2012) a frequência desses linfócitos expressando FoxP3 foi diminuída. Em relação a IL-10, não foi observado diferença significativa nos linfócitos T CD4⁺CD25^{hi} expressando esta citocina entre os grupos. Entretanto, nós observamos que nos indivíduos com AGR a frequência dos linfócitos T CD4 expressando a IL-10 foi diminuída em relação aos indivíduos com asma leve. Matsumoto *et al.* (2004) observaram que nos pacientes com asma grave instável a frequência de linfócitos T CD4 expressando IL-10 também foi diminuída em relação aos pacientes com asma grave estável ao tratamento (MATSUMOTO *et al.*, 2004). Outros estudos também observaram uma baixa produção de IL-10 pelos linfócitos T em adultos asmáticos graves resistentes à glicocorticóides (HAWRYLOWICZ *et al.*, 2002), e pelas CMSP de crianças com asma grave resistente a terapia comparada aos controles não-asmáticos (GUPTA *et al.*, 2014). Os nossos resultados demonstram que os indivíduos

com AGR apresentam uma diminuição na regulação pelos linfócitos, o que pode explicar a dificuldade desses indivíduos de controlar/suprimir o processo inflamatório exacerbado.

O papel do TGF- β continua controverso na asma, uma vez que esta citocina exerce um papel dual na doença, por ser responsável tanto pela regulação da resposta imune como no remodelamento das vias aéreas (SCHMIDT-WEBER e BLASER, 2006). No presente estudo nós observamos que nos indivíduos com AGR a frequência dos linfócitos T CD4 expressando TGF- β foi diminuída em comparação aos indivíduos com AGC e ALM. Entretanto, estudo de Chakir et al (2003) observaram que o tratamento com glicocorticoides não diminuíram a expressão de TGF- β em amostras de biópsias brônquicas e nem dos colágenos tipo I e III em pacientes com asma grave, sugerindo que a falha terapêutica com glicocorticoides para reduzir a deposição do colágeno pode ser devido a expressão elevada de TGF- β (CHAKIR *et al.*, 2003). Em outro estudo, por sua vez, não foi observado diferenças na expressão do mRNA para TGF- β pelas células T CD4 em indivíduos asmáticos após tratamento com glicocorticoides (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2004). Apesar de termos encontrado dados divergentes com a literatura, a diminuição da frequência dos linfócitos T CD4 expressando TGF- β nos indivíduos com AGR pode sugerir a incapacidade de suprimir a resposta imune nesses indivíduos. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer o papel desta citocina nos linfócitos T, como também em outras células nesses grupos de indivíduos.

As citocinas associadas à resposta do tipo Th2, tais como IL-5 e IL-13, também foram avaliadas neste estudo. Nós observamos que no grupo de indivíduos com ALM a frequência dos linfócitos T CD4⁺ expressando IL-5 foi maior comparado aos grupos de AGR e CSA. A citocina IL-5 está envolvida principalmente na maturação, diferenciação, sobrevivência, recrutamento e ativação dos eosinófilos (CLUTTERBUCK *et al.*, 1989; SANDERSON, 1992), e o aumento do número de eosinófilos nas vias aéreas e no sangue periférico tem sido correlacionado com a gravidade da asma (COYLE *et al.*, 1995; CHLUMSKY *et al.*, 2006). Estudo de Dente et al (2010) observaram níveis

diminuídos de IL-5 em amostra de escarro de pacientes com asma grave refratária tratados com prednisona em comparação aos não tratados (DENTE *et al.*, 2010). Outro estudo observou que as células linfoides inatas 2 (ILCs2) de amostra de escarro de pacientes com asma grave produziram mais citocinas tipo 2, como IL-5 e IL-13, do que as células T CD4⁺ (SMITH, *et al.*, 2016). Uma possível explicação para o nosso resultado, em que observamos uma frequência diminuída de células T CD4⁺ expressando IL-5 em indivíduos com AGR é que o tratamento com corticosteroides inalatórios pode ter conseguido reduzir os níveis desta citocina ou que a principal fonte de IL-5 nesses indivíduos não seja os linfócitos T CD4⁺ e sim as ILCs2. Quanto a IL-13, não observamos diferença significativa na frequência de células T CD4⁺ expressando esta citocina entre os grupos. As citocinas IL-13 e IL-4 são importantes para síntese de IgE pelos linfócitos B, contribuem para produção de muco, fibrose dos brônquios e hiperresponsividade das vias aéreas na asma (WILLS-KARP *et al.*, 1998). Estudo de Machura *et al.* (2010) observaram aumento da frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produzindo IL-13 em crianças com asma atópica comparado aos controles saudáveis (MACHURA *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos também observaram níveis elevados de IL-13 em amostras de lavado broncoalveolar (BAL), escarro ou biópsias brônquicas de pacientes com asma resistente a corticosteroides (HUANG *et al.*, 1995; NASEER *et al.*, 1997), como também de pacientes com asma moderada a grave após uso de corticosteroides sistêmico e inalatório (AGRAWAL e TOWNLEY, 2014; KAUR *et al.*, 2014). Em um estudo mais recente, os autores observaram que nos indivíduos com asma não-controlada e parcialmente controlada a frequência de células ILCs2 IL-13⁺ foi maior quando comparado com o grupo de indivíduos com asma bem-controlada e controles saudáveis, além de que essas células foram mais resistente a ação dos glicocorticoides do que as células Th2 *in vitro* (JIA *et al.*, 2016). Esses dados da literatura juntamente com o resultado obtido em nosso estudo sugerem que outras células, a exemplo das ILCs2, parecem ter um papel importante no

controle na asma nesses grupos de indivíduos com asma grave sob tratamento.

O perfil de citocinas do tipo Th1, IFN- γ , e do tipo Th17, IL-17A, também foram avaliadas. Nós observamos que a frequência dos linfócitos T CD4 expressando IFN- γ e IL-17A foi elevada nos grupos de asma grave, independente de sua resposta ao tratamento. Alguns estudos têm demonstrado o papel do IFN- γ na gravidade da asma, Kobayashi et al (2011) observaram que o IFN- γ aumentou a hiperresponsividade das vias aéreas via a sinalização de neurocinina A com o receptor de neurocinina-2 em modelo experimental (KOBAYASHI *et al.*, 2011), e Raundhal et al (2015) observaram que níveis elevados de IFN- γ reduziu a expressão de SLPI (inibidor de proteases derivadas dos neutrófilos e outras células) na asma grave tanto em humano como em modelo animal (RAUNDHAL *et al.*, 2015). Além do IFN- γ , vários estudos também têm relatado o papel da citocina IL-17A na gravidade desta doença (CHAKIR *et al.*, 2003; AGACHE *et al.*, 2010), como também têm associado níveis elevados desta citocina com a resistência ao tratamento com corticosteróides tanto em modelo animal como em humano (MCKINLEY *et al.*, 2008; NANZER *et al.*, 2013). Chambers et al (2015) mostraram que ambas as citocinas IFN- γ e IL-17A apresentaram níveis elevados em CMSP de pacientes com asma grave resistente a corticosteroides comparado aos pacientes que são sensíveis ao tratamento (CHAMBERS *et al.*, 2015). Entretanto, nossos dados sugerem que ambas as citocinas estejam envolvidas na imunopatogênese da asma grave, independente de sua resposta ao tratamento.

Diante destes resultados, concluímos que a gravidade da asma está associada a um aumento das citocinas do perfil Th1 e Th17 pelos linfócitos e a refratariedade ao tratamento associada a uma diminuição de regulação por essas células. No entanto, mais estudos são necessários para entender o perfil imunológico desses indivíduos, visando uma estratégia terapêutica de prevenção para forma refratária da doença.

4.5 REFERÊNCIAS

Agache, I., C. Ciobanu, *et al.* Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. Respir Med, v.104, n.8, Aug, p.1131-7. 2010.

Agrawal, S. e R. G. Townley. Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma. Expert Opin Biol Ther, v.14, n.2, Feb, p.165-81. 2014.

Akdis, C. A., T. Blesken, *et al.* Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest, v.102, n.1, Jul 1, p.98-106. 1998.

ATS. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med, v.162, n.6, Dec, p.2341-51. 2000.

Bakr, S. I., M. Z. Mahran, *et al.* Role of regulatory CD4+CD25+ Foxp3 T cells in bronchial asthma in Egyptian children. Egypt J Immunol, v.20, n.2, p.29-38. 2013.

Bousquet, J., P. Chanez, *et al.* Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med, v.323, n.15, Oct 11, p.1033-9. 1990.

Brasil. Ministério da Saúde 2015.

Brightling, C. E., P. Bradding, *et al.* Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. N Engl J Med, v.346, n.22, May 30, p.1699-705. 2002.

Chakir, J., J. Shannon, *et al.* Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.6, Jun, p.1293-8. 2003.

Chambers, E. S., A. M. Nanzer, *et al.* Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A(high) and IFN-gamma(high) immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. J Allergy Clin Immunol, v.136, n.3, Sep, p.628-637 e4. 2015.

_____. Serum 25-dihydroxyvitamin D levels correlate with CD4(+)Foxp3(+) T-cell numbers in moderate/severe asthma. J Allergy Clin Immunol, v.130, n.2, Aug, p.542-4. 2012.

Chlumsky, J., I. Striz, *et al.* Strategy aimed at reduction of sputum eosinophils decreases exacerbation rate in patients with asthma. J Int Med Res, v.34, n.2, Mar-Apr, p.129-39. 2006.

Clutterbuck, E. J., E. M. Hirst, *et al.* Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and

interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. Blood, v.73, n.6, May 1, p.1504-12. 1989.

Coyle, A. J., S. J. Ackerman, *et al.* Human eosinophil-granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. J Clin Invest, v.95, n.4, Apr, p.1735-40. 1995.

Dente, F. L., E. Bacci, *et al.* Effects of oral prednisone on sputum eosinophils and cytokines in patients with severe refractory asthma. Ann Allergy Asthma Immunol, v.104, n.6, Jun, p.464-70. 2010.

Gascan, H., J. F. Gauchat, *et al.* Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J Exp Med, v.173, n.3, Mar 1, p.747-50. 1991.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2006.

Greenwald, R. J., G. J. Freeman, *et al.* The B7 family revisited. Annu Rev Immunol, v.23, p.515-48. 2005.

Global Asthma Network. Global asthma report 2014. Global burden of disease due to asthma. Auckland, New Zealand 2014.

Gupta, A., S. Dimeloe, *et al.* Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. Thorax, v.69, n.6, Jun, p.508-15. 2014.

Hartl, D., B. Koller, *et al.* Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. J Allergy Clin Immunol, v.119, n.5, May, p.1258-66. 2007.

Hawrylowicz, C., D. Richards, *et al.* A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol, v.109, n.2, Feb, p.369-70. 2002.

Holgate, S. T. e R. Polosa. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol, v.8, n.3, Mar, p.218-30. 2008.

Huang, S. K., H. Q. Xiao, *et al.* IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. J Immunol, v.155, n.5, Sep 1, p.2688-94. 1995.

Janssens, J. P., J. C. Pache, *et al.* Physiological changes in respiratory function associated with ageing. Eur Respir J, v.13, n.1, Jan, p.197-205. 1999.

Jenkins, M. A., S. C. Dharmage, *et al.* Parity and decreased use of oral contraceptives as predictors of asthma in young women. Clin Exp Allergy, v.36, n.5, May, p.609-13. 2006.

Jia, Y., X. Fang, *et al.* IL-13+ Type 2 Innate Lymphoid Cells Correlate with Asthma Control Status and Treatment Response. Am J Respir Cell Mol Biol, v.55, n.5, Nov, p.675-683. 2016.

Karagiannidis, C., M. Akdis, *et al.* Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. J Allergy Clin Immunol, v.114, n.6, Dec, p.1425-33. 2004.

Kaur, M., S. Reynolds, *et al.* The effects of corticosteroids on cytokine production from asthma lung lymphocytes. Int Immunopharmacol, v.23, n.2, Dec, p.581-4. 2014.

Klunker, S., A. Trautmann, *et al.* A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN-gamma-inducible protein 10, monokine induced by IFN-gamma, and IFN-gamma-inducible alpha-chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis. J Immunol, v.171, n.2, Jul 15, p.1078-84. 2003.

Kobayashi, M., S. Ashino, *et al.* IFN-gamma elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. Eur J Immunol, v.42, n.2, Feb, p.393-402. 2011.

Lambrecht, B. N. e H. Hammad. The immunology of asthma. Nat Immunol, v.16, n.1, Jan, p.45-56. 2015.

Machura, E., B. Mazur, *et al.* Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. Clin Dev Immunol, v.2010, p.606139. 2010.

Mamessier, E., A. Nieves, *et al.* T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. Allergy, v.63, n.9, Sep, p.1202-10. 2008.

Matsumoto, K., H. Inoue, *et al.* Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. Int Arch Allergy Immunol, v.134, n.4, Aug, p.295-302. 2004.

Mckinley, L., J. F. Alcorn, *et al.* TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. J Immunol, v.181, n.6, Sep 15, p.4089-97. 2008.

Moniuszko, M., A. Bodzenta-Lukaszyk, *et al.* Effects of oral glucocorticoid therapy on CD4+CD25+CD127- and CD4+CD25high T cell levels in asthmatic patients. Inflammation, v.33, n.6, Dec, p.415-20. 2010.

Nanzer, A. M., E. S. Chambers, *et al.* Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in a glucocorticoid-independent fashion. J Allergy Clin Immunol, v.132, n.2, Aug, p.297-304 e3. 2013.

Naseer, T., E. M. Minshall, *et al.* Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. Am J Respir Crit Care Med, v.155, n.3, Mar, p.845-51. 1997.

Niewoehner, D. E. e J. Kleinerman. Morphologic basis of pulmonary resistance in the human lung and effects of aging. J Appl Physiol, v.36, n.4, Apr, p.412-8. 1974.

Pietruczuk, M., M. Eusebio, *et al.* Phenotypic characterization of ex vivo CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} immune regulatory T cells in allergic asthma: pathogenesis relevance of their FoxP3, GITR, CTLA-4 and FAS expressions. J Biol Regul Homeost Agents, v.26, n.4, Oct-Dec, p.627-39. 2012.

Provoost, S., T. Maes, *et al.* Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. Allergy, v.64, n.10, Oct, p.1539-46. 2009.

Rao, C. K., C. G. Moore, *et al.* Characteristics of perimenstrual asthma and its relation to asthma severity and control: data from the Severe Asthma Research Program. Chest, v.143, n.4, Apr, p.984-92. 2013.

Raundhal, M., C. Morse, *et al.* High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. J Clin Invest, v.125, n.8, Aug 3, p.3037-50. 2015.

Robinson, D. S., Q. Hamid, *et al.* Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. N Engl J Med, v.326, n.5, Jan 30, p.298-304. 1992.

Sanderson, C. J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. Blood, v.79, n.12, Jun 15, p.3101-9. 1992.

Schmidt-Weber, C. B. e K. Blaser. The role of TGF-beta in allergic inflammation. Immunol Allergy Clin North Am, v.26, n.2, May, p.233-44, vi-vii. 2006.

Shi, Y. H., G. C. Shi, *et al.* Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. Chin Med J (Engl), v.124, n.13, Jul 5, p.1951-6. 2011.

Smith, S. G., R. Chen, *et al.* Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. J Allergy Clin Immunol, v.137, n.1, Jan, p.75-86 e8. 2016.

Smyth, L. J., A. Eustace, *et al.* Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. Chest, v.138, n.4, Oct, p.905-12. 2010.

Wenzel, S. E., L. B. Schwartz, *et al.* Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.3, Sep, p.1001-8. 1999.

Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science, v.282, n.5397, Dec 18, p.2258-61. 1998.

Xystrakis, E., S. Kusumakar, *et al.* Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. J Clin Invest, v.116, n.1, Jan, p.146-55. 2006.

Zhao, J., C. M. Lloyd, *et al.* Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. Mucosal Immunol, v.6, n.2, Mar, p.335-46. 2012.

5 CAPÍTULO 2: PERFIL FENOTÍPICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NA GRAVIDADE DA ASMA

Jamille Souza Fernandes^{1,2}, Maria Ilma Araujo^{2,3}, Tarcísio Vila Verde Santana de Almeida^{1,2}, Lorena Santana Andrade³, Edgar Marcelino Carvalho^{2,5}, Álvaro A. Cruz⁶, Luciana Santos Cardoso^{2,5,7}

¹ Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

² Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil;

³ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brasil;

⁴ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil;

⁵ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), CNPQ/MCT, Brasil

⁶ ProAr-Núcleo de Excelência em Asma, UFBA, Salvador, BA, Brasil;

⁷ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, 40170-115 Salvador, BA, Brasil.

Resumo

Introdução: Estima-se que aproximadamente 334 milhões de pessoas sofrem de asma no mundo, e 5-10% dos indivíduos asmáticos tem asma grave, caracterizada por uma resposta insatisfatória ao tratamento habitual. Os monócitos são células importantes do sistema imune inato, que a depender dos estímulos locais, são capazes de secretar citocinas de perfil pró-inflamatório, pró-fibrótico e regulatório. Não existem estudos demonstrando o perfil das subpopulações de monócitos de indivíduos com asma grave conforme a sua resposta ao tratamento. Por isso, o nosso objetivo foi avaliar o perfil fenotípico das subpopulações de monócitos de pacientes com asma grave de acordo com a sua resposta ao tratamento.

Métodos: Foram recrutados 19 pacientes com asma grave refratária ao tratamento (AGR), 21 com asma grave bem controlada/parcialmente controlada (AGC), 23 com asma leve a moderada (ALM) e 10 controles sem asma (CSA). Os monócitos foram obtidos de CMSP e as frequências dos marcadores de superfície e citocinas nesta população foram realizadas utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Resultados: Foi observado que a frequência dos monócitos intermediários foi maior no grupo AGR quando comparado com o grupo de ALM. Nós também observamos que no grupo de AGR a frequência dos monócitos intermediários expressando IL-10R foi maior quando comparado ao grupo de AGC e ALM. Quanto a IL-10, observamos que a frequência dos monócitos clássicos e não-clássicos expressando esta citocina foi maior nos grupos de AGR e AGC, respectivamente, quando comparado aos grupos controles. Além disso, nós observamos que as subpopulações de monócitos de ambos os grupos de asma grave expressavam mais as citocinas IL-13, IL-33 e TGF- β quando comparado aos controles. Quanto aos receptores, observamos que basicamente no grupo de AGR a frequência das subpopulações de monócitos expressando os receptores IL-4R α e IL-13R α 2 foi maior quando comparado aos controles (ALM e CSA) e ao grupo AGC, respectivamente.

Conclusões: As subpopulações de monócitos de pacientes com AGR e AGC têm um papel importante na gravidade da doença por apresentarem perfis distintos associados com a produção de citocinas e expressão de receptores envolvidos na resposta imune Th2 e no remodelamento tecidual.

5.1 INTRODUÇÃO

A asma é um problema mundial de saúde pública, acometendo cerca de 334 milhões de pessoas (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). Apesar da doença ser controlada na maioria dos pacientes pelo uso combinado de corticosteroides inalatórios mais agonista adrenérgico β_2 , cerca de 5 a 10% dos pacientes são refratários ao tratamento (ATS, 2000).

Como já são conhecidos, os monócitos são células mononucleares do sangue periférico com papéis importantes no processamento e apresentação antigênica ao sistema imunológico, além de serem capazes de migrar aos tecidos periféricos espontaneamente e em resposta a mediadores inflamatórios (GEISSMANN *et al.*, 2003; TACKE e RANDOLPH, 2006). Dependendo do seu estado de diferenciação e sinais locais, os monócitos e macrófagos são capazes de secretar uma variedade de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas e anti-inflamatórias (AUFFRAY *et al.*, 2009). Os monócitos humanos foram classificados em três subpopulações de acordo com sua expressão de CD14 e CD16: clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e não-clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Estudos têm observado uma frequência elevada dos monócitos intermediários nos indivíduos com asma grave (MONIUSZKO *et al.*, 2009; KOWAL *et al.*, 2012), e correlacionado esse aumento com o grau de hiperreatividade brônquica (KOWAL *et al.*, 2012).

Na literatura não existe nenhum estudo com seres humanos relatando sobre o papel das subpopulações de monócitos na gravidade da doença principalmente quando associado com a resposta ao tratamento. Desta forma, o nosso objetivo foi avaliar o perfil das subpopulações de monócitos de pacientes com asma grave conforme a sua resposta ao tratamento, através da

expressão de marcadores de superfície e do perfil de expressão intracelular de citocinas.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Características dos grupos do estudo

Neste estudo foram avaliados 73 indivíduos, dos quais 19 são indivíduos com asma grave refratária ao tratamento (AGR), 21 são indivíduos com asma grave bem controlada/parcialmente controlada ao tratamento (AGC), 23 indivíduos com asma leve a moderada (ALM) e 10 indivíduos controles sem asma (CSA). Os indivíduos com asma grave têm sido acompanhados por vários anos pelo Programa de Controle da Asma e de Rinite Alérgica na Bahia (PROAR), em Salvador, Bahia-Brasil e os grupos controles foram convidados a se voluntariar por publicidade pública em postos de saúde e transporte público. Simplificando, os indivíduos com asma grave foram identificados tendo qualquer um dos seguintes critérios: (i) sintomas diários contínuos; (ii) limitação nas atividades diárias; (iii) sintomas noturnos maior que duas vezes por semanas; (iv) uso de broncodilatadores ≥ 2 vezes ao dia; (v) Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF1) ou Pico de Fluxo Expiratório $< 60\%$. Os indivíduos AGC foram identificados seguindo os critérios estabelecidos pela GINA (GINA, 2006) e os indivíduos com AGR foram identificados pelos critérios da Sociedade Torácica Americana (ATS, 2000). No momento da coleta de sangue todos os indivíduos com asma grave estavam sendo tratados com uma combinação de média ou alta dose de corticosteróides inalatórios (800mcg a 1600 de budesonida ou equivalente) e agonista beta 2 de longa ação (12, 24 ou 48 mcg de formoterol ou 100 mcg de salmeterol). Os indivíduos com ALM foram identificados com base no seu histórico de asma, tendo seu diagnóstico validado por um especialista na área, e não foram tratados com corticosteroides inalatórios.

Em todos os pacientes foram avaliados a positividade do teste cutâneo para as proteínas alergênicas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus níger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Dermatophagoides farinae*,

Dermatophagoides pteronyssinus, *Blomia tropicalis*, epitélio de gato, epitélio de cachorro, *Blatella germanica*, *Periplaneta americana*, *Paspalum notatum*, *Cynodon dactylon*. Não foram incluídos fumantes, gestantes, além de indivíduos com sorologia positiva para doença de Chagas, HIV, HTLV-1, vírus da hepatite do tipo B e C ou quaisquer outras condições que pudessem interferir na resposta imunológica.

Em relação às características da população do estudo foi observado que a média da idade dos indivíduos com AGR (49 ± 11) foi maior do que os indivíduos com ALM ($39,3 \pm 13,1$), $p < 0,05$). Quanto ao gênero foi observado que a frequência do gênero feminino nos indivíduos com AGC (52,3%) foi menor quando comparado aos outros três grupos (AGR: 84,2%, ALM: 78,3 e CSA: 100%) ($p < 0,05$). Adicionalmente, foi observado que no teste cutâneo a frequência de positividade para pelo menos um alérgeno foi menor nos indivíduos com CSA (30%) em relação aos três grupos de pacientes com asma (ALM: 52,2%, AGC: 61,9% e AGR: 63,1%).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira, da Universidade Federal da Bahia.

5.2.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e citometria de fluxo

Foram coletados 20 mL de sangue dos indivíduos e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de 3×10^5 células/mL em RPMI 1640, contendo 10% de soro humano AB⁺ normal inativado, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100 μ L/mL, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

Após a separação, as células foram marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos e adquiridos pelo citômetro de fluxo. Simplificando esta etapa, em suspensões de 3×10^5 células foram adicionados brefeldina A (10 μ g/mL; Sigma, St. Louis, MO), o qual impede a secreção das proteínas pelo complexo de Golgi, em placas de 96 poços por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂.

Em seguida, foram realizadas marcações de superfície nas células com anticorpos monoclonais específicos para os monócitos e receptores avaliados por esta célula: CD14 (clone 61D3, eBioscience), CD16 (clone eBioCB16, eBioscience), IL-4R α (clone hIL-4R-M57, BD Pharmigen), IL-10R (clone 3F9, BD Pharmigen), IL-13R α 2 (clone B-D13, Abcam) e TSLPR (clone eBio1A6, eBioscience). Após esta etapa, as placas foram incubadas com 150 μ l/poço do tampão de permeabilização, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-citocinas avaliadas pelos monócitos: TNF- α (clone MAb11, eBioscience), IL-33 (clone 390412, R&D System), IL-13 (clone PVM13-1, eBioscience), IL-10 (JES3-9D7, eBioscience) e TGF- β (clone 9016, R&D System).

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência da expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa "Flow Jo". As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica a partir da dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) como parâmetros de tamanho e granulidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, foi feita a seleção da população de linfócitos por janela nesta população. Foi delimitada uma região específica no gráfico correspondente a área de monócitos (Figura 1a). Depois da seleção da população, nós selecionamos as subpopulações de monócitos de acordo com a expressão de CD14 e CD16 em: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (Figura 1b). Em seguida, nós avaliamos a expressão dos marcadores de superfície e citocinas intracelulares em cada subpopulação de monócitos.

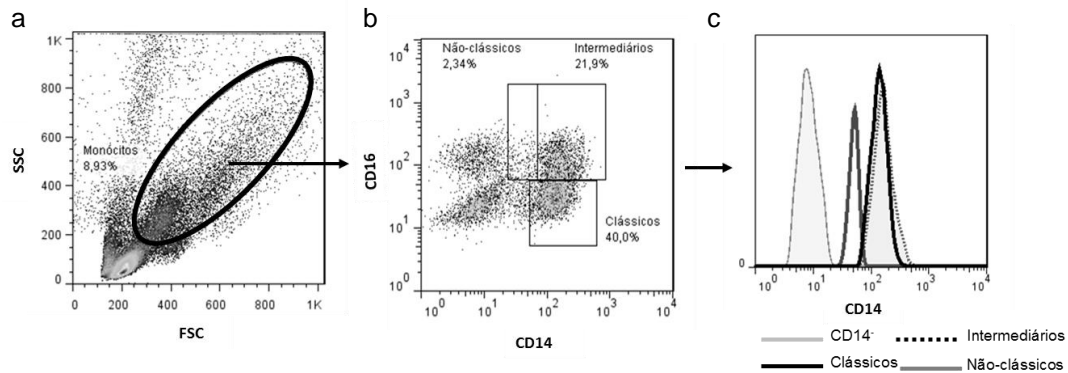


Figura 1: Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular identificando a população de monócitos (a); Subpopulações de monócitos a partir da expressão de CD14 e CD16 (b). Histograma de expressão de CD14 nas subpopulações de monócitos (c).

5.2.3 Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados no programa Graphpad PRISM 5.0 (La Jolla, CA, USA). Antes da análise de cada dado foi realizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson, desta forma, para comparação entre 2 ou mais grupos, testes paramétricos e não-paramétricos foram utilizados de acordo com a natureza dos dados gerados (ANOVA com pós teste de Bonferroni e Kruskal Wallis com pós teste de Dunn). Todos os testes foram bicaudais e a significância estatística foi estabelecida no intervalo de confiança de 95% e o valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Frequência das subpopulações de monócitos nos indivíduos com asma

A figura 2 mostra a frequência das subpopulações de monócitos e os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão. Neste estudo foi observado que nos indivíduos com AGR a frequência dos monócitos intermediários foi maior ($15,8\% \pm 8,3$) em relação aos indivíduos com ALM ($10,3\% \pm 5,2$, $p < 0,05$) (Figura 2b). Quanto a frequência dos monócitos clássicos e não-clássicos não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 2a e 2c, respectivamente).

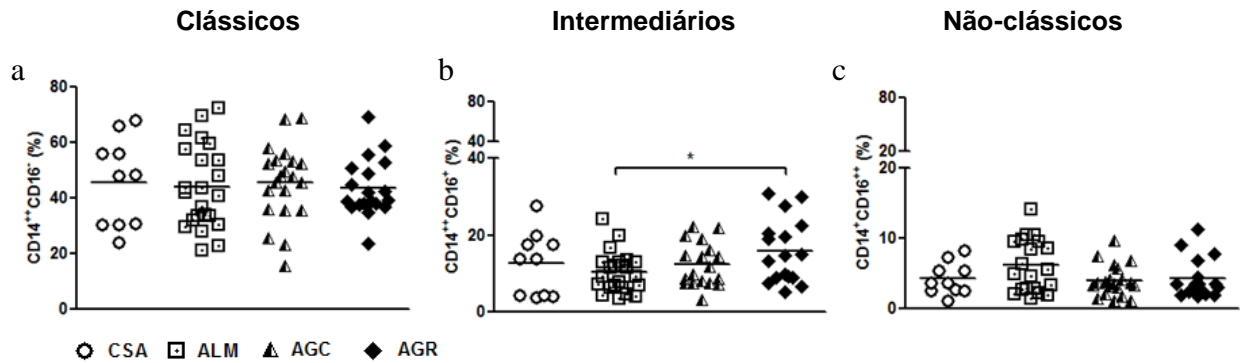


Figura 2: Frequência das subpopulações de monócitos: clássicos ($CD14^{+}CD16^{-}$) (a), intermediários ($CD14^{+}CD16^{+}$) (b) e não-clássicos ($CD14^{+}CD16^{+}$) (c) nos indivíduos com asma. * $p < 0,05$ (ANOVA)

5.3.2 Frequência das moléculas de regulação pelas subpopulações de monócitos nos indivíduos com asma

A frequência das subpopulações de monócitos expressando as moléculas regulatórias, IL-10R e IL-10, está mostrada na Figura 3. Foi observado que apenas nos monócitos intermediários a frequência do receptor de IL-10 foi maior nos indivíduos com AGR ($43\% \pm 12$) em comparação aos indivíduos com AGC e ALM ($36\% \pm 15$ e $33,2\% \pm 14$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 3b). Não foram observadas diferenças na frequência nos monócitos clássicos e não-clássicos expressando este receptor entre os grupos (Figura 3a e 3c, respectivamente). Quanto a IL-10, foi observado que nos indivíduos com AGR a frequência dos monócitos clássicos expressando esta citocina foi maior ($18\% \pm 8,6$) em relação aos indivíduos com ALM e CSA ($11,4\% \pm 7,7$ e $9,8\% \pm 4,3$; respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 3d), e nos indivíduos com AGC a frequência dos monócitos não-clássicos expressando a IL-10 foi maior ($24,3\% \pm 13,4$) em comparação aos indivíduos CSA ($17,7\% \pm 9,1$; $p < 0,005$) (Figura 3f). Não foram observadas diferenças significativas na frequência dos monócitos intermediários expressando IL-10 entre os grupos (Figura 3e).

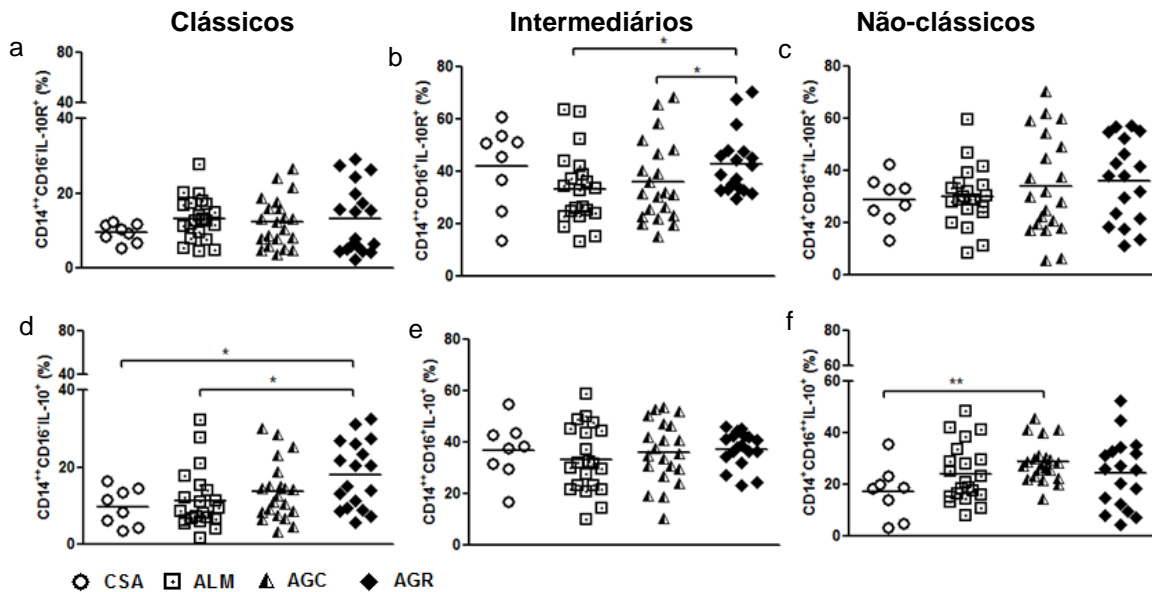


Figura 3: Frequência das subpopulações de monócitos expressando as moléculas regulatórias IL-10R (a-c) e IL-10 (d-f) nos indivíduos com asma. * $p<0,05$, ** $p<0,005$ (ANOVA)

5.3.3 Frequência dos receptores associados a resposta Th2/reparo tecidual pelas subpopulações de monócitos nos indivíduos com asma

Neste estudo também foi avaliado a frequência dos receptores associados a resposta Th2 e reparo tecidual pelas subpopulações de monócitos, os quais incluem o receptor α de IL-4, o receptor $\alpha 2$ de IL-13 e o receptor de TSLP (Figura 4). Foi observado que nos indivíduos com AGR a frequência dos monócitos intermediários expressando o IL-4R α foi maior ($40\% \pm 13$) em comparação aos indivíduos com ALM ($30\% \pm 13$) (Figura 4b), como também foi maior nos monócitos não-clássicos ($36,2\% \pm 19,2$) em relação aos CSA ($20,7\% \pm 7,6$) (Figura 4c). Nós observamos que nos indivíduos com AGC e com AL a frequência dos monócitos clássicos expressando este receptor foi maior ($11,4\% \pm 5,9$ e $12,2\% \pm 5,3$, respectivamente) em comparação aos indivíduos CSA ($6,9\% \pm 2$; $p<0,05$) (Figura 4a).

Quanto ao IL-13R $\alpha 2$, foi observado que apenas nos monócitos clássicos a sua frequência foi elevada nos indivíduos com AGR ($25,8\% \pm 9,9$) em relação aos indivíduos com AGC e CSA ($18,2\% \pm 9,7$ e $16\% \pm 2,4$, $p<0,05$) (Figura 4d). Não foram observadas diferenças significativas na frequência dos monócitos

intermediários e não-clássicos expressando este receptor entre os grupos (Figura 4e e 4f).

Além disso, também não foram observadas diferenças significativas na frequência das subpopulações de monócitos expressando o receptor de TSLPR entre os grupos (Figura 4g-4i).

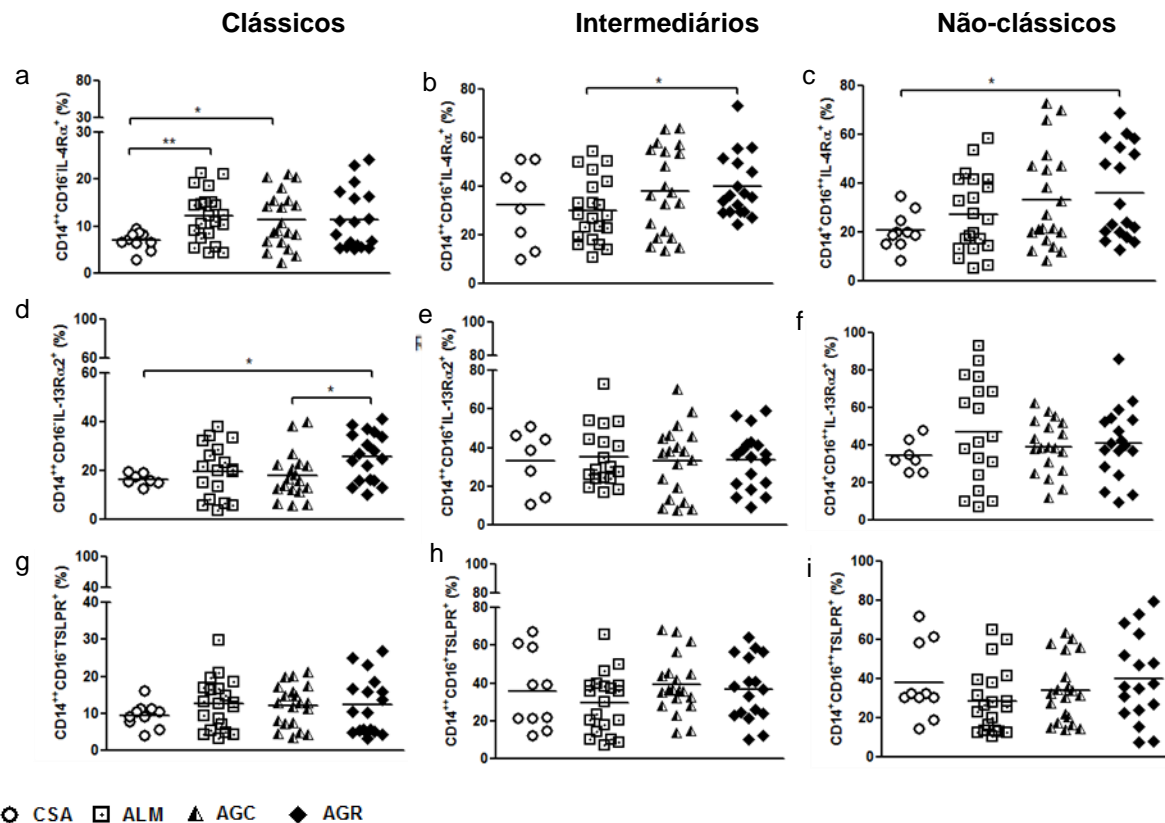


Figura 4: Frequência das subpopulações de monócitos expressando IL-4R α (a-c), IL-13R α 2 (d-f) e TSLPR (g-i) nos indivíduos com asma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (ANOVA)

5.3.4 Frequência de citocinas pelas subpopulações de monócitos nos indivíduos com asma

A figura 5 mostra a frequência das subpopulações de monócitos expressando as citocinas IL-13, IL-33, TGF- β e TNF- α nos indivíduos com asma. Foi observado que nos indivíduos com AGR e AGC a frequência dos monócitos clássicos e não-clássicos expressando IL-13 foi maior (Clássicos: $21\% \pm 9,9$ e $22,7\% \pm 12,8$, respectivamente e Não-clássicos: $43\% \pm 19,1$ e $40,6\% \pm 14,8$, respectivamente) em comparação aos indivíduos CSA (Clássicos: $12,7\% \pm 3,1$ e Não-clássicos: $27\% \pm 5,2$; $p < 0,05$) (Figura 5a e 5c).

Adicionalmente, a frequência dos monócitos não-clássicos expressando esta citocina foi também maior nos indivíduos com ALM ($44,3\% \pm 20,3$) em comparação aos indivíduos CSA ($27\% \pm 5,2$, $p < 0,05$) (Figura 5c). Entretanto, não foi observada diferença significativa na frequência dos monócitos intermediários expressando IL-13 entre os grupos (Figura 5b).

Quanto a IL-33, foi observado que apenas nos monócitos intermediários a sua frequência foi maior nos indivíduos com AGR e AGC ($31,3\% \pm 10,4$ e $32\% \pm 7,6$, respectivamente) em relação aos indivíduos com ALM e CSA ($21,2\% \pm 5,3$ e $21,4\% \pm 3,6$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 5e). Não foram observadas diferenças significativas na frequência nos monócitos clássicos e não-clássicos expressando IL-33 entre os grupos (Figura 5d e 5f).

Em relação ao TGF- β , foi observado que a frequência das três subpopulações de monócitos expressando esta citocina foi maior nos indivíduos com AGR (Clássicos: $15,5\% \pm 7,4$, Intermediários: $36,7\% \pm 20,6$ e Não-clássicos: $29,9\% \pm 18,8$) em comparação aos indivíduos CSA (Clássicos: $7,5\% \pm 4,3$, Intermediários: $21,6\% \pm 6,3$ e Não-clássicos: $18,4\% \pm 4,3$) (Figura 5g-5i). Além disso, também foi observado que nos indivíduos com AGR a frequência dos monócitos intermediários e não-clássicos expressando o TGF- β foi maior quando comparado aos indivíduos com ALM (Intermediários: $24,9\% \pm 12,8$ e Não-clássicos: $15,3\% \pm 11,1$) (Figura 5h e 5i). Nos indivíduos com AGC, a frequência dos monócitos clássicos e intermediários expressando TGF- β foi maior ($14,1\% \pm 7,9$ e $30,6\% \pm 11$, respectivamente) em relação aos indivíduos CSA (Figura 5g e 5h). Nós também observamos que a frequência dos monócitos clássicos expressando esta citocina foi maior nos indivíduos com ALM ($12,7\% \pm 5$) quando comparado aos indivíduos CSA (Figura 5g) e nos monócitos não-clássicos foi maior nos indivíduos com AGR em relação aos indivíduos AGC ($17\% \pm 8,5$, $p < 0,005$) (Figura 5i).

Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na frequência das subpopulações de monócitos expressando TNF- α entre os grupos (Figura 5j-5l).

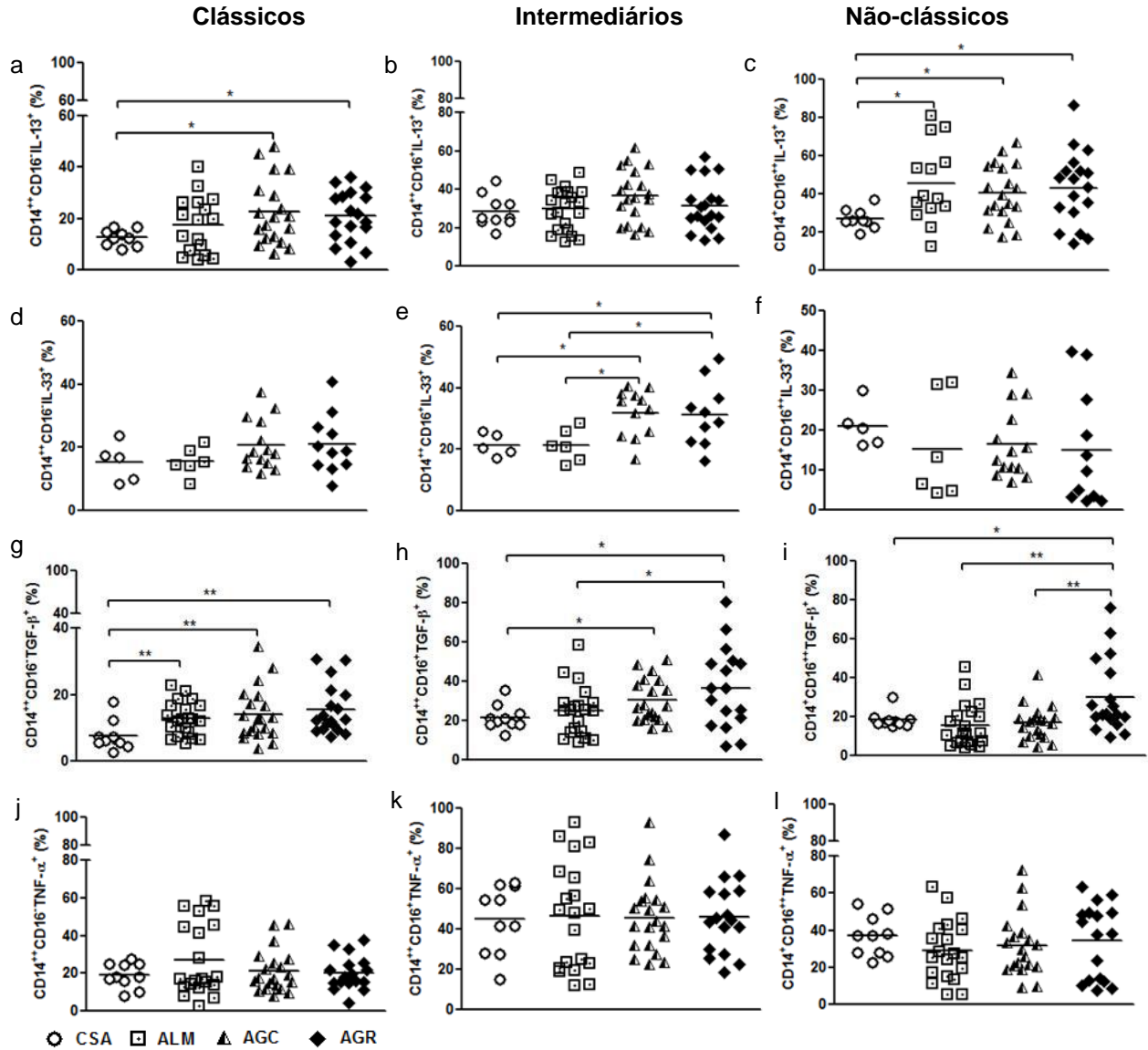


Figura 5: Frequência das subpopulações de monócitos expressando as citocinas IL-13 (a-c), IL-33 (d-f), TGF- β (g-i) e TNF- α (j-l) nos indivíduos com asma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (ANOVA)

5.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que aborda o perfil fenotípico das subpopulações de monócitos de pacientes com asma grave de acordo com sua resposta ao tratamento. Primeiramente, nós avaliamos a frequência das subpopulações de monócitos entre os grupos e observamos que nos indivíduos com AGR a frequência dos monócitos intermediários foi maior em relação aos indivíduos com ALM, o que pode sugerir uma participação dessas células na refratariedade da doença. Alguns estudos também observaram uma frequência elevada desta subpopulação em pacientes com asma grave, mas não associaram com a refratariedade ao tratamento (MONIUSZKO *et al.*, 2009; KOWAL *et al.*, 2012).

Quanto as moléculas regulatórias, tais como o IL-10R e a IL-10, nós observamos que a frequência dos monócitos expressando o IL-10R foi maior apenas nos monócitos intermediários de indivíduos com AGR em comparação aos indivíduos com AGC e ALM. Alguns estudos não observaram diferença na expressão do IL-10R nos macrófagos alveolares e brônquicos entre os pacientes asmáticos e sadios (LIM *et al.*, 2004; MONIUSZKO *et al.*, 2007), nem mesmo daqueles que receberam terapia com corticosteróides (MONIUSZKO, *et al.*, 2007). Estudo de Moniuszko *et al.* (2009) observaram que dentre as subpopulações de leucócitos (T CD4⁺, T CD8⁺, monócitos, células NK e neutrófilos), os monócitos e as células T CD4⁺CD25^{hi} foram os que apresentaram uma maior expressão deste receptor, sendo que entre as subpopulações de monócitos, a expressão do IL-10R foi elevada nos monócitos intermediários e não-clássicos (MONIUSZKO, BODZENTA-LUKASZYK e DABROWSKA, 2009). Neste mesmo estudo, os autores observaram que o tratamento com glicocorticóide de pacientes asmáticos diminui a expressão desse receptor em todas as subpopulações de leucócitos (MONIUSZKO, BODZENTA-LUKASZYK e DABROWSKA, 2009). Quanto a IL-10, nós observamos que a frequência das subpopulações de monócitos expressando esta citocina foi maior principalmente nos indivíduos com asma grave. São raros os trabalhos que relatam o papel dos monócitos expressando

esta citocina regulatória nos indivíduos com asma grave, especialmente quanto a sua resposta ao tratamento. Alguns estudos basicamente não observaram diferenças nos níveis de IL-10 em culturas não estimuladas de CMSP de pacientes com asma grave em relação aos pacientes com asma leve e saudáveis (TOMITA *et al.*, 2002; HEW *et al.*, 2006). No geral, apesar de termos encontrado uma frequência maior do IL-10R e IL-10 nos monócitos de indivíduos AGR, esse aumento pode ter sido causado pelo próprio efeito dos medicamentos ou um mecanismo do próprio organismo de suprimir algum processo inflamatório.

Além disso, os receptores associados à resposta Th2 e reparo tecidual, tais como o IL-4R α , IL-13R α 2 e TSLPR, também foram avaliados nas subpopulações de monócitos. Vários estudos têm demonstrado que a inflamação alérgica e o remodelamento das vias aéreas envolvem as citocinas IL-4 e IL-13, e a sinalização dessas citocinas é parcialmente ligada ao uso compartilhado do IL-4R α (NELMS *et al.*, 1999; HOFFJAN e OBER, 2002; WYNN, 2003). No nosso estudo observamos que a frequência dos monócitos intermediários e não-clássicos expressando IL-4R α foi maior no grupo de AGR e nos monócitos clássicos foi maior nos grupos de AGC e ALM. Kowal *et al.* (2004) observaram que a frequência dos monócitos CD14⁺ coexpressando o IL-4R α foi maior nos indivíduos com asma brônquica comparado aos controles, e que a imunoterapia específica ao alérgeno (*Dermatophagoides pteronyssinus*) diminuiu a frequência destas células CD14⁺IL-4R α ⁺, sugerindo um papel importante deste receptor para patogênese da asma (KOWAL *et al.*, 2004). Entretanto, outro estudo observou que os macrófagos alternativamente ativados dependentes do IL-4R α não desempenham papéis importantes na patologia da doença das vias aéreas alérgica em modelo experimental (NIEUWENHUIZEN *et al.*, 2012). Não existem estudos relatando o papel deste receptor nos monócitos na asma grave refratária, no nosso estudo, por sua vez, mostra que os monócitos intermediários e não-clássicos de indivíduos com AGR têm uma expressão aumentada do IL-4R α , sugerindo um papel

significativo deste receptor na patologia da doença. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer o papel do mesmo na asma.

Em relação ao IL-13R α 2, nós observamos que a frequência deste receptor foi maior apenas nos monócitos clássicos de indivíduos com AGR em relação aos indivíduos com AGC e CSA. Estudo de Fichtner-Feigl et al (2006) demonstraram que a sinalização do IL-13R α 2 (na forma de membrana) está envolvido na indução da produção de TGF- β e fibrose tanto em humano como em modelo experimental (FICHTNER-FEIGL *et al.*, 2006). Entretanto, não existem estudos avaliando o IL-13R α 2 em monócitos de indivíduos asmáticos. Para entender a função do IL-13R α 2 de membrana em modelo experimental de asma, Chen et al (2013) cruzaram camundongos transgênicos que expressavam este receptor no epitélio pulmonar com camundongos deficientes do IL-13R α 2 para gerar camundongos que expressassem exclusivamente apenas IL-13R α 2 no epitélio pulmonar. Após estimular com ácaros, observaram que esses camundongos apresentaram hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas, sugerindo que o IL-13R α 2 contribui para o desenvolvimento da asma alérgica (CHEN *et al.*, 2013). Em humanos, o seu papel ainda não está claro, mas observamos que a frequência dos monócitos clássicos de indivíduos com AGR expressando IL-13R α 2 foi maior em relação aos indivíduos AGC, sugerindo uma participação deste receptor na refratariedade da doença.

Quanto ao TSLPR, nós não observamos diferenças significativas na frequência das subpopulações de monócitos expressando este receptor entre os grupos. Estudo de Han et al (2013) demonstraram em modelo experimental que a sinalização do TSLP/TSLPR amplifica a diferenciação dos macrófagos alternativamente ativados, sugerindo sua participação na inflamação das vias aéreas alérgica (HAN *et al.*, 2013). O papel do receptor de TSLP em humanos ainda não está muito bem elucidado, principalmente em indivíduos com asma grave em resposta ao tratamento. Apesar de não termos encontrado diferenças deste receptor nas subpopulações de monócitos, são necessários mais estudos para esclarecer o seu papel em outras células do sistema imunológico.

Além dos receptores, avaliamos algumas citocinas associadas a resposta tipo 2/reparo tecidual, IL-13, TGF- β e IL-33, e a resposta Th1, TNF- α . Em relação ao TGF- β , nós observamos que basicamente nos grupos de asma grave as três subpopulações de monócitos apresentaram uma frequência elevada desta citocina. Estudos têm observado um aumento da expressão de TGF- β em amostras de biópsias brônquicas de pacientes adultos (CHAKIR *et al.*, 2003) e no lavado broncoalveolar de crianças (BROWN *et al.*, 2012), ambos com asma grave, sendo que neste último artigo os autores associaram as concentrações de TGF- β com a limitação do fluxo aéreo. Chakir et al (2003) também observaram que o tratamento com glicocorticoides não diminuíram a expressão de TGF- β e nem dos colágenos tipo I e III em pacientes com asma grave, sugerindo que a falha terapêutica com glicocorticoides para reduzir a deposição do colágeno pode ser devido a expressão elevada de TGF- β (CHAKIR *et al.*, 2003). Outro estudo mostrou que camundongos cronicamente desafiados com ovoalbumina estimulou macrófagos peribronquiais a co-expressarem o FCFb (fator de crescimento de fibroblasto básico) e TGF- β , o que contribuiu para o desenvolvimento do remodelamento das vias aéreas (YUM *et al.*, 2011). Além disso, é importante ressaltar que o TGF- β é uma citocina importante para diferenciação das células Th17 (BETTELLI *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; KORN *et al.*, 2009), podendo induzir células a produzir grandes quantidades de IL-17, e assim perpetuar um processo inflamatório (TIRADO-RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Desta forma, de acordo com os nossos dados, a expressão desta citocina pelas subpopulações de monócitos parecem contribuir para a gravidade da doença, por influenciar também na indução da resposta do tipo Th17. Os monócitos não-clássicos, por sua vez, parece contribuir também com a refratariedade, já que a expressão do TGF- β por essa subpopulação foi maior quando comparado aos indivíduos com AGC.

As citocinas associadas à resposta tipo 2, tais como IL-13 e IL-33, também foram avaliadas neste estudo. A frequência das subpopulação de monócitos expressando IL-13 foi maior principalmente nos grupos de asma grave,

independente da sua resposta ao tratamento. Estudo de Hancock et al (1998) têm mostrado a presença de mRNA de IL-13 de macrófagos alveolares e que sua produção foi aumentada na presença de doença inflamatória no pulmão (HANCOCK *et al.*, 1998). Outro estudo mostrou que a IL-13 pode aumentar a expressão de TGF- β 2 em células epiteliais brônquicas em humanos, podendo contribuir para fibrose subepitelial na asma (MALAVIA *et al.*, 2008). Além disso, outros estudos também observaram níveis elevados de IL-13 em amostras de lavado broncoalveolar (BAL), escarro ou biópsias brônquicas de pacientes com asma resistente a corticosteroides (HUANG *et al.*, 1995; NASEER *et al.*, 1997), como também de pacientes com asma moderada a grave após uso de corticosteroides sistêmico e inalatório (AGRAWAL e TOWNLEY, 2014; KAUR *et al.*, 2014). Não existem estudos avaliando o papel da IL-13 pelas subpopulações de monócitos na gravidade asma, como também na refratariedade ao tratamento. Apesar desses dados da literatura sugerirem uma associação de IL-13 com a resistência ao tratamento, mais estudos são necessários para esclarecer o papel desta citocina na doença. No nosso estudo, por sua vez, observamos que a frequência das subpopulações de monócitos expressando a IL-13 foi maior em ambos os grupos de asma grave, sugerindo sua participação na gravidade, mas não na refratariedade tratamento.

A citocina IL-33 foi avaliada nas subpopulações de monócitos e nós observamos que apenas nos monócitos intermediários a sua frequência foi elevada nos grupos de indivíduos com asma grave, AGR e AGC, em comparação aos grupos com ALM e CSA. Entre as fontes produtoras de IL-33 estão as células epiteliais brônquicas, fibroblastos, células da musculatura lisa, queratinócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas (SCHMITZ *et al.*, 2005; TASHIRO, 2016). Estudo de Saglani et al (2013) observou aumento da expressão de IL-33 em amostras de biópsias endobrônquica de pacientes pediátricos com asma grave resistente a terapia, e que esta citocina foi relacionada a síntese de colágeno e ao remodelamento das vias aéreas (SAGLANI *et al.*, 2013). Outro estudo, em modelo experimental de asma,

observou que IL-33 amplifica a polarização dos macrófagos alternativamente ativados que contribui para inflamação das vias aéreas (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2009). O nosso resultado, por sua vez, mostra que os monócitos intermediários através da produção de IL-33 parecem contribuir apenas com a patogênese da asma grave.

Quanto ao TNF- α , alguns estudos têm mostrado que os monócitos não-clássicos são os principais produtores desta citocina em outros modelos de doença (DUTERTRE *et al.*, 2012; MONIUSZKO *et al.*, 2015). Em nosso estudo nós não observamos diferença significativa na frequência das subpopulações de monócitos expressando TNF- α entre os grupos. Evidências sugerem a participação do TNF- α na patogênese da asma grave (KIPS *et al.*, 1992; THOMAS *et al.*, 1995; FRANCHIMONT *et al.*, 1999; WASERMAN *et al.*, 2000) e refratária (BERRY *et al.*, 2006), além de que outros estudos mostraram que o tratamento que visam antagonizar as funções do TNF- α melhoraram a qualidade de vida e a hiperresponsividade das vias aéreas de pacientes com asma grave refratária (HOWARTH *et al.*, 2005; TAILLE *et al.*, 2013). Em um estudo recente mostrou que a forma ativa da vitamina D, sozinho ou em combinação com glicocorticoide, diminuiu a produção de TNF- α pelos monócitos intermediários e não-clássicos em pacientes asmáticos (GRUBCZAK *et al.*, 2015). Ainda não existem estudos avaliando a produção desta citocina nas subpopulações de monócitos de pacientes com asma grave em resposta ao tratamento, uma possível explicação por não termos encontrado diferença entre grupos é que talvez outras células do sistema inato ou adaptativo estejam contribuindo para produção da mesma.

Concluimos que as subpopulações de monócitos parecem contribuir de forma semelhante na gravidade da asma, com aumento na expressão de marcadores associados a resposta imune tipo-2 e ao remodelamento tecidual. Por outro lado, quando avaliamos a refratariedade ao tratamento os monócitos parecem atuar de formas distintas, sendo os clássicos e não clássicos mais envolvidos ao remodelamento tecidual, pela expressão de IL-13R α 2 e TGF- β e a população de monócitos intermediários, com caráter mais regulatório,

observado pela expressão aumentada do IL-10R. Estes achados sugerem que a expressão dessas moléculas por esses monócitos têm um papel importante na refratariedade ao tratamento na asma.

5.5 REFERÊNCIAS

Agrawal, S. e R. G. Townley. Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma. Expert Opin Biol Ther, v.14, n.2, Feb, p.165-81. 2014.

ATS. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med, v.162, n.6, Dec, p.2341-51. 2000.

Auffray, C., M. H. Sieweke, *et al.* Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.669-92. 2009.

Berry, M. A., B. Hargadon, *et al.* Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. N Engl J Med, v.354, n.7, Feb 16, p.697-708. 2006.

Bettelli, E., Y. Carrier, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.235-8. 2006.

Brown, S. D., K. M. Baxter, *et al.* Airway TGF-beta1 and oxidant stress in children with severe asthma: association with airflow limitation. J Allergy Clin Immunol, v.129, n.2, Feb, p.388-96, 396 e1-8. 2012.

Chakir, J., J. Shannon, *et al.* Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.6, Jun, p.1293-8. 2003.

Chen, W., U. Sivaprasad, *et al.* IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. J Allergy Clin Immunol, v.132, n.4, Oct, p.951-8 e1-6. 2013.

Dutertre, C. A., S. Amraoui, *et al.* Pivotal role of M-DC8(+) monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFalpha overproduction in response to microbial products. Blood, v.120, n.11, Sep 13, p.2259-68. 2012.

Fichtner-Feigl, S., W. Strober, *et al.* IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. Nat Med, v.12, n.1, Jan, p.99-106. 2006.

Franchimont, D., H. Martens, *et al.* Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. J Clin Endocrinol Metab, v.84, n.8, Aug, p.2834-9. 1999.

Geissmann, F., S. Jung, *et al.* Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, v.19, n.1, Jul, p.71-82. 2003.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2006.

Global Asthma Network. Global asthma report 2014. Global burden of disease due to asthma. Auckland, New Zealand 2014.

Grubczak, K., D. Lipinska, *et al.* Vitamin D3 Treatment Decreases Frequencies of CD16-Positive and TNF-alpha-Secreting Monocytes in Asthmatic Patients. Int Arch Allergy Immunol, v.166, n.3, p.170-6. 2015.

Han, H., M. B. Headley, *et al.* Thymic stromal lymphopietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages. J Immunol, v.190, n.3, Feb 1, p.904-12. 2013.

Hancock, A., L. Armstrong, *et al.* Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. Am J Respir Cell Mol Biol, v.18, n.1, Jan, p.60-5. 1998.

Hew, M., P. Bhavsar, *et al.* Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.174, n.2, Jul 15, p.134-41. 2006.

Hoffjan, S. e C. Ober. Present status on the genetic studies of asthma. Curr Opin Immunol, v.14, n.6, Dec, p.709-17. 2002.

Howarth, P. H., K. S. Babu, *et al.* Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. Thorax, v.60, n.12, Dec, p.1012-8. 2005.

Huang, S. K., H. Q. Xiao, *et al.* IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. J Immunol, v.155, n.5, Sep 1, p.2688-94. 1995.

Kaur, M., S. Reynolds, *et al.* The effects of corticosteroids on cytokine production from asthma lung lymphocytes. Int Immunopharmacol, v.23, n.2, Dec, p.581-4. 2014.

Kips, J. C., J. Tavernier, *et al.* Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. Am Rev Respir Dis, v.145, n.2 Pt 1, Feb, p.332-6. 1992.

Korn, T., E. Bettelli, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.485-517. 2009.

Kowal, K., M. Moniuszko, *et al.* Allergen challenge differentially affects the number of circulating monocyte subsets. Scand J Immunol, v.75, n.5, May, p.531-9. 2012.

Kowal, K., J. Osada, *et al.* Expression of interleukin 4 receptors in bronchial asthma patients who underwent specific immunotherapy. Ann Allergy Asthma Immunol, v.93, n.1, Jul, p.68-75. 2004.

Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, *et al.* IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J Immunol, v.183, n.10, Nov 15, p.6469-77. 2009.

Lim, S., G. Caramori, *et al.* Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. Allergy, v.59, n.5, May, p.505-14. 2004.

Malavia, N. K., J. D. Mih, *et al.* IL-13 induces a bronchial epithelial phenotype that is profibrotic. Respir Res, v.9, Mar 18, p.27. 2008.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.231-4. 2006.

Moniuszko, M., A. Bodzenta-Lukaszyk, *et al.* Oral glucocorticoid treatment decreases interleukin-10 receptor expression on peripheral blood leucocyte subsets. Clin Exp Immunol, v.156, n.2, May, p.328-35. 2009.

_____. Bronchial macrophages in asthmatics reveal decreased CD16 expression and substantial levels of receptors for IL-10, but not IL-4 and IL-7. Folia Histochem Cytobiol, v.45, n.3, p.181-9. 2007.

_____. Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. Clin Immunol, v.130, n.3, Mar, p.338-46. 2009.

Moniuszko, M., N. P. Liyanage, *et al.* Glucocorticoid treatment at moderate doses of SIVmac251-infected rhesus macaques decreases the frequency of circulating CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes but does not alter the tissue virus reservoir. AIDS Res Hum Retroviruses, v.31, n.1, Jan, p.115-26. 2015.

Naseer, T., E. M. Minshall, *et al.* Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. Am J Respir Crit Care Med, v.155, n.3, Mar, p.845-51. 1997.

Nelms, K., A. D. Keegan, *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol, v.17, p.701-38. 1999.

Nieuwenhuizen, N. E., F. Kirstein, *et al.* Allergic airway disease is unaffected by the absence of IL-4R α -dependent alternatively activated macrophages. J Allergy Clin Immunol, v.130, n.3, Sep, p.743-750 e8. 2012.

Saglani, S., S. Lui, *et al.* IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. J Allergy Clin Immunol, v.132, n.3, Sep, p.676-685 e13. 2013.

Schmitz, J., A. Owyang, *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity, v.23, n.5, Nov, p.479-90. 2005.

Tacke, F. e G. J. Randolph. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, v.211, n.6-8, p.609-18. 2006.

Taille, C., C. Poulet, *et al.* Monoclonal Anti-TNF-alpha Antibodies for Severe Steroid-Dependent Asthma: A Case Series. Open Respir Med J, v.7, p.21-5. 2013.

Tashiro, H. T., K.; Hayashi, S.; Kato, G.; Kurata, K.; Kimura, S.; Sueoka-Aragane, N. Interleukin-33 from Monocytes Recruited to the Lung Contributes to House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model. PLoS One, v.16, p.6. 2016.

Thomas, P. S., D. H. Yates, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. Am J Respir Crit Care Med, v.152, n.1, Jul, p.76-80. 1995.

Tirado-Rodriguez, B., E. Ortega, *et al.* TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. J Immunol Res, v.2014, p.318481. 2014.

Tomita, K., S. Lim, *et al.* Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. Clin Immunol, v.102, n.3, Mar, p.258-66. 2002.

Veremeyko, T., S. Siddiqui, *et al.* IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. PLoS One, v.8, n.12, p.e81774. 2013.

Waserman, S., J. Dolovich, *et al.* TNF-alpha dysregulation in asthma: relationship to ongoing corticosteroidtherapy. Can Respir J, v.7, n.3, May-Jun, p.229-37. 2000.

Wynn, T. A. IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol, v.21, p.425-56. 2003.

Yum, H. Y., J. Y. Cho, *et al.* Allergen-induced coexpression of bFGF and TGF-beta1 by macrophages in a mouse model of airway remodeling: bFGF induces macrophage TGF-beta1 expression in vitro. Int Arch Allergy Immunol, v.155, n.1, p.12-22. 2011.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood, v.116, n.16, Oct 21, p.e74-80. 2010.

6 CONCLUSÃO GERAL

A gravidade da asma está associada a um aumento das citocinas do perfil Th1 e Th17 pelos linfócitos e a refratariedade ao tratamento associada a uma diminuição de regulação por essas células. Entretanto, os monócitos de pacientes com AGR e AGC apresentam um perfil distintos associado com produção de citocinas e expressão de receptores envolvidos na resposta tipo-2 e no remodelamento tecidual.

7 RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 1: Resumo dos resultados da avaliação fenotípica dos linfócitos T CD4 nos indivíduos com asma

Linfócitos	CSA	ALM	AGC	AGR
T CD4	CD28+++	CD28+	CD28+	CD28+
	CTLA-4+	CTLA-4+++	CTLA-4+++	CTLA-4+
	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+	FoxP3+
	IL-5+	IL-5+++	IL-5+	IL-5+
	IL-17A+	IL-17A+	IL-17A+++	IL-17A+++
	IFN- γ +	IFN- γ +	IFN-γ+++	IFN-γ+++
	TGF- β +	TGF-β +++	TGF-β +++	TGF- β +
	IL-10+	IL-10+++	IL-10+	IL-10+
	IL-13+	IL-13+	IL-13+	IL-13+
T CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD25 ^{hi} +	CD25 ^{hi} +	CD25^{hi}+++	CD25 ^{hi} +
	FoxP3+	FoxP3+++	FoxP3+	FoxP3+
	IL-10+	IL-10+	IL-10+	IL-10+

Tabela 2: Resumo dos resultados da avaliação fenotípica das subpopulações de monócitos nos indivíduos com asma.

Monócitos	CSA	ALM	AGC	AGR
Clássicos	IL-10R+	IL-10R+	IL-10R+	IL-10R+
	IL-4R α +	IL-4Rα+++	IL-4Rα+++	IL-4R α +
	TSLPR+	TSLPR+	TSLPR+	TSLPR+
	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+	IL-13Rα2+++
	TNF+	TNF+	TNF+	TNF+
	TGF- β +	TGF-β +++	TGF-β +++	TGF-β ++++
	IL-10+	IL-10+	IL-10+	IL-10+++
	IL-13+	IL-13+	IL-13+++	IL-13+++
Intermediários	IL-33+	IL-33+	IL-33+	IL-33+
	IL-10R+	IL-10R+	IL-10R+	IL-10R+++
	IL-4R α +	IL-4R α +	IL-4R α +	IL-4Rα+++
	TSLPR+	TSLPR+	TSLPR+	TSLPR+
	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+
	TNF+	TNF+	TNF+	TNF+
	TGF- β +*	TGF- β +	TGF-β +++	TGF-β +++
	IL-10+	IL-10+	IL-10+	IL-10+
IL-13+	IL-13+	IL-13+	IL-13+	
Não-clássicos	IL-33+	IL-33+	IL-33+++	IL-33+++
	IL-10R+	IL-10R+	IL-10R+	IL-10R+
	IL-4R α +	IL-4R α +	IL-4R α +	IL-4Rα+++
	TSLPR+	TSLPR+	TSLPR+	TSLPR+
	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+	IL-13R α 2+
	TNF+	TNF+	TNF+	TNF+
	TGF- β +	TGF- β +	TGF- β +	TGF-β +++
	IL-10+	IL-10+	IL-10+++	IL-10+
IL-13+	IL-13+++	IL-13+++	IL-13+++	
IL-33+	IL-33+	IL-33+	IL-33+	

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agache, I., C. Ciobanu, *et al.* Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. Respir Med, v.104, n.8, Aug, p.1131-7. 2010.

Agrawal, S. e R. G. Townley. Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma. Expert Opin Biol Ther, v.14, n.2, Feb, p.165-81. 2014.

Akdis, C. A., T. Blesken, *et al.* Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. J Clin Invest, v.102, n.1, Jul 1, p.98-106. 1998.

Al-Ramli, W., D. Prefontaine, *et al.* T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. J Allergy Clin Immunol, v.123, n.5, May, p.1185-7. 2009.

Al-Shami, A., R. Spolski, *et al.* A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. J Exp Med, v.202, n.6, Sep 19, p.829-39. 2005.

Alcorn, J. F., C. R. Crowe, *et al.* TH17 cells in asthma and COPD. Annu Rev Physiol, v.72, p.495-516. 2010.

Allen, J. E. e R. M. Maizels. Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat Rev Immunol, v.11, n.6, Jun, p.375-88. 2011.

Ancuta, P., R. Rao, *et al.* Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. J Exp Med, v.197, n.12, Jun 16, p.1701-7. 2003.

Andrews, R. P., M. B. Ericksen, *et al.* Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. J Biol Chem, v.277, n.39, Sep 27, p.36563-9. 2002.

ATS. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med, v.162, n.6, Dec, p.2341-51. 2000.

Auffray, C., M. H. Sieweke, *et al.* Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.669-92. 2009.

Baecher-Allan, C., J. A. Brown, *et al.* CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol, v.167, n.3, Aug 1, p.1245-53. 2001.

Bakr, S. I., M. Z. Mahran, *et al.* Role of regulatory CD4+CD25+ Foxp3 T cells in bronchial asthma in Egyptian children. Egypt J Immunol, v.20, n.2, p.29-38. 2013.

Barlow, J. L. A. M., A.N.J. Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol, v.14, p.6. 2014.

Benoit, M., B. Desnues, *et al.* Macrophage polarization in bacterial infections. J Immunol, v.181, n.6, Sep 15, p.3733-9. 2008.

Berry, M. A., B. Hargadon, *et al.* Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. N Engl J Med, v.354, n.7, Feb 16, p.697-708. 2006.

Bettelli, E., Y. Carrier, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.235-8. 2006.

Bousquet, J., P. Chanez, *et al.* Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med, v.323, n.15, Oct 11, p.1033-9. 1990.

Brasil. Encontro Nacional do PPSUS: iniciativas inovadoras de pesquisa em saúde : programa pesquisa para o SUS : gestão compartilhada em saúde - PPSUS: Ministério da Saúde 2014.

_____. Ministério da Saúde 2015.

Brightling, C. E., P. Bradding, *et al.* Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. N Engl J Med, v.346, n.22, May 30, p.1699-705. 2002.

Brown, S. D., K. M. Baxter, *et al.* Airway TGF-beta1 and oxidant stress in children with severe asthma: association with airflow limitation. J Allergy Clin Immunol, v.129, n.2, Feb, p.388-96, 396 e1-8. 2012.

Burgler, S., N. Ouaked, *et al.* Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. J Allergy Clin Immunol, v.123, n.3, Mar, p.588-95, 595 e1-7. 2009.

Chakir, J., J. Shannon, *et al.* Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.6, Jun, p.1293-8. 2003.

Chambers, E. S., A. M. Nanzer, *et al.* Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A(high) and IFN-gamma(high) immunophenotypes: Potential benefits of calcitriol. J Allergy Clin Immunol, v.136, n.3, Sep, p.628-637 e4. 2015.

_____. Serum 25-dihydroxyvitamin D levels correlate with CD4(+)Foxp3(+) T-cell numbers in moderate/severe asthma. J Allergy Clin Immunol, v.130, n.2, Aug, p.542-4. 2012.

Chen, W., U. Sivaprasad, *et al.* IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. J Allergy Clin Immunol, v.132, n.4, Oct, p.951-8 e1-6. 2013.

_____. IL-13R alpha 2 membrane and soluble isoforms differ in humans and mice. J Immunol, v.183, n.12, Dec 15, p.7870-6. 2009.

Chlumsky, J., I. Striz, *et al.* Strategy aimed at reduction of sputum eosinophils decreases exacerbation rate in patients with asthma. J Int Med Res, v.34, n.2, Mar-Apr, p.129-39. 2006.

Clutterbuck, E. J., E. M. Hirst, *et al.* Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. Blood, v.73, n.6, May 1, p.1504-12. 1989.

Collison, L. W., V. Chaturvedi, *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. Nat Immunol, v.11, n.12, Dec, p.1093-101. 2010.

Collison, L. W., C. J. Workman, *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature, v.450, n.7169, Nov 22, p.566-9. 2007.

Coyle, A. J., S. J. Ackerman, *et al.* Human eosinophil-granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. J Clin Invest, v.95, n.4, Apr, p.1735-40. 1995.

Cros, J., N. Cagnard, *et al.* Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity, v.33, n.3, Sep 24, p.375-86. 2010.

Daines, M. O., Y. Tabata, *et al.* Level of expression of IL-13R alpha 2 impacts receptor distribution and IL-13 signaling. J Immunol, v.176, n.12, Jun 15, p.7495-501. 2006.

Dente, F. L., E. Bacci, *et al.* Effects of oral prednisone on sputum eosinophils and cytokines in patients with severe refractory asthma. Ann Allergy Asthma Immunol, v.104, n.6, Jun, p.464-70. 2010.

Doe, C., M. Bafadhel, *et al.* Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. Chest, v.138, n.5, Nov, p.1140-7. 2010.

Donaldson, D. D., M. J. Whitters, *et al.* The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. J Immunol, v.161, n.5, Sep 01, p.2317-24. 1998.

Dutertre, C. A., S. Amraoui, *et al.* Pivotal role of M-DC8(+) monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFalpha overproduction in response to microbial products. Blood, v.120, n.11, Sep 13, p.2259-68. 2012.

Fallon, P. G., S. J. Ballantyne, *et al.* Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. J Exp Med, v.203, n.4, Apr 17, p.1105-16. 2006.

Faria, A. M. e H. L. Weiner. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. Inflamm Allergy Drug Targets, v.5, n.3, Sep, p.179-90. 2006.

Feleszko, W., A. Zawadzka-Krajewska, *et al.* Parental tobacco smoking is associated with augmented IL-13 secretion in children with allergic asthma. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.1, Jan, p.97-102. 2006.

Ferreira, M. A. Inflammation in allergic asthma: initiating events, immunological response and risk factors. Respirology, v.9, n.1, Mar, p.16-24. 2004.

Fichtner-Feigl, S., W. Strober, *et al.* IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. Nat Med, v.12, n.1, Jan, p.99-106. 2006.

Ford, J. G., D. Rennick, *et al.* IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation. J Immunol, v.167, n.3, Aug 1, p.1769-77. 2001.

Fort, M. M., J. Cheung, *et al.* IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity, v.15, n.6, Dec, p.985-95. 2001.

Foster, P. S., S. P. Hogan, *et al.* Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. J Exp Med, v.183, n.1, Jan 1, p.195-201. 1996.

Franchimont, D., H. Martens, *et al.* Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. J Clin Endocrinol Metab, v.84, n.8, Aug, p.2834-9. 1999.

Frankenberger, M., T. Sternsdorf, *et al.* Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood, v.87, n.1, Jan 1, p.373-7. 1996.

Friend, S. L., S. Hosier, *et al.* A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. Exp Hematol, v.22, n.3, Mar, p.321-8. 1994.

Fuentes, L., T. Roszer, *et al.* Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. Mediators Inflamm, v.2010, p.219583. 2010.

Gascan, H., J. F. Gauchat, *et al.* Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. J Exp Med, v.173, n.3, Mar 1, p.747-50. 1991.

Geissmann, F., S. Jung, *et al.* Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, v.19, n.1, Jul, p.71-82. 2003.

Global Asthma Network. Global asthma report 2014. Global burden of disease due to asthma. Auckland, New Zealand 2014.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2006.

_____. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2010.

_____. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2017.

Gordon, S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol, v.3, n.1, Jan, p.23-35. 2003.

Gordon, S. e F. O. Martinez. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity, v.32, n.5, May 28, p.593-604. 2010.

Gordon, S. e P. R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol, v.5, n.12, Dec, p.953-64. 2005.

Greenwald, R. J., G. J. Freeman, *et al.* The B7 family revisited. Annu Rev Immunol, v.23, p.515-48. 2005.

Grubczak, K., D. Lipinska, *et al.* Vitamin D3 Treatment Decreases Frequencies of CD16-Positive and TNF-alpha-Secreting Monocytes in Asthmatic Patients. Int Arch Allergy Immunol, v.166, n.3, p.170-6. 2015.

Gupta, A., S. Dimeloe, *et al.* Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. Thorax, v.69, n.6, Jun, p.508-15. 2014.

Hammad, H. e B. N. Lambrecht. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. J Allergy Clin Immunol, v.118, n.2, Aug, p.331-6. 2006.

Han, H., M. B. Headley, *et al.* Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages. J Immunol, v.190, n.3, Feb 1, p.904-12. 2013.

Hancock, A., L. Armstrong, *et al.* Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. Am J Respir Cell Mol Biol, v.18, n.1, Jan, p.60-5. 1998.

Hartl, D., B. Koller, *et al.* Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. J Allergy Clin Immunol, v.119, n.5, May, p.1258-66. 2007.

Hashimoto, T., K. Akiyama, *et al.* Correlation of allergen-induced IL-5 and IL-13 production by peripheral blood T cells of asthma patients. Int Arch Allergy Immunol, v.134 Suppl 1, Jun, p.7-11. 2004.

Hawrylowicz, C., D. Richards, *et al.* A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. J Allergy Clin Immunol, v.109, n.2, Feb, p.369-70. 2002.

Hawrylowicz, C. M. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. J Exp Med, v.202, n.11, Dec 05, p.1459-63. 2005.

Hesse, M., M. Modolell, *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. J Immunol, v.167, n.11, Dec 1, p.6533-44. 2001.

Hew, M., P. Bhavsar, *et al.* Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.174, n.2, Jul 15, p.134-41. 2006.

Hoffjan, S. e C. Ober. Present status on the genetic studies of asthma. Curr Opin Immunol, v.14, n.6, Dec, p.709-17. 2002.

Holgate, S. T. Pathogenesis of asthma. Clin Exp Allergy, v.38, n.6, Jun, p.872-97. 2008.

Holgate, S. T. e R. Polosa. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol, v.8, n.3, Mar, p.218-30. 2008.

Holt, P. G., C. Macaubas, *et al.* The role of allergy in the development of asthma. Nature, v.402, n.6760 Suppl, Nov 25, p.B12-7. 1999.

Hori, S., T. Nomura, *et al.* Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science, v.299, n.5609, Feb 14, p.1057-61. 2003.

Howarth, P. H., K. S. Babu, *et al.* Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. Thorax, v.60, n.12, Dec, p.1012-8. 2005.

Huang, S. K., H. Q. Xiao, *et al.* IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. J Immunol, v.155, n.5, Sep 1, p.2688-94. 1995.

IV Diretrizes Brasileira para o Manejo da Asma. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 7):S 447-S 474, v.32, p.27. 2006.

Janssens, J. P., J. C. Pache, *et al.* Physiological changes in respiratory function associated with ageing. Eur Respir J, v.13, n.1, Jan, p.197-205. 1999.

Jenkins, M. A., S. C. Dharmage, *et al.* Parity and decreased use of oral contraceptives as predictors of asthma in young women. Clin Exp Allergy, v.36, n.5, May, p.609-13. 2006.

Jia, Y., X. Fang, *et al.* IL-13+ Type 2 Innate Lymphoid Cells Correlate with Asthma Control Status and Treatment Response. Am J Respir Cell Mol Biol, v.55, n.5, Nov, p.675-683. 2016.

Kaminuma, O., F. Kitamura, *et al.* T-box 21 transcription factor is responsible for distorted T(H)2 differentiation in human peripheral CD4+ T cells. J Allergy Clin Immunol, v.123, n.4, Apr, p.813-23 e3. 2009.

Karagiannidis, C., M. Akdis, *et al.* Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. J Allergy Clin Immunol, v.114, n.6, Dec, p.1425-33. 2004.

Karimi, K., M. D. Inman, *et al.* Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. Am J Respir Crit Care Med, v.179, n.3, Feb 01, p.186-93. 2009.

Kaur, M., S. Reynolds, *et al.* The effects of corticosteroids on cytokine production from asthma lung lymphocytes. Int Immunopharmacol, v.23, n.2, Dec, p.581-4. 2014.

Kawakami, K., J. Taguchi, *et al.* The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. Blood, v.97, n.9, May 1, p.2673-9. 2001.

Kay, A. B. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. Trends Mol Med, v.11, n.4, Apr, p.148-52. 2005.

Kimura, S., R. Pawankar, *et al.* Increased expression and role of thymic stromal lymphopoietin in nasal polyposis. Allergy Asthma Immunol Res, v.3, n.3, Jul, p.186-93. 2011.

Kips, J. C., J. Tavernier, *et al.* Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. Am Rev Respir Dis, v.145, n.2 Pt 1, Feb, p.332-6. 1992.

Kitani, A., I. Fuss, *et al.* Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. J Exp Med, v.198, n.8, Oct 20, p.1179-88. 2003.

Klunker, S., A. Trautmann, *et al.* A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN-gamma-inducible protein 10, monokine induced by IFN-gamma, and IFN-gamma-inducible alpha-chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis. J Immunol, v.171, n.2, Jul 15, p.1078-84. 2003.

Kobayashi, M., S. Ashino, *et al.* IFN-gamma elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. Eur J Immunol, v.42, n.2, Feb, p.393-402. 2011.

Korn, T., E. Bettelli, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.485-517. 2009.

Kowal, K., M. Moniuszko, *et al.* Allergen challenge differentially affects the number of circulating monocyte subsets. Scand J Immunol, v.75, n.5, May, p.531-9. 2012.

Kowal, K., J. Osada, *et al.* Expression of interleukin 4 receptors in bronchial asthma patients who underwent specific immunotherapy. Ann Allergy Asthma Immunol, v.93, n.1, Jul, p.68-75. 2004.

Kreymborg, K., R. Etzensperger, *et al.* IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol, v.179, n.12, Dec 15, p.8098-104. 2007.

Kuperman, D. A., X. Huang, *et al.* Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nat Med, v.8, n.8, Aug, p.885-9. 2002.

Kurowska-Stolarska, M., B. Stolarski, *et al.* IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J Immunol, v.183, n.10, Nov 15, p.6469-77. 2009.

Lambrecht, B. N. e H. Hammad. The immunology of asthma. Nat Immunol, v.16, n.1, Jan, p.45-56. 2015.

Langrish, C. L., Y. Chen, *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med, v.201, n.2, Jan 17, p.233-40. 2005.

Laporte, S. L., Z. S. Juo, *et al.* Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. Cell, v.132, n.2, Jan 25, p.259-72. 2008.

Lemanske, R. F., Jr. e W. W. Busse. Asthma. J Allergy Clin Immunol, v.111, n.2 Suppl, Feb, p.S502-19. 2003.

Li, M. O., Y. Y. Wan, *et al.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu Rev Immunol, v.24, p.99-146. 2006.

Lim, S., G. Caramori, *et al.* Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. Allergy, v.59, n.5, May, p.505-14. 2004.

Loke, P., I. Gallagher, *et al.* Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. J Immunol, v.179, n.6, Sep 15, p.3926-36. 2007.

Loke, P., M. G. Nair, *et al.* IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. BMC Immunol, v.3, Jul 04, p.7. 2002.

Look, D. C., S. R. Rapp, *et al.* Selective induction of intercellular adhesion molecule-1 by interferon-gamma in human airway epithelial cells. Am J Physiol, v.263, n.1 Pt 1, Jul, p.L79-87. 1992.

Louis, R., L. C. Lau, *et al.* The relationship between airways inflammation and asthma severity. Am J Respir Crit Care Med, v.161, n.1, Jan, p.9-16. 2000.

Machura, E., B. Mazur, *et al.* Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. Clin Dev Immunol, v.2010, p.606139. 2010.

Maggi, E., P. Parronchi, *et al.* Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. J Immunol, v.148, n.7, Apr 01, p.2142-7. 1992.

Malavia, N. K., J. D. Mih, *et al.* IL-13 induces a bronchial epithelial phenotype that is profibrotic. Respir Res, v.9, Mar 18, p.27. 2008.

Mamessier, E., A. Nieves, *et al.* T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. Allergy, v.63, n.9, Sep, p.1202-10. 2008.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature, v.441, n.7090, May 11, p.231-4. 2006.

Mantovani, A., M. Locati, *et al.* Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. Trends Immunol, v.22, n.6, Jun, p.328-36. 2001.

Matsumoto, K., H. Inoue, *et al.* Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. Int Arch Allergy Immunol, v.134, n.4, Aug, p.295-302. 2004.

Mcgee, H. S. e D. K. Agrawal. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.180, n.3, Aug 01, p.211-25. 2009.

Mckenzie, G. J., P. G. Fallon, *et al.* Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. J Exp Med, v.189, n.10, May 17, p.1565-72. 1999.

Mckinley, L., J. F. Alcorn, *et al.* TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. J Immunol, v.181, n.6, Sep 15, p.4089-97. 2008.

Menezes, A. M., F. C. Wehrmeister, *et al.* Prevalence of asthma medical diagnosis among Brazilian adults: National Health Survey, 2013. Rev Bras Epidemiol, v.18 Suppl 2, Dec, p.204-13. 2015.

Mills, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. Crit Rev Immunol, v.32, n.6, p.463-88. 2012.

Miloux, B., P. Laurent, *et al.* Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. FEBS Lett, v.401, n.2-3, Jan 20, p.163-6. 1997.

Moniuszko, M., A. Bodzenta-Lukaszyk, *et al.* Oral glucocorticoid treatment decreases interleukin-10 receptor expression on peripheral blood leucocyte subsets. Clin Exp Immunol, v.156, n.2, May, p.328-35. 2009.

_____. Effects of oral glucocorticoid therapy on CD4+CD25+CD127- and CD4+CD25high T cell levels in asthmatic patients. Inflammation, v.33, n.6, Dec, p.415-20. 2010.

_____. Bronchial macrophages in asthmatics reveal decreased CD16 expression and substantial levels of receptors for IL-10, but not IL-4 and IL-7. Folia Histochem Cytobiol, v.45, n.3, p.181-9. 2007.

_____. Enhanced frequencies of CD14++CD16+, but not CD14+CD16+, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. Clin Immunol, v.130, n.3, Mar, p.338-46. 2009.

Moniuszko, M., N. P. Liyanage, *et al.* Glucocorticoid treatment at moderate doses of SIVmac251-infected rhesus macaques decreases the frequency of circulating

CD14+CD16++ monocytes but does not alter the tissue virus reservoir. AIDS Res Hum Retroviruses, v.31, n.1, Jan, p.115-26. 2015.

Moon, H. G., Y. M. Tae, *et al.* Conversion of Th17-type into Th2-type inflammation by acetyl salicylic acid via the adenosine and uric acid pathway in the lung. Allergy, v.65, n.9, Sep, p.1093-103. 2010.

Morris, D. L., K. Singer, *et al.* Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.14, n.4, Jul, p.341-6. 2011.

Mou, Z., J. Xia, *et al.* Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis. Acta Otolaryngol, v.129, n.3, Mar, p.297-301. 2009.

Munder, M., F. Mollinedo, *et al.* Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. Blood, v.105, n.6, Mar 15, p.2549-56. 2005.

Murata, T., J. Taguchi, *et al.* Sharing of receptor subunits and signal transduction pathway between the IL-4 and IL-13 receptor system. Int J Hematol, v.69, n.1, Jan, p.13-20. 1999.

Nakamura, K., A. Kitani, *et al.* TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. J Immunol, v.172, n.2, Jan 15, p.834-42. 2004.

Nanzer, A. M., E. S. Chambers, *et al.* Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in a glucocorticoid-independent fashion. J Allergy Clin Immunol, v.132, n.2, Aug, p.297-304 e3. 2013.

Naseer, T., E. M. Minshall, *et al.* Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. Am J Respir Crit Care Med, v.155, n.3, Mar, p.845-51. 1997.

Nelms, K., A. D. Keegan, *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol, v.17, p.701-38. 1999.

Nguyen, K. D., C. Vanichsarn, *et al.* Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4+CD25hiCD127lo/- natural regulatory T cells in human allergic asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.180, n.9, Nov 01, p.823-33. 2009.

Nielsen, J., T. L. Holm, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. Apmis, v.112, n.10, Oct, p.642-50. 2004.

Nieuwenhuizen, N. E., F. Kirstein, *et al.* Allergic airway disease is unaffected by the absence of IL-4R α -dependent alternatively activated macrophages. J Allergy Clin Immunol, v.130, n.3, Sep, p.743-750 e8. 2012.

Niewoehner, D. E. e J. Kleinerman. Morphologic basis of pulmonary resistance in the human lung and effects of aging. J Appl Physiol, v.36, n.4, Apr, p.412-8. 1974.

O'garra, A., F. J. Barrat, *et al.* Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. Immunol Rev, v.223, Jun, p.114-31. 2008.

O'toole, M., H. Legault, *et al.* A novel and sensitive ELISA reveals that the soluble form of IL-13R α 2 is not expressed in plasma of healthy or asthmatic subjects. Clin Exp Allergy, v.38, n.4, Apr, p.594-601. 2008.

Ochoa, J. B., A. C. Bernard, *et al.* Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. Ann Surg, v.233, n.3, Mar, p.393-9. 2001.

Oliveira, R. R., K. J. Gollob, *et al.* Schistosoma mansoni infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. Microbes Infect, v.11, n.2, Feb, p.223-9. 2009.

Ouyang, W., J. K. Kolls, *et al.* The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. Immunity, v.28, n.4, Apr, p.454-67. 2008.

Park, S. W., H. K. Jangm, *et al.* Interleukin-13 and interleukin-5 in induced sputum of eosinophilic bronchitis: comparison with asthma. Chest, v.128, n.4, Oct, p.1921-7. 2005.

Park, S. W., C. Verhaeghe, *et al.* Distinct roles of FOXA2 and FOXA3 in allergic airway disease and asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.180, n.7, Oct 01, p.603-10. 2009.

Passlick, B., D. Flieger, *et al.* Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. Blood, v.74, n.7, Nov 15, p.2527-34. 1989.

Pawankar, R. B.-C., C.E.; Bousquet, J.; Canonica, G.W.; Cruz, A.A.; Kaliner, M.A.; Lanier, B.Q. And Henley, K. . State of World Allergy Report 2008: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. World Allergy Organ J, v.1. 2008.

Pelletier, M., L. Maggi, *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. Blood, v.115, n.2, Jan 14, p.335-43. 2010.

Pietruczuk, M., M. Eusebio, *et al.* Phenotypic characterization of ex vivo CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} immune regulatory T cells in allergic asthma: pathogenesis relevance of their FoxP3, GITR, CTLA-4 and FAS expressions. J Biol Regul Homeost Agents, v.26, n.4, Oct-Dec, p.627-39. 2012.

Platts-Mills, T. A. e L. M. Wheatley. The role of allergy and atopy in asthma. Curr Opin Pulm Med, v.2, n.1, Jan, p.29-34. 1996.

Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease. Nat Rev Immunol, v.9, n.4, Apr, p.259-70. 2009.

Provoost, S., T. Maes, *et al.* Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. Allergy, v.64, n.10, Oct, p.1539-46. 2009.

Raes, G., R. Van Den Bergh, *et al.* Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. J Immunol, v.174, n.11, Jun 1, p.6561; author reply 6561-2. 2005.

Rao, C. K., C. G. Moore, *et al.* Characteristics of perimenstrual asthma and its relation to asthma severity and control: data from the Severe Asthma Research Program. Chest, v.143, n.4, Apr, p.984-92. 2013.

Raundhal, M., C. Morse, *et al.* High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. J Clin Invest, v.125, n.8, Aug 3, p.3037-50. 2015.

Read, S., V. Malmstrom, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med, v.192, n.2, Jul 17, p.295-302. 2000.

Reche, P. A., V. Soumelis, *et al.* Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. J Immunol, v.167, n.1, Jul 1, p.336-43. 2001.

Robinson, D. H., M.; Buhl, R.; Cruz, A.A.; Inoue, H.; Korom, S.; Hanania, N.A.; Nair, P. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. Clinical & Experimental Allergy, p.14. 2017.

Robinson, D. S., Q. Hamid, *et al.* Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. N Engl J Med, v.326, n.5, Jan 30, p.298-304. 1992.

Rouzaut, A., M. L. Subira, *et al.* Co-expression of inducible nitric oxide synthase and arginases in different human monocyte subsets. Apoptosis regulated by endogenous NO. Biochim Biophys Acta, v.1451, n.2-3, Sep 21, p.319-33. 1999.

Ryanna, K., V. Stratigou, *et al.* Regulatory T cells in bronchial asthma. Allergy, v.64, n.3, Mar, p.335-47. 2009.

Saglani, S., S. Lui, *et al.* IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. J Allergy Clin Immunol, v.132, n.3, Sep, p.676-685 e13. 2013.

Saito, S., Y. Sasaki, *et al.* CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. J Reprod Immunol, v.65, n.2, Apr, p.111-20. 2005.

Sanderson, C. J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. Blood, v.79, n.12, Jun 15, p.3101-9. 1992.

Schmidt-Weber, C. B. e K. Blaser. The role of TGF-beta in allergic inflammation. Immunol Allergy Clin North Am, v.26, n.2, May, p.233-44, vi-vii. 2006.

Schmitz, J., A. Owyang, *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity, v.23, n.5, Nov, p.479-90. 2005.

Shi, Y. H., G. C. Shi, *et al.* Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. Chin Med J (Engl), v.124, n.13, Jul 5, p.1951-6. 2011.

Sica, A. e A. Mantovani. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest, v.122, n.3, Mar, p.787-95. 2012.

Smith, S. G., R. Chen, *et al.* Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. J Allergy Clin Immunol, v.137, n.1, Jan, p.75-86 e8. 2016.

Smyth, L. J., A. Eustace, *et al.* Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. Chest, v.138, n.4, Oct, p.905-12. 2010.

Soumelis, V., P. A. Reche, *et al.* Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. Nat Immunol, v.3, n.7, Jul, p.673-80. 2002.

Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med, v.13, n.2, Feb, p.139-45. 2007.

Tacke, F. e G. J. Randolph. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, v.211, n.6-8, p.609-18. 2006.

Taille, C., C. Poulet, *et al.* Monoclonal Anti-TNF-alpha Antibodies for Severe Steroid-Dependent Asthma: A Case Series. Open Respir Med J, v.7, p.21-5. 2013.

Tashiro, H. T., K.; Hayashi, S.; Kato, G.; Kurata, K.; Kimura, S.; Sueoka-Aragane, N. Interleukin-33 from Monocytes Recruited to the Lung Contributes to House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model. PLoS One, v.16, p.6. 2016.

Thomas, P. S., D. H. Yates, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. Am J Respir Crit Care Med, v.152, n.1, Jul, p.76-80. 1995.

Tirado-Rodriguez, B., E. Ortega, *et al.* TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. J Immunol Res, v.2014, p.318481. 2014.

To T, S. S., Moores G, Gershon as, Bateman Ed, Cruz Aa, Boulet Lp. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. BMC Public Health, v.19, p.12. 2012.

Togbe, D., L. Fauconnier, *et al.* Thymic Stromal Lymphopoietin Enhances Th2/Th22 and Reduces IL-17A in Protease-Allergen-Induced Airways Inflammation. ISRN Allergy, v.2013, p.971036. 2013.

Tomita, K., S. Lim, *et al.* Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. Clin Immunol, v.102, n.3, Mar, p.258-66. 2002.

Truyen, E., L. Coteur, *et al.* Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. Thorax, v.61, n.3, Mar, p.202-8. 2006.

Valerius, T., R. Repp, *et al.* Effects of IFN on human eosinophils in comparison with other cytokines. A novel class of eosinophil activators with delayed onset of action. J Immunol, v.145, n.9, Nov 01, p.2950-8. 1990.

Venkayya, R., M. Lam, *et al.* The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. Am J Respir Cell Mol Biol, v.26, n.2, Feb, p.202-8. 2002.

Vercelli, D. Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? J Clin Invest, v.111, n.12, Jun, p.1815-7. 2003.

Veremeyko, T., S. Siddiqui, *et al.* IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. PLoS One, v.8, n.12, p.e81774. 2013.

Von Bubnoff, D., M. Scheler, *et al.* Comparative immunophenotyping of monocytes from symptomatic and asymptomatic atopic individuals. Allergy, v.59, n.9, Sep, p.933-9. 2004.

Von Garnier, C., L. Filgueira, *et al.* Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. J Immunol, v.175, n.3, Aug 01, p.1609-18. 2005.

Waserman, S., J. Dolovich, *et al.* TNF-alpha dysregulation in asthma: relationship to ongoing corticosteroidtherapy. Can Respir J, v.7, n.3, May-Jun, p.229-37. 2000.

Weiner, H. L. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. Annu Rev Med, v.48, p.341-51. 1997.

Wenzel, S. E., L. B. Schwartz, *et al.* Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.3, Sep, p.1001-8. 1999.

Wills-Karp, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. Immunol Rev, v.202, Dec, p.175-90. 2004.

Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science, v.282, n.5397, Dec 18, p.2258-61. 1998.

Wilson, R. H., G. S. Whitehead, *et al.* Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med, v.180, n.8, Oct 15, p.720-30. 2009.

Wong, K. L., J. J. Tai, *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood, v.118, n.5, Aug 4, p.e16-31. 2011.

Woodruff, P. G., R. Khashayar, *et al.* Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. J Allergy Clin Immunol, v.108, n.5, Nov, p.753-8. 2001.

Wynn, T. A. IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol, v.21, p.425-56. 2003.

Wynn, T. A., A. Chawla, *et al.* Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature, v.496, n.7446, Apr 25, p.445-55. 2013.

Xystrakis, E., S. Kusumakar, *et al.* Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. J Clin Invest, v.116, n.1, Jan, p.146-55. 2006.

Yadava, K., J. Massacand, *et al.* Thymic stromal lymphopoietin plays divergent roles in murine models of atopic and nonatopic airway inflammation. Allergy, v.69, n.10, Oct, p.1333-42. 2014.

Ying, S., B. O'connor, *et al.* Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. J Immunol, v.174, n.12, Jun 15, p.8183-90. 2005.

Yssel, H., S. Lecart, *et al.* Regulatory T cells and allergic asthma. Microbes Infect, v.3, n.11, Sep, p.899-904. 2001.

Yssel, H., P. Schneider, *et al.* Production of IL4 by human T cells and regulation of differentiation of T-cell subsets by IL4. Res Immunol, v.144, n.8, Oct, p.610-6. 1993.

Yum, H. Y., J. Y. Cho, *et al.* Allergen-induced coexpression of bFGF and TGF-beta1 by macrophages in a mouse model of airway remodeling: bFGF induces macrophage TGF-beta1 expression in vitro. Int Arch Allergy Immunol, v.155, n.1, p.12-22. 2011.

Zanluqui, N. G., P. F. Wowk, *et al.* Macrophage Polarization in Chagas Disease. Journal of Clinical & Cellular Immunology, v.6, p.6. 2015.

Zhang, J. G., D. J. Hilton, *et al.* Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (IL)-13-binding protein. Evidence that it is distinct from the cloned Il-13 receptor and Il-4 receptor alpha-chains. J Biol Chem, v.272, n.14, Apr 4, p.9474-80. 1997.

Zhao, J., C. M. Lloyd, *et al.* Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. Mucosal Immunol, v.6, n.2, Mar, p.335-46. 2012.

Zhou, B., M. R. Comeau, *et al.* Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. Nat Immunol, v.6, n.10, Oct, p.1047-53. 2005.

Zhu, Z., R. J. Homer, *et al.* Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest, v.103, n.6, Mar, p.779-88. 1999.

Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol, v.81, n.3, Mar, p.584-92. 2007.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood, v.116, n.16, Oct 21, p.e74-80. 2010.

Zimmermann, N., N. E. King, *et al.* Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. J Clin Invest, v.111, n.12, Jun, p.1863-74. 2003.

9 ANEXOS

9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Nome do Projeto: Avaliação do perfil de linfócitos e monócitos em pacientes com asma grave

Investigador Principal: Álvaro A. Cruz, médico do Programa de Controle de Asma e Rinite alérgica da Bahia – ProAr, Rua Carlos Gomes, 270, 2 de Julho, 40060-330, Salvador, BA, Brasil

Nome do Paciente: _____

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar o perfil de linfócitos e monócitos em pacientes com asma grave. Esta participação implica na sua concordância responder a um questionário sobre a sintomatologia da asma, além da coleta de amostras de sangue.

Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Finalidade do estudo:

Este estudo tem a finalidade de avaliar o perfil dos linfócitos e monócitos dos indivíduos com asma grave no sentido de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você doará 20 mL de sangue que será coletado por profissional capacitado para tal, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis.

Duração do Estudo:

Após a assinatura do termo de consentimento, sua participação no estudo terá uma duração máxima prevista de 12 meses.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análise dos Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Estudos que contribuem para identificação dos mecanismos envolvidos nas manifestações clínicas da asma, podem levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a prevenção do aparecimento destas manifestações.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão, se desejarem, os resultados dos mesmos. Você será tratado gratuitamente e receberá acompanhamento médicos especializados.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Álvaro A. Cruz, coordenador do projeto, médico do Programa de Controle de Asma e Rinite alérgica da Bahia – ProAr, Rua Carlos Gomes, 270, 2 de Julho, 40060-330, Salvador, BA, Brasil, telefone (71) 3013-8460, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA, no endereço Rua do Limoeiro, 37 – Nazaré, Salvador – BA.

Consentimento:

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

Assinatura do Participante

RG nº

Assinatura do Pesquisador

RG nº

Local: _____ Data _____ / _____ / _____ e Hora: _____

10 ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

1. KRUSCHEWSKY, RAMON DE ALMEIDA; CARDOSO, LUCIANA SANTOS; **FERNANDES, JAMILLE SOUZA**; SOUZA, ROBSON DA PAIXÃO DE; LOPES, DIEGO MOTA; CARVALHO, OTAVIO AUGUSTO MORENO DE; ARAUJO, MARIA ILMA. Immunological Profile in Individuals with Schistosomal Myeloradiculopathy. *Neuroimmunomodulation*, v. 23, p. 157-167, 2016.

2. DE ALMEIDA, TARCÍSIO VILA VERDE SANTANA; **FERNANDES, JAMILLE SOUZA**; LOPES, DIEGO MOTA; ANDRADE, LORENA SANTANA; OLIVEIRA, SÉRGIO COSTA; CARVALHO, EDGAR M.; ARAUJO, MARIA ILMA; CRUZ, ÁLVARO A.; CARDOSO, LUCIANA SANTOS. *Schistosoma mansoni* antigens alter activation markers and cytokine profile in lymphocytes of patients with asthma. *Acta Tropica*, v. 166, p. 268-279, 2016.

3. **FERNANDES, JAMILLE SOUZA**; ARAUJO, MARIA ILMA; LOPES, DIEGO MOTA; SOUZA, ROBSON DA PAIXÃO DE; CARVALHO, EDGAR M.; CARDOSO, LUCIANA SANTOS. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Mediators of Inflammation (Print)*, v. 2014, p. 1-12, 2014.

4. LOPES, DIEGO MOTA; **FERNANDES, JAMILLE SOUZA**; CARDOSO, THIAGO MARCONI DE SOUZA; BAFICA, ALINE MICHELE BARBOSA; OLIVEIRA, SÉRGIO COSTA; CARVALHO, EDGAR M.; ARAUJO, MARIA ILMA; CARDOSO, LUCIANA SANTOS. Dendritic Cell Profile Induced by *Schistosoma mansoni* Antigen in Cutaneous Leishmaniasis Patients. *BIOMED RES INT*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

5. CARDOSO, LUCIANA SANTOS; BARRETO, ANDRÉIA DE SOUZA ROCHA; **FERNANDES, JAMILLE SOUZA**; OLIVEIRA, RICARDO RICCIO; SOUZA, ROBSON DA PAIXÃO DE; CARVALHO, EDGAR M.; ARAUJO, MARIA ILMA. Impaired Lymphocyte Profile in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. *Clinical & Developmental Immunology (Print)*, v. 2013, p. 1-8, 2013.