

KEILA ABREU DA SILVEIRA

**REDES EXTRACELULARES DE DNA DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS NO
ESCARRO DE CRIANÇAS COM ASMA**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina/ Pediatria da
Escola de Medicina da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo M. C. Pitrez

Porto Alegre
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

S587r Silveira, Keila Abreu da

Redes extracelulares de DNA de células granulocíticas no escarro de crianças com asma / Keila Abreu da Silveira . – 2017.

58 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcio Condessa Pitrez.

1. asma. 2. rede extracelular de DNA. 3. inflamação. 4. escarro. 5. NETs EETs. I. Pitrez, Paulo Marcio Condessa. II. Título.

KEILA ABREU DA SILVEIRA

**REDES EXTRACELULARES DE DNA DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS NO
ESCARRO DE CRIANÇAS COM ASMA**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Medicina/ Pediatria da
Escola de Medicina da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Florencia Barbe-Tuana

Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza

Prof. Dr. Jose Eduardo Vargas Muñoz

Porto Alegre
2017

Dedicatória

*Dedico esta conquista a minha família, em especial
aos meus pais, Jucemar e Zulmi*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar ao longo dessa trajetória.

À minha família, especialmente a minha mãe e o meu pai, que sempre me incentivaram a estudar, me apoiaram nos momentos difíceis e me deram muito amor. Obrigada pelo exemplo de caráter e perseverança. Aos meus irmãos pelo carinho. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Rodrigo, que sempre foi meu parceiro e companheiro de todas as horas, muito obrigada por tudo! Amo-te!

Ao meu orientador Paulo Pitrez, pela oportunidade e confiança que em mim depositou.

A Aline Andrea da Cunha pelo apoio, atenção, ensinamentos, orientação e disponibilidade. Considero-te um exemplo de pesquisadora.

Ao João Heinzmann-Filho pela disponibilidade, atenção, ensinamentos e competência. Admiro-te muito João!

Agradeço aos colegas de laboratório pelo carinho e auxílio, Géssica Antunes, Rodrigo Godinho, Nailê Nuñez, Carolina Luft, Tássia Thaís e Cristian Roncada, em especial a querida Josiane Silveira que me ajudou em alguns experimentos.

Agradeço as meninas do laboratório 21, Giovana dos Santos e Laís Bridi por todo carinho.

A minha colega e amiga Vanessa Fey, que viveu comigo cada momento desta conquista.

A todas as minhas amigas em especial a Camila Wilhelm, Natália Poletti e Luiza Argiles por estarem ao meu lado nessa conquista, pelo carinho, apoio, risadas e pelas palavras de incentivo. Amo vocês!

À secretaria do Instituto de Pesquisas Biomédicas e do Programa de Pós-Graduação em Pediatria/ Saúde da Criança, Elisangela Mello e Carla Rothmann, respectivamente.

Agradeço também à PUCRS e a CNPq pela bolsa de estudos recebida.

*“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de
crise.*

*Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
se tornar um autor da própria história.*

*É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de
encontrar*

Um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um 'não'!

*É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que
injusta.*

Pedras no caminho?

Guardo todas... um dia vou construir um castelo!”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Base teórica: a asma é uma doença heterogênea, caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas inferiores. O processo inflamatório está associado à hiper-responsividade brônquica, tendo como consequência, episódios recorrentes de sibilância, tosse, dispneia e opressão torácica. A doença atinge em torno de 300 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada uma doença com elevada prevalência, principalmente na população infantil. A inflamação crônica presente nas vias aéreas de indivíduos com asma é complexa e envolve um conjunto de células provenientes do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, granulócitos, células epiteliais, entre outras. Os granulócitos são considerados células fundamentais para sustentar a inflamação. Os neutrófilos e os eosinófilos apresentam características e funções diferentes para a resposta imune na asma. Ambos liberam uma variedade de mediadores que contribuem para inflamação crônica e alterações na estrutura das vias aéreas, com estímulos externos. Neste contexto, foi demonstrado que os neutrófilos e eosinófilos, após ativação, são capazes de liberar “armadilhas” de DNA extracelular com proteínas específicas, que combatem agentes patogênicos extracelularmente. Por outro lado, é possível que essas “armadilhas” de DNA contribuam para a imunopatologia em doenças inflamatórias crônicas, como na asma. Portanto, recentemente, foi identificado que neutrófilos e eosinófilos geram redes extracelulares de DNA nas vias aéreas de asmáticos adultos.

Objetivo: verificar se existe formação de redes extracelulares de DNA com a presença de células inflamatórias em amostra de escarro de crianças e adolescentes com asma.

Métodos: nosso estudo transversal selecionou crianças e adolescentes com asma, entre 6 e 18 anos de idade, em acompanhamento regular em um centro de referência do sul do Brasil. Foram coletados dados relativos a função pulmonar (espirometria), teste cutâneo para alérgenos, e escarro induzido para identificação do perfil de células inflamatórias, formação das redes extracelulares de DNA, e quantificação do DNA extracelular. Para a visualização das redes extracelulares de DNA, as células foram coradas com *Hoechst 33342*. As imagens foram capturadas em microscópio confocal de fluorescência.

Resultados: foram incluídos 18 crianças e adolescentes, sendo 13 com asma grave e 5 não grave. Destes, 17 (94,4%) obtiveram o teste cutâneo positivo para algum tipo de alérgenos e todos apresentaram função pulmonar dentro dos limites da normalidade. Os pacientes com perfil de células inflamatórias (7,12 [4,41-45,23]) obtiveram um aumento significativo ($p=0,01$) nas concentrações extracelulares de DNA quando comparados com pacientes com perfil pauci-granulocítico (2,31[1,47-3,56]). Os níveis de DNA extracelular correlacionaram-se positivamente ($r=0,73$; $p=0,0004$) com as células granulocíticas totais no escarro destes pacientes. Do mesmo modo, houve uma correlação positiva entre o DNA extracelular com a contagem absoluta de neutrófilos ($r=0,71$; $p=0,008$) e contagem absoluta de eosinófilos ($r=0,69$; $p=0,0013$) nas amostras de escarro.

Conclusão: nossos resultados mostram a presença de redes extracelulares de DNA no escarro com padrão inflamatório em crianças e adolescentes com asma sugerindo que estas redes são liberadas por células granulocíticas, especificamente neutrófilos e eosinófilos.

Palavras-chave: asma; rede extracelular de DNA; inflamação; escarro; NETs; EETs.

ABSTRACT

Background: asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic inflammation of the lower airways. The inflammatory process is associated with bronchial hyperresponsiveness, resulting in recurrent episodes of wheezing, coughing, dyspnea and chest tightness. Asthma affects around 300 million people worldwide, with high prevalence, mainly in children. Chronic inflammation in the airways of patients with asthma is complex and involves a range of cells from the immune system, including T lymphocytes, granulocytes, epithelial cells, among others. Granulocytes are considered key cells to maintain inflammation. Neutrophils and eosinophils have different characteristics and functions for the immune response in asthma. Both type of cells release a variety of mediators that contribute to chronic inflammation and changes in the structure of the airways, secondary to external agents. In this context, it was demonstrated that after activation neutrophils and eosinophils are able to release extracellular DNA "traps" with specific proteins that kill extracellular pathogens. On the other hand, it is possible that these DNA "traps" contribute to immunopathology in chronic inflammatory diseases, such as asthma. Therefore, it has recently been shown that neutrophils and eosinophils generate extracellular DNA traps in the airways of asthmatics, possibly contributing to tissue damage.

Objective: to verify whether there is extracellular DNA traps and the presence of inflammatory cells in sputum samples of children and adolescents with asthma.

Methods: this cross-sectional study selected children and adolescents with asthma, between 6 and 18 years of age, in a regular follow-up at a reference center from southern Brazil. We have performed lung function (spirometry), allergen skin test, and induced sputum to identify the inflammatory cells profile, formation of extracellular DNA traps, and quantification of extracellular DNA. To visualize the extracellular DNA traps, the cells were stained with *Hoechst* 33342. The images were captured on a fluorescence confocal microscope.

Results: 18 children and adolescents were included, 13 with severe asthma and 5 with non-severe asthma. Of these, 17 (94.4%) had a positive skin test for some type of allergens and all patients presented pulmonary function within the limits of

normality. Patients with inflammatory cell profiles in sputum (7,12 [4,41,45,23]) showed a significant increase ($p = 0.01$) in extracellular DNA concentrations compared to patients with pauci-granulocytic profile (2.31 [1.47-3.56]). The extracellular DNA levels correlated positively ($r = 0.73$, $p = 0.004$) with the total granulocytic cells in the sputum of these patients. Likewise, there was a significant positive correlation between extracellular DNA and absolute sputum neutrophil counts ($r = 0.71$, $p = 0.008$) and absolute sputum eosinophils counts ($r = 0.69$; $p = 0.0013$) in the sputum samples.

Conclusion: Our results show the presence of extracellular DNA traps in sputum with inflammatory pattern of children and adolescents with asthma suggesting that these traps are released by granulocytic cells, specifically neutrophils and eosinophils.

Key words: asthma; DNA extracellular trap; inflammation; sputum; NETs; EETs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de redes extracelulares de DNA de neutrófilos.....	21
Figura 2. Representação esquemática da formação de redes extracelulares de DNA de eosinófilos (EETs) em tecidos infiltrados por eosinófilos.....	24

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Pacientes com asma mostram aumento nas concentrações de DNA extracelular em escarro.....	52
Figura 2. Correlação entre níveis de DNA extracelular e células totais granulocíticas..	53

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1: Características das crianças e adolescentes com asma.....	51
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BET	<i>Basophils Extracellular Trap</i> (Redes extracelulares de basófilos)
CVF	Capacidade Vital Forçada
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DTT	Ditiotreitol
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EET	<i>Eosinophil Extracellular Trap</i> (Redes extracelulares de eosinófilos)
ECP	<i>Eosinophil Cationic Protein</i> (Proteína catiônica eosinofílica)
EPO	<i>Eosinophil Peroxidase</i> (Peroxidase eosinofílica)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FEF ₂₅₋₇₅	Fluxo expiratório forçado em 25 e 75% da CVF
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
IFN γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
LBA	Lavado Broncoalveolar
MBP	<i>Major basic protein</i> (proteína básica principal)
MCET	<i>Mast cell extracellular trap</i> (Redes extracelulares de mastócitos)
MET	<i>Macrophage Extracellular Trap</i> (Redes extracelulares de macrófagos)
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i> (Redes extracelulares de neutrófilos)

OMS	Organização Mundial de Saúde
OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldeído
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RS	Rio Grande do Sul
SUS	Sistema Único de Saúde
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	Células T <i>helper</i> do tipo 1
Th2	Células T <i>helper</i> do tipo 2
Th17	Células T <i>helper</i> do tipo 17
Treg	Células T regulatórias
USA	<i>United States of American</i> (Estados Unidos da América)
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. EPIDEMIOLOGIA	18
2.2. INFLAMAÇÃO E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA ASMA	18
2.3. REDES EXTRACELULARES DE DNA	20
2.4. REDES EXTRACELULARES DE DNA E ASMA	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. HIPÓTESES.....	26
5. MATERIAIS E METÓDOS	27
5.1. DELINEAMENTO DE PESQUISA	27
5.2. PARTICIPANTES DO ESTUDO	27
5.3. critérios de inclusão e exclusão dos participantes	27
5.3.1 Critérios de inclusão:.....	27
5.3.2 Critérios de exclusão:	27
5.4. AVALIAÇÃO DO CONTROLE DA DOENÇA.....	27
5.5. TESTE CUTÂNEO	28
5.6. ESPIROMETRIA.....	28
5.7. TECNICAS DE ESCARRO INDUZIDO.....	29
5.8. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DO ESCARRO INDUZIDO.....	29
5.9. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRACELULAR E FORMAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE DNA NO ESCARRO	30
5.10. ASPECTOS ETICOS	30
5.11. TESTES ESTATÍSTICOS	31
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS.....	33
ANEXO	39
ANEXO - APROVAÇÃO CEP	39
APÊNDICE.....	43
APÊNDICE - ARTIGO ORIGINAL	43

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença respiratória obstrutiva crônica, com elevada prevalência na população infantil, sendo considerada uma das doenças de maior causa de hospitalizações no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 300 milhões de pessoas no mundo são acometidas pela doença, com importante comprometimento da qualidade de vida, e elevada mortalidade (250 mil pessoas/ano no mundo) (1, 2).

A inflamação crônica presente em indivíduos asmáticos é complexa e resulta de interações entre múltiplas células inflamatórias, citocinas e mediadores celulares. Entre as várias células que contribuem para o processo inflamatório na asma, os eosinófilos, os macrófagos, os neutrófilos e os linfócitos exercem um papel central na fisiopatogenia da doença (3, 4).

Sabe-se que os linfócitos participam da resposta imune adaptativa da asma, através das células T. Essas células apresentam um papel essencial na iniciação e regulação da resposta inflamatória, ativando outras células mediante a secreção de citocinas. Diante disso, a asma pode apresentar resposta imune mediada por linfócitos do tipo Th1, Th2, Th17 e Treg, que atuam de forma diferente no desenvolvimento da doença (5, 6).

A atuação dos eosinófilos nas vias aéreas de pacientes asmáticos tem um papel importante, uma vez que estas células são estimuladas e recrutadas para o tecido pulmonar, liberando proteínas citotóxicas que geram danos ao tecido epitelial do pulmão (7-9). Enquanto isso, a atuação dos neutrófilos também tem sido relatada como papel importante na asma, secretando mediadores pró-inflamatórios (10, 11). Nesse contexto, tem sido descrito um novo mecanismo eficiente na defesa do hospedeiro utilizado por células inflamatórias, principalmente por neutrófilos e eosinófilos, no combate a infecções (12-14). Durante o processo inflamatório, os granulócitos liberam redes extracelulares de DNA, particularmente associado a apoptose celular. A formação das redes extracelulares de DNA participa do combate a infecções bacterianas e outros patógenos (15). Apesar das propriedades vantajosas dessas redes de DNA, sua produção excessiva tem sido demonstrada

em várias condições inflamatórias, desencadeando inflamação e dano ao tecido (16). Além disso, as redes extracelulares de DNA foram identificadas em algumas doenças pulmonares, mais recentemente em pacientes adultos com asma (14). Contudo, seu papel na patogênese da asma ainda não é claro (17).

Desta forma, a presente dissertação é composta de uma fundamentação teórica sobre o tema e também por um artigo original. O artigo tem como objetivo avaliar se crianças e adolescentes com asma produzem redes extracelulares de DNA, e se existe alguma correlação com células granulocíticas presentes no escarro desses pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A asma é uma doença complexa, com muitos fenótipos clínicos, tanto em adultos, como em crianças. Suas principais características incluem a limitação variável do fluxo aéreo expiratório, hiper-responsividade brônquica e inflamação das vias aéreas. Clinicamente, apresentam episódios recorrentes de sibilância, tosse, dispneia e opressão torácica. Para muitos pacientes, a doença tem sua origem na infância, com fatores genéticos, predominantemente atópico, e aspectos ambientais contribuindo para seu desenvolvimento (8).

2.1. EPIDEMIOLOGIA

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da asma está aumentando na maioria dos países, cerca de 300 milhões de pessoas, de todas as idades, são portadoras da doença no mundo. Este aumento ocorre especialmente entre as crianças com uma taxa aproximada de 60%, sendo esta a doença crônica mais comum na infância (1, 18). A falta de controle da doença e a dificuldade de acesso ao tratamento em alguns países são importantes fatores que corroboram para os índices de morbimortalidade (19, 20).

Estima-se que a asma resulte em mais de 250 mil óbitos por ano no mundo, e que até 2025 tenhamos aproximadamente 100 milhões de pessoas com asma (21). No Brasil, a asma é um grave problema de saúde pública, ocupando a oitava posição mundial em prevalência de asma. Estima-se que o Brasil tenha ao redor de 15 milhões de asmáticos (10-15% da faixa etária pediátrica) (22), com cerca de 6 óbitos por dia pela doença, e aproximadamente 350 mil hospitalizações por ano, gerando altos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) (23).

2.2. INFLAMAÇÃO E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA ASMA

A inflamação é um aspecto característico de muitas doenças crônicas pulmonares, incluindo a asma. O processo inflamatório na asma é complexo, com diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios envolvidos, interagindo com diferentes fatores ambientais desencadeantes (4). Os linfócitos, macrófagos e granulócitos são células centrais na fisiopatogenia da doença (24, 25).

Os linfócitos exercem um papel importante na resposta imune adaptativa da asma (26, 27). Sabe-se que os linfócitos são classificados por moléculas de superfície, e no caso das células T, são subdivididos funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem (28). Apesar de a asma ser frequentemente considerada uma doença imunologicamente mediada por linfócitos do tipo Th2, outros subtipos de linfócitos T estão envolvidos na resposta imune, tais como os linfócitos Th1, Th17 e Treg (5, 29, 30). Assim, as células Th1 conduzem a imunidade celular, produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e INF-gama, que são fundamentais para o mecanismo de defesa do organismo (31). Por outro lado, as células Th-2 produzem citocinas específicas da resposta inflamatória alérgica, como IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam a inflamação eosinofílica, além de ativar os linfócitos B, que são responsáveis pela produção de IgE (32, 33). Alguns estudos têm observado o papel importante das células Th-17 na inflamação das vias aéreas na asma, sendo consideradas células que expressam IL-17, IL-22 e promovem inflamação neutrofílica nas vias aéreas (30, 34). Por outro lado, as células T-reg apresentam funções essenciais no controle da resposta imune (35).

Os macrófagos são considerados vigilantes imunológicos por sua distribuição em diferentes tecidos do organismo (36). Seu papel é essencial na modulação de respostas inflamatórias agudas e crônicas, mas embora possam proliferar dentro do pulmão, seu número não é adequado para combater a infecção (37, 38). Ainda assim, os macrófagos são a principal fonte de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios que suprimem ou propagam a inflamação (39, 40). Aliás, essas citocinas e quimiocinas liberadas pelos macrófagos alveolares têm efeito imediato na via aérea e no tecido pulmonar, promovendo o acúmulo de neutrófilos, eosinófilos e outras células diretamente implicadas na fisiopatogenia da asma (4).

Os neutrófilos compreendem em torno de 60% de todos os leucócitos encontrados na circulação sanguínea (41). Além disso, são os granulócitos mais

abundantes na via aérea, tanto em indivíduos saudáveis, como em pacientes com asma (42). Durante a inflamação pulmonar, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico a serem recrutadas para o local da lesão (43). As células migram da corrente sanguínea para os tecidos, onde liberam citocinas, enzimas, radicais livres e outros fatores inflamatórios que podem afetar a estrutura e a função das vias aéreas(44, 45).

Os eosinófilos estão primariamente envolvidos no combate a infecções parasitárias e nas doenças alérgicas, tais como a asma (46). São células granulocíticas menos comuns, mas características da resposta alérgica nas vias aéreas. No entanto, estão presentes em quantidades variáveis na via aérea de pacientes com asma, e praticamente ausentes em indivíduos normais (47). Os eosinófilos têm um papel efetor. Uma vez ativados pela IL-5, migram para o tecido inflamado, degranulam, liberando proteínas citotóxicas importantes no mecanismo efetor, resultando na broncoconstrição e produção de muco, mas que, se não reguladas podem também induzir dano tecidual (9, 48).

Em resumo, os sintomas resultantes da inflamação brônquica na asma são efeito de um complexo ambiente de desencadeantes ambientais e participação de de linfócitos T, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e citocinas, que tem sido alvo de pesquisas para novas terapias.

2.3. REDES EXTRACELULARES DE DNA

As redes extracelulares de DNA tem sido mencionadas, ultimamente, como um novo mecanismo celular eficiente na defesa do hospedeiro contra infecções. Estas redes são geradas por diferentes células que representam um papel fundamental na resposta imune (12). Pimeiramente descritas em neutrófilos, as redes extracelulares de neutrófilos (NETs) são compostas, pricipalmente, por fibras de cromatina descondensada, revestidas com histonas e enzimas granulares de neutrófilos, tais como mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica, catepsina G, e lactoferrina. Logo, estas estruturas são liberadas em resposta a agentes infecciosos

e mediadores inflamatórios, levando à captura e morte de numerosos microrganismos patogênicos (15, 49, 50).

A figura 1 mostra um esquema da formação das NETs. Apesar da formação das redes extracelulares servir como uma armadilha para bactérias e outros patógenos, sua produção excessiva pode levar ao dano de diversos tecidos.

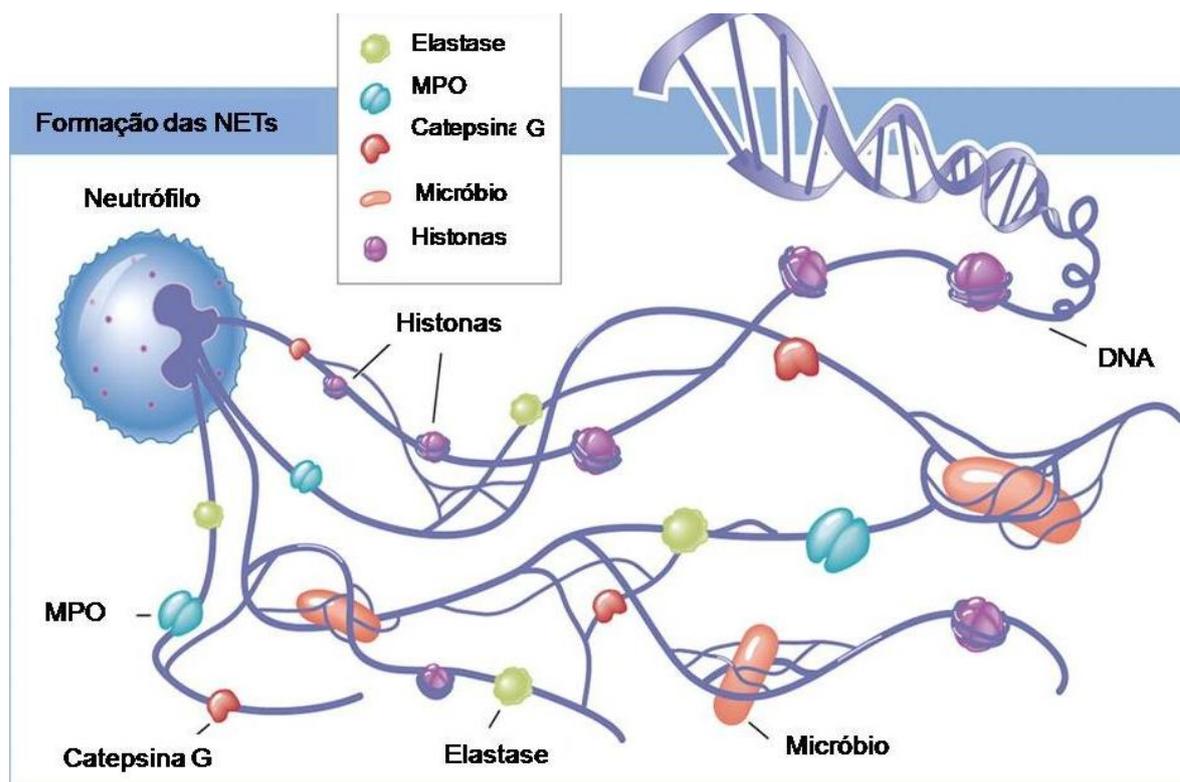


Figura 1. Formação de redes extracelulares de DNA de neutrófilos. As NETs são formadas de nucleossomos (complexo de DNA e histonas) revestidos com componentes granulares, incluindo elastase de neutrófilos, mieloperoxidase (MPO), e catepsina G. As NETs ligam e matam micróbios. Fonte: adaptado de Miyata and Fan (2012) (51).

A formação de redes extracelulares de DNA não parece ser um mecanismo exclusivo dos neutrófilos. Recentemente, alguns estudos vêm documentando a formação de estruturas similares às NETs, em macrófagos (METs), mastócitos (MCETs), basófilos (BETs) e eosinófilos (EETs) (48, 52-54). Assim, um estudo publicado por Aliuk e colaboradores (2012) mostrou que as redes extracelulares de DNA geradas por macrófagos foram capazes de reter e matar uma variedade de bactérias (55). Os mastócitos são também descritos por exercer atividade antimicrobiana extracelular através da formação de “armadilhas” de DNA (56). Os

basófilos são também capazes de gerar redes extracelulares de DNA, sob condições inflamatórias. As BETs contêm DNA mitocondrial, mas não nuclear, e proteínas de grânulos especificamente expressas pelos basófilos. Por fim, dados mais recentes relatam um mecanismo de proteção extracelular por eosinófilos para matar agentes infecciosos, de forma rápida e eficiente (52). As redes extracelulares de DNA produzidas por eosinófilos são compostas por uma malha de fibras de DNA e proteínas de grânulos de eosinófilos, tais como a proteína básica principal (MBP) e a proteína catiônica eosinofílica (ECP) (48). Essas proteínas são responsáveis por boa parte das funções citotóxicas exercidas pelos eosinófilos, podendo ser protetoras helmintos e ao mesmo tempo nocivas, uma vez expostas no meio extracelular, causando lesões teciduais devido ao efeito citotóxico nas células do próprio organismo (57).

O DNA expelido pelos eosinófilos, curiosamente, é de origem mitocondrial, parecendo não estar associado com a morte celular (58). Um evento chave na sinalização intracelular para a formação das EETs parece ser a ativação de uma enzima chamada NADPH oxidase. Essa enzima está ligada a membrana de eosinófilos e de várias outras células (48, 59). Portanto, uma vez que ocorra a inibição desta enzima por algum efeito farmacológico ou genético, pode resultar na diminuição de precursores e mediadores inflamatórios, entre eles as espécies reativas de oxigênio (EROs), que inibem completamente a capacidade dos eosinófilos em liberar EETs (48). Além disso, estudos sugerem que a atividade fagocítica dos eosinófilos é em grande parte limitada, quando comparada com outras células fagocíticas, sugerindo que sua atividade bactericida possa ocorrer extracelularmente, provavelmente através da liberação de EETs (60).

2.4. REDES EXTRACELULARES DE DNA E ASMA

Como descrito acima, a formação de redes extracelulares de DNA apresenta um importante papel na resposta imune inata, agindo na defesa contra infecções, e tem sido reportada em várias doenças pulmonares, incluindo a asma (14). Nos últimos anos, tem sido comprovado que as células granulares, tais como neutrófilos

e eosinófilos, geram armadilhas extracelulares bactericidas, com conteúdo de DNA e proteínas de grânulos (12, 15, 48).

A asma foi classicamente descrita como uma doença eosinofílica, entretanto, nos últimos anos, foi demonstrado que os neutrófilos também exercem um papel importante na inflamação das vias aéreas da doença (61). O papel principal das redes extracelulares de DNA é evitar a propagação microbiana e matar agentes patogênicos (15). Assim, tem sido descrito que os neutrófilos são recrutados para os pulmões de asmáticos liberando redes extracelulares compostas por proteínas derivadas do citoplasma celular e por DNA (14). Além disso, foi detectado um aumento de NETs e componentes nas vias aéreas de pacientes com asma, sugerindo um envolvimento das NETs na patogênese da asma (62).

Apesar das propriedades vantajosas das NETs, sua produção excessiva já foi demonstrada em várias condições inflamatórias, desencadeando inflamação e dano ao tecido (16). O papel patogênico das NETs foi descrito por várias doenças inflamatórias e autoimunes (63). Nesse sentido, um estudo recentemente realizado por Pham e colaboradores (2016), observou a produção de redes extracelulares de DNA a partir de neutrófilos de sangue periférico de pacientes com asma grave, indicando que as NETs estejam envolvidas na preservação da inflamação (17). Dworski e colaboradores (2011) também relataram que além dos neutrófilos, os eosinófilos infiltrados nas vias aéreas de asmáticos liberam redes extracelulares de DNA (14). Adicionalmente, um estudo mais recente do nosso grupo de pesquisa mostrou no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos asmáticos a presença de EETs, sem nenhum sinal de apoptose ou necrose, sugerindo que a liberação seja um processo ativo celular (64).

Yousefi e colaboradores (2012) mostram de forma ilustrativa na Figura 2 que os eosinófilos podem ser ativados diretamente por bactérias invasoras e/ou citocinas geradas por células epiteliais ou por células T, produzindo as EETs. As EETs são capazes de ligar e matar bactérias, mas também ocorrem em doenças não infecciosas, como nas alergias. No entanto, nem todos os eosinófilos que infiltram o tecido necessariamente participam na formação de EETs (58).

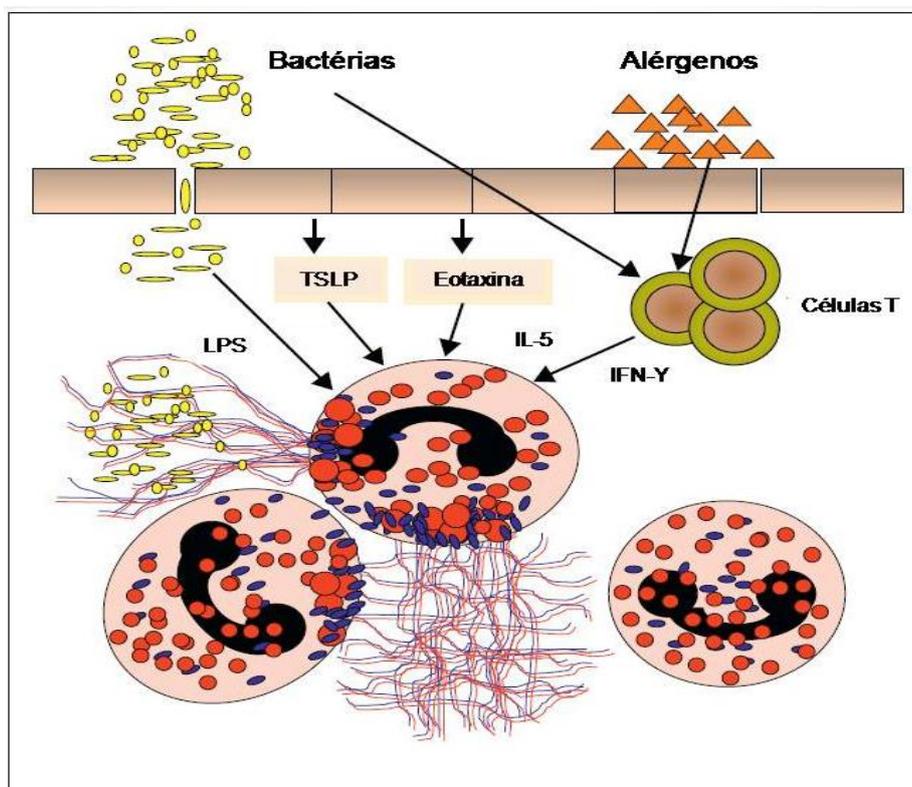


Figura 2. Representação esquemática da formação de redes extracelulares de DNA de eosinófilos (EETs) em tecidos infiltrados por eosinófilos. Mitocôndrias (azul) e grânulos (vermelho) liberando DNA e proteínas catiônicas que co-localizam no espaço extracelular, formando uma estrutura em forma de rede. Fonte: Adaptado de Yousefi et al. (2012) (58).

De forma geral, as redes extracelulares de DNA podem ser geradas como ferramentas eficientes para proteger o hospedeiro contra agentes infecciosos, que potencialmente invadem brônquios após a lesão tecidual. Por outro lado, a formação das redes extracelulares de DNA pode contribuir para o dano celular epitelial e endotelial característico na asma (65). Assim, o papel das NETs e EETs na asma ainda não é bem compreendidos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se existe presença de redes extracelulares de DNA e células granulocíticas no escarro de crianças e adolescentes com asma.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se redes extracelulares de DNA estão mais elevadas em escarros com células do sistema imune de crianças e adolescentes com asma.
- Verificar se existe correlação entre níveis de DNA extracelular e células granulocíticas (eosinófilos e neutrófilos) em pacientes com asma.

4. HIPÓTESES

- Redes extracelulares de DNA são liberadas nas vias aéreas inferiores de crianças com asma.
- Concentrações de DNA extracelular estão associadas a células granulocíticas (neutrófilos e eosinófilos) presentes no escarro de crianças e adolescentes com asma.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo transversal

5.2. PARTICIPANTES DO ESTUDO

- Crianças e adolescentes, com diagnóstico de asma (6 a 18 anos), de ambos os sexos.

5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

5.3.1 Critérios de inclusão:

Crianças e adolescentes com idade entre 6 e 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de asma, em acompanhamento ambulatorial por mais de três meses, independente do tratamento prescrito.

5.3.2 Critérios de exclusão:

Participantes com limitações cognitivas ou com outras doenças crônicas associadas (doenças neurológicas, anomalias cardíacas, congênitas ou imunodeficiências).

5.4. AVALIAÇÃO DO CONTROLE DA DOENÇA

Para fins de controle da doença, as crianças e os adolescentes asmáticos foram convidados a responder um questionário curto, padronizado e bem estabelecido pela literatura. Foi utilizado o questionário do GINA (66), sobre o

controle da doença, com 5 perguntas sobre sintomas relacionado às quatro últimas semanas antecedentes à entrevista.

5.5. TESTE CUTÂNEO

Para avaliação de sensibilização a alérgenos foi realizado um teste cutâneo (*Prick test*), através de método padronizado internacionalmente reconhecido e utilizado pelo nosso grupo de pesquisa (67). O teste foi realizado na superfície volar medial do antebraço, onde foram aplicados os extratos de alérgenos (gota única), utilizando-se o conta-gotas, a uma distância de aproximadamente 2 cm.

A região avaliada foi dividida em duas fileiras, sendo a primeira sequência composta pela aplicação do soro (controle negativo), histamina (controle positivo), mix de baratas, *Dermatophagoide pteronyssinus*, epitélio de cão e epitélio de gato. Já a segunda, foi seguido do *Aspergillus formigatus*, mix de gramíneas, *Blomia tropicalis*, fungos do ar e *Dermatophagoide farinae*. Foi utilizada uma pequena lanceta (PUNTOR®, com dispositivo plástico que limita o grau de penetração na pele) para cada alérgeno. Após 3 minutos, foi retirado o excesso de extrato com papel toalha, evitando-se “contaminar” os testes vizinhos. A leitura foi feita entre 15 e 20 minutos após a aplicação dos alérgenos. O teste cutâneo foi considerado positivo para qualquer alérgeno na presença de pápulas com diâmetro ≥ 3 mm (67).

5.6. ESPIROMETRIA

Os procedimentos técnicos e os critérios de aceitabilidade e reprodutibilidade para a realização do exame de função pulmonar seguiram as recomendações da *American Thoracic Society – European Respiratory Society* (ATS/ERS) (66). O teste foi realizado com equipamento Koko (Louisville, CO, EUA). Todas as medidas foram corrigidas de acordo com a pressão barométrica local e com a temperatura do dia.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁), a relação da razão

VEF₁/CVF e o fluxo expiratório forçado entre 25% e 75 % da capacidade vital forçada (FEF_{25-75%}). Os dados foram apresentados em valores absolutos (litros) e normalizados através do escore-z por uma equação de referência internacional (68). Desta forma, foram considerados normais os valores de VEF₁, CVF e VEF₁/CVF \geq 1,645 em escore-z.

5.7. TÉCNICAS DE ESCARRO INDUZIDO

O procedimento para obtenção do escarro induzido foi realizado conforme o método adaptado de Pizzichini e colaboradores (1998) (69), após a espirometria e o teste de broncodilatador. As amostras foram obtidas através da inalação de solução salina em uma concentração de 4,5%, com quatro repetições de cinco minutos, sucessivamente, até obtenção do escarro, ou interrompido por uma queda de VEF₁ \geq 15%, em relação ao valor basal da espirometria. Utilizou-se um nebulizador ultrassônico de alto débito (Ultra-Neb 2000, DeVilbiss-Sunrise Medical, Somerset, Pennsylvania, USA). Após cada período de inalação, o VEF₁ foi medido para garantir a segurança do teste. A amostra de escarro foi coletada de forma espontânea, em um pote estéril, por meio da participação ativa dos pacientes.

5.8. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DO ESCARRO INDUZIDO

A amostra de escarro foi processada dentro de no máximo duas horas. Os grumos foram separados da saliva manualmente, diluídos em ditiotreitol (DTT) (1:9) por 10 minutos, com posterior adição de DPBS, e filtrados em nylon (60 μ m). A amostra foi centrifugada. Posteriormente foi realizada a contagem celular total de leucócitos e viabilidade celular, utilizando uma Câmara de Neubauer espelhada, e método de exclusão pelo corante azul de trypan. Lâminas para exame citológico diferencial foram citocentrifugadas a 500 rpm, por 5 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico rápido (Laborclin), e 400 células foram contadas. Os resultados foram expressos como percentual do tipo celular. As amostras obtidas

foram consideradas adequadas se a contagem celular total apresentar viabilidade celular maior que 50% e uma contaminação com células escamosas da orofaringe inferior a 20% no exame citológico diferencial (69).

Os escarros com células epiteliais escamosas $\leq 20\%$ foram classificados como: pauci-granulocítico ($< 2,5\%$ eosinófilos e $< 54\%$ de neutrófilos), eosinofílicas ($> 2,5\%$ de eosinófilos e $< 54\%$ de neutrófilos), neutrofílicas ($< 2,5\%$ de eosinófilos e $> 54\%$ de neutrófilos) ou mistas ($> 2,5\%$ de eosinófilos e $> 54\%$ de neutrófilos) (70).

5.9. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRACELULAR E FORMAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE DNA NO ESCARRO

O DNA extracelular foi quantificado no sobrenadante da amostra, usando o kit dsDNAHS (Invitrogen®, USA) e mensurados no fluorímetro Quibit 2.0 (Invitrogen®, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a visualização das redes extracelulares de DNA, o escarro foi aderido em lâmina revestida com poli-L-lisina previamente revestida (Sigma-Aldrich®, USA), posteriormente a este período a lâmina foi incubada com paraformaldeído (PFA) 4% por 1 hora, após este período a lâmina foi lavada com PBS-1X por 10 minutos, em seguida as células foram incubadas com o Hoechst 33342 (1:2000 em PBS, Molecular Probes®), para a coloração do DNA, por 4 minutos, à temperatura ambiente. As imagens foram capturadas em microscópio confocal de fluorescência (Zeiss LSM Exciter, USA).

5.10. ASPECTOS ÉTICOS

- O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP-PUCRS) com aprovação consubstanciada n°. 1.309.504.
- Os responsáveis pelos pacientes foram convidados a ler e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), o qual contemplou informações sobre todos os procedimentos aplicados, bem como os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados.

- As crianças e adolescentes foram convidados a ler e assinar o termo de assentimento ao estudo.
- As crianças concordaram em participar do estudo.

5.11. TESTES ESTATÍSTICOS

A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados que apresentaram distribuição normal foram demonstrados em média e desvio-padrão, enquanto os dados assimétricos, em mediana e intervalo interquartilico. As variáveis categóricas foram expressas em frequência absoluta e relativa. A comparação do DNA extracelular entre o grupo com perfil inflamação e pauci-granulocítico foi realizado pelo teste U de *Mann-Whitney*. Já a associação do DNA extracelular com as células granulocíticas no escarro foi realizada pelo teste de correlação de *Spearman*. Todas as análises e o processamento dos dados foram realizados com o programa SPSS versão 18,0 (SPSS Inc., EUA). Em todos os casos as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. CONCLUSÕES

- Redes extracelulares de DNA estão presentes em escarro com padrão inflamatório de crianças e adolescentes com asma.
- As formações de redes extracelulares de DNA apresentam uma correlação positiva com número de células granulocíticas totais, neutrófilos e eosinófilos.

7. REFERÊNCIAS

1. Bateman E, Hurd S, Barnes P, Bousquet J, Drazen J, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*. 2008;31(1):143-78.
2. Boulet L-P, FitzGerald JM, Reddel HK. The revised 2014 GINA strategy report: opportunities for change. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2015;21(1):1-7.
3. Stirbulov R, Bernd LAG, Sole D. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma. 2006.
4. Campos HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. *Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária*. 2007;15(1):47-60.
5. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Böck A, Otto R, da Costa OP, et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(1):81-91.
6. Hamzaoui A, Berraïes A, Hamdi B, Kaabachi W, Ammar J, Hamzaoui K. Vitamin D reduces the differentiation and expansion of Th17 cells in young asthmatic children. *Immunobiology*. 2014;219(11):873-9.
7. Kroegel C, Virchow J, Luttmann W, Walker C, Warner J. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *European Respiratory Journal*. 1994;7(3):519-43.
8. Busse WW LR. Asthma. *The New England Journal of Medicine*. 2001;344(5):350-62.
9. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 2008;38(5):709-50.
10. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma—a review. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2015;209:13-6.
11. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(8):577-82.
12. Ermer D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *Journal of innate immunity*. 2009;1(3):181-93.

13. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*. 2012;189(6):2689-95.
14. Dworski R, Simon H-U, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(5):1260-6.
15. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
16. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2011;187(1):538-52.
17. Pham D, Ban GY, Kim SH, Shin YS, Ye YM, Chwae YJ, et al. Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2017;47(1):57-70.
18. Beasley R, of Asthma TIS. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet*. 1998;351(9111):1225-32.
19. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures J-P. The public health implications of asthma. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005;83(7):548-54.
20. Fernandes AGO, Souza-Machado C, Coelho RCP, Franco PA, Esquivel RM, Souza-Machado A, et al. Risk factors for death in patients with severe asthma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2014;40(4):364-72.
21. Global Initiative for asthma. *Global strategy for asthma management and prevention*. 2016.
22. DATASUS. Brasil. Ministério da Saúde. 2010.
23. Fiori NS, Gonçalves H, Dumith SC, Cesar MADC, Menezes A, Macedo SEC. Ten-year trends in prevalence of asthma in adults in southern Brazil: comparison of two population-based studies. *Cadernos de saude publica*. 2012;28(1):135-44.
24. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Frontiers in immunology*. 2012;3:277.

25. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:263.
26. Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(3):450-63.
27. Kay A. The role of T lymphocytes in asthma. *Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach*. 91: Karger Publishers; 2005. p. 59-75.
28. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Cruvinel WdM, Andrade LEC, et al. Immune system-part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Revista brasileira de reumatologia*. 2010;50(5):552-80.
29. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1991;88(6):935-42.
30. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(12):838-48.
31. Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, et al. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res*. 2009;2:1-11.
32. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature medicine*. 2012;18(5):716-25.
33. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2010;690(1):24-39.
34. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *The Journal of Immunology*. 2008;181(6):4089-97.
35. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(11):1459-63.
36. Vega M, Corbí A. Human macrophage activation: too many functions and phenotypes for a single cell type. *Immunologia*. 2006;25(4):248-72.

37. Bender AT, Ostenson CL, Wang EH, Beavo JA. Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(2):497-502.
38. Viksman MY, Liu MC, Bickel CA, Schleimer RP, Bochner BS. Phenotypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation. I. Evidence for activation of alveolar macrophages, but not peripheral blood monocytes, in subjects with allergic rhinitis and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(3):858-63.
39. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000;164(12):6166-73.
40. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(43):17253-8.
41. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(3):173-82.
42. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009;6(3):256-9.
43. Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological reviews*. 2003;83(2):309-36.
44. Lambrecht B, Persson E, Hammad H. Myeloid Cells in Asthma. *Microbiology spectrum*. 2017;5(1).
45. Li T, Ke Y, Cheng H. Research progress on the role of neutrophils in asthma. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban= Journal of Zhejiang University Medical sciences*. 2016;45(5):544.
46. Carr TF, Berdnikovs S, Simon H-U, Bochner BS, Rosenwasser LJ. Eosinophilic bioactivities in severe asthma. *World Allergy Organization Journal*. 2016;9(1):21.
47. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(6):1303-10.
48. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature medicine*. 2008;14(9):949-53.

49. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 2012;198(5):773-83.
50. Nauseef W, Clark R. Granulocytic phagocytes. *Principles and practice of infectious diseases.* 2000:93-117.
51. Miyata T, Fan X. A second hit for TMA. *Blood.* 2012;120(6):1152-4.
52. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, et al. NADPH Oxidase–Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. *The Journal of Immunology.* 2014;192(11):5314-23.
53. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *The Journal of Immunology.* 2011;187(1):490-500.
54. Hellenbrand KM, Forsythe KM, Rivera-Rivas JJ, Czuprynski CJ, Aulik NA. *Histophilus somni* causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and macrophages. *Microbial pathogenesis.* 2013;54:67-75.
55. Aulik NA, Hellenbrand KM, Klos H, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils. *Infection and immunity.* 2010;78(11):4454-66.
56. von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood.* 2008;111(6):3070-80.
57. Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1986;83(10):3146-50.
58. Yousefi S, Simon D, Simon H-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Current opinion in immunology.* 2012;24(6):736-9.
59. Henderson LM, Chappell JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1996;1273(2):87-107.
60. Hatano Y, Taniuchi S, Masuda M, Tsuji S, Ito T, Hasui M, et al. Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils. *Apmis.* 2009;117(2):115-23.

61. Deckers J, Madeira FB, Hammad H. Innate immune cells in asthma. *Trends in immunology*. 2013;34(11):540-7.
62. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*. 2016.
63. Malachowa N, Kobayashi SD, Quinn MT, DeLeo FR. Net confusion. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
64. Cunha A, Porto B, Nuñez N, Souza R, Vargas M, Silveira J, et al. Extracellular DNA traps in bronchoalveolar fluid from a murine eosinophilic pulmonary response. *Allergy*. 2014;69(12):1696-700.
65. Simon D, Simon HU, Yousefi S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy*. 2013;68(4):409-16.
66. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2013;erj02020-2013.
67. Heinzerling L, Mari A, Bergmann K-C, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test—European standards. *Clinical and translational allergy*. 2013;3(1):3.
68. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *European Respiratory Journal*. 2012;40(6):1324-43.
69. Pizzichini E, Pizzichini M, Kidney J, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *European Respiratory Journal*. 1998;11(4):828-34.
70. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax*. 2012;67(8):675-81.

ANEXO

ANEXO - APROVAÇÃO CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação longitudinal do impacto e de características da asma grave resistente à terapia em crianças do sul do Brasil

Pesquisador: Paulo Márcio Condessa Pitrez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47845415.4.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.309.540

Apresentação do Projeto:

A asma é um problema de saúde global, altamente prevalente na população infantil. Um subgrupo de crianças, cerca de 5-10% dos asmáticos, não responde adequadamente ao tratamento, com ausência de controle da doença, mesmo com a melhor otimização do manejo clínico, sendo então classificados como asma grave resistente à terapia (AGRT). Existem poucos estudos avaliando o impacto da doença em crianças com AGRT.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o impacto da doença (qualidade de vida e saúde mental), as características da função pulmonar (espirometria, pletismografia e testes de broncoprovocação), o perfil de inflamação das vias aéreas inferiores (escarro induzido), e a aptidão física (ergoespirometria e Shuttle Walk Test), em um período de seguimento de seis meses, em crianças com asma grave resistente à terapia, comparando com crianças com asma leve a moderada.

Objetivo secundário:

Avaliar os seguintes aspectos em crianças com asma grave resistente à terapia, comparando com

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.309.540

crianças com asma leve a moderada:1. Qualidade de vida e aspectos emocionais através de questionários validados2. Fluxos expiratórios e volumes pulmonares através da espirometria e pletismografia3. Hiperresponsividade brônquica através de testes de broncoprovocação por exercício e por metacolina4. Avaliação de aptidão física através da ergoespirometria e do Shuttle Walk Test

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este estudo oferece riscos mínimos aos seus participantes. É possível que os exames de soprar, correr na esteira e inalar medicamentos possam dificultar a entrada e saída do ar, levando a chiado no peito e falta de ar. No entanto, todos esses procedimentos são considerados seguros e suas complicações são consideradas raras de acordo com as recomendações clínicas desses exames, principalmente em crianças e adolescentes. Caso

seja necessário, medidas de broncodilatação serão tomadas pela equipe médica do estudo, visando a recuperação do paciente. Além disso, os testes serão interrompidos a qualquer momento caso o paciente relate algum desconforto.

Benefícios:

Ao participar do nosso estudo os pacientes estarão ajudando a melhorar os conhecimentos sobre a asma grave em crianças, trazendo benefícios para o tratamento e diagnóstico da doença. Além disso, os pacientes estarão proporcionado uma avaliação completa da asma do seu(sua) filho(a) pela equipe médica do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Crianças com idades entre 6 e 18 anos, de ambos os sexos, com o diagnóstico de asma, e seguido por mais de três meses no Ambulatório de Asma Infantil do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, independentemente do tratamento prescrito.

Os pacientes serão classificados em AGRT ou asma leve a moderada, de acordo com critérios internacionalmente estabelecidos na literatura. Os pacientes, após inclusão no estudo, serão acompanhados por 6 meses, mensalmente, quando questionários de qualidade de vida/controle da doença/componente emocional, testes de função pulmonar, aptidão física, e escarro induzido serão aplicados e realizados.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
 Bairro: Partenon CEP: 90.619-000
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br

Considerações sobre os termos de apresentação obrigatórios:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Recomendamos adequar os termos (TCLE e TA) conforme Resolução N° 406 de 12 de dezembro de 2012, **IV DO PROCESSO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, IV.6, d)** ser elaborado em duas vias rubricadas em todas as páginas e assinadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Typo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE INFORMACOES BASICAS DO PROJETO_532872.pdf	03/11/2015 11:5803		Aceito
Outros	Doc Unificao SIPE3Q.pdf	31/07/2015 18:5127		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto projeto assinada.pdf	16/07/2015 13:3935		Aceito
Outros	oponimento aprovado CPC.pdf	16/07/2016 08:1654		Aceito
Outros	cv lattes equipe.docx	13/07/2015 18:5859		Aceito
Outros	termo de compromisso para utilização de dados2.pdf	13/07/2015 18:3108		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Projeto ADC TCLE 2015.docx	10/07/2015 16:2856		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Projeto ADC TA 2015.docx	10/07/2015 16:2919		Aceito
Outros	carta chefe PR.pdf	10/07/2015 14:1706		Aceito
Outros	carta chefe ambulatório pneumopedatra.pdf	10/07/2015 14:1644		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto ADC 2015-1.docx	10/07/2015 14:1104		Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6691, prédio 40, sala 505
 Bairro: Partenon CEP: 90.119-000
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51) 3336-3345 Fax: (51) 3332-3345 E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.309.540

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 05 de Novembro de 2015

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schnelder
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Petrópolis CEP: 90.610-900
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@pucrs.br