

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E  
SAÚDE DA CRIANÇA

**AUSÊNCIA DE RESISTÊNCIA AO  
GLICOCORTICÓIDE EM CULTURA DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE  
SANGUE PERIFÉRICO EM CRIANÇAS  
COM ASMA PERSISTENTE GRAVE.**

Rejane Fialho Matias Lopes

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade  
De Medicina da PUCRS para obtenção de título de  
Mestre em Medicina/Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Porto Alegre, abril de 2009.

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

L864e Lopes, Rejane Fialho Matias

Ausência de resistência ao glicocorticóide em cultura de células mononucleares de sangue periférico em crianças com asma persistente grave / Rejane Fialho Matias Lopes. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

xvii; 75f.: Il. tab. Inclui um artigo de periódico.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança. Mestrado em Pediatria.

1. ASMA/sangue. 2. GLUCOCORTICÓIDES. 3. CORTICOSTERÓIDES. 4. LEUCÓCITOS MONONUCLEARES. 5. HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA. 6. AUTOIMUNIDADE. 7. INFLAMAÇÃO. 8. TESTES DE FUNÇÃO RESPIRATÓRIA. 9. TESTES CUTÂNEOS. 10. CRIANÇA. 11. ESTUDOS PROSPECTIVOS. 12. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 616.23

C.D.U. 616.248-053.2:57.086.83(043.3)

N.L.M. WF 553

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

Mestranda: Rejane Fialho Matias Lopes

Endereço: Alameda 3 de Outubro 51- Sarandi - Porto Alegre – RS – 91130 – 470

Fone: (51) 9817-8995 / (51) 3365-8276

e-mail: [rejanefmatias@hotmail.com](mailto:rejanefmatias@hotmail.com)

CREMERS: 23416

---

*Dedicatória*

*In memorial aos meus pais e a meu esposo por tudo.*

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Paulo C. Pitrez, pela dedicação, paciência, otimismo e infinita competência na arte de ensinar e fazer ciência.

Ao Dr Renato T.Stein e ao Dr Marcos H.Jones que sempre se mostraram incentivadores e disponíveis para o meu crescimento profissional.

À Dra Taísa Paim que, mais do que colega mostrou-se amiga e em muito me ajudou e incentivou nos momentos difíceis.

Ao Dr Moíses E.Bauer e ao mestrando Guilherme C.Müller pelo trabalho de processamento, leitura e ajuda na análise dos dados.

Aos demais integrantes da Pneumologia Pediátrica e residentes que com muita paciência me receberam e me ajudaram na colheita dos dados, o meu reconhecimento e muito obrigada.

À bolsista Priscila Souza, por sua incansável disponibilidade e enorme competência, que muito me auxiliou e se mostrou indispensável para a realização da pesquisa.

A Fisioterapeuta e mestranda Fernanda Luisi pelo incentivo e ajuda no recrutamento dos pacientes.

À equipe da Cirurgia Pediátrica, em especial Dr Cyrus, Dr Marcus e Dra Melissa.

---

Ao Dr Marcos W. Fridman, residentes e secretários da traumatologia

Aos colhetadores do ambulatório da pediatria, agradeço tamanha eficiência e paciência para com os pacientes.

À secretária da pós-graduação, Carla Rothmann, por seu empenho e carinho para comigo, sempre me informando e me lembrando das atualizações do curso.

À minha amiga e colega Patrícia Edom companheira de plantão e estudo, pela ajuda e tamanho incentivo.

Aos demais professores e colegas do pós-graduação, por todo conhecimento e ajuda recebida no desenvolvimento de meu mestrado.

A todos meus amigos, ao meu irmão Roberto e em especial ao meu esposo Pedro que incansavelmente mostrou-se um verdadeiro companheiro e incentivador principalmente nos momentos difíceis, me ajudando e estimulando a prosseguir na conquista deste grande objetivo, o meu muito obrigada.

---

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>

## CAPÍTULO I

<b>1.REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Introdução .....	2
1.1.2 Fisiopatogenia da asma atópica.....	6
1.1.3 Papel do glicocorticóide no tratamento da asma.....	8
1.1.4 Mecanismos de ação dos glicocorticóides .....	9
1.1.5 Mecanismos de resistência aos glicocorticóides .....	11
1.1.6 Estudos clínicos de resistência aos glicocorticóides em asma .....	14
<b>1.2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>

---

---

1.3.1 Objetivo Geral.....	20
1.3.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>1.4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>

## CAPÍTULO II

<b>2.1 MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Delineamento .....	31
2.1.2 População e amostra.....	31
2.1.3 Critérios de inclusão (pacientes com asma).....	32
2.1.4 Critérios de exclusão (pacientes com asma) .....	33
2.1.5 Critérios de inclusão (grupo controle) .....	34
2.1.6 Critérios de exclusão (grupo controle).....	35
2.1.7 Descrição dos procedimentos.....	35
<b>2.2 Análise Estatística .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Considerações Éticas.....</b>	<b>41</b>
<b>2.4 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>42</b>

---

### **CAPÍTULO III**

<b>3 ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>46</b>
-------------------------------	-----------

### **CAPÍTULO IV**

<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
--------------------------	-----------

### **ANEXO**

<b>Anexo - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>74</b>
--	-----------

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1** - Interação das células e citocinas na fisiopatogenia da asma atópica ..... 7

### CAPÍTULO II

**Figura 1** - Ilustração da técnica de cultura de linfomonócitos em sangue periférico ..... 38

**Figura 2** - Ensaio de proliferação linfocitária de cultura de linfomonócitos  
de sangue periférico ..... 39

### CAPÍTULO III

**Figura 1** - Proliferação linfocitária de sangue periférico, com estimulação com fitohemaglutinina (PHA) em concentrações crescentes, comparando os pacientes com asma e o grupo controle..... 59

---

- Figura 2** - Avaliação da proliferação dos linfócitos T em sangue periférico, conforme a gravidade da asma, comparando com o grupo controle..... 60
- Figura 3** - Sensibilidade a dexametasona em cultura de linfomonócitos de sangue periférico, demonstrando ausência de diferença significativa entre os pacientes com asma e o grupo controle ..... 61
- Figura 4** - Sensibilidade a dexametasona em cultura de linfomonócitos de sangue periférico, comparando os grupos em relação a gravidade da asma ..... 62
-

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b> - Critérios de classificação de gravidade da asma.....	34
--	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b> - Características dos pacientes com asma e grupo controle .....	57
---	----

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AP-1</b>	proteína ativadora-1
<b>CD</b>	corticóide-dependente
<b>CR</b>	corticóide-resistente
<b>CS</b>	corticóide-sensível
<b>CVF</b>	capacidade vital forçada
<b>DPOC</b>	doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>EOS</b>	eosinófilo
<b>FEC-GM / GM-CSF</b>	fator estimulador de colônias granulócito-macrófago
<b>FOXP3</b>	<i>forkhead Box P3</i>
<b>GC</b>	glicocorticóide
<b>GR</b>	receptor de corticóide
<b>GRE</b>	elemento receptor de corticóide
<b>GR<math>\alpha</math></b>	receptor de corticóide $\alpha$

---

<b>GR<math>\beta</math></b>	receptor de corticóide $\beta$
<b>HAT</b>	enzima acetiltransferase
<b>HDAC</b>	enzima deacetilase
<b>IgE</b>	imunoglobulina E
<b>IL</b>	interleucinas/citocinas
<b>ISAAC</b>	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
<b>LT</b>	leucotrieno
<b>MAP</b>	enzima proteica mitógeno-ativado
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	proteína inflamatória de macrófago-1 $\alpha$
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	fator nuclear kappa B
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>OD</b>	densidade ótica
<b>PAF</b>	fator ativador plaquetário
<b>PBMC</b>	cultura de células mononucleares de sangue periférico
<b>PBP</b>	proteína básica principal

---

<b>PCE</b>	proteína catiônica eosinofílica
<b>PFE</b>	pico de fluxo expiratório
<b>PG</b>	prostaglandina
<b>PHA</b>	fitohemaglutinina
<b>SMA<sub>3</sub></b>	mothers against decapentaplegic homolog 3
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>VEF<sub>1</sub></b>	volume expiratório forçado no primeiro segundo

---

## RESUMO

**Introdução:** O corticóide inalatório é considerado o fármaco mais efetivo e seguro no controle da asma persistente, tanto em adultos quanto em crianças. Pacientes com asma grave podem apresentar resistência ao corticóide, com repercussão clínica variável. Os mecanismos de resistência aos corticóides têm sido estudados há décadas na população adulta. No entanto, resistência aos corticóides em asma não foi estudada em crianças. O objetivo do presente estudo é analisar a sensibilidade ao corticóide das células mononucleares de sangue periférico em crianças com asma persistente grave.

**Métodos:** Crianças com asma persistente (entre 6-15 anos de idade) foram divididas em três grupos (graves, moderados e leves), e comparadas com crianças saudáveis. Testes de função pulmonar e testes cutâneos foram realizados em todas as crianças asmáticas estudadas. Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e cultivadas *in vitro* e analisada a proliferação mitógeno-induzido, bem como a sensibilidade celular a dexametasona.

**Resultados:** Foram incluídas 57 crianças com asma e 18 crianças no grupo controle. Em relação à proliferação dos linfócitos, pacientes com asma apresentaram menor proliferação celular ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo controle. Além disto, em relação à gravidade, somente pacientes com asma moderada apresentaram proliferação menor quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). No teste de sensibilidade para dexametasona, não houve diferença entre os pacientes com asma e o grupo controle. No entanto, foi observada uma menor sensibilidade dos pacientes com asma leve para dexametasona ( $p < 0,05$ ). Pacientes com asma grave apresentaram sensibilidade a dexametasona semelhante ao grupo controle.

**Conclusões:** Crianças com asma grave não são resistentes ao corticóide em análise *in vitro* de células mononucleares periféricas. Nossos achados sugerem que a resistência aos corticóides em pacientes com asma grave pode ser um processo adquirido durante a vida.

**Descritores:** atopia; corticóide; resposta imune; inflamação.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Inhaled steroids is considered the most effective and safe medication for control of persistent asthma in adults and children. Patients with severe asthma may present corticosteroid resistance, with different clinical presentations. Mechanisms of steroid resistance have been studied in adult asthmatics over the last decades. However, glucocorticoid (GC) resistance has not been studied in children with asthma. The aim of the present study is to analyze peripheral blood mononuclear cell (PBMC) sensitivity to GCs of children with severe persistent asthma.

**Methods:** Children with persistent asthma (between 6-15 years of age) were divided into three groups (severe, moderate and mild), and compared with healthy children. Lung function tests and skin prick tests were performed in all studied asthmatic children. PBMCs were isolated and cultured *in vitro* to assess mitogen-induced proliferation as well as cellular sensitivity to dexamethasone.

**Results:** Fifty-seven children with persistent asthma and 18 healthy children were included. Patients with mild asthma showed significantly less proliferation of stimulated T-cells ( $p<0.05$ ). Moreover, only subjects with moderate asthma presented with lower lymphocyte proliferation when compared to the control group ( $p<0.05$ ). When dexametasone sensitivity was analyzed, there was no difference between patients with asthma and controls. However, subjects with mild asthma showed less sensitivity to dexametasone ( $p<0.05$ ) Children with severe asthma presented similar dexametasone sensitivity when compared to controls

**Conclusions:** Children with severe asthma are not resistant to GCs from *in vitro* PBMC analysis. Our findings suggest that the resistance to GCs in adults with severe asthma might be an acquired process with aging process.

**Key-words:** atopy; corticosteroid; immune response; inflammation.

---

---

# **CAPÍTULO I**

---

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1.1 Introdução**

A asma é uma doença crônica caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável ao fluxo aéreo, causadas por broncoconstrição, secreção aumentada de muco e infiltração local de células inflamatórias. É resultante da interação entre características genéticas, exposição a fatores ambientais (poeira, ácaro, pêlo de animais e fumaça de cigarro) e presença de outros fatores desencadeantes associados (infecções virais, estresse emocional e uso de drogas como aspirina ou beta-bloqueadores).<sup>1,2</sup> Diferentes fenótipos de asma têm sido descritos, sendo a asma atópica a forma mais grave e relacionada à persistência dos sintomas, por isso mais amplamente estudada nas últimas décadas.<sup>3</sup>

Em todo o mundo, aproximadamente 300 milhões de pessoas são portadoras de asma, com uma prevalência mundial elevada na população adulta e infantil.<sup>3</sup> Entre as crianças, a prevalência mundial varia muito, apresentando elevada morbidade. Uma

---

iniciativa de pesquisa multicêntrica em dezenas de países, chamada *International Study for Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC), demonstrou uma prevalência de asma entre 4 e 32 % entre escolares (6-7 anos) e entre 2 e 32 % entre adolescentes (13-14 anos) de diferentes países, reforçando a característica multifatorial da etiopatogenia desta doença.<sup>4</sup>

As maiores prevalências encontradas foram nos países de maior desenvolvimento sócio-econômico, como nos países ocidentais de língua inglesa, enquanto os países do oeste da Europa e da Ásia tiveram a menor prevalência.<sup>3,4</sup> A asma constitui o maior problema de saúde pública dos Estados Unidos e estima-se que 20 milhões de pessoas sofram da doença, sendo responsável por mais de 5.000 mortes anuais. Com o objetivo de diminuir os números desta estatística, vários programas de intervenção, incluindo saúde educacional, foram estabelecidos.<sup>5</sup>

Nos países da América Latina, como Brasil, Uruguai, Paraguai e Peru, a prevalência da asma é elevada (entre 18 e 27%). Porém, destaca-se nesses países o interessante fenótipo da asma não atópica, podendo estar relacionado com a “hipótese da higiene”.<sup>3,4</sup> No sul do Brasil, Chatkin et.al. mostrou uma prevalência de 21% de sibilantes entre crianças de 4-5 anos.<sup>6</sup>

No Brasil, cerca de 350.000 internações hospitalares por asma ocorrem anualmente, constituindo a 4ª causa de hospitalizações pelo SUS (2,3 % do total). Em 2005, os custos com internação no Brasil por asma corresponderam a 1,4% do total anual gasto com doenças, equivalente a 96 milhões de reais.<sup>1,7,8</sup> Sua mortalidade é baixa em muitos países desenvolvidos. No entanto, nos países em desenvolvimento, a mortalidade

---

tem aumentado na última década, correspondendo a 5-10% das mortes por causa respiratória, com elevada proporção de óbitos domiciliares.<sup>3,8</sup>

O diagnóstico de asma é essencialmente clínico, resultando da interação entre a avaliação clínica inicial (história e exame físico) e da resposta ao tratamento. Provas de função pulmonar e exames de sensibilidade a alérgenos auxiliam no diagnóstico. Os sintomas clínicos, a necessidade de uso de medicamentos e as características da função pulmonar, norteiam a classificação da gravidade do paciente.<sup>2,8</sup> Os sintomas mais comuns de asma são tosse, dispnéia e chiado no peito. Sintomas noturnos ou induzidos por exercícios são freqüentes. Outras doenças devem ser sempre excluídas.<sup>1</sup>

A asma é classificada quanto à gravidade em: intermitente ou persistentes leve, moderada e grave.<sup>1</sup> No entanto, a gravidade da asma apresenta uma característica variável, podendo mudar ao longo dos meses ou anos, como evolução da própria doença ou resposta ao tratamento. Em razão dessa variabilidade, atualmente a asma também tem sido classificada em asma controlada, parcialmente controlada e não controlada.<sup>2</sup> A maioria dos pacientes apresenta asma intermitente, ou persistente leve e moderada. A asma persistente grave representa aproximadamente 5% dos casos, porém é o maior desafio dos profissionais no manejo clínico desta doença.<sup>9</sup>

O tratamento medicamentoso da asma é dividido em manejo de resgate e profilático. O manejo de resgate é utilizado nas exacerbações agudas da doença, realizado com broncodilatadores simpaticomiméticos inalados, associados ou não ao uso de corticóide oral. O tratamento profilático é essencial para o controle da doença na asma persistente, utilizando medicamentos antiinflamatórios. O fármaco de primeira escolha

---

nesta situação é o glicocorticóide (GC) inalatório.<sup>1,10</sup> Os GCs inalatórios têm sido utilizados amplamente no tratamento da asma nas últimas décadas, tanto em adultos quanto em crianças. Apesar dos potenciais efeitos colaterais, principalmente quando usado em doses elevadas, o GC inalado tem sido considerado o fármaco mais efetivo e seguro no controle da doença com inflamação persistente.<sup>11</sup>

Um dos desafios clínicos mais importantes desta doença tem sido o manejo da asma persistente grave. Esses pacientes necessitam de altas doses de GC inalatório, associado à broncodilatadores de longa duração, com freqüentes cursos de tratamento de resgate com broncodilatador e GC oral, para atingir um controle adequado ou muitas vezes parcial da doença.<sup>12</sup> Hospitalizações e atendimento nas emergências por episódios agudos de asma são comuns nesse grupo de pacientes.<sup>13</sup> Além disto, alguns pacientes com asma grave de difícil controle apresentam falha na resposta ao tratamento com GC, mesmo em altas doses.

A resposta individual ao GC pode apresentar um amplo espectro. Alguns casos podem apresentar resistência ao GC, com repercussão clínica variável.<sup>14,15</sup> A origem desta resistência, se inata ou adquirida, ainda não foi esclarecida. Além disto, a prevalência e comportamento da resistência ao GC em crianças ainda não foi estudado. Este é o objetivo principal do presente trabalho.

---

### **1.1.2 Fisiopatogenia da asma atópica**

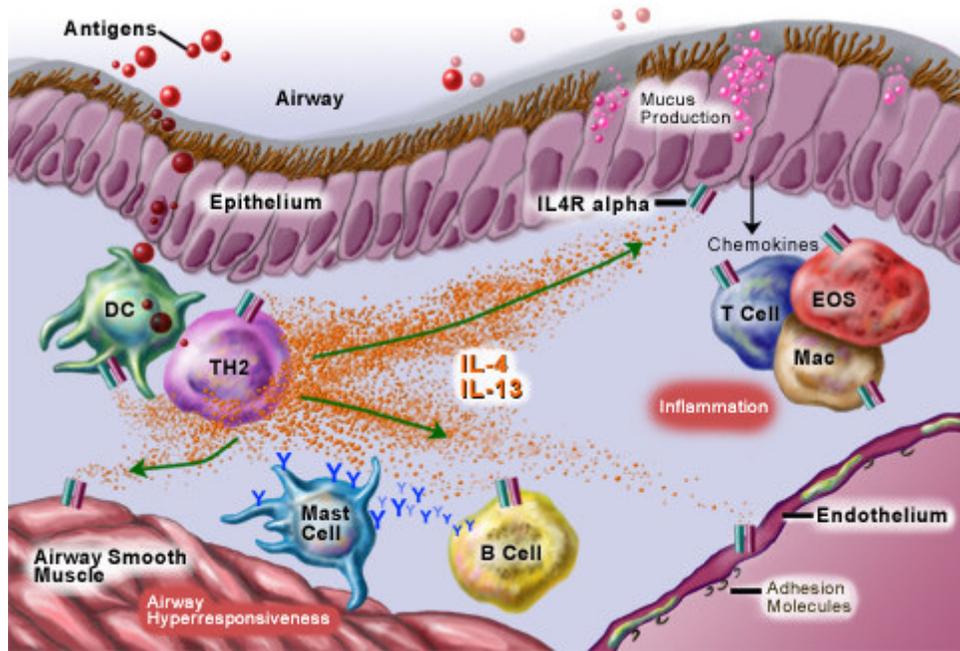
No indivíduo atópico, existe uma resposta imune de hipersensibilidade contra antígenos ambientais comuns e inócuos. Interações entre células inflamatórias, mediadores químicos e células estruturais das vias aéreas ocorrem no aparelho respiratório, conferindo à inflamação brônquica o mais importante fator na fisiopatogenia da asma.<sup>16,17</sup>

O contato da mucosa respiratória com alérgenos inalados desencadeia a liberação de histamina, leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs) pelos mastócitos e basófilos, após a ativação do complexo antígeno-IgE, ligado ao receptor específico nas suas membranas celulares. Os macrófagos e células dendríticas têm o papel de apresentar o antígeno aos linfócitos T, que liberam diversas citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13), algumas delas responsáveis pela diferenciação destas células em Th2.<sup>18</sup>

Os linfócitos Th2, responsáveis pela resposta imune característica da asma de origem atópica, estimulam a produção de mais IgE pelos linfócitos B, a ativação de mastócitos pulmonares e a diferenciação, recrutamento e ativação de eosinófilos.<sup>19,20</sup> Os mediadores químicos liberados pelas células inflamatórias resultam em alterações patológicas da asma. A histamina, PG, LTs, fator ativador plaquetário (PAF), e bradicinina são mediadores que resultam em aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa brônquica e secreção aumentada de muco.<sup>17,21</sup> As citocinas (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13) possuem como principal ação a estimulação da proliferação e diferenciação de todas as células da série dos leucócitos. A IL-4 possui importante papel

---

no aumento da produção dos anticorpos IgE específicos ao alérgeno e a IL-5 no recrutamento e na ativação de eosinófilos.<sup>22,23</sup> A fisiopatogenia da asma é resumida na Figura 1.



**Figura1:** Interação das células e citocinas na fisiopatogenia da asma atópica. IL: interleucina; DC: célula dendrítica; EOS: eosinófilo; Mac: macrófago; IL4R: receptor de IL-4. (www.aerovance.com/asthma\_clip\_image002.gif)

### **1.1.3 Papel do glicocorticóide no tratamento da asma**

Devido a sua alta prevalência mundial e elevada morbidade, a asma atrai um número elevado de pesquisadores que se interessa em estudar e conhecer os mecanismos da asma, na tentativa de um melhor controle e tratamento da doença. Utilizados desde a década de 50, os GCs ganharam importância no tratamento da doença e atualmente são considerados os fármacos de escolha no tratamento de manutenção dos pacientes com asma persistente.<sup>10,24</sup>

Tanto na forma oral quanto na inalatória, os GCs inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imune, reduzindo o número e a ativação das células inflamatórias e a hiper-responsividade das vias aéreas, resultando em redução dos sintomas da asma, melhora significativa da inflamação e da função pulmonar, em questão de dias ou semanas.<sup>25</sup> Seu uso contínuo na asma persistente diminui a limitação das atividades físicas, o absenteísmo escolar e do trabalho, visitas a salas de emergências e internações hospitalares. O controle da doença reduz a morbidade e mortalidade da asma de forma significativa, resultando em melhor qualidade de vida para o paciente.<sup>26,27</sup> O efeito do uso precoce de GC para prevenção de remodelamento pulmonar e do desenvolvimento de alterações estruturais irreversíveis na árvore brônquica não foi determinado por estudos científicos de forma clara.<sup>26</sup>

Uma minoria de pacientes com asma persistente grave necessita de altas doses de GC, muitas vezes não respondendo ao tratamento.<sup>28</sup> Nestes pacientes, a terapia prolongada, altas doses e pouca eficácia clínica resultam em aumento do risco de efeitos

---

colaterais indesejáveis.<sup>29</sup> A supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário, com redução da secreção do cortisol, retardo do crescimento e risco de osteoporose são os mais importantes efeitos adversos e relacionam-se ao uso prolongado e indiscriminado dos GCs sistêmicos.<sup>29,30</sup> O melhor entendimento dos mecanismos de ação dos GCs podem auxiliar potencialmente no benefício terapêutico de pacientes com asma, particularmente em mecanismos de resistência e fármaco-genética.

#### **1.1.4 Mecanismos de ação dos glicocorticóides**

Os GCs exercem efeitos diversos e profundos em um número amplo de células do organismo. Produzido no córtex adrenal, e regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o GC endógeno participa de numerosos processos fisiológicos, tais como homeostase da glicose, metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, apoptose celular, entre outros. Os GCs, como fármaco, estão entre os antiinflamatórios mais prescritos no mundo para doenças inflamatórias, alérgicas e neoplásicas.<sup>29</sup>

A magnitude dos efeitos biológicos dos GCs é determinada, entre outros fatores, pela densidade de receptores das células-alvo e a afinidade dos receptores.<sup>31</sup> O receptor do glicocorticóide (GR) é um fator de transcrição preservado evolutivamente, encontrado em diversas espécies, e essencial dentro do mecanismo de ação do GC. Na espécie humana, é o produto de um gene localizado no braço longo do cromossoma 5 (região 5q31p).<sup>32</sup>

---

Foram descritos duas diferentes isoformas de receptores humanos de GCs: o receptor corticóide  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) e o  $\beta$  (GR $\beta$ ). O GR $\alpha$  encontra-se no citoplasma e liga-se ao GC. O GR $\beta$  localiza-se no núcleo e não liga-se ao GC, mas diretamente ao DNA. Sua relevância fisiológica ainda é controversa, mas tem sido identificado como um fator contribuinte para a resistência aos GCs, e sua expressão está aumentada na presença de potentes citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-1.<sup>33,34</sup>

Os GRs residem no citoplasma e são amplamente distribuídos no parênquima pulmonar, principalmente nas células epiteliais e nas células do endotélio brônquico.<sup>35</sup> Após sua ligação, os receptores são ativados e o complexo esteróide-receptor transfere-se para o núcleo por translocação.<sup>36</sup> Este complexo pode então se ligar a genes no DNA ou a fatores de transcrição (proteína ativadora-1 [AP-1], NF- $\kappa$ B, Smad3), controlando a formação de RNA mensageiro (RNAm) específico, direcionando a síntese de proteínas, reprimindo a expressão de genes e a inibição da produção de certas proteínas.<sup>36,37,38</sup> Os GCs regulam a expressão de genes das seguintes formas: 1) ligando-se a genes-alvo (GREs) que ativam transcrição; 2) inibindo genes de transcrição por ligação direta no DNA; e 3) regulação de genes pela interação com fatores de transcrição. Estes últimos (particularmente, AP-1 e NF- $\kappa$ B) são mediadores que ativam a sinalização de citocinas pró-inflamatórias e são reprimidos pelos GCs.<sup>29</sup>

O entendimento dos mecanismos moleculares de ação dos GCs comprova, cada vez mais, sua importância como fármaco antiinflamatório, mas ao mesmo tempo

---

evidencia a participação de alguns mecanismos na resistência ao tratamento com GCs em pacientes com doenças inflamatórias.

Estudar e identificar quais mecanismos participam dessa resistência tem sido o objetivo de muitos pesquisadores, e seu melhor entendimento poderá resultar em melhor controle da doença através de medicações alternativas para esses pacientes.

### **1.1.5 Mecanismos de resistência aos glicocorticóides**

Em 1968, foi descrito o primeiro estudo mencionando a possibilidade de resistência aos GCs em pacientes com asma. Schwartz et al. demonstraram que a sensibilidade aos GCs era evidenciada pela diminuição dos eosinófilos no sangue periférico, baseado em estudo prévio.<sup>39</sup> No entanto, pacientes com asma clinicamente resistente ao GC apresentava uma resposta reduzida na redução de eosinofilia sanguínea.<sup>40</sup>

Posteriormente, na década de 80, estudos sugeriram a participação da resposta imune adquirida nos mecanismos de resistência aos GCs.<sup>41,42</sup> Carmichael et al., ao analisarem um grupo de pacientes com asma resistente aos GCs (CR) e sensíveis aos GCs (CS), documentaram uma baixa sensibilidade dos monócitos a prednisolona em asmáticos CR.<sup>42</sup> Poznansky e colaboradores cultivaram células mononucleares de sangue periférico com metilprednisolona de asmáticos CS e CR. Os CS apresentaram uma inibição superior a 60% da proliferação dos linfócitos T na presença do GC, ao

---

contrário dos CR, onde a redução não foi significativa. A presença de vieses, como por exemplo, a inclusão de tabagistas, tornou os dois estudos bastante criticados.<sup>43,13</sup> Foi somente no início da década 90, que foi levantada a hipótese da resistência ao GC estar relacionada ao GR. Através da análise de sangue periférico com diferentes tipos e concentrações de GC, Corrigan et al. não encontraram redução da proliferação linfocitária, ocorrendo falha na inibição da cascata inflamatória desencadeada pela asma. A resistência das células T ao GC pode ser devido a anormalidades das próprias células T, a redução da afinidade da ligação GR, ou, menos freqüentemente, a uma relativa deficiência do sítio do GR.<sup>14</sup> Atualmente, o entendimento do mecanismo de ação do GC no meio intracelular é resultado de inúmeros estudos analisando a participação de mecanismos celulares na resistência ao corticóide na asma e em outras doenças imunológicas. Em torno de 30% dos pacientes com artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, colite ulcerativa, sinusite crônica e dermatite atópica apresentam resistência ao tratamento com GC.<sup>44,45,46,47</sup> Os mecanismos de resistência ao GC, descritos até o presente, são os seguintes: anormalidades estruturais do GR, resistência induzida por citocinas (IL-2 e IL-4), produção de GR- $\beta$ , acetilação de histona anormal e outros (infecções, tabagismos, etc.). As anormalidades estruturais de GR parecem ser raras na asma. A causa mais comum parece ser a forma adquirida, particularmente associada a produção de citocinas pró-inflamatórias. O papel do GR $\beta$  é controverso em asma.<sup>48</sup>

Elevados níveis de GR $\beta$  foram observados em lesões inflamatórias, células mononucleares do sangue periférico e células T de pacientes com asma CR e colite ulcerativa intestinal.<sup>29,33,49</sup> Estes receptores poderiam competir com os GR $\alpha$  na ligação ao sítio do DNA celular ou interagir com moléculas coativadoras, podendo estar

---

relacionados a resistência terapêutica destes pacientes.<sup>33</sup> No entanto, estudos recentemente realizados não encontraram aumento da expressão dos GR $\beta$  nas células mononucleares dos pacientes que mostraram reduzida resposta ao corticóide *in vitro*, havendo predomínio dos GR $\alpha$  sobre os GR $\beta$ .<sup>50,51</sup>

Outro mecanismo recentemente proposto foi a falha dos GRs em inibir a ativação dos genes inflamatórios através do antagonismo sobre os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1. A excessiva ativação da AP-1 nas células dos pacientes CRs, pode ser responsável por este defeito inibitório da AP-1 em resposta aos corticóides nas células mononucleares destes pacientes.<sup>52</sup> As citocinas inflamatórias (IL-2, IL-4 e IL-13, que se encontram aumentadas em biópsias brônquicas de pacientes CRs, também podem estar relacionadas com uma reduzida afinidade dos GRs para os linfócitos T, através da ativação da proteína p38 mitógeno-ativada (p38 MAP), que fosforila os GRs e reduz a afinidade de ligação do corticóide com o núcleo.<sup>53</sup>

Apesar de inúmeras hipóteses serem levantadas e estudadas ao longo das últimas décadas, a resposta para as causas da resistência ao corticóide ainda permanecem obscuras. No entanto, parece claro a presença de vários mecanismos celulares de resistência ao tratamento com corticóide, que podem variar entre os pacientes e o tipo de doença. Na asma, a resistência ao GC tem sido documentada em adultos, com poucas publicações estudando os mecanismos envolvidos.<sup>48</sup>

---

### **1.1.6 Estudos clínicos de resistência aos glicocorticóides em asma**

Uma importante característica da resposta aos GCs na asma é a sua variabilidade.<sup>14</sup> Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que alguns pacientes não respondem ao tratamento com GC em doses adequadas ou elevadas, tornando-se sujeitos aos efeitos colaterais indesejáveis da terapia prolongada e com pouca evidência de algum benefício clínico.<sup>54</sup> Esse subgrupo de pacientes, cuja prevalência encontra-se usualmente em torno de 25% dos pacientes com asma de difícil controle, tem sido estudado há décadas.<sup>55</sup>

Esses pacientes podem apresentar uma variedade de características na apresentação da doença. As características clínicas principais são o tratamento com GC oral contínuo ou superior a 50% do tempo nos últimos 12 meses, ou o uso de altas concentrações de GC inalatório para o controle da doença. Como características menores consideram-se a necessidade do uso de medicações como broncodilatador de longa ação, teofilina ou leucotrienos, juntamente com GC inalatório, uso de broncodilatador de curta ação diariamente ou quase diariamente para o manejo das crises, uma ou mais visitas por ano a salas de emergência por asma e obstrução pulmonar persistente, entre outros.<sup>9</sup> O fluxo pulmonar é limitado na maioria dos casos, apresentando ausência de resposta ao broncodilatador, mesmo após 7 a 14 dias de GC oral.<sup>55</sup> Excluir causas como uso inadequado da técnica de inalação, diagnóstico diferencial das causas de tosse, dispnéia e sibilância (DPOC, fibrose cística), associação de doenças que possam interferir no seu

---

manejo (sinusite crônica), exposição crônica excessiva a alérgenos (fumaça de cigarro) e transtornos psicossociais, é importante no diagnóstico de asma CR.<sup>56</sup>

Objetivando diminuir a exposição dos pacientes CR a altas doses de GCs e seus efeitos colaterais indesejáveis, estudos clínicos com pacientes com asma de difícil controle são realizados, buscando caracterizar melhor aqueles resistentes a GC. Após o estudo pioneiro de 1968,<sup>39</sup> Turner-Warwick et al., em 1977, observou padrões de respostas aos GCs entre pacientes asmáticos e medidas seriadas de *peak flow*, classificando os pacientes como asma de difícil controle e irreversíveis. Em sua análise, esses pacientes foram aqueles intratáveis, com flutuação na taxa do fluxo expiratório mesmo após o uso de altas doses de GCs. Os asmáticos irreversíveis respondiam ao broncodilatador, mas persistiam com componente de irreversibilidade no *peak flow* após terapia com GC sistêmico.<sup>57</sup>

Na década de 80, Carmichael et al. definiu como CR pacientes com aumento de 15% no VEF<sub>1</sub> pré-broncodilatador, após 7 dias de terapia com 20mg/dia de prednisolona ou equivalente. Outros fatores como hereditariedade, maior tempo de doença, menor *peak flow* expiratório matinal e aumento da hiperresponsividade brônquica foram observados nos pacientes CR.<sup>41</sup>

Ellen e colaboradores examinaram se alterações nos ligantes GR causavam uma pobre resposta aos GCs. Como resultado, encontraram a possibilidade da existência de no mínimo dois mecanismos de resistência presentes na população de CR. O CR tipo I, que possui uma reduzida afinidade do ligante GR e um maior número de GR nas células T e o CR tipo II, que possui uma afinidade normal do ligante GR, mas reduzido número

---

de GR por célula. Quando incubadas células T com as citocinas inflamatórias IL-2 e IL-4, sugeriram que, numa inflamação persistente, certamente as citocinas podem contribuir para uma diminuída afinidade do GR, contribuindo para uma pobre resposta aos GC, nos CR tipo I.<sup>54</sup>

Em 1996, Spahn et al. analisaram e compararam a capacidade dos GCs (dexametasona e budesonida) em inibir a proliferação dos linfócitos T do sangue periférico de 13 pacientes asmáticos CR e CS. Os pacientes CS foram mais sensíveis aos efeitos dos GCs estudados, comparados com os CR, independente das concentrações de GCs ( $p < 0,04$  a  $p < 0,002$ ). A afinidade do GR foi superior para a budesonida em relação a dexametasona para os dois grupos e para a dexametasona foi superior nos CS. Esse estudo foi pioneiro em documentar as diferenças das preparações de GCs inalatórios na resposta inflamatória de pacientes CR e CS.<sup>58</sup> No mesmo ano, um estudo feito por Corrigan et al., comparou a eficácia da budesonida, beclometasona e da fluticasona, encontrando similar resposta ao estudo anterior, ou seja, uma ação reduzida dos GCs na inibição da proliferação linfocitária dos CR.<sup>59</sup>

Anormalidades farmacocinéticas dos GCs como absorção incompleta, falha da conversão da forma inativa (prednisona) na forma ativa (prednisolona) e/ou sua rápida excreção, também foram relatados na década de 90. A anormalidade mais encontrada, foi a rápida excreção dos GCs, geralmente associado a interação com outras drogas como anticonvulsivantes, fenitoína, carbamazepina e fenobarbital.<sup>13</sup>

Mark et al. demonstraram que os linfomonócitos de pacientes com asma grave apresentam uma menor sensibilidade aos GCs quando comparados aos pacientes com

---

asma moderada, concluindo que a liberação de citocinas nestes pacientes foi pouco suprimida para a IL-1 $\beta$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$  e IL-6.<sup>14</sup>

Atualmente, muitas hipóteses levantadas em estudos prévios estão sendo confirmadas, e outras, substituídas por novos conhecimentos moleculares do GR.<sup>56,15</sup> Mais recentemente, Barnes et al. reclassificou os pacientes asmáticos graves em CR e corticóide-dependentes (CD).<sup>56</sup> Os CD são os pacientes com reduzida resposta aos corticóides, onde são necessárias altas doses de GC inalados ou oral para o controle das crises. Inflamação eosinofílica típica da asma foi encontrada na biópsia pulmonar desses pacientes. Em seu estudo, alterações relacionadas à afinidade da ligação e ao número de GR foram raras para asma, não expressando alteração funcional nos GR.<sup>60</sup> Ao contrário, em outras famílias CR foram encontradas anormalidades nos GR que poderiam resultar em menor afinidade da ligação aos GC.<sup>61</sup> As citocinas IL-2, IL-4 e IL-13 foram responsáveis pela redução na afinidade dos GR aos GCs para linfócitos T e monócitos, bem como a combinação da IL-2 e IL-4 induziu a CR através da p38 MAP.<sup>53,62</sup>

Barnes et al. não encontraram aumento na expressão dos GR $\beta$  nas células mononucleares dos pacientes CD que tinham reduzida resposta ao GC *in vitro*, marcando improvável efeito inibitório desse receptor sobre os GCs.<sup>63</sup> Reduzida síntese de IL-10 pelos macrófagos alveolares e monócitos, em resposta aos GCs, foi encontrado em pacientes com asma grave.<sup>64,65</sup> Fatores ambientais, como tabagismo e presença de infecções virais, também somaram para resistência aos GCs.<sup>56,66,67</sup>

Por fim, Mark Hew et al., em 2005, analisou a inibição dos GCs sobre a proliferação de citocinas inflamatórias e enzimas nucleares de 35 pacientes. Seus

---

resultados revelaram uma diminuída sensibilidade aos GCs das células mononucleares dos pacientes com asma grave, associado com uma reduzida atividade da HDAC.<sup>15</sup>

É evidente que mesmo com todos esses estudos, desvendar os mecanismos de resistência aos GCs ainda não está próximo e apresenta vital importância para a população adulta. Todos os estudos apresentados foram realizados em adultos. Porém, é importante ressaltar que a asma inicia na maioria das vezes na infância e o conhecimento da origem dessa resistência é fundamental para a população de asmáticos, visando um melhor controle da doença, garantindo assim, uma melhor qualidade de vida. Além disto, somente com estudos na faixa etária pediátrica, será possível entender melhor a questão da resistência aos GCs ser inata ou adquirida nas doenças alérgicas e auto-imunes. Até o presente, nenhum estudo foi publicado analisando a resistência aos GCs em crianças com asma persistente.

---

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A asma é uma doença com danos à qualidade de vida do indivíduo, cuja importância social e política gera gastos em saúde pública, com hospitalizações e medicações de elevado custo. Os aspectos psicológicos e sociais causados aos pacientes, devido à restrição de suas atividades físicas, perdas de dias escolares ou de trabalho, reforçam o impacto desta doença em uma população.

Aproximadamente 5% dos pacientes com asma apresentam a forma persistente grave. Esses pacientes representam a maior parcela relacionada à elevada morbidade e alta utilização de recursos econômicos. Um subgrupo desses pacientes apresenta asma de difícil manejo. A dificuldade no tratamento destes pacientes, que necessitam de altas doses de GC tópicos e uso frequente de GC sistêmico, sem obtenção de uma resposta adequada, tem levado vários grupos de pesquisadores no mundo a buscar um melhor entendimento dos mecanismos da doença e dos efeitos do GC, para que novas estratégias de tratamento possam ser utilizadas. Em adultos com asma grave, a resistência a GCs tem sido documentada há algumas décadas. No entanto, ainda não está claro se este achado é inato ou adquirido e não existe relato de estudos publicados na faixa etária pediátrica.

Desta forma, o presente estudo busca estudar a questão da resistência ao GC em pacientes pediátricos com asma persistente, tentando elucidar melhor os aspectos de causa-efeito. Este estudo é inédito na literatura e tem como objetivo também responder melhor a pergunta sobre a resistência dos GCs serem inatas ou adquiridas.

---

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo Geral**

- Analisar a sensibilidade ao glicocorticóide em células mononucleares do sangue periférico de pacientes pediátricos com asma persistente.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Comparar a proliferação linfocitária sob efeito do glicocorticóide em cultura de células mononucleares do sangue periférico entre crianças com asma persistente, com diferentes classificações de gravidade, e com um grupo controle de crianças saudáveis.

- Comparar a proliferação linfocitária estimulada por mitógeno dos pacientes com asma persistente, quando comparada ao grupo controle.

---

**1.4 REFERÊNCIAS**

1. John M III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002;28(Supl1).
  2. Global Initiative of Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda(MD): National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health;2002. NIH publication 02-3659. Available at:<http://www.ginasthma.com>
  3. Pitrez PM, Stein RT. Asthma in Latin America: the dawn of a new epidemic. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:378-83.
  4. Sole D, Yamada E, Vana AT, Werneck G, Solano de Freitas L, Sologuren MJ, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001;11:123-8.
  5. Getahun D, Demissie K, Rhoads GG. Recent trends in asthma hospitalization and mortality in the United States. *Journal of Asthma* 2005;42:373-8.
  6. Chatkin MN, Menezes AM, Victora CG, Barros FC. High prevalence of asthma in preschool children in Southern Brazil: a population-based study. *Pediatr Pulmonol* 2003;35:296-301.
  7. Ministério da Saúde, Secretaria nacional de Ações Básicas de Saúde. Protocolo clínico diretrizes terapêuticas de asma grave. 2002.
-

- 
8. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da asma; J Pneumol. 2006;32(supl 7):S447-S474
  9. Official American thoracic society workshop report, ATS board of directors. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:2341-51.
  10. Barnes PJ. A new approach to the treatment of asthma. The New England Journal of Medicine 1989;321:1517-27.
  11. Szeffler ST. Glucocorticoid therapy for asthma:clinical pharmacology. J Allergy Clin Immunol 1991;88:147-65.
  12. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, et al. Can guideline-definid asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:836-44.
  13. Leung DYM, Szeffler SJ. New insights into steroid resistant asthma. Pediatr Allergy Immunol 1998;9:3-12.
  14. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Szeffler SJ, Tsai J-J, Frew AJ, et al. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Am Rev Respir dis 1991;144:1016-25.
  15. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:134-41.
-

16. Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR. Asthma. Philadelphia: Lippincott-Raven;1997.
  17. Kumar RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. *Pharmacol Ther* 2001;91:93-104.
  18. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
  19. Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, Begley CG, Harlan JM, Klebanoff SJ, et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* 1986;78:1220-8.
  20. Linden M, Brattsand R. Effects of a corticosteroid, budesonide, on alveolar macrophage and blood monocyte secretion of cytokines: differential sensitivity of GM-CSF, IL-1 $\beta$ , and IL-6. *Pulmonary Pharmacology* 1994;7:43-7.
  21. Holgate ST. Inflammatory and structural changes in the airways of patients with asthma. *Respir Med* 2000;94(Suppl D):S3-6.
  22. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990;323(15):1033-9.
  23. Silberstein DS, David JR. The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunol Today* 1987;8(12):380-5.
-

- 
24. Alvarez J, Surs W, Leung DYM, Iklé D, Gelfand EW, Szeffler SJ. Steroid-resistant asthma: immunologic and pharmacologic features. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:714-21.
  25. Marco R, Marcon A, Jarvis D, Accordini S, Bugiani M, Cazzoletti L, et al. Inhaled steroids are associated with reduced lung function decline in subjects with asthma with elevated total IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:611-7.
  26. Agertoft L, Pedersen S. Effects of long-term treatment with an inhaled corticosteroid on growth and pulmonary function in asthmatic children. *Respir Med* 1994;88:373-81.
  27. Suissa S, Ernest P. Inhaled corticosteroid: impact on asthma morbidity and mortality. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:937-44.
  28. Pedersen S. Early use of inhaled steroids in children with asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 1997;27:995-9.
  29. Necela BM, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:239-46.
  30. Umland SP, Schleimer RP, Johnston SL. Review of the molecular and cellular mechanisms of glucocorticoids for use in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2002;15:35-50.
  31. Hurley DM, Accilli D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Roler E, et al. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 1991;87:680-6.
-

- 
32. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991;266:7182-8.
  33. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tscopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, et al. Increased glucocorticoid receptor  $\beta$  in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;59:1600-4.
  34. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative  $\beta$  isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6865-70.
  35. Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM, Chung KF, Barnes PJ. Glucocorticoid receptor localization in normal human lung and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:771-82.
  36. Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:S1-S53.
  37. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 1996;87:953-9.
  38. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005;25:552-63.
  39. Tolksdorf S. Laboratory evaluation of anti-inflammatory steroids. *Ann NY Acad Sci* 1959;82:829.
-

- 
40. Schwartz HJ, Lowell FC, Melby JC. Steroid resistance in bronchial asthma. *Annals of Internal Medicine* 1968;69:493-9.
  41. Carmichael J, Paterson IC, Diaz P, Crompton GK, Kay AB, Grant IWB. Corticosteroid resistance in chronic asthma. *Br Med J* 1981;282:1419-22.
  42. Kay AB, Diaz P, Carmichael J, Grant JWB. Corticosteroid resistant asthma and monocyte complement receptors. *Clin Exp Immunol* 1981;44:576-80.
  43. Poznanzky MC, Gordon ACH, Douglas JG, Krajewski AS, Wyllie AH, Grant IW. Resistance to methylprednisolone in cultures of blood mononuclear cells from glucocorticoid-resistant asthmatic patients. *Clin Sci* 1984;67:639-45.
  44. Van SD, Valkema R, Dijkmans BA, Papapoulos S, Zwinderman AH, Han KH, et al. Prednisone treatment of elderly onset rheumatoid arthritis. Disease activity and bone mass in comparison with chloroquine treatment. *Arthritis rheum* 1995;38:334-42.
  45. Seki M, Ushiyama C, Seta N, Abe K, Fukazawa T, Asakawa J, et al. Apoptosis of Lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis rheum* 1998;41:823-30.
  46. Hamilos DL. Chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:213-27.
  47. Noh G, Lee KY. Intravenous immune globulin therapy in steroid-resistance atopic dermatitis. *J Korean Med Sci* 1999;14:63-8.
-

- 
48. Leung DYM, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22.
  49. Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, et al. Expression of glucocorticoid receptor  $\beta$  in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000;118:859-66.
  50. Pujols L, Mullol J, Roca FJ, et al. Expression of glucocorticoid receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C1324-C1331.
  51. Brogan IJ, Murray IA, Cerillo G, Needhan M, White A, Davis JR. Interaction of glucocorticoid receptor isoforms with transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B: lack of effect of glucocorticoid receptor  $\beta$ . *Mol Cell Endocrinol* 1999;157:95-104.
  52. Adcock IM, Lane SJ, Brown CA, Lee TH, Barnes PJ. Abnormal glucocorticoid receptor/AP-1 interaction in steroid resistant asthma. *J Exp Med* 1995;94:220-1.
  53. Szeffler SJ, Leung DY. Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Respir J* 1997;10:1640-7.
  54. Sher ER, Leung DY, Sure W, Kam JC, Zleg G, Kamada AK, et al. Steroid-resistant asthma. *J Clin Invest* 1994;93:33-9.
  55. Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD. Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:594-601.
-

- 
56. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:264-8.
  57. Turner-Warwick M. On observing patterns of airflow obstruction in chronic asthma. *Br J Dis Chest* 1977;71:73-86.
  58. Spahn JD, Landwehr LP, Nimmagadda S, Surs W, Leung Dy, Szeffler SJ. Effects of glucocorticoids on lymphocyte activation in patients with steroid-sensitive and steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1073-9.
  59. Corrigan CJ, Bungre JK, Assoufi B, Cooper AE, Seddon H, Kay AB. Glucocorticoid resistant asthma: T-lymphocyte steroid metabolism and sensitivity to glucocorticoids and immunosuppressive agents. *Eur Respir J* 1996;9:2077-86.
  60. Lane SJ, Arm JP, Staynov DZ, Lee TH. Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid-resistant bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:42-8.
  61. Bray PJ, Cotton RG. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): Pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* 2003;21:557-568.
  62. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. P38 mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:649-57.
-

- 
63. Gagliardo R, Chanez P, Vignola AM, Bousquet J, Godard P, Bonsignore G, et al. Glucocorticoid receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:7-13.
64. , Lim S, Seybold J, Robichaud A, O'Connor B, Barnes PJ, et al. Inhaled corticosteroids increase IL-10 but reduce MIP-1 $\alpha$ , GM-CSF and IFN- $\gamma$  release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:256-62.
65. Tomita K, Lim S, Hanazawa T, Usmani O, Stirling R, Barnes PJ, et al. Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severa asthma. *Clin Immunol* 2002;102:258-66.
66. Pedersen B, Dahi R, Karistrom R, Pedersen CG, Venge P. Eosinophil and neutrophil activity in asthma in a one-year trial with inhaled budesonid. The impact of smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1519-29.
67. Macek V, Soru J, Korpriva S, Marin J. Persistent adenoviral infection and chronic airway obstruction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:7-10.
-

---

## CAPÍTULO II

---

## **2 MÉTODOS**

### 2.1.1 Delineamento

Estudo de caso-controle, prospectivo.

### 2.1.2 População e amostra

Foram selecionados pacientes com asma persistente e crianças saudáveis (grupo controle), nos ambulatórios de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, pelos investigadores, no período entre julho de 2007 e julho de 2008.

---

*Pacientes com asma*

## 2.1.3 Critérios de inclusão (pacientes com asma)

- Criança entre 6 e 15 anos
- Diagnóstico de asma pela equipe clínica.

Os critérios utilizados para o diagnóstico de asma nos pacientes selecionados foram baseados nos critérios clínicos do III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma.<sup>1</sup> Os pacientes deveriam apresentar os seguintes critérios descritos a seguir:

- um ou mais dos seguintes sintomas: dispnéia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã;
  - sintomas episódicos ou contínuos;
  - melhora dos sintomas espontânea ou pelo uso de medicações específicas para asma (broncodilatadores, antiinflamatórios esteróides);
-

#### 2.1.4 Critérios de exclusão (pacientes com asma)

- Doenças crônicas, que não asma ou rinite (fibrose cística, cardiopatias congênitas, imunodeficiências, doença pulmonar crônica da prematuridade, doença neurológica, etc.).
- Imunodeficiências (congenita ou adquirida).
- Uso de medicações contínuas, exceto para tratamento de asma (corticoesteróide e broncodilatador inalatório de longa duração ou antileucotrieno).
- Pacientes com asma aguda no momento do recrutamento ou nas últimas três semanas, ou que tivessem utilizado corticóide sistêmico nas últimas três semanas.
- Infecções agudas e uso de qualquer medicação sistêmica nas últimas três semanas.

Os pacientes com asma incluídos no estudo, no dia da consulta no ambulatório, foram classificados de acordo com sua gravidade, também utilizando os critérios de classificação do III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma: (tabela 1)

---

**Tabela1:** Critérios de classificação de gravidade da asma.

	<b>Intermitente*</b>	<b>leve</b>	<b>Persistente moderada</b>	<b>grave</b>
Sintomas	Raros	Semanais	Diários	Diários ou contínuos
Despertares noturnos	Raros	Mensais	Semanais	Quase diários
Necessidade de beta-2 para alívio	Rara	Eventual	Diária	Diária
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente nas exacerbações	Presente nas exacerbações	Contínua
Exacerbações	Raras	Afeta atividades e o sono	Afeta atividades e o sono	Freqüentes
VEF <sub>1</sub> ou PFE	≥ 80% predito	≥ 80% predito	60-80% predito	≤ 60% predito
Varição VEF <sub>1</sub> ou PFE	< 20%	< 20-30%	> 30%	> 30%

Classificar o paciente sempre pela manifestação de maior gravidade.

\*Pacientes com asma intermitente, mas com exacerbações graves, devem ser classificados como tendo asma persistente moderada.

VEF<sub>1</sub>: volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE: pico de fluxo expiratório.

- III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma; **J Pneumol** 28 (Supl 1) - junho de 2002

### *Grupo controle*

Crianças saudáveis foram recrutadas nos ambulatórios de pediatria, cirurgia pediátrica e traumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

#### 2.1.5 Critérios de inclusão (grupo controle)

- Criança entre 6 e 15 anos
- ausência de doenças crônicas

- Crianças saudáveis que realizariam exames com coleta de sangue pré-operatórios ou de rotina.

#### 2.1.6 Critérios de exclusão (grupo controle)

- Utilização de qualquer medicamento de uso contínuo
- Infecção de qualquer tipo nas últimas quatro semanas

Após recrutamento e seleção, os pacientes foram divididos em quatro grupos:

- Asma leve;
- Asma moderada;
- Asma grave;
- Grupo controle.

#### 2.1.7 Descrição dos procedimentos

Os pacientes selecionados, após avaliação clínica, foram submetidos, juntamente com seu responsável, à explicação e leitura do termo de consentimento informado. Se autorizada a participação do paciente no estudo, o responsável assinava o consentimento em duas vias, das quais uma permanecia com o paciente e a outra com os

---

investigadores. A seguir, os pacientes eram submetidos a preenchimento de um questionário, espirometria, coleta de amostra de sangue periférico e realização de teste cutâneo. Os pacientes saudáveis tinham seus sangues coletados no momento da realização de exames pré-operatórios ou de rotina, após as consultas médicas. Os pacientes cirúrgicos se submetiam a cirurgias eletivas. As amostras de sangue eram enviadas para o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, para processamento e análise.

#### *Aplicação de questionário*

Todas as crianças com asma foram submetidas a um questionário resumido e adaptado do estudo ISAAC,<sup>2</sup> aplicado pelos investigadores. A aplicação desse questionário teve por objetivo auxiliar no diagnóstico da asma e sua classificação.

#### *Realização de testes cutâneos para alérgenos comuns*

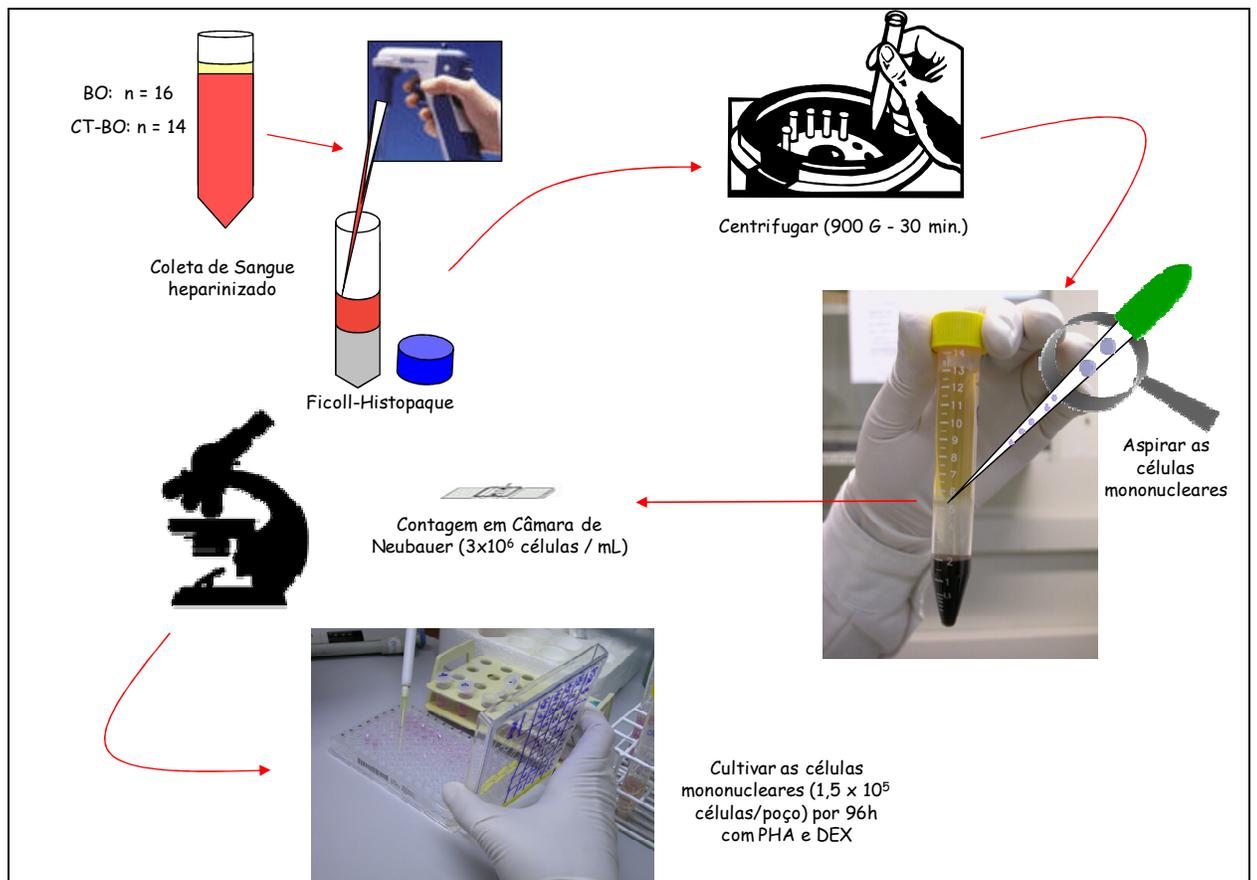
Todas as crianças com asma também foram submetidas a testes cutâneos para seis alérgenos ambientais comuns (*Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria alternata*, extrato de gramíneas, extrato de árvores e epitélio de gato), utilizando-se lancetas, com controle positivo com histamina e negativo com glicerina (ALK, Dinamarca). Os pacientes foram considerados atópicos se apresentassem teste positivo a pelo menos um dos alérgenos testados, definido pela presença de uma pápula com diâmetro  $\geq$  3mm do diâmetro médio do halo do controle negativo. O teste cutâneo era sempre realizado antes da coleta de sangue, conforme método descrito e realizado anteriormente.<sup>2</sup>

#### *Realização de espirometria*

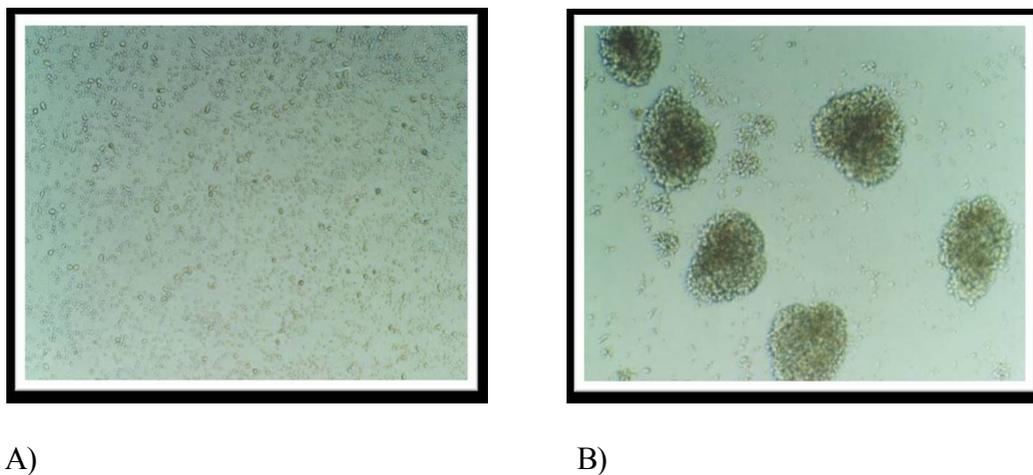
As espirometrias foram realizadas com o aparelho SuperSpiro<sup>®</sup> (Micro Medical, Reino Unido) e Koko (Ferraris, EUA). Foram registrados o VEF<sub>1</sub> basal e a relação VEF<sub>1</sub>/ CVF, e a seguir administrados 400 µg de salbutamol spray, sendo a espirometria repetida após 15 minutos.<sup>3</sup> O resultado da espirometria, somado com critérios clínicos e de resposta a terapêutica, auxiliou na classificação final dos pacientes.<sup>4</sup>

#### *Isolamento das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)*

As células mononucleares (linfomonócitos) de sangue periférico foram isoladas através da centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Histopaque (Sigma, USA) a 900g, por 30 minutos, e lavados 2 vezes com solução salina de Hanks (Sigma, USA). A contagem celular foi feita através da microscopia (100x) e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul de tripan (Sigma USA). As células foram cultivadas em triplicatas nas microplacas de 96 poços de fundo chato, numa concentração final de  $1,5 \times 10^5$  células/poço, em meio de cultura completo (RPMI-1640, com gentamicina a 0,5%, glutamina a 1%, HEPES a 1%, fungizona a 0,1% e soro fetal bovino a 10%, da Sigma, USA). O resumo da técnica é ilustrada na Figura 1. As células mononucleares foram estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA 2, 1 e 0,5%) (Murex Biotech Ltda, Gibco, USA) em triplicatas na concentração de 1%, e cultivadas por 96 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>5</sup> (Figura 2)



**Figura 1:** Ilustração da técnica de cultura de linfomonócitos em sangue periférico.



**Figura 2:** Ensaio de proliferação linfocitária de cultura de linfomonócitos de sangue periférico. A figura 1A ilustra os linfócitos em cultura não estimulados por fitohemaglutinina (PHA). Na figura 1B, observa-se a proliferação linfocitária, após estimulação com PHA, com aglomeração celular, sem dexametasona.

#### *Teste de sensibilidade ao corticóide através do método de proliferação linfocitária*

Foram acrescentados nos poços de cultura de cada indivíduo, concentrações crescentes de dexametasona ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M, Sigma, USA). A proliferação linfocitária/viabilidade foi mensurada por ensaio colorimétrico (MTT) em leitor de ELISA. Os dados foram apresentados como percentual da proliferação basal, onde 100% (basal) representa culturas de PHA a 1% sem corticóide. A concentração da droga que inibe 50% (IC50) da proliferação linfocitária foi estimada pela regressão não-linear (Prism 4.0 Graphpad software, USA). Uma equação de dose-resposta sigmoideal foi escolhida para ajustar os dados ( $R^2$  maior do que 0,95). Dexametasona foi adicionado nas duplicatas (50 $\mu$ l/poço) com PHA%. A resposta da proliferação foi determinada por um ensaio colorimétrico modificado, previamente descrito.<sup>5,6</sup> A densidade óptica (OD) foi determinada usando o leitor de placa de ELISA da Biorad, para um comprimento de onda de 570 nm e 630 nm. A proliferação e viabilidade foram expressas através da OD das culturas estimuladas e não estimuladas.

*Resposta ao corticóide*

A sensibilidade ao GC foi identificada através da análise final da curva de controle dose-resposta, testados em cultura com dexametasona. A área sob a curva (AUC) foi calculada pela regra trapezoidal. Pacientes com AUC de dexametasona acima da mediana foram classificados como não responsivos, enquanto pacientes com uma AUC abaixo deste valor foram considerados sensíveis ao corticóide *in vitro*.

**2.2 Análise Estatística**

O cálculo do tamanho amostral não foi realizado devido a ausência de estudos em crianças. Não havia referências sobre resultados de testes de sensibilidade da dexametasona em cultura de linfomonócitos de sangue periférico de crianças da faixa etária estudada. Desta forma, foram utilizadas as referências de estudos com resultados significativos em adultos com tamanho amostral de 50 pacientes.<sup>7</sup>

Para análise das variáveis sobre características dos pacientes estudados foi utilizado o teste ANOVA (variáveis numéricas) e teste qui-quadrado (variáveis qualitativas). Para a análise da proliferação linfocitária entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%. Os testes estatísticos foram realizados através do programa SPSS, versão 11.5.

---

### **2.3 Considerações Éticas**

No presente estudo, foi tomado o cuidado de evitar a retirada de sangue desnecessária, aproveitando-nos do momento da coleta de exames pré-operatórios ou de rotina nas crianças do grupo controle e incluindo outros exames que poderiam auxiliar no manejo dos pacientes com asma (hemograma e IgE total). Todos os procedimentos realizados foram explicados pela equipe ao paciente e familiares e só foram realizados após concordância do paciente e de seu responsável legal. Todos os pacientes tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável do paciente, antes da inclusão do mesmo no estudo (Anexo 1).

---

## 2.4 Referências Bibliográficas

1. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002;28(Supl. 1).
  2. The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC). *Eur Respir J* 1998;12:315-35.
  3. Global Initiative of Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda(MD): National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health;2002. NIH publication 02-3659. Available at:<http://www.ginasthma.com>.
  4. Polgar CPV. Standar Values. In: Pulmonary function testing in children: techniques and standards. Saunders W, editor. Philadelphia;1971.87-122p.
  5. Collaziol, D., T. Preissler, and M.E. Bauer, Avaliação da proliferação linfocitária e sensibilidade a glicocorticóides por ensaios colorimétricos. *Rev.Medicina PUCRS*, 2001. 12 ((3)): p. 226-231.
  6. Luz C, Collaziol D, Preissler T, da Cruz IM, Glock L, Bauer ME. Healthy aging is associated with unaltered production of immunoreactive growth hormone but impaired neuroimmunomodulation. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:90-99.
-

7. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:134-41.

---

## **CAPÍTULO III**

---

---

### **3 ARTIGO ORIGINAL**

---

**AUSÊNCIA DE RESISTÊNCIA AO GLICOCORTICÓIDE EM CULTURA DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO EM CRIANÇAS COM  
ASMA PERSISTENTE GRAVE.**

Rejane Fialho Matias Lopes\*, Paulo Márcio Condessa Pitrez\*\*

\* Médica pediatra do Hospital São Lucas da PUCRS e do Hospital da Criança Santo Antônio.

\*\* Professor da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Doutor em Pneumologia pela UFRGS.

**Instituição**

Laboratório de Respirologia Pediátrica do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia

Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da PUCRS

**Correspondência e contato pré-publicação**

Rejane Fialho Matias Lopes

Alameda 3 de Outubro 51. Bairro: Sarandi. Porto Alegre-RS-Brasil

Telefones: (51) 3365-8276, (51) 9817-8995

e-mail: [rejanefmatias@hotmail.com](mailto:rejanefmatias@hotmail.com)

Obs: A versão em inglês deste manuscrito, com alguns dados adicionais de marcadores inflamatórios, foi submetida para o American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e limitação ao fluxo aéreo, causados por broncoconstrição, secreção aumentada de muco e infiltração local de células inflamatórias.<sup>1,2</sup> Sua prevalência mundial é elevada, tanto na população adulta quanto na infantil, apresentando elevada morbidade.<sup>3</sup> A maioria dos pacientes apresenta asma intermitente, ou persistente leve e moderada. A asma persistente grave representa aproximadamente 5% dos casos, sendo é o maior desafio dos profissionais no manejo clínico desta doença.<sup>4</sup>

O fármaco de primeira escolha para o tratamento da asma persistente é o glicocorticóide (GC) inalatório.<sup>5,6</sup> Nos pacientes persistente graves são necessárias altas doses de GC inalatório, associado à broncodilatadores de longa duração, com freqüentes cursos de tratamento de resgate com broncodilatador e GC oral, para atingir um controle adequado ou muitas vezes parcial da doença.<sup>7</sup> Ao analisar esses pacientes, pesquisadores observaram que alguns não respondiam ao tratamento com GC, levando a hipótese da existência de pacientes resistentes ao corticóide.

Na década de 60 foi descrito o primeiro estudo mencionando pacientes com resistência ao GC. Ao analisar o sangue periférico de um grupo de asmáticos com pouca resposta ao GC sistêmico, pesquisadores observaram uma diminuída resposta eosinofílica aos GCs.<sup>8</sup> Em 1991, Corrigan et al. analisando a proliferação dos linfócitos T do sangue periférico de 37 pacientes asmáticos graves induzidos pela PHA fitohemoaglutinina (PHA), observou uma inibição dessa proliferação na presença de

---

doses crescentes de dexametasona ( $10^{-7}$ ) para os asmáticos sensíveis, mas não para os resistentes ( $p < 0,01$ ), reforçando a variabilidade da resposta aos GCs na asma.<sup>9</sup>

Em 1996, Joseph D. Spahn et al. comparou a capacidade dos GCs (dexametasona e budesonida) em inibir a proliferação dos linfócitos T do sangue periférico de 13 pacientes asmáticos corticóides resistentes (CR) e corticóides sensíveis (CS). Os pacientes CS foram mais sensíveis aos efeitos dos GCs estudados, comparados com os CR, independente das concentrações de GCs ( $p < 0,04$  a  $p < 0,002$ ). A afinidade do GR foi superior para a budesonida em relação a dexametasona para os dois grupos e para a dexametasona foi superior nos CS. Esse estudo foi pioneiro em documentar as diferenças das preparações de GCs inalatórios na resposta inflamatória de pacientes CR e CS.<sup>10</sup>

A participação multifatorial desses mecanismos, como a falha dos GCs em inibir a proliferação dos linfócitos T e dos monócitos, bem como dos fatores de transcrição pró-inflamatórios NF- $\kappa$ B e AP-1 ou, a presença do receptor glicocorticóide  $\beta$  (GR $\beta$ ) competindo com os receptores glicocorticóides  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) na ligação ao sítio receptor glicocorticóide (GRE) do DNA celular ou interagindo com moléculas coativadoras, tem sido proposto pelos pesquisadores dessa década, como possibilidade de resistência ao GC.<sup>11,12,13</sup>

Apesar dos estudos realizados até o presente, a origem da resistência ao corticóide, se inata ou adquirida, ainda não foi esclarecida. Descobrir a causa da falha na resposta ao tratamento de doenças corticodependentes resultará em melhor qualidade de vida para esses pacientes, que além da morbidade da própria doença, ainda sofrem pelos

---

efeitos colaterais indesejáveis dos GCs. Além disso, a resistência ao GC em crianças com asma ainda não foi estudado.

O presente estudo tem como objetivo analisar a sensibilidade ao GC *in vitro* em pacientes pediátricos com asma persistente, através da análise das células mononucleares do sangue periférico, particularmente no grupo de crianças com asma grave.

## **MÉTODOS**

### **Desenho do estudo**

Estudo prospectivo de caso-controle.

### **População e amostra**

Os pacientes foram recrutados e avaliados nos ambulatórios de pneumologia pediátrica, pediatria, cirurgia pediátrica e traumatologia do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS. O processamento e a análise das amostras de sangue dos pacientes foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Foram selecionadas crianças com asma persistente e saudáveis (grupo controle), no período de julho de 2007 a julho de 2008.

### **Pacientes com asma**

Os critérios utilizados para o diagnóstico de asma nos pacientes selecionados foram baseados nos critérios clínicos do III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma.<sup>1</sup> Os pacientes deveriam apresentar os seguintes critérios descritos a seguir: idades entre 6 a 15 anos; um ou mais dos seguintes sintomas: dispnéia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã; sintomas episódicos ou contínuos; melhora dos sintomas espontânea ou pelo uso

---

de medicações específicas para asma (broncodilatadores, antiinflamatórios esteróides); diagnósticos alternativos excluídos (realizado pelos médicos preceptores do ambulatório de Pneumologia Pediátrica); assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo responsável.

Foram excluídos pacientes portadores de doenças crônicas, que não asma ou rinite (fibrose cística, cardiopatias congênitas, imunodeficiências congênita ou adquirida), doença pulmonar crônica da prematuridade, doença neurológica, etc; pacientes em uso de medicações contínuas ou nas últimas três semanas, exceto para tratamento de asma (corticoesteróide e broncodilatador inalatório de longa duração ou antileucotrieno); pacientes com asma aguda no momento do recrutamento ou nas últimas três semanas, ou que tivessem utilizado corticóide sistêmico nas últimas três semanas; presença de infecções agudas.

Os pacientes com asma incluídos no estudo, no dia da consulta no ambulatório, foram classificados de acordo com sua gravidade, também utilizando os critérios de classificação do III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma.<sup>1</sup>

### **Grupo controle**

Crianças saudáveis, entre 6 e 15 anos, que realizariam exames com coleta de sangue pré-operatórios ou de rotina. Foram excluídas crianças em uso de qualquer medicamento de uso contínuo e infecção de qualquer tipo nas últimas quatro semanas.

---

Por fim, os pacientes recrutados foram divididos em quatro grupos: grupo 1, asma leve; grupo 2, asma moderada; grupo 3, asma grave; grupo 4, crianças saudáveis (grupo controle).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS.

Os pacientes selecionados, após avaliação clínica, foram submetidos, juntamente com seu responsável, à explicação e leitura do termo de consentimento informado. Se autorizada a participação do paciente no estudo, o responsável assinava o consentimento em duas vias, das quais uma permanecia com o paciente e a outra com os investigadores. A seguir, os pacientes eram submetidos ao preenchimento de um questionário, espirometria, coleta de amostra de sangue periférico (20 ml) e realização de teste cutâneo.

Os pacientes saudáveis tinham seus sangues coletados no momento da realização de exames pré-operatórios ou de rotina, geralmente após as consultas dos ambulatórios de cirurgia pediátrica, pediatria ou traumatologia. É importante esclarecer que os pacientes cirúrgicos se submeteriam a cirurgias eletivas.

#### *Aplicação de questionário*

Todas as crianças com asma foram submetidas a um questionário resumido e adaptado do estudo ISAAC, aplicado pelos investigadores.<sup>2</sup> A aplicação desse questionário teve por objetivo auxiliar no diagnóstico da asma e sua classificação.

---

*Realização de testes cutâneos para alérgenos comuns*

Todas as crianças com asma também foram submetidas a testes cutâneos para seis alérgenos ambientais comuns (*Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria alternata*, extrato de gramíneas, extrato de árvores e epitélio de gato), utilizando-se lancetas, com controle positivo com histamina e negativo com glicerina (laboratório ALK, Dinamarca). Os pacientes foram considerados atópicos se apresentassem teste positivo a pelo menos um dos alérgenos testados, definido pela presença de uma pápula com diâmetro  $\geq$  3mm do diâmetro médio do halo do controle negativo. O teste cutâneo era sempre realizado antes da coleta de sangue.<sup>2</sup>

*Realização de espirometria*

As espirometrias foram realizadas com o aparelho SuperSpiro<sup>®</sup> (Micro Medical, Reino Unido) e Koko (Ferraris, EUA). O teste foi realizado nos pacientes com asma, a partir de uma manobra expiratória forçada, sendo avaliados os seguintes parâmetros: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), relação VEF1/CVF e fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da CVF (FEF 25-75%).

Foram obtidas 3 curvas aceitáveis e pelo menos 2 curvas reprodutíveis, segundo os critérios estabelecidos pela American Thoracic Society (ATS). Após, o paciente recebia 400 mcg de salbutamol spray, com uso de espaçador. Aguardava-se 15 minutos e repetia-se o exame.<sup>2</sup> Foram utilizados como valores de referência os valores de Crapo/Polgar.

---

*Coleta de sangue*

Foram coletados 20 ml dos pacientes recrutados para o estudo, sendo utilizados para exames de rotina e nível sérico de IgE, e o restante, 10 ml, encaminhado para o IPB (Instituto de Pesquisa Biomédicas) do HSL- PUCRS, para análise e processamento da amostra. O sangue retirado dos pacientes foi cuidadosamente armazenado com heparina.

*Isolamento das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)*

As células mononucleares (linfomonócitos) de sangue periférico foram isoladas através da centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Histopaque (Sigma, USA) a 900g, por 30 minutos, e lavados 2 vezes com solução salina de Hanks (Sigma, USA). A contagem celular foi realizada por microscopia (100X). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul de tripan (Sigma USA). A seguir, as células foram cultivadas em triplicatas nas microplacas de 96 poços de fundo chato, numa concentração final de  $1,5 \times 10^5$  células/poço, em meio de cultura completa (RPMI-1640, com gentamicina a 0,5%, glutamina a 1%, HEPES a 1%, fungizona a 0,1% e soro fetal bovino a 10%, do Sigma, USA). As células mononucleares foram estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Murex Biotech Ltda, UK Gibco) em triplicatas na concentração de 1%, e cultivadas por 96 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.

*Teste de sensibilidade ao corticóide através do método de proliferação linfocitária*

Foram acrescentados nos poços de cultura de cada indivíduo, concentrações crescentes de dexametasona ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M, Sigma, USA). A proliferação linfocitária/viabilidade foi mensurada por ensaio colorimétrico (MTT) em leitor de ELISA. Os dados foram apresentados

---

como percentual da proliferação basal, onde 100% (basal) representa culturas de PHA a 1% sem corticóide.<sup>21</sup> A concentração da droga que inibe 50% (IC50) da proliferação linfocitária foi estimada pela regressão não-linear (Prism 4.0 Graphpad software, USA). Uma equação de dose-resposta sigmoidal foi escolhida para ajustar os dados ( $R^2$  maior do que 0,95).

#### *Resposta ao corticóide*

A resposta ou não resposta foi identificada através da análise final da curva de controle dose-resposta, testados em cultura com dexametasona. A área sob a curva (AUC) foi calculada pela regra trapezoidal. Pacientes com AUC de dexametasona acima da mediana foram classificados como não responsivos, enquanto pacientes com uma AUC abaixo deste valor foram considerados sensíveis ao corticóide *in vitro*.

#### *Análise estatística*

O cálculo do tamanho amostral não foi realizado devido a ausência de estudos em crianças. No entanto, foram utilizados as referências de estudos em adultos para um tamanho amostral de 60 pacientes (15 pacientes por grupo).

Para análise das variáveis sobre características dos pacientes estudados foi utilizado o teste ANOVA (variáveis numéricas) e teste qui-quadrado (variáveis qualitativas). Para a análise da proliferação linfocitária entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%. Os testes estatísticos foram realizados através do programa SPSS, versão 11.5.

---

*Considerações éticas*

No presente estudo, foi tomado o cuidado de evitar a retirada de sangue desnecessária, aproveitando-nos do momento da coleta de exames pré-operatórios ou de rotina nas crianças do grupo controle e incluindo outros exames que poderiam auxiliar no manejo dos pacientes com asma (hemograma e IgE total). Todos os procedimentos realizados foram explicados pela equipe ao paciente e familiares e só foram realizados após concordância do paciente e de seu responsável legal. Todos os pacientes tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável do paciente, antes da inclusão do mesmo no estudo.

---

## RESULTADOS

Foram recrutados para o estudo 75 pacientes. As características dos pacientes com asma leve, moderada e grave estão apresentadas na Tabela 1. Pacientes com asma leve apresentaram altos níveis de IgE sérico comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença nos resultados da função pulmonar entre os grupos estudados. Três pacientes com asma (um moderado e dois graves) não responderam ao broncodilatador. Os testes cutâneos foram positivos para atopia em 78% da amostra.

**Tabela 1:** Características dos pacientes com asma e grupo controle.

	Leve n=19	Moderada n=24	Grave n=14	Controle n=18
Sexo, masculino	8/19	8/24	8/14	13/18
Idade, anos	10.14 ± 0.44	9.875 ± 0.48	10.79 ± 0.59	9.28 ± 0.63
IMC	18.37 ± 0.76	19.28 ± 0.79	21.48 ± 1.08	-
Tratamento profilático (%)	12 (63)	24 (100)	14 (100)	-
VEF <sub>1</sub> , L	1.90 ± 0.11	2.01 ± 0.09	1.99 ± 0.16	-
VEF <sub>1</sub> % previsto	98.93 ± 3.10	104.48 ± 2.69	93.23 ± 5.13	-
VEF <sub>1</sub> /CVF	0.83 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.82 ± 0.03	-
Eosinófilos (sangue), %	5.76 ± 1.11	7.80 ± 0.96	6.38 ± 1.49	3.83 ± 0.69
Linfócitos (sangue), %	31.54 ± 4.44	32.13 ± 2.46	31.00 ± 4.77	43.83 ± 1.82
IgE, IU/ml*	1100.19 ± 197.57	700.13 ± 138.33	798.22 ± 157.04	138.45 ± 53.02

- variáveis quantitativas expressas como média±DP; IMC: índice de massa corpórea; VEF<sub>1</sub>: volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: capacidade vital forçada.

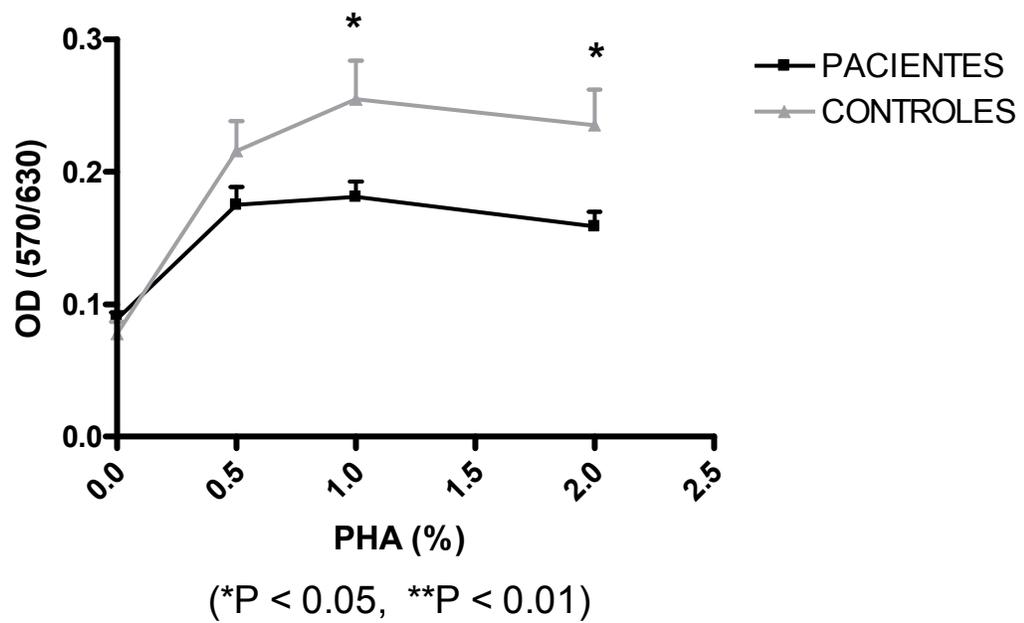
- \*  $p < 0.05$ , com o grupo com asma leve significativamente diferente do grupo controle.

*Proliferação dos linfócitos e sensibilidade aos glicocorticóides*

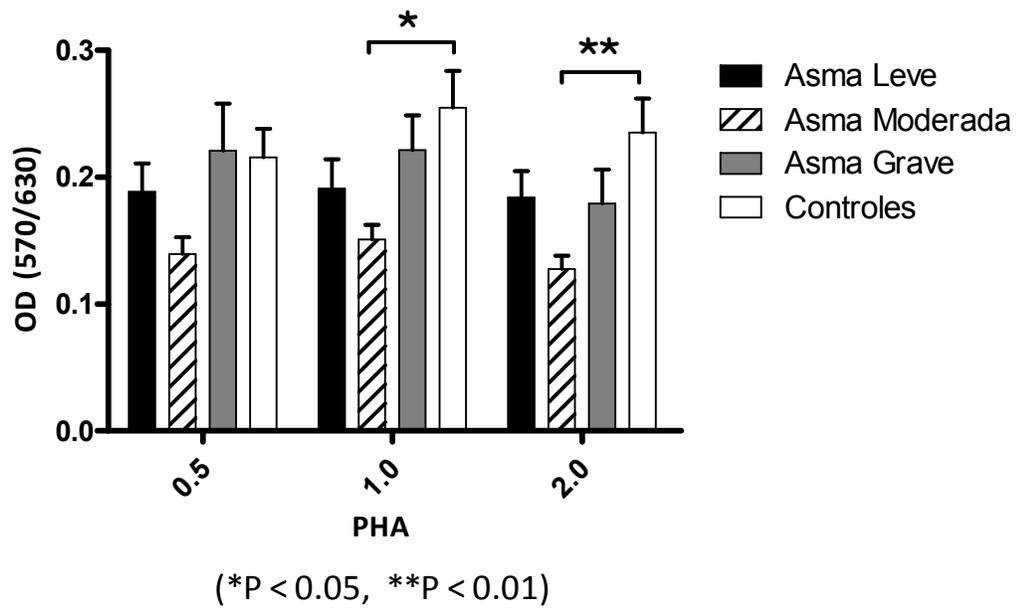
Foi avaliada a proliferação linfocitária induzida por mitógeno, como um índice da resposta imune celular. Os pacientes com asma (todos os grupos) apresentaram uma proliferação de linfócitos menor ( $p < 0,05$ ) do que o grupo controle (Figura 1). Quando os dados são analisados em relação a gravidade da doença, os pacientes com asma moderada apresentaram uma proliferação linfocitária menor do que o grupo controle ( $p < 0,05$ ), com fitohemaglutinina a 1% e 2% (Figura 2).

No teste da sensibilidade ao GC, não houve diferença entre todos os pacientes com asma e o grupo controle. No entanto, foi observado uma reduzida sensibilidade dos pacientes com asma leve para DEX *in vitro* ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Curiosamente, pacientes com asma grave apresentaram uma sensibilidade ao GC semelhante ao grupo controle.

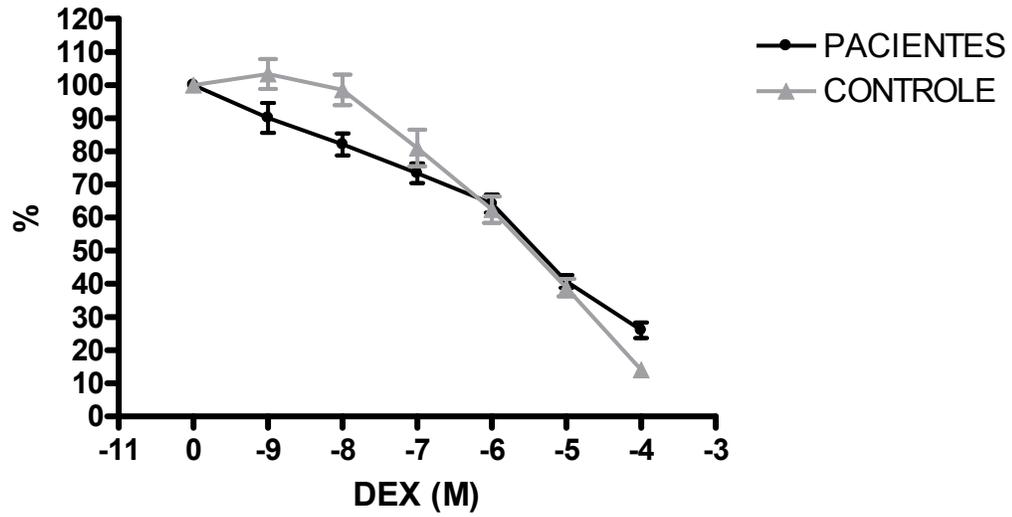
---



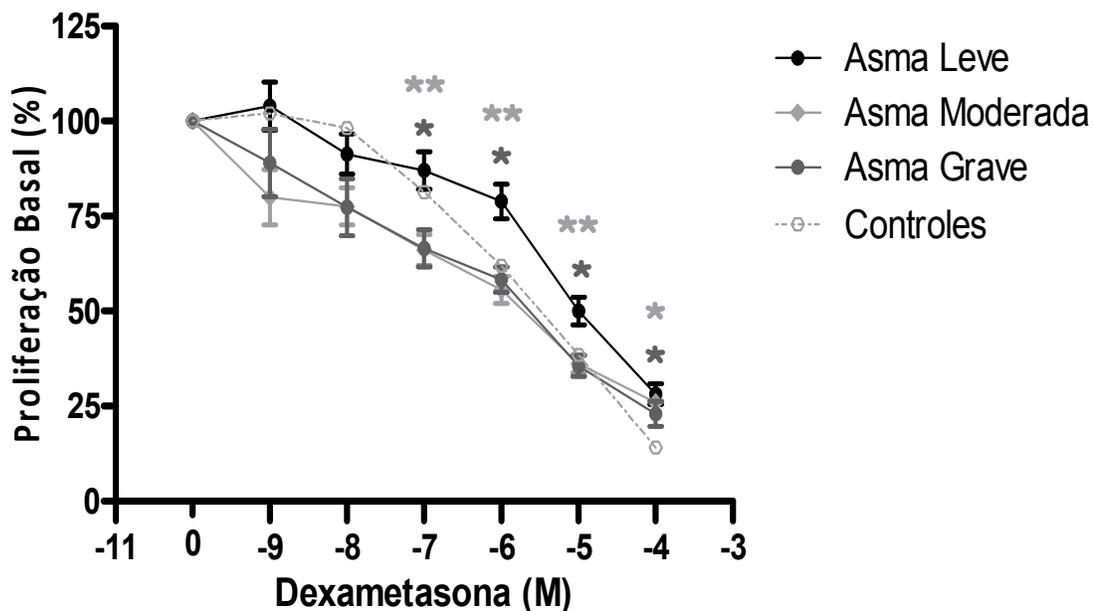
**Figura 1:** Proliferação linfocitária de sangue periférico, com estimulação com fitohemaglutinina (PHA) em concentrações crescentes, comparando os pacientes com asma e o grupo controle.



**Figura 2:** Avaliação da proliferação dos linfócitos T em sangue periférico, conforme a gravidade da asma, comparando com o grupo controle.



**Figura 3:** Sensibilidade a dexametasona em cultura de linfomonócitos de sangue periférico, demonstrando ausência de diferença significativa entre os pacientes com asma e o grupo controle.



**Figura 4:** Sensibilidade a dexametasona em cultura de linfomonócitos de sangue periférico, comparando os grupos em relação a gravidade da asma. Diferenças estatisticamente significativas indicadas: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  para pacientes com asma leve, quando comparados ao grupo controle.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar a sensibilidade *in vitro* dos linfócitos de sangue periférico em crianças com asma. Resistência ao GC em adultos com asma grave tem sido amplamente demonstrada.<sup>9,10,14</sup> No entanto, a presença de resistência ao GC em crianças com asma não foi estudada até o presente. Curiosamente, nossos dados demonstraram ausência de resistência ao GC em crianças escolares com asma grave, sugerindo que este aspecto clínico não tenha uma origem inata.

No presente estudo, foi observado que crianças com asma moderada apresentam proliferação linfocitária significativamente reduzida quando comparada ao grupo controle. Além disto, crianças com asma, independente da gravidade, apresentaram também proliferação linfocitária significativamente menor do que crianças saudáveis. Uma das possíveis explicações para estes achados pode estar relacionada ao uso contínuo de GC profilático e conseqüente efeito potencial deste fármaco nas células T. Evidências recentes sugerem que efeitos imunológicos periféricos podem ser observados com o uso de GC.<sup>15</sup> O tratamento com GC inalatório pode promover diferenciação de células T reguladoras, com expressão aumentada de FOXP3, em PBMC de pacientes com asma moderada e grave.<sup>16</sup> Outro estudo também demonstrou uma associação entre aumento de linfócitos CD4+CD25+ em pacientes com asma moderada e grave.<sup>17</sup> Esses achados sugerem que o uso tópico de GC pode inibir a resposta celular linfocitária, possivelmente por efeito nas células T reguladoras.

Em relação a sensibilidade dos linfócitos T ao GC, observamos que a gravidade da asma parece interferir neste aspecto. Crianças com asma leve apresentaram uma

---

sensibilidade menor do que pacientes com asma mais grave (Figura 4). Esses resultados são discrepantes quando comparados a estudos prévios em adultos.<sup>9,10,14</sup> Em adultos, a resistência ao GC é observada em pacientes com asma grave. O tratamento farmacológico pode ser uma das explicações para estes resultados controversos. Estudos recentes têm demonstrado que o uso de  $\beta$ 2-agonistas aumentam a sensibilidade ao GC.<sup>18,19</sup> Considerando que crianças com asma moderada e grave utilizam mais  $\beta$ 2-agonistas, isto poderia explicar nossos resultados com sensibilidade ao GC menor em crianças com asma mais leve.

Na opinião dos autores, o achado mais importante e original deste estudo é a observação de que crianças com asma grave não apresentam resistência ao GC. Vários estudos prévios demonstraram que um subgrupo de adultos com asma grave são resistentes ao GC clinicamente e *in vitro*. Em adultos com asma de difícil controle, aproximadamente 25% dos pacientes são clinicamente resistentes ao GC.<sup>20,21</sup> Além disto, em pacientes com asma definidos como não sensíveis ao GC, células mononucleares de sangue periférico são menos inibidas pelo GC *in vitro*.<sup>9,10</sup> Mais recentemente, Hew et al. demonstraram que adultos com asma grave são mais resistentes ao GC quando comparados àqueles com doença mais leve.<sup>14</sup>

Nossos achados sugerem que a resistência ao GC em asma é um processo adquirido, ou auxiliado pela idade ou induzido por citocinas pró-inflamatórias. Em relação a idade, existem evidências consistentes de que a idade pode estar associada a sensibilidade ao GC. Recém-nascidos são altamente sensíveis ao GC, e esta sensibilidade atinge características da idade adulta já no primeiro ano de vida.<sup>22</sup> Nosso

---

grupo demonstrou também, em um estudo prévio, que idosos apresentam uma sensibilidade ao GC em células mononucleares menor do que pacientes mais jovens.<sup>23</sup> O tipo de resistência ao GC, quanto a ser inato ou adquirido, tem sido descrito e classificado por especialistas no assunto. A asma resistente ao GC do tipo I (também chamada de adquirida ou induzida por citocinas) é uma condição complexa e pouco compreendida.<sup>24</sup> Esta resistência adquirida parece representar 95% das asma resistentes ao GC em adultos. Nossos resultados reforçam estas hipóteses, demonstrando que crianças e adolescentes com asma grave não apresentam nenhum grau de insensibilidade ao GC.

A elevada positividade de teste cutâneo (80%) e os altos níveis de IgE total das crianças com asma na amostra estudada reforçam a característica atópica desses pacientes. A ausência de diferença na função pulmonar entre os grupos de crianças com asma pode ser explicado pelo uso de medicação profilática das crianças em acompanhamento. As crianças com asma grave eram classificadas como tal no início do estudo, mas a maioria encontrava-se com controle da doença no momento da avaliação.

Uma das limitações do nosso estudo é que a análise de sensibilidade ao GC em sangue periférico pode não refletir a resposta imune do tecido pulmonar. No entanto, foi demonstrado que macrófagos alveolares de adultos com asma grave apresentam resistência ao GC,<sup>25</sup> como outros trabalhos que analisaram a resposta em sangue periférico.<sup>9,14</sup> Na mesma linha de pensamento, um outro estudo mostrou uma correlação de níveis de quimiocinas entre escarro e plasma de pacientes com exacerbação de asma ou DPOC.<sup>26</sup> Por outro lado, nós demonstramos que, em lactentes com bronquiolite aguda, a produção de algumas citocinas não apresentam correlação significativa entre

---

secreção das vias aéreas e cultura de linfomonócitos em sangue periférico.<sup>27</sup> No entanto, a análise *in vitro* da sensibilidade ao GC em sangue periférico utilizado no presente estudo é o método aplicado por outros autores nesse tipo de estudo,<sup>9,10,14</sup> demonstrando que este tem sido o método de escolha para avaliar, até o presente, a resposta imune celular em doenças inflamatórias.

Concluindo, nossos resultados apresentam relevância clínica, sugerindo que a resistência ao GC é um processo adquirido na asma atópica, provavelmente causado por inflamação tecidual contínua e/ou uso prolongado de GC. Entender melhor os mecanismos de desenvolvimento de resistência ao GC na asma pode ser útil para estabelecer estratégias de melhor manejo ao longo prazo de pacientes com doença grave, reduzindo a morbidade da doença na idade adulta.

---

**REFERÊNCIAS**

1. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002;28(Supl. 1).
  2. The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC). *Eur Respir J* 1998;12:315-35.
  3. Pitrez PM, Stein RT. Asthma in Latin America: the dawn of a new epidemic. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:378-83.
  4. Official American thoracic society workshop report, ATS board of directors. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2341-51.
  5. Barnes PJ. A new approach to the treatment of asthma. *N Eng J Med* 1989;321:1517-27.
  6. Alvarez J, Surs W, Leung DYM, Iklé D, Gelfand EW, Szeffler SJ. Steroid-resistant asthma: immunologic and pharmacologic features. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:714-21.
  7. Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:836-44.
  8. Schwartz HJ, Lowell FC, Melby JC. Steroid resistance in bronchial asthma. *Ann Int Med* 1968;69:493-99.
-

- 
9. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Szeffler SJ, Tsai JJ, Frew AJ, et al. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1016-25.
  10. Spahn JD, Landwehr LP, Nimmagadda S, Surs W, Leung DYM, Szeffler SJ. Effects of glucocorticoids on lymphocyte activation in patients with steroid-sensitive and steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1073-9.
  11. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2005;56:515-48.
  12. Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024:86-101.
  13. Dostert A, Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 2004;10:2807-16.
  14. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:134-41.
  15. Chapman KR. The impact of budesonide and other inhaled corticosteroid therapies in the management of asthma in children and adults. *Clin Ther* 2003;25 Suppl C:C2-C14.
  16. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, et al. Glucocorticoids upregulate foxp3 expression and regulatory t cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1425-1433.
-

- 
17. Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. The levels of cd4+cd25+ regulatory t cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 2007;148:53-63.
  18. Johnson M. Interactions between corticosteroids and beta2-agonists in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:200-206.
  19. Usmani OS, Ito K, Maneechotesuwan K, Ito M, Johnson M, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:704-712.
  20. Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD. Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:594-601.
  21. Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:410-8.
  22. Heijnen CJ, Kavelaars A. The importance of being receptive. *J Neuroimmunol* 1999;100:197-202.
  23. Luz C, Collaziol D, Preissler T, da Cruz IM, Glock L, Bauer ME. Healthy aging is associated with unaltered production of immunoreactive growth hormone but impaired neuroimmunomodulation. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:90-99.
  24. Leung DYM, Bloom JW. Update on glucocorticoid and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22.
-

25. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Torrego A, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* 2008;63:784-790.
26. Daldegan MB, Teixeira MM, Talvani A. Concentration of ccl11, cxcl8 and tnf-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1359-1365.
27. Pitrez PM, Ponzi D, Machado DC, Bauer M, Jones MH, Stein RT. Discrepancy between cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and nasal secretions among infants with acute bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;92:659-62.
28. Sher ER, Leung DY, Sure W, Kam JC, Zleg G, Kamada AK, et al. Steroid-resistant asthma. *J Clin Invest* 1994;93:33-9.
-

---

## **CAPÍTULO IV**

---

## 4 CONCLUSÕES

1. Resistência ao glicocorticóide em cultura de linfomonócitos de sangue periférico não foi observada em crianças com asma persistente grave. Este achado, baseado nos resultados de estudos com pacientes adultos com asma grave, sugere que a resistência ao glicocorticóide é um processo adquirido.
  2. Crianças com asma persistente apresentam uma sensibilidade ao glicocorticóide semelhante a crianças saudáveis. No entanto, foi observada uma sensibilidade menor ao glicocorticóide em crianças com asma leve, quando comparada ao grupo controle.
  3. Crianças com asma persistente, particularmente aquelas com asma moderada, apresentam uma proliferação linfocitária em sangue periférico menor do que crianças saudáveis.
-

---

# **ANEXO**

---

**Anexo - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Porto Alegre, \_\_\_\_\_****Resistência ao corticóide em cultura de células mononucleares de sangue periférico em pacientes pediátricos com asma grave.**

Esta carta tem como objetivo convidar seu filho(a) a participar de um trabalho sobre asma brônquica que está sendo conduzido pela Equipe de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS.

A asma brônquica é uma doença crônica dos brônquios, muito freqüente no Rio Grande do Sul, usualmente secundária a fatores ambientais (fumaças, poeiras, umidade), genéticos (de pai para filho), imunológicos (defesas do organismo). Clinicamente, o paciente apresenta respiração rápida, falta de ar, tosse com encatarramento e “chiado” no peito persistente que podem ser de intensidade leve ou grave. Na confirmação diagnóstica, sintomas clínicos e história compatível são na maioria das vezes suficientes, mas exames de sangue auxiliam na confirmação do diagnóstico e provas de função pulmonar servem para mostrar o grau de comprometimento pulmonar do paciente e a resposta ao medicamento utilizado pelo mesmo.

O uso de broncodilatadores (Berotec®, Aerolin®) na forma de nebulização ou spray oral (bombinha), combinado com corticóide (potente medicamento antiinflamatório, que diminui a inflamação dos brônquios), na maioria das vezes é suficiente para o tratamento da crise de asma. Pacientes com sintomas mais freqüentes ou graves necessitam do uso diário de corticóide inalatório (bombinhas), para controle das crises. Para alguns destes pacientes, o corticóide pode não ter efeito, devendo-se optar por outro tipo de tratamento.

Apesar da freqüência e da gravidade desta doença, pouco ainda se conhece sobre o motivo pelo qual uma criança desenvolve este problema, e porque em algumas a doença é grave sem efeito benéfico dos corticóides.

O objetivo deste trabalho é verificar como o sistema de defesa do organismo responde ao corticóide, através de uma análise no sangue, comparando esses pacientes com crianças saudáveis, verificando se a medicação prescrita ao seu filho está fazendo efeito.

Gostaríamos de contar com sua colaboração no sentido de autorizar a coleta de sangue de seu filho(a). A coleta será programada junto com o médico assistente para que seja realizada no mesmo momento de alguma coleta de exames de rotina. Não haverá coleta de sangue exclusiva para este fim, nem procedimentos que prejudiquem o bem-estar de seu filho. O material coletado (10ml) será enviado ao Instituto de Pesquisas Biomédicas para ser processado e analisado. Todos os resultados e dados pessoais coletados para esta pesquisa serão confidenciais.

Seu filho também realizará o teste de função pulmonar, que consiste em fazer uma respiração forçada junto a um aparelho conectado ao computador, que avaliará como está o pulmão do seu filho. Este exame, realizado de rotina em crianças com asma, será feito no mesmo momento da coleta de sangue.

A participação de seu filho neste estudo é muito importante, pois possibilitará uma melhor compreensão do tratamento de crianças com asma grave, podendo auxiliar futuramente em melhorias do manejo destes pacientes.

Eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo paciente \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre os procedimentos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. As minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei

que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento, através da Dra. Rejane no telefone (51)9817-8995 ou (51)3320-3000, R:2461 ou Dr. Paulo Márcio no telefone (51)3320-3000 R:2221. Além disto, sei que esta pesquisa possui o aval do Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital, que poderei contactar através do CEP 33203345. Novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa pela equipe de Pneumologia Pediátrica se assim o quiser, sem haver prejuízo no atendimento ao meu filho(a).

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Desta forma, autorizo a inclusão de meu filho (a) neste estudo.

---

Assinatura do responsável

---

Assinatura do investigador principal

---