
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA
TESE DE DOUTORADO**

LIANA ANTUNES

Avaliação do perfil de células iNKT em crianças com asma severa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez
Coorientadora: Profa Dra Ana Paula Duarte

Porto Alegre
2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL PUCRS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**Avaliação do perfil de células iNKT em crianças com asma
severa**

LIANA ANTUNES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina /Pediatría e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez
Coorientadora: Profa Dra Ana Paula Duarte

Porto Alegre

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A636a Antunes, Liana

Avaliação do perfil de células iNKT em crianças com asma severa / Liana Antunes. – Porto Alegre, 2015.
78 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde da Criança) – Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.
Coorientadora: Profª. Dra. Ana Paula Duarte.

1. Medicina. 2. Pediatria. 3. Asma/imunologia. 4. Células Matadoras Naturais.
I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Duarte, Ana Paula.
III. Título.

CDD 616.23
CDU 616.248-053.2
NLM WF 553

**Ficha Catalográfica elaborada por Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer” (Mahatma Gandhi)

Dedicatória

Aos meus pais Aquino e Rosmeri, pela compreensão da minha ausência, amor incondicional e incentivo constante na realização desse projeto.

Aos meus irmãos Douglas e Glauber, pelo apoio.

A família Taborda, que sempre torceu pela minha vitória.

AGRADECIMENTOS

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

A minha família, em especial aos meus pais Aquino e Rosmeri Antunes, que sempre me confortaram nos momentos difíceis com palavras de carinho e orações. Obrigada pelo exemplo de caráter e perseverança. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu “namorado” Felipe Dalpiaz, que compreendeu minha ausência, meu nervosismo, minhas preocupações e meus choros nos momentos difíceis. Obrigada por estar ao meu lado nessa conquista. Ela ficou mais leve e doce quando você entrou na minha vida. Te amo!

Ao meu orientador Paulo Márcio Condessa Pitrez, que além de orientador era um “pai”, com um coração enorme e uma humildade incrível, mesmo diante de tanto conhecimento e ocupando posições importantes na Universidade. Obrigada por compreender minha ausência e por se um exemplo de profissional o qual sempre me espelharei.

A minha co-orientadora, que considero uma “mãe” por sempre estar disposta a me ajudar (inclusive aos sábados), compreender minha ausência e confiar no meu trabalho. Obrigada por tudo que fizeste por mim nessa jornada. Tenho-te como exemplo na minha vida.

A colega e amiga Patrícia Dias de Araújo, que viveu comigo cada momento dessa conquista. Obrigada por ter me ajudado em todas as fases desse projeto. Levo-te no coração.

A secretária Elis, pela amizade e palavras de incentivo. Obrigada por não me deixar desanimar, mesmo diante das dificuldades.

A secretária do programa de Pós-Graduação, Carla Carmo de Melo Rothmann, pelas orientações e auxílios durante todo o doutorado. Obrigada pelo teu carinho comigo.

A todos os colegas dos laboratórios do IPB que de uma maneira ou outra me auxiliaram na conclusão desse trabalho.

A PUCRS, pela bolsa de incentivo a pesquisa concedido.

RESUMO

Introdução: Células invariante de células NK (iNKT) desempenham funções complexas no sistema imune, liberando citocinas do tipo Th1 e Th2. O papel das células invariante de células NK (iNKT) na asma em humanos ainda é controverso e nunca foi descrito em crianças com asma grave resistente à terapia (AGRT).

Objetivo: Analisar a frequência de células iNKT no sangue periférico de crianças com asma grave resistente à terapia (AGRT), comparando com crianças com asma leve e controles saudáveis.

Métodos: Este é um estudo de caso-controle onde foi coletado sangue de crianças asmáticas com asma leve e AGRT (n=136) com idade entre 11.01±1.69 e controles saudáveis (n=40) com idade entre 11.21±1.16 anos. A fração mononuclear do sangue periférico (PBMC) foi isolada, marcada com anti-CD3⁺ e anti-iNKT (Vα24Jα18) e analisada no citômetro de fluxo. A atopia foi definida através da medição dos níveis plasmáticos de IgE. A inflamação das vias aéreas foi avaliada através da expectoração induzida.

Resultados: As crianças com asma (n = 136) apresentaram um aumento da frequência de células iNKT⁺CD3⁺ (média: 2.31%±4.41), quando comparadas com os controles saudáveis (n=40) (média: 0.48%±0.79 p=0.02). Crianças com asma leve (n = 99) apresentaram um aumento da frequência de células iNKT (2.65%±4.91; p = 0.002) quando comparadas com as crianças com AGRT (n = 11) (2.05%±1.62). Crianças com AGRT mostraram um aumento da frequência das células iNKT (2.05%±1.62) quando comparadas com os controles saudáveis (0.48%±0.79; p = 0.002). O número de células iNKT não foi diferente entre atópicos (n = 127) e não-atópicos (n = 45), com média de 2.25% ± 4.55 e 1.01% ± 1.46 respectivamente. Além disso, as células iNKT não foram associadas com nenhum padrão inflamatório (eosinofílico n = 18; neutrofílico n = 23; misto n = 31; paucicelular n = 5) estudado no escarro induzido (p=0.09).

Conclusão e Relevância Clínica: Nossos dados sugerem que as células iNKT desempenham um papel na asma pediátrica, uma vez que estava aumentada nas crianças asmáticas; entretanto, essas células não estão associadas com a atopia ou com o espectro mais severo da doença.

Palavras-chave: iNKT, asma, crianças, AGRT.

ABSTRACT

Background: Invariant natural killer T (iNKT) cells play complex functions in the immune system, releasing both Th1 and Th2 cytokines. The role of iNKT cells in human asthma is still controversy and never described in severe therapy asthmatic children (STRA).

Objective: To analyse iNKT frequency in peripheral blood of children with severe therapy-resistant asthma (STRA), comparing with children with milder asthma and healthy controls.

Methods: This is a case-control study where blood was collected from asthmatic children (n=136) (milder and STRA) and healthy controls (n=40). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated, stained with anti-CD3 and anti-iNKT (V α 24J α 18), and analysed through flow cytometry. Atopic status was defined by measuring specific IgE in serum. Airway inflammation was assessed through induced sputum.

Results: Children with asthma (n = 136) presented an increased frequency of CD3⁺iNKT⁺ cells (mean 2.31% SD 4.41), compared to healthy controls (n = 40) (mean 0.48% SD 0.79) (p = 0.02). Mild-asthmatic children (n = 99) showed an increased frequency of iNKT cells (2.65% SD 4.91; p = 0.002) compared to STRA (n = 11) (2.05% SD 1.62). STRA children have shown an increase frequency of iNKT cells (2.05% SD 1.62) than controls (0.48% SD 0.79; p = 0.002). The number of iNKT cells was not different between atopic (n = 127) and non-atopic (n = 45) children. In addition, iNKT cells were not associated with any inflammatory pattern of induced sputum studied classified as eosinophilic (n = 18), neutrophilic (n = 23), mixed (n = 31) (eosinophilic and neutrophilic) and pauci-granulocytic (n = 5). However, iNKT cell numbers were not associated with any airway inflammatory pattern (p=0.09)

Conclusion and Clinical Relevance: Our data suggested a role to iNKT in paediatric asthma since it increased in asthmatic children; however these cells are not associated with atopic status or with the more severe spectrum of the disease.

Keywords: iNKT, asthma children, STRA.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Subtipos de células NKT e suas características..... 27

Tabela 2. Principais estudos que avaliaram iNKT em pacientes com asma..... 35

CAPÍTULO III

Table 1. Age, gender and atopic status of the subjects studied..... 50

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Fluxograma da seleção dos artigos. 25
- Figura 2.** Ativação das células iNKT e linfócitos Th2 contribuindo para a hiper-reatividade e a inflamação das vias aéreas. Produção de citocinas do tipo Th2, IgE e ativação de mastócitos 28

CAPITULO III

- Figure 1.** (A) A representative flow cytometric analysis performed in children with asthma and controls. (B) PBMCs were collected from asthmatic (n = 136) and control (n = 40) children and stained with anti-CD3 APC (SK7) and anti-iNKT V α 24J α 18 FITC (6B11) (BD Bioscience®, USA) to assess the presence of invariant natural killer T (iNKT) (1A)..... 50
- Figure 2.** Analysis of the frequencies of peripheral blood CD3+TCRV α 24/J α 18+ invariant natural killer T (iNKT) in children with atopic and non atopic asthma. 51
- Figure 3.** Comparative analysis between iNKT cell numbers and the different patterns of inflammation in induced sputum through inhalation of saline solution concentration of 4.5% if VF1>70% and physiological solution concentration of 0.9% if VEF1<70%. 52
- Figure 4.** A representative plot of the frequencies of peripheral blood CD3+TCRV α 24/J α 18+ invariant natural killer T (iNKT) in controls (n=40), non-severe (n=99) and severe (n=11) asthmatic children 53
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS

AHR	Hiper-responsividade das vias aéreas
Anti-CD3	Anticorpo monoclonal anti-CD3
Anti-iNKT	Anticorpo monoclonal anti-iNKT
ASRT	Asma severa resiste à terapia
Cd1D	grupamento de diferenciação 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
IFN-γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNKT	Invariante da célula natural killer
LBA	Lavado bronco-alveolar
MS	Ministério da Saúde
NKT	Célula T natural killer
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
RPMI	Instituto Parque Memorial Roswall
RS	Rio Grande do Sul
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Célula T <i>helper</i> do tipo 2
Th2	Célula T <i>helper</i> do tipo 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral - alfa
VEF1	Volume expiratório final

α -GalCer α -galactosil ceramida

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 JUSTIFICATIVA	15
1.3 OBJETIVOS	16
1.3.1 Objetivo Geral	16
1.3.2 Objetivos Específicos	16
1.4 REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO II.....	19
2.1 ARTIGO DE REVISÃO	20
CAPÍTULO III	42
3.1 ARTIGO ORIGINAL	43
CAPÍTULO IV.....	61
4.1 CONCLUSÃO	62
ANEXOS	64
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CONEP	65
ANEXO 2 – APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL	72

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A asma atinge em torno de 300 milhões de indivíduos ao redor do mundo. Essa doença crônica das vias aéreas é considerada um problema de saúde pública mundial e sua prevalência aumentou muito nas últimas duas décadas, atingindo principalmente as crianças [1,2].

No Brasil, a asma é a terceira causa de hospitalização e a quarta causa de morte por doenças respiratórias. Segundo dados do Ministério da Saúde (MS), no período de 1998 a 2009, houve 31.843 mortes registradas por asma. A Organização Pan-americana de Saúde estima que no Brasil existam aproximadamente 15 milhões de pessoas com asma, o que corresponde a 350 mil internações hospitalares por ano, segundo os dados do Sistema Único de Saúde (SUS) [3]. Com o aumento da população mundial urbana, estima-se que em 2025 haverá 100 milhões de pessoas a mais no mundo com asma [4].

A asma é uma doença multifatorial que está diretamente relacionada com fatores ambientais e genéticos, podendo apresentar diversos fenótipos [5]. Dentre os fenótipos, os mais comuns e estudados são o de origem atópica (alérgica) e não atópica. A asma atópica, que se desenvolve muitas vezes no início da vida, apresenta histórico familiar de doença alérgica e resposta inflamatória mediada pela produção de citocinas do tipo Th2, como interleucina (IL)-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 [6, 7]. IL-4 e IL-13 estimulam a síntese de imunoglobulina E (IgE), assim como IL-13, juntamente com IL-3 e IL-9, contribuem para a diferenciação e ativação de mastócitos [6]. Por sua vez, a IL-5, juntamente com a IL-3, promovem a maturação e o recrutamento de eosinófilos e basófilos, células que também estão envolvidas na fisiopatogenia da asma atópica, contribuindo para a obstrução e hiper-responsividade brônquica (HRB) [6]. A asma não-atópica (intrínseca) apresenta sintomas clínicos semelhantes aos pacientes com asma atópica, mas teste cutâneo negativo, baixos níveis de IgE e ausência de histórico familiar [7-10].

Os principais sintomas observados em pacientes com asma são sibilância, sensação de aperto no peito, falta de ar e tosse. Além disso, podemos observar a diminuição da

função pulmonar, com redução dos fluxos expiratórios forçados. Esses sintomas podem ser revertidos com a administração de β -2 agonistas inalatórios e corticoides, apresentando-se de forma crônica ou recorrente [5]. No entanto, alguns pacientes com diagnóstico de asma e que recebem medicação adequada não respondem de maneira efetiva a terapia convencional, sendo considerados indivíduos com asma grave resistente à terapia (AGRT). Na criança, a asma é prevalente, podendo comprometer bastante a qualidade de vida, particularmente naqueles pacientes com doença grave (aproximadamente 10% dos casos) [11].

Apesar de a asma ser mais comumente considerada uma doença imunologicamente mediada por citocinas do tipo Th2, outros subtipos de células T estão envolvidas. Considerada atualmente uma doença muito complexa e heterogênea, esses subtipos celulares parecem promover uma interação multifatorial entre o tipo de resposta imunológica, fatores genéticos e ambientais na fisiopatogenia da asma, sugerindo que respostas do tipo Th2 podem não ser essenciais para o desenvolvimento da doença [12-14].

A célula NKT (“célula T natural killer”), célula classificada como um subgrupo dos linfócitos que apresenta características de célula T e NK representa uma ligação entre a resposta imune inata e adaptativa [13]. Essas células podem ativar ou suprimir a resposta imune, atuando de forma protetora em algumas doenças como infecções e câncer, mas também podendo exercer uma ação patogênica em doenças pulmonares, como pneumonia e asma (13). Recentemente, alguns estudos tem descrito uma nova população de células T, denominadas invariante de células NK (iNKT), ou célula iNKT do tipo I, que parecem estar envolvidas na fisiopatogenia da asma (12-14). Essas células são caracterizadas pela expressão de receptores $V\alpha 14$ e $J\alpha 18$ em camundongos, e $V\alpha 24$ e $J\alpha 18$ em humanos [12, 14].

O α -GalCer (α -galactosil ceramida) é o ligante para as células iNKT, que é extraído de uma esponja marinha denominada *Agelas mauritanus*. Esse antígeno se liga ao receptor CD1d presente na célula dendrítica, e seu reconhecimento pela célula iNKT ocorre através da ativação do receptor $V\alpha 14$ em camundongos, e $V\alpha 24$ em humanos. A célula iNKT ativada induz uma resposta imunológica do tipo Th1, com produção de $IFN\gamma$, e uma resposta do tipo Th2, através da produção de IL-4, IL-5, IL-13 e TNF- α (fator de necrose tumoral - alfa), atuando de forma a exacerbar a resposta alérgica [12, 14, 15]. Akbari e colaboradores, 2006, relataram que mais de 60% das células T $CD4^+$ presentes no lavado

bronco-alveolar de pacientes com asma eram células iNKT, enquanto pacientes saudáveis e pacientes com sarcoidose não apresentavam essas células [16]. Outros estudos mostraram que as células iNKT não estão aumentadas em pacientes com asma, mostrando um reduzido número de células iNKT observado nas vias aéreas de controles, pacientes asmáticos e com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) [17].

Considerando-se as diferentes metodologias utilizadas, assim como, o local distinto de obtenção e a escassa evidência sobre o papel das células iNKT, pretendemos analisar a frequência destas células em crianças com asma, comparando as diferentes apresentações de gravidade da doença.

1.2 JUSTIFICATIVA

Muitas hipóteses tem surgido em relação à presença das células iNKT em pacientes adultos com asma. Todavia, um número pequeno de pesquisadores descreveu o papel dessa célula na fisiopatogenia da asma em crianças. Além disso, esses estudos apresentam um número reduzido de participantes asmáticos e controles [18, 19].

Essa célula está presente não só em sangue periférico, como também em lavado broncoalveolar e biópsias de tecido pulmonar de pacientes, com elevada quantidade de células iNKT [16]. Ainda não se sabe como essas células se acumulam nas vias aéreas e como são ativadas, não se compreendendo se elas são ativadas e proliferam no pulmão dos pacientes com asma, ou se as células ativadas migram de órgãos linfoides para o pulmão[12].

As pesquisas realizadas com células iNKT podem nos fornecer uma melhor compreensão da resposta imune na asma, além de mostrar resultados promissores em relação a novas terapias que podem ser desenvolvidas, através da compreensão do seu mecanismo de ação e sua função imuno-reguladora.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a frequência de células iNKT em crianças com asma atópica, não-atópica e saudáveis (controle) de uma população de escolares de Porto Alegre-RS.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a frequência de células iNKT entre os pacientes com asma e os saudáveis (controle);
 - Relacionar a frequência das células iNKT com o padrão de inflamação das vias aéreas através da celularidade do escarro;
 - Relacionar a frequência de células iNKT com a severidade da doença.
-

1.4 REFERÊNCIAS

1. Fiori NS, Goncalves H, Dumith SC, Cesar MA, Menezes AM, Macedo SE. Ten-year trends in prevalence of asthma in adults in southern Brazil: comparison of two population-based studies. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*. 2012;28(1):135-44. Epub 2012/01/24.
 2. Magnus P, Jaakkola JJ. Secular trend in the occurrence of asthma among children and young adults: critical appraisal of repeated cross sectional surveys. *BMJ*. 1997;314(7097):1795-9. Epub 1997/06/21.
 3. de Souza-Machado C, Souza-Machado A, Cruz AA. Asthma mortality inequalities in Brazil: tolerating the unbearable. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:625829. Epub 2012/05/26.
 4. Jucá SCBMP, Takano OA, Moraes LSL, Guimarães LV. Prevalência e fatores de risco para asma em adolescentes de 13 a 14 anos do Município de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil Asthma prevalence and risk factors in adolescents 13 to 14 years of age in Cuiabá, Mato Grosso. *Cad Saúde Pública*. 2012;28(4):689-97.
 5. Edwards MR, Bartlett NW, Hussell T, Openshaw P, Johnston SL. The microbiology of asthma. *Nature reviews Microbiology*. 2012. Epub 2012/06/07.
 6. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine*. 2012;18(5):673-83. Epub 2012/05/09.
 7. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature medicine*. 2012;18(5):716-25. Epub 2012/05/09.
 8. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*. 1999;54(3):268-72. Epub 1999/05/18.
 9. Wuthrich B. Atopic dermatitis flare provoked by inhalant allergens. *Dermatologica*. 1989;178(1):51-3. Epub 1989/01/01.
 10. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunology today*. 1999;20(11):528-33. Epub 1999/10/26.
 11. Kroegel C. Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines: 15 years of application. *Expert review of clinical immunology*. 2009;5(3):239-49. Epub 2010/05/19.
 12. Iwamura C, Nakayama T. Role of NKT cells in allergic asthma. *Current opinion in immunology*. 2010;22(6):807-13. Epub 2010/12/01.
-

13. Rijavec M, Volarevic S, Osolnik K, Kosnik M, Korosec P. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respiratory medicine*. 2011;105 Suppl 1:S20-5. Epub 2011/11/02.
 14. Oki S, Miyake S. Invariant natural killer T (iNKT) cells in asthma: a novel insight into the pathogenesis of asthma and the therapeutic implication of glycolipid ligands for allergic diseases. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2007;56(1):7-14. Epub 2007/01/30.
 15. Akbari O. The role of iNKT cells in development of bronchial asthma: a translational approach from animal models to human. *Allergy*. 2006;61(8):962-8. Epub 2006/07/27.
 16. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlström J, Kronenberg M, et al. CD4+ invariant T-cell–receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(11):1117-29.
 17. Vijayanand P, Seumois G, Pickard C, Powell RM, Angco G, Sammut D, et al. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(14):1410-22.
 18. Yan-ming L, Lan-fang C, Chen L, Ya-qin L, Wei C, Wen-ming Z. The effect of specific immunotherapy on natural killer T cells in peripheral blood of house dust mite-sensitized children with asthma. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:148262. Epub 2012/09/26.
 19. Zedan MM, El-Chennawi FA, Fouda AE. Interleukin-12 and peripheral blood invariant natural killer T cells as an axis in childhood asthma pathogenesis. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. 2010;9(1):43-8. Epub 2010/06/16.
-

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro estudo que descreve o papel das células iNKT em crianças com asma grave resistente à terapia (AGRT). Nossos dados sugerem que as células iNKT desempenham um papel na asma pediátrica, uma vez que estava aumentada nas crianças asmáticas. Entretanto, essas células não estão associadas com a atopia ou com o espectro mais severo da doença.

Apesar da compreensão da função das células iNKT na asma ter progredido consideravelmente nos últimos anos, a literatura científica ainda não é clara em relação ao verdadeiro mecanismo de ação dessa célula em adultos e crianças com asma. Até o presente momento, não sabemos como essas células se acumulam nas vias aéreas e como são ativadas. Ainda não está claro se as células iNKT são ativadas e proliferam-se no pulmão dos pacientes com asma, ou se as células ativadas migram de órgãos linfoides para o pulmão. Embora modelos murinos com asma nos forneçam fortes evidências de que diferentes tipos de iNKT atuam nas mais diferentes formas da doença, alguns autores relatam que essa célula é dispensável ou atua apenas como um adjuvante na resposta alérgica.

Uma limitação do nosso estudo é que todas as análises das células iNKT foram realizadas em sangue periférico. A melhor amostra para o estudo da asma deve ser recolhida diretamente das vias aéreas inferiores. No entanto, devido à exigência de procedimento invasivo para a realização de biópsia brônquica ou lavado bronco-alveolar, questões éticas geralmente se opõem a essa alternativa em crianças, sendo o sangue periférico um alternativo mais atraente para a coleta de amostra com potenciais biomarcadores clínicos.

A falta de terapias efetivas nos casos mais graves ou terapias curativas para asma permite afirmarmos que ainda há muito a ser estudado sobre o mecanismo dessa doença. As pesquisas realizadas com células iNKT podem nos fornecer interessantes informações em relação a novas terapias que podem ser desenvolvidas, através da compreensão do seu mecanismo de ação e sua função imunoreguladora na asma. As questões investigadas até o

Conclusão

momento indicam que a iNKT pode exercer um papel na fisiopatogenia da asma, mas provavelmente seja mais predominante em alguns fenótipos específicos da doença que outros.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CONEP**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER N. 202/2011**

Registro CONEP 16083 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0026.0.002.000-10

Processo nº 25000.138596/2010-21

Projeto de Pesquisa: *“Prevalência de asma em uma amostra de crianças brasileiras e caracterização de fenótipos clínicos, marcadores biológicos e funcionais”*

Pesquisador Responsável: Renato T. Stein

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Centro Único)

CEP de origem: CEP-PUCRS

Área Temática Especial: Genética humana

Patrocinador: CNPq – Coordenação Geral do programa de pesquisa em Saúde.

Sumário geral do protocolo

A asma é uma doença crônica que afeta praticamente todas as faixas etárias e apresenta elevada prevalência, especialmente em crianças. Atualmente, a asma é a doença crônica mais comum na infância e no Brasil é a segunda maior causa de internação do SUS. No município de São Paulo, foi a 2º causa de internações pelo Sistema Único de Saúde - SUS em 2006, perdendo só para pneumonias, que pode ser considerada uma patologia secundária. Até agora o tratamento vem sendo conduzido apenas de modo assistencial com custos para o Ministério da Saúde, representando o 4º orçamento gasto no Brasil entre os vários programas. No Brasil nos anos de 2003/2004, ocorreram 327.276 internações por asma com repercussões e morbidades dos indicadores de saúde. Um dos fatores complicadores para o entendimento dos fatores de risco para a doença é que a prevalência de asma apresenta grande variabilidade (entre 2 e 33%) em diferentes regiões do mundo, devido à complexidade da combinação de padrões genéticos e de meio ambiente.

Embora os diferentes tipos de asma resultante dessas combinações possam apresentar uma gama de expressões clínicas, sempre estão associados à elevada morbidade e a estimativa é que, em todo o mundo, aproximadamente 300 milhões de pessoas sofrem de asma. Dados recentes demonstram que a prevalência de asma é especialmente elevada em populações mais urbanizadas e desenvolvidas, determinando elevados gastos para os sistemas de saúde. Nos países em desenvolvimento estes os gastos com asma indicam também um grande impacto da doença, dado que é corroborado por estudos atuais que mostram o grande impacto da doença no Brasil.

Com base no aumento da prevalência de asma nas últimas quatro décadas, estima-se que poderão ser diagnosticados 100 milhões de novos casos de asma até 2025. Não há uma explicação clara para o elevado aumento da prevalência observado em um período relativamente curto. Uma das hipóteses correntes é de que as taxas de prevalência de asma em países em desenvolvimento ainda devem crescer significativamente nas próximas décadas, com aumento dos quadros mais graves, em paralelo ao desenvolvimento de fenótipos de doença ligados à alergia, a qual é um marcador de gravidade. O aumento na prevalência da asma em países com elevados

Cont. Parecer CONEP n. 202/2011

índices de avanço social levaram ao desenvolvimento da conhecida hipótese da higiene, a qual postula que um menor grau de exposição a antígenos bacterianos é fator determinante para o desenvolvimento de asma e alergias.

Por outro lado, quando são observadas as altas taxas de prevalência de sintomas de asma na América Latina, fica evidente que outros fatores influenciam o desenvolvimento da doença. Nestes países, a forma mais prevalente de asma não está relacionada à sensibilização alérgica, sugerindo que fatores ambientais "agressivos" às vias aéreas e infecções virais dos primeiros anos de vida estejam associados a esse fenótipo não-atópico.

O estudo ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) demonstrou uma elevada prevalência de asma no Brasil, na avaliação de um total de 13.604 escolares (6 a 7 anos) e 20.554 adolescentes (13 a 14 anos) na visita à população em 1994/95. A prevalência de sibilância no período de 12 meses anterior à consulta foi de 27.2% em Porto Alegre, enquanto, entre os adolescentes, as taxas de prevalência variaram entre 9.6% (em Itabira) e 27.1%. (em Salvador a prevalência de asma diagnosticada pelo médico foi significativamente menor do que a asma ativa e ficou em níveis próximos de 12%. A discrepância entre áreas urbanas pode estar associada à presença de diferentes fenótipos de sibilância em amostras populacionais brasileiras.

Quando a avaliação foi repetida anos mais tarde em Porto Alegre se observaram pequena redução nas altas prevalências de asma, porém a prevalência da asma grave se manteve estável. Aproximadamente 5% dos escolares estudados em 1994/95 e novamente em 2005 em Porto Alegre apresentaram quadros sugestivos de asma grave.

Recentemente, um estudo multicêntrico mudou os paradigmas no entendimento de asma e mostrou que a associação entre sintomas de asma e marcadores de atopia é diferente em comunidades de diferentes estágios de avanço social. Em outras palavras, populações de melhor renda apresentaram maior prevalência de asma atópica, enquanto que populações mais pobres apresentaram mais asma do tipo não-atópica. Nesse estudo também se avaliou a prevalência da asma em um pequeno município do sul do Brasil e observou-se alta prevalência de asma não-atópica nessa população de baixa renda, sinalizando a importância de estudos dos diferentes fenótipos de asma na infância.

Os objetivos principais são: Identificar a prevalência de asma em uma população de escolares, representativa de crianças dessa mesma faixa etária, em Porto Alegre e Caracterizar os fenótipos de asma nesta população de asmáticos através da identificação de marcadores inflamatórios, genéticos e funcionais.

Os objetivos secundários são: Identificar e definir a prevalência dos alérgenos ambientais mais frequentes nas crianças com asma, através de medidas de IgE total e IgE específica; Descrever e comparar a função pulmonar dos escolares nos diferentes fenótipos de asma, através de espirometria completa, oscilometria, volumes pulmonares e resposta a broncodilatadores; Descrever e comparar as medidas de óxido nítrico exalado no período inter- crise dos escolares nos diferentes fenótipos de asma; Descrever o perfil citológico e marcadores biológicos específicos das vias aéreas dos escolares nos diferentes fenótipos de asma, através do escarro induzido com solução hipertônica; Descrever o perfil citológico e marcadores inflamatórios no sangue periférico dos escolares nos diferentes fenótipos de asma; Determinar a prevalência de asma grave em escolares, através de questionário específico e índice de gravidade; Identificar associações de polimorfismos genéticos com fenótipos de asma (IL4, IL13, CD14; IL8, IFNgama e IRF1).

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico. Serão 2500 sujeitos de pesquisa no centro em tela.

Cont. Parecer CONEP n. 202/2011

Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto (página 02 da numeração do CEP) está preenchida e assinada.

Foi apresentado o projeto de pesquisa nas páginas 06-31 da numeração do CEP.

Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (páginas 32, 33-36 e 37-40 da numeração do CEP, referentes à Fase 1, Fase 2 e Fase 2, respectivamente) foram apresentados.

Foi apresentado orçamento do projeto (páginas 41 e 42 da numeração do CEP).

Foram apresentados os currículos dos pesquisadores envolvidos no estudo (páginas 43-67 da numeração do CEP).

Consta ofício de aprovação do CEP que coordena o estudo (página 68 da numeração do CEP).

O cronograma do estudo foi apresentado na página 69 da numeração do CEP.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 592/2010, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Não está claro qual será a participação de cada pesquisador estrangeiro. Solicitam-se esclarecimentos se haverá remessa de material biológico para o exterior e para realizar quais exames.

Resposta: Não haverá remessa de material biológico para o exterior. Os pesquisadores estrangeiros citados no projeto já colaboram com nosso grupo de pesquisa e o papel neste projeto é colaborar no desenvolvimento do projeto, auxiliar no controle de qualidade dos exames, participação das análises dos resultados e redação do manuscrito e ajuda intelectual.

Análise: Pendência atendida

2. Na folha de rosto é informado que haverá formação de banco de material biológico. No entanto não há referência a este banco no protocolo. Solicita-se esclarecer e, se for o caso adequar ao que é requerido pela resolução 347 que se refere a formação de banco de material biológico.

Resposta: Comunicamos a retirada de formação de banco de material biológico. A folha de rosto SISNEP foi alterada e encaminhada ao CEP-PUCRS.

Análise: Pendência atendida.

3. Não está clara a participação dos pesquisadores externos à PUC-RS. Solicitam-se esclarecimentos se haverá remessa de material biológico para os laboratórios participantes da UFRJ ou da UFSC e se haverá formação de banco de material biológico nessas instituições.

Resposta: Conforme citado anteriormente não haverá mais formação de banco de material biológico ou envio de material biológico para outros laboratórios (UFRJ e/ou UFSC).

Análise: Pendência atendida.

4. Na medida em que há participação de vários laboratórios é importante que onde quer que haja manipulação de materiais biológicos os responsáveis por essas unidades declarem que os materiais somente serão usados para os fins previstos no protocolo. Solicita-se adequação.

Resposta: O material biológico será analisado somente em nossos laboratórios da PUCRS. A UFSC auxiliou no treinamento e processamento da técnica de coleta de escarro. Uma de nossas bolsistas da pós-graduação foi a Florianópolis realizar o treinamento.

Análise: Pendência atendida

5. Não há no protocolo indicação sobre o que será feito com as crianças que precisarem de atendimento clínico. Solicita-se esclarecimento se elas serão

Cont. Parecer CONEP n. 202/2011

encaminhadas para algum serviço. Nesse caso deverá haver acordo com a instituição que fará os atendimentos. Solicita-se adequação.

Resposta: Informamos que nosso projeto foi submetido às Secretarias de Educação tanto do município de Porto Alegre como do estado do Rio Grande do Sul sendo que as mesmas solicitaram retorno dos resultados da pesquisa. A secretaria de educação do RS solicitou atendimento às crianças que forem diagnosticadas com asma. Este atendimento acontecerá da seguinte forma: todas as crianças com diagnóstico de asma receberão atendimento por um ano em nosso ambulatório de asma localizado no Hospital São Lucas da PUCRS e caso seja necessário continuidade do atendimento o paciente será encaminhado ao posto de saúde mais próximo de sua residência com uma carta de nosso serviço solicitando encaminhamento ao hospital de referência mais próximo. Durante a coleta de dados do projeto qualquer intercorrência com a criança durante os exames realizados em nosso laboratório de função pulmonar esta será atendida pela nossa equipe de pneumologia pediátrica e caso for necessário encaminharemos ao serviço de emergência do Hospital São Lucas da PUCRS.

Análise: Pendência atendida

6. Em relação aos TCLEs:

- a. O TCLE da fase 1 não informa os objetivos da pesquisa, justificativa e relevância, não há sequer a informação de que o sujeito poderá ser contatado em momento futuro caso seja incluído na fase 2 da pesquisa. É preciso que os sujeitos que participarão da pesquisa sejam suficientemente esclarecidos sobre o conjunto da pesquisa. Solicita-se que os TCLE tenham uma parte idêntica que se refere ao esclarecimento sobre os objetivos, justificativa e relevância da pesquisa e que difiram no que diz respeito aos procedimentos. Solicita-se adequação.

Resposta: Foi adequado conforme solicitação. Os TCLE Fase 1 e 2 foram alterados informando os objetivos da pesquisa, justificativa e relevância. No TCLE da fase 1 incluímos a possibilidade de participação da criança na fase 2 do estudo. Os TCLE fase 1 e 2 estão em anexo.

Análise: Pendência atendida

- b. Como se trata de pesquisa com crianças de 8 a 12 anos solicita-se que seja elaborado um termo de assentimento da criança para participar do estudo. Solicita-se adequação.

Resposta: Elaboramos um termo de assentimento das crianças com idade entre 8-12 anos para participação no estudo tanto da fase 1 quanto da fase 2. Documento em anexo.

Análise: O termo de assentimento é um TCLE com uma linguagem adequada à compreensão da criança. Deve constar os objetivos, justificativa, relevância assim como a descrição dos procedimentos. Mais importante no assentimento é a descrição pelos pesquisadores do que será feito para que as crianças sejam suficientemente esclarecidas acerca da pesquisa e que deixe claro seu compromisso de incluir somente as crianças que assentirem. **Pendência parcialmente atendida.**

- c. É importante deixar claro no TCLE da fase 2 que o consentimento refere-se à participação dos pais e da criança. Solicita-se adequação.

Resposta: Foi adequado conforme solicitação. O convite para participar da pesquisa tanto da fase 1 quanto da fase 2 foi feito aos responsáveis legais e para a criança.

Análise: Pendência atendida

Cont. Parecer CONEP n. 202/2011

- d. Não consta garantia de assistência ou de encaminhamento às crianças que forem diagnosticadas durante o estudo e que necessitem de assistência. Solicita-se adequação.
Resposta: Este item foi respondido conforme consideração número 5.
Análise: Pendência atendida
- e. Como prevêem os itens IV.1."h" e VI.3."h" da Resolução CNS 196/96, deve ser garantido ao sujeito de pesquisa o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença. Assim sendo, uma vez que haverá deslocamento dos participantes solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo. Solicita-se adequação.
Resposta: Foi adequado conforme solicitação. No TCLE fase 2 página 2 item CUSTO explicamos sobre o ressarcimento de despesas de transporte e alimentação tanto da criança quanto de seu acompanhante. Salientamos também que não haverá nenhum pagamento pela participação do estudo.
Análise: Pendência atendida
- f. Não consta a informação de que será emitido em duas vias, ficando uma com o pesquisador e outra com o sujeito de pesquisa (item IV.2."d" da Resolução CNS 196/96). Solicita-se adequação.
Resposta: Foi adequado conforme solicitação. Colocamos uma observação como nota de rodapé informando que será fornecida cópia do TCLE ao responsável legal.
Análise: Pendência atendida
- g. Não há informação sobre como serão devolvidos os resultados da pesquisa, nem os exames, inclusive os genéticos, nem os resultados finais do projeto. Não basta a publicação científica. Como bem reivindica a secretaria de educação, é preciso que os resultados sejam apresentados às escolas e à secretaria de educação. Solicita-se adequação.
Resposta: Este item foi respondido conforme consideração número 5. Ressaltamos que os resultados finais serão divulgados às secretarias de educação do município de Porto Alegre e do estado do RS, às escolas selecionadas, bem como aos veículos de comunicação pertinentes. Os responsáveis legais receberão laudo dos exames de função pulmonar no dia do exame. Porém os resultados da análise imunológica e de genética no sangue não se caracterizam como dados de informação clínica, estes são marcadores ainda em caráter de pesquisa.
Análise: Em relação à frase "Seu filho receberá um laudo dos exames de função pulmonar e caso você queira receber os resultados dos testes laboratoriais (imunológicos) e de genética essa solicitação será feita por escrito no momento da coleta do material (sangue)" contida no TCLE consideramos, conforme Resolução 340 Item III.4 "Aos sujeitos de pesquisa deve ser oferecida a opção de escolher entre serem informados ou não sobre resultados de seus exames.". Solicita-se adequação do TCLE retirando a expressão "por escrito" uma vez que pode ser entendida como uma barreira ao exercício do direito do sujeito reter consigo o resultado dos exames imunológico e genético. **Pendência parcialmente atendida.**
- h. Como forma de contato com os pesquisadores somente é informado um telefone. Solicita-se que seja incluído também o endereço onde o sujeito de pesquisa possa encontrar os mesmos.
Resposta: Foi adequado conforme solicitação.

Cont. Parecer CONEP n. 202/2011

Análise: Pendência atendida

- i. No termo referente à fase 1 (página 32, numeração do CEP) não estão descritos os possíveis riscos envolvidos na participação no estudo em tela. Nos termos referentes à fase 2 (página 33-36 e 37-40, numeração do CEP) encontra-se a citação: "não há grandes riscos associados à coleta de sangue. A coleta pode causar desconforto, dor local, ou hematoma e, ocasionalmente, mal-estar e tontura. Somente pessoas treinadas serão responsáveis pela coleta". Cabe ressaltar que de acordo com o item V da Resolução CNS 196/96, "considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade". Ressalte-se ainda o item II.8 da mesma resolução que define como "Risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente". Solicita-se adequação.

Resposta: Foi adequado conforme solicitação no TCLE tanto da fase 1 quanto da fase 2. Referente ao TCLE da fase 1 incluímos a seguinte citação: "Esta primeira etapa do estudo do ponto de vista físico, psíquico, moral, intelectual, social, cultural, ou espiritual oferece risco mínimo para você e seu filho(a)". Referente ao TCLE fase 2 incluímos um novo item RISCOS onde descrevemos o seguinte: "A sua participação e de seu filho(a) neste estudo do ponto de vista físico, psíquico, moral, intelectual, social, cultural, ou espiritual oferece risco mínimo. Ressaltamos que conforme o item V da Resolução CNS 196/96 toda pesquisa com seres humanos envolve riscos. O dano pode ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade".

Análise: Pendência atendida

- j. Com relação aos Termos referentes à fase 2 (página 33-36 e 37-40, numeração do CEP), se por questões de configuração, a página de assinaturas do TCLE se apresentar em uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável legal nas demais folhas dos TCLE, considerando-se a proteção do sujeito, bem como do pesquisador. Solicita-se adequação.

Resposta: O TCLE da fase 1 apresenta-se em uma única folha. Para evitar extravio dos documentos a impressão do TCLE é feita junto com o questionário da fase 1 (frente e verso). Já o TCLE da fase 2 as assinaturas encontram-se na página número 4 porém como este termo é mais detalhado foi redigido em quatro páginas solicitaremos as rubricas do sujeito da pesquisa e seu responsável legal em todas as páginas do referido termo.

Análise: Pendência atendida

- k. Os modelos de TCLE apresentados não possuem numeração em suas páginas, o que pode comprometer a integridade das informações contidas no documento (retirada ou adição de páginas). Solicita-se adequação.

Resposta: Foi adequado conforme solicitação.

Análise: Pendência atendida

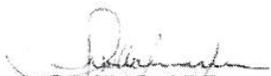
Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela

Cont. Parecer CONEP n. 202/2011

aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 03 de março de 2011.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO 2 – APROVAÇÃO PLATAFORMA BRASIL

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: PREVALÊNCIA DE ASMA EM UMA AMOSTRA DE CRIANÇAS BRASILEIRAS E CARACTERIZAÇÃO DE FENÓTIPOS CLÍNICOS, MARCADORES BIOLÓGICOS E FUNCIONAIS

Pesquisador: Renato Tetelbom Stein

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19835913.8.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 337.598

Data da Relatoria: 19/07/2013

Apresentação do Projeto:

Vide conclusões

Objetivo da Pesquisa:

Vide conclusões

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide conclusões

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide conclusões

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide conclusões

Recomendações:

Vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada a inclusão de mais 25 sujeitos de pesquisa.

Endereço: Av.Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320-3345

Fax: (513)320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

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



Continuação do Parecer: 337.598

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 20 de Julho de 2013

Assinador por:
caio coelho marques
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320--3345

Fax: (513)320--3345

E-mail: cep@pucrs.br