
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

PATRÍCIA DIAS DE ARAÚJO

**Caracterização de Diferentes Expressões Fenotípicas de Células
T CD4 na Asma Atópica e Não-atópica de Uma População de
Escolares de Porto Alegre/RS**

**PORTO ALEGRE
2013**

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

PATRÍCIA DIAS DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES EXPRESSÕES FENOTÍPICAS DE
CÉLULAS TCD4 NA ASMA ATÓPICA E NÃO-ATÓPICA DE UMA POPULAÇÃO
DE ESCOLARES DE PORTO ALEGRE/RS**

Porto Alegre, 2013

PATRÍCIA DIAS DE ARAÚJO

CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES EXPRESSÕES FENOTÍPICAS DE
CÉLULAS TCD4 NA ASMA ATÓPICA E NÃO-ATÓPICA DE UMA POPULAÇÃO DE
ESCOLARES DE PORTO ALEGRE/RS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina /Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Beatriz Bonorino
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Duarte Souza

Porto Alegre, 2013

Ficha Catalográfica

A663cAraújo, Patrícia Dias de

Caracterização de diferentes expressões fenotípicas de células TCD4 na asma atópica e não-atópica de uma população de escolares de Porto Alegre/RS / Patrícia Dias de Araújo. – Porto Alegre, 2013.

79f.: il. tab. Inclui um artigo de periódico a ser submetido à publicação.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grandedo Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Pediatria e Saúde da Criança.

Orientadora: Profª. Drª. Cristina Beatriz Bonorino

Co-orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Duarte Souza

1. Asma/fisiopatologia. 2. Criança. 3. Células T Helper. 4. Linfócitos T.I. Bonorino, Cristina Beatriz. II. Souza, Ana Paula Duarte. III. Título.

CDD618.9223

Bibliotecária Responsável:
Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

Dedicatória

Aos meus pais João e Iris, pelo amor incondicional e pelo companheirismo e incentivo constante.

Aos meus irmãos Luciano, Alexandre e Marcelo pelo apoio.

A minha cunhada, Cláudia que sempre torceu pela minha vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me orientar ao longo dessa trajetória de formação.

A minha família, em especial aos meus pais Iris Dias e João Gonçalves de Araújo, que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e me forneceram muito amor nesta etapa da minha vida. Aos meus irmãos pelas palavras de conforto e incentivo, os quais são minhas razões de viver. Obrigada!

Ao meu namorado Tiago Zang, que me ajudou em todas as horas que precisei, sempre me confortando quando os problemas que nas últimas semanas apareceram. Te amo!

A minha orientadora, Cristina Beatriz Bonorino pela oportunidade e confiança que depositou em mim.

A minha co-orientadora e amiga Ana Paula Duarte Souza pela enorme ajuda e conhecimento que me passou durante a realização deste trabalho, além de ser responsável pela concretização desta etapa de minha formação.

A colega Bárbara Porto, pela ajuda do meu aperfeiçoamento de formação.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Giovana dos Santos, Stéfanie Muraro, Suelen Goecks, pela ajuda amizade e cooperação que deles recebi nos momentos que sempre necessitei.

Ao meu colega e amigo João Paulo Heinzmann Filho pela amizade, paciência durante as aulas e apresentações de trabalhos, e por se tornar um irmão durante essa caminhada.

A todos os colegas dos laboratórios que de maneira ou outra me auxiliaram para a conclusão deste trabalho.

A secretária do programa de Pós-Graduação, Carla Carmo de Melo Rothmann, pelas orientações e auxílios durante todo o mestrado.

As crianças, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa de incentivo a pesquisa concedido.

RESUMO

Introdução: A asma é uma doença com predominância da presença das células T CD4 do tipo Th2, que afeta das crianças e tem como principais características a inflamação e hiperreatividade das vias aéreas. A asma apresenta dois fenótipos principais dependendo da presença de atopia. Ainda não foi totalmente descrito em crianças asmáticas com idade escolar a presença dos diferentes perfis de células Th1, Th2, Th17 e Treg no sangue periférico, que podem estar relacionados com a patogênese da doença.

Objetivo: Avaliar o perfil fenotípico de células T CD4 em pacientes asmáticos escolares do município de Porto Alegre/RS.

Métodos: Este foi um estudo transversal realizado com o recrutamento de crianças com 09 a 15 anos de idade, asmáticas e controles. O sangue periférico foi coletado e as células mononucleares foram separadas utilizando Ficoll e colocadas em cultura com anticorpos anti-CD3/CD28. Após 24hs as células foram marcadas com anticorpos específicos para fatores de transcrição para análise do perfil Th1, Th2, Th17 e Treg por citometria de fluxo e o sobrenadante foi recolhido para análise de citocinas por CBA. No plasma foi realizada a análise de IgE específicas.

Resultados: Foram analisados 104 pacientes, sendo 12 controles e 92 asmáticos. Os pacientes asmáticos atópicos apresentaram um perfil Th2 mais acentuado, comparado com os não-atópicos e controles atópicos. Quando analisamos as células que expressam mais de um fator de transcrição foi observado que os pacientes asmáticos atópicos apresentam maior frequência de células T CD4 positivas GATA3+FOXP3+, ROR γ T+GATA3+, GATA3+Tbet+ comparada com pacientes não-atópicos e controles atópicos. Analisando a severidade foi observado uma frequência maior de células T CD4+ ROR γ T+ GATA3+ em pacientes com asma moderada comparado com pacientes com asma leve. O estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 nas células dos pacientes asmáticos atópicos induziu mais um perfil Th1 enquanto que estímulo com DerP1 mudou o perfil de algumas células principalmente de células Tregs e Th17.

Conclusão: Este é o primeiro estudo em crianças que analisa o perfil Th1, Th2, Th17 e Treg utilizando a marcação de fatores de transcrição por citometria de fluxo em crianças asmáticas atópicas ou não-atópicas e controles. Encontramos um perfil mais Th2 em crianças asmáticas atópicas de acordo com a literatura. Interessantemente as crianças não-atópicas não apresentaram nenhum perfil predominante. As crianças com asma moderadas apresentam um perfil que expressa ao mesmo tempo o fator de transcrição ROR γ T e GATA3. Dependendo do estímulo são induzidas diferentes fenótipos nas células deste grupo de pacientes com asma.

ABSTRACT

Introduction: Asthma is a disease with predominant presence of CD4 Th2 cells that affects children. The disease main characteristics is inflammation and airway hyperreactivity. Asthma has two main phenotypes depending on the presence of atopy. It was not yet fully described in asthmatic children of school age the presence of different profiles of Th1, Th2, Th17 and Treg cells in peripheral blood, which may be related to the pathogenesis of the disease.

Aims: To analyze the phenotypic of CD4 T cells in asthmatics children in Porto Alegre/RS.

Methods: This was a cross-sectional study when it was recruited children between 9 to 15 years old, asthmatics and controls. The PBMCs were isolated using Ficoll and the cells were cultured with anti-CD3/CD28 antibodies, Derp1 or left unstimulated. After 24hs the cells were stained with antibodies specific for transcription factors in order to analyze Th1, Th2, Treg and Th17 cells by flow cytometry and the supernatant was collected for cytokine analysis by CBA assay. Plasma was used to perform analysis of specific IgE.

Results: It was analyzed 104 patients, 12 controls and 92 asthmatics. Atopic asthmatic patients presented higher frequency of Th2 cells compared with non-atopic and atopic controls. When we analyzed cells expressing more than one transcription factor it was observed that atopic asthmatics patients have a higher frequency of CD4+GATA3+FOXP3+, CD4+ROR γ T+GATA3+ and CD4+GATA3+Tbet+ compared with non-atopic patients and controls atopic. Analyzing the asthma severity it was seen a higher frequency of CD4+ROR γ T+GATA3+ in patients with moderate asthma compared with patients with mild asthma. Stimulating the cells from atopic asthma patients with anti-CD3 and anti-CD28 induced more Th1 profile while stimulating with DerP1 protein changed the profile of the cells mainly to Th17 and Treg cells.

Conclusion: This is the first study in children that analyzes Th1, Th2, Treg and Th17 cells using the tag transcription factor by flow cytometry in asthmatic or atopic and non-atopic controls. We found a Th2 profile in atopic asthmatic children according to the literature. Interestingly non-atopic children showed no predominant profile. Children with moderate asthma have a profile that expresses both the transcription factor GATA3 and ROR γ T. Depending on the stimulus used it was induced different phenotypes in the cells of this group of patients with asthma.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Fig.1. A diferenciação de células T naive..... 26
Fig.2. Esquematização da busca e seleção de referências para o artigo de revisão 27

CAPÍTULO III

- Figura 1. Expressão dos fatores de transcrição que determinam a diferenciação das células Th1, Th2, Th17 e Treg em pacientes asmáticos e controles 57
Figura 2. Análise da expressão de fatores de transcrição conforme a severidade da asma 59
Figura 3. Análise das células duplo-positivas para fatores de transcrição em pacientes asmáticos e controles, não-atópicos e atópicos 62
Figura 4. Análise das células duplo-positivas para fatores de transcrição em pacientes asmáticos de acordo com a severidade 64
Figura 5. Análise das citocinas em pacientes asmáticos e controles. 67
Figura 6. Análise das células estimuladas com DerP1 em pacientes asmáticos e controles 69
-

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes	55
Tabela 2 - Dados em relação a atopia e gravidade da doença nos pacientes asmáticos	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AHR	Hiperresponssividade das vias aéreas
ANTI/CD3	Anticorpo monoclonal anti-CD3/CD28
ANTI/CD28	
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CBA	<i>Cytometric Beads Array</i>
DerP1	Dermatophagoid esptonissinus com atividade de protease
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Foxp3	Forkhead Box P3
HDM	House dust mite
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IL-9R	Receptor de interleucina-9
INF- γ	Interferon gama
IRF4	Interferon regulatory factor 4
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
mRNA	RNA mensageiro
OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PUBMED	<i>Index at US National Library of Medicine</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ROR γ t	<i>Orphan Nuclear Receptor T</i>
RPMI	<i>Roswall Park Memorial Institute</i>
RS	Rio Grande do Sul

SBF	Soro Fetal Bovino
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T CD4	Linfócitos T auxiliares
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
Treg	Células T reguladoras
VEGF- β	<i>Vascular endothelial growth factor beta</i>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	15
1.1	APRESENTAÇÃO	15
1.2	JUSTIFICATIVA.....	17
1.3	OBJETIVOS.....	18
1.3.1	Objetivo geral	18
1.3.2	Objetivos específicos	18
1.4	REFERÊNCIAS	19
2	ARTIGO DE REVISÃO	21
3	CAPÍTULO III.....	44
3.1	ARTIGO ORIGINAL.....	45
4	CAPÍTULO IV	78
4.1	CONCLUSÕES.....	79

1 CAPÍTULO I

APRESENTAÇÃO

JUSTIFICATIVA

OBJETIVOS

REFERÊNCIAS

1.1 APRESENTAÇÃO

A asma alérgica é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica e hiperresponsividade das vias aéreas (AHR) acompanhada de secreção de muco. Ela é uma doença que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo e vem aumentando nos últimos anos, principalmente no mundo Ocidental em que 10% dos adultos e 30% das crianças são afetados (1-3). Asma é dividida em asma atópica e não-atópica. A asma atópica é uma doença com processo inflamatório liderada por citocinas produzidas por células T CD4 (4). Exemplos destas células são: células Th1, Th2, Th17 e Tregs, os quais têm auxiliado na inflamação eosinofílica, que é uma das características da asma (5).

A asma não-atópica ou não alérgica (intrínseca), é similar a asma atópica, porém os pacientes asmáticos assim classificados apresentam teste negativo para atopia, acabando por não envolver atopia no curso da doença (6, 7). Além disso, os pacientes não apresentam clínica nem história familiar de atopia, além do baixo nível de IgE (8). Outra característica deste grupo é que os pacientes geralmente são mais velhos e os sintomas têm início tardio, sendo mais predominante no sexo feminino. Uma das diferenças entre pacientes atópico e não atópico foi observada em biopsias destes pacientes, em que o infiltrado de macrófagos era mais evidente em não-atópicos quando comparado com atópicos (7, 9).

Cada subtipo de célula T CD4 está envolvido em um aspecto do desenvolvimento da doença, a qual é caracterizada como uma doença “Th2”. Depois do contato com o alérgeno os níveis de IL-4, IL-13 são encontrados aumentados em sujeitos asmáticos, produzidas pelas células do tipo Th2 que auxiliam a produção de imunoglobulina E (IgE) a resposta alérgica (10). Além disso, as células Th1 aumentam a resposta imune celular. Outro subtipo de células envolvida na patologia da asma são as células Th17 que produzem citocinas IL17A-17F. Estas células foram descritas em modelos murinos por serem resistentes ao uso de corticóides, além de ser relatado como um importante mediador de asma severa por produzir TNF- α . A IL-17 produzida por Th17 pode induzir e ativar os neutrófilos e pode estar envolvidas na promoção de propriedades da estrutura celular (11). Por fim, outro

subtipo descrito como componente da fisiopatologia da asma são as Tregs, em que estudos revelaram que estas células têm uma influência direta na supressão de células T efectoras. Devido a isso, este subtipo é caracterizado por inibir a expressão do gene da IL-2, e essas células também suprimem a asma alérgica induzida por células Th2 (2).

Desta forma, a presente dissertação apresenta dois artigos relacionados com diferentes fenótipos das células T CD4 com a asma, sendo que no **CAPÍTULO II** apresenta-se um **Artigo de Revisão “Células Th9 e Interleucina-9 na Patogenia da Asma”**.

No artigo de revisão, foi descrito a influência de células Th9 e interleucina-9 na patologia da asma, bem como informações sobre este novo subgrupo de células T *helper*, e novas descobertas em torno da interleucina-9 e asma.

As células Th9 podem expressar ambas IL-9 e IL-10, e a regulação destas células é realizada pelo fator de transcrição PU.1 (12). Também foi relatado sobre a interleucina-9, que também é implicada na asma e como proteção contra infecções a nematódeo. A IL-9 é uma interleucina multifuncional, a qual é secretada por células Th9 e que pode regular a inflamação crônica alérgica, além de promover o crescimento de células T e a proliferação das mesmas(13).

No **Capítulo III** desta dissertação será apresentado o **Artigo Original “Caracterização de Diferentes Expressões Fenotípicas de Células T CD4 na Asma Atópica e Não-atópica de Uma População de Escolares de Porto Alegre/RS”**.

Segundo a literatura, a maioria dos dados sugere que na asma as células com papel central são as células Th2, porém diversos relatados incluíram mais três subtipos de células com participação na patogenia da doença, sendo eles: Th1, Th17 e Treg (13). Pensando nisto, este artigo original apresentou a presença destas células pela análise da expressão do fator de transcrição em pacientes asmáticos e controles, além de relatar a plasticidade destas células correlacionando com a gravidade da doença nestes grupos de pacientes.

1.2 JUSTIFICATIVA

Estudos revelam que a asma não alérgica é predominante em populações de crianças de baixa renda no Brasil, em que influências ambientais têm influenciado a maior ocorrência da asma. Além disso, a asma não-atópica é o fenótipo mais prevalente entre as crianças da América Latina. Os estudos também apontam que as células Th17 encontram-se mais predominante em pacientes não-atópicos, com maior recrutamento de neutrófilos de acordo com a gravidade da doença. E em pacientes com fenótipo atópicos ocorre maior expressão de células Th2 (14, 15).

Estudos revelam que a asma pode ter células T CD4 específicas envolvidas na sua patogenia além de podem terem como característica a plasticidade em seu fator de transcrição onde pode desempenhar um papel modulando as doenças inflamatórias (5). Baseando-se nas premissas apresentadas acima pretendemos definir melhor os fenótipos da doença em crianças para que então o tratamento e condução da asma sejam de acordo com cada fenótipo da doença.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

- Caracterizar os diferentes fenótipos de células T CD4, ou seja, Th1, Th2, Th17 e Treg na asma atópica e não-atópica de uma população de escolares de Porto Alegre RS e correlacionar com severidade da doença.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar e definir a prevalência dos fenótipos mais frequentes em crianças com asma, por meio da medida de IgE total e IgE específica;
 - Avaliar a frequência de células T CD4 do tipo Treg, Th2, Th17 e Th1 e através das marcações dos seus respectivos fatores de transcrição: Foxp3 GATA3, ROR γ t e Tbet, com ou sem estímulo;
 - Quantificar as citocinas produzidas por células mononucleares de pacientes asmáticos atópicos e não-atópicos após desafio com estímulos de células T e alérgenos in vitro;
 - Correlacionar os fenótipos de células T encontrados nos pacientes asmáticos com a severidade da doença.
-

1.4 REFERÊNCIAS

1. Barreto ML, Cunha SS, Fiaccone R, Esquivel R, Amorim LD, Alvim S, et al. Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. *Respir Res.* 2010;11:167.
 2. Dehzad N, Bopp T, Reuter S, Klein M, Martin H, Ulges A, et al. Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2. *J Immunol.* 2011;186(4):2238-44.
 3. Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1165-74.
 4. Bettiol J, Bartsch P, Louis R, De Groote D, Gevaerts Y, Louis E, et al. Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy.* 2000;55(12):1134-41.
 5. Malmhäll C, Bossios A, Rådinger M, Sjöstrand M, Lu Y, Lundbäck B, et al. Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans--possible role in asthma. *PLoS One.* 2012;7(6):e40012.
 6. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 1999;54(3):268-72.
 7. 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. *Immunol Today.* 1999;20(11):528-33.
 8. Wüthrich B. Atopic dermatitis flare provoked by inhalant allergens. *Dermatologica.* 1989;178(1):51-3.
 9. Böttcher MF, Bjurström J, Mai XM, Nilsson L, Jenmalm MC. Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14(5):345-50.
 10. Agrawal DK, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010;10(1):39-48.
 11. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1185-7.
 12. Nowak EC, Noelle RJ. Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine. *Immunology.* 2010;131(2):169-73.
 13. Soroosh P, Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology.* 2009;127(4):450-8.
 14. Weinmayr G, Weiland SK, Björkstén B, Brunekreef B, Büchele G, Cookson WO, et al. Atopic sensitization and the international variation of asthma symptom prevalence in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(6):565-74.
-

15. Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, Jones MH, Escouto D, Dias AC, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J.* 2007;29(6):1154-60.
-

2 CAPÍTULO II

ARTIGO DE REVISÃO

2.1 ARTIGO DE REVISÃO

“CÉLULAS TH9 E INTERLEUCINA-9 NA PATOGENIA DA ASMA”

“ TH9 CELLS AND INTERLEUKIN-9 IN THE PATHOGENESIS OF ASTHMA”

Autores: Patrícia Dias de Araújo, Ana Paula Duarte de Souza, Cristina Beatriz

Bonorino

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo é revisar as principais informações sobre o recente subtipo de células Th9 e interleucina-9 na patogenia da asma.

Fonte de dados: Foram pesquisados nas bases de dados Medline/Pubmed e OVID, artigos originais publicados no período de 1997 a 2012, em inglês e espanhol, utilizando os descritores selecionados.

Síntese de dados: A asma é um problema de saúde pública e sua fisiopatologia inclui subtipos de células da família T *helper*, bem como suas respectivas citocinas. A IL-9 é uma citocina produzida pelas células T CD4 através da ativação de fatores de transcrição IRF4 e PU.1. Produzem IL9, as células Th2, mas principalmente células Th9. Essa citocina está envolvida na patologia da asma por aumentar a hiperresponsividade das vias aéreas e liberar eotoxina pelas células epiteliais pulmonares. Além disso, a inibição da produção de IL-9 na asma já vem sendo estudada e relatada como um tratamento preventivo e inibitório no remodelamento das vias aéreas de camundongos.

Conclusões: Como ainda é escasso o tratamento da asma alérgica, a identificação desse novo subgrupo de células T *helper* pode possibilitar novos tratamentos, através da inibição da produção de IL9, além de maior entendimento do seu envolvimento no desenvolvimento da asma.

Descritores: Interleucina-9, células T helper e TGF- β

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to review the key information about the recent subtype of Th9 cells and interleukin-9 in the pathology of asthma.

Data source: It was surveyed in the databases Medline/Pubmed and OVID, original papers published between 1997 and 2012, in English and Spanish, using the selected descriptors.

Data synthesis: Asthma is a problem of public health, and its pathophysiology includes subtype of cells of the T *helper* family and their respective cytokines. The cytokine IL9 is produced by CD4 T cells by activation of transcription factors IRF4 and PU.1. Th9 mainly produce IL9, but Th2 can also secrete this cytokine. IL9 is involved of pathology of asthma by increasing of airway hyperresponsiveness and eotaxin release by lung epithelial cells. Moreover, inhibition of IL9 in asthma has been studied and reported as a preventive and inhibitory airway remodeling in mice.

Conclusion: Nowadays, the discovery of new treatments for allergic asthma is a necessity. Identification of this new subtype of helper T cells may provide a possibility of new treatments, such as inhibiting the production of IL9. In addition, it can provide a better understanding of Th9 involvement in the development of asthma.

Keywords: Interleukin-9, T helper cells, and TGF- β

INTRODUÇÃO

A asma é um problema de saúde pública mundial, especialmente prevalente em crianças, que está presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e a maior parte das mortes ocorre em países de baixa renda. A asma é caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas (AHR), recrutamento de leucócitos inflamatórios para os pulmões e remodelamento tecidual (1).

A asma é dividida em asma atópica e asma não-atópica, conforme a presença ou não de atopia(2). Na fisiopatologia da asma, subtipos de células da família T *helper* (auxiliares), que constituem as células Th1, Th2, Th17, Treg e Th9, de acordo com a produção de citocinas, podem ter um papel fundamental no desenvolvimento da doença (3) (figura 1).

Historicamente, acreditava-se que apenas dois subtipos de células T *helper*, Th1 e Th2, desempenhavam papel importante nas doenças alérgicas (4). No entanto, sabe-se que as células TCD4⁺ auxiliares diferenciam-se em subconjuntos funcionalmente distintos após encontrar o antígeno, e que essa heterogeneidade funcional de células T é moldada por muitos componentes, tais como a força do sinal inicial dos receptores de antígenos de células T, as citocinas e os fatores epigenéticos (5). Partindo disso, essa idéia vem mudando desde a identificação de um subtipo de células T que secretam IL-9 e que são distintas de Th1, Th2, Th17 e Treg (6), bem como o pensamento de que as células Th2 eram preferencialmente produtoras de IL-9, a qual é uma interleucina chave no desenvolvimento da asma (7). Esse novo subtipo foi denominado de células Th9 aumentando assim o entendimento da imunidade adaptativa (8).

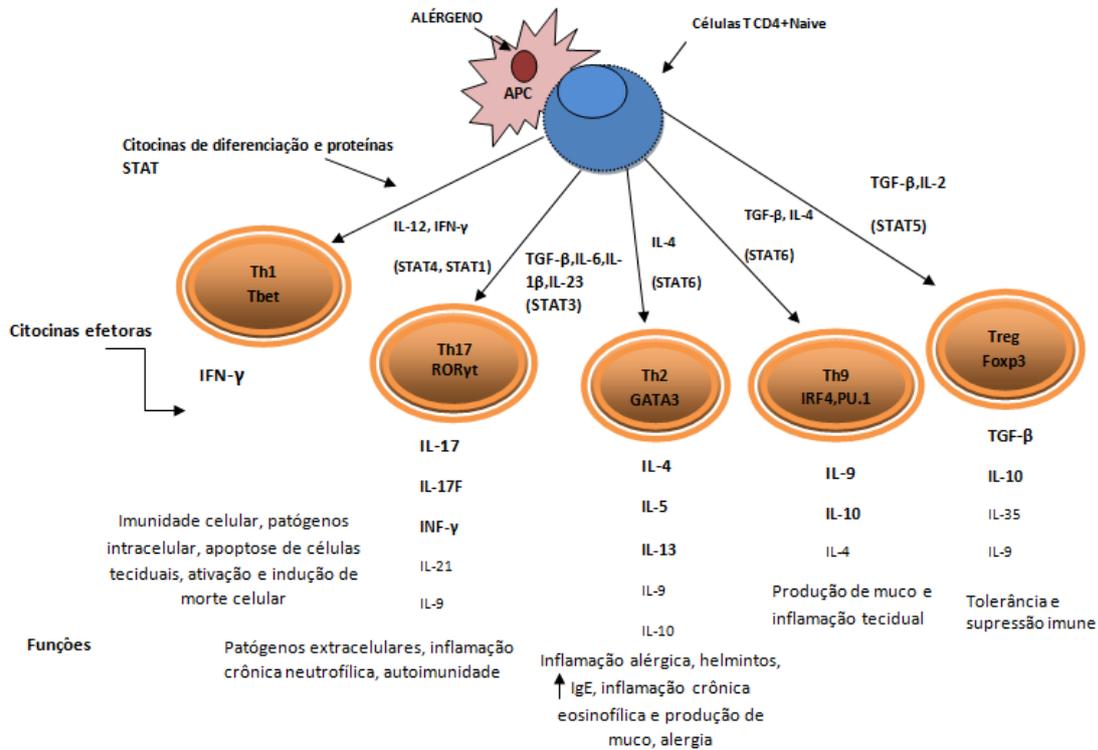


Fig.1. A diferenciação de células T naive. Após estimulação com alérgeno, estado das células e microambiente, as células T naive se diferenciam entre células T helper de diferentes subtipos, sendo eles Th1, Th2, Th17, Treg e Th9. Cada um destes subtipos tem fatores de transcrições e STATs específico para seu destino de diferenciação, bem como suas respectivas citocinas efetoras e suas funções.

A metodologia deste artigo foi através da seleção das referências baseadas de artigos originais através de uma revisão das bases de dados MEDLINE/*Pubmed* e *OVID*, publicados no período de 1997 a 2012, em inglês espanhol, utilizando os termos interleucina 9, asma, células Th9 e TGF- β . Foram excluídas as referências em que os autores não tiveram acesso aos artigos na sua forma completa, além daquelas referências em que os termos utilizados não eram completamente abordados nos artigos (Figura 2).

FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

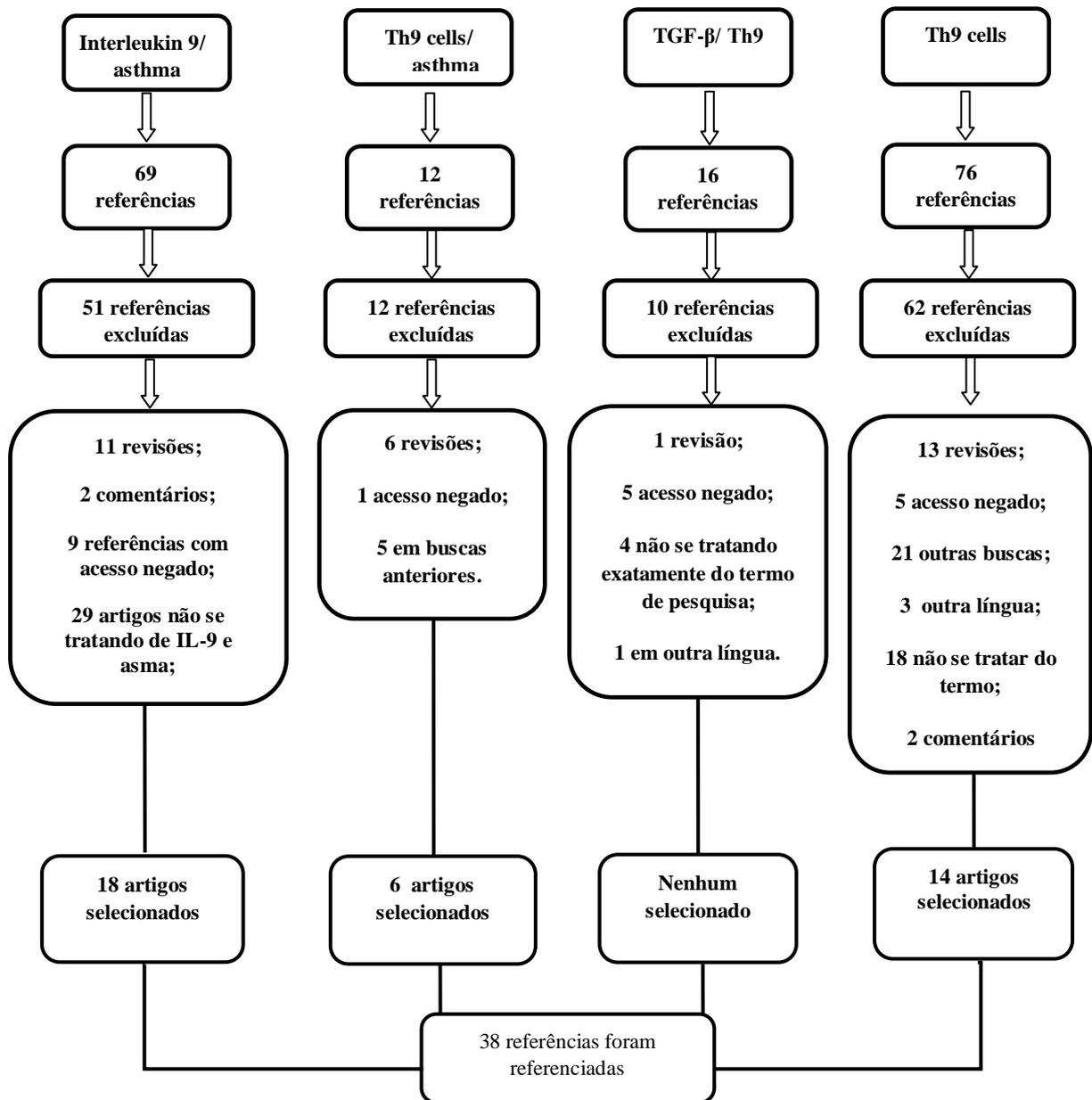


Fig.2. Esquematização da busca e seleção de referências para o artigo de revisão

Com bases nessas informações, esta revisão tem por objetivo esclarecer a influência das células Th9, a qual foi descrita recentemente, e da interleucina secretada por ela, a IL-9, para fornecer um melhor entendimento de seu mecanismo

doença e, por conseqüência, uma melhor condução do tratamento por meio dessa nova fisiopatologia.

FISIOPATOLOGIA DA ASMA

A asma é uma desordem crônica inflamatória, rotulada como “*Th2like*”, por diferenciar células TCD4 do tipo Th2, as quais secretam citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13. A asma é causada pela combinação de fatores genéticos, ambientais e uma resposta inapropriada a alérgenos, que geralmente tem seu início precocemente e emerge como a doença mais comum em crianças. Ela é caracterizada fisiologicamente por hiperresponsividade brônquica e infiltração de células inflamatórias nas vias aéreas, levando à intermitente obstrução das vias aéreas (9, 10).

As mudanças causadas pela asma incluem deposição de proteína na matriz extracelular, como fibronectina, colágeno e hipersecreção de muco, além da proliferação de células no músculo liso das vias aéreas. Uma das principais características da asma é o remodelamento das vias aéreas, o qual está associado com a super-regulação dos fatores de crescimento pró-fibróticos, em particular TGF- β (11). O remodelamento é explicado pela produção excessiva de muco epitelial, que é a causa de obstrução das vias aéreas (10), o que é papel chave neste processo de remodelamento (11). Na histologia, as vias aéreas de pacientes asmáticos foram analisadas, e as mesmas mostraram infiltração de um grande número de células inflamatórias, causando um aumento da camada do músculo liso das vias aéreas (12).

Essas características acontecem porque há um contato inicial da mucosa com um alérgeno, o que inicia a produção de anticorpos IgE pelas células B com a

cooperação das células Th2. Depois de desafiados com alérgenos, os níveis de citocinas Th2, IL-4 e IL-13 são encontrados nas vias aéreas de sujeitos asmáticos com influxo de eosinófilos que contribuem para a inflamação alérgica na asma (3).

A produção de IFN- γ por células Th1 regula negativamente a síntese de IgE, enquanto que IL-9 estimula a produção de IgE e o crescimento de mastócitos (13). O aumento evidente de células Th1, e a interação complexa entre essas células levam à produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, a qual desempenha um papel na patogenia da asma (14).

IL-9, TH9 E ASMA

Geralmente, estão envolvidas nas desordens inflamatórias crônicas as citocinas de células tipo Th2, como IL-5, IL-13 e IL-14. Entretanto, não muito tempo atrás, Simonetta Baraldo citou que a interleucina-9 (IL-9) pode desempenhar um importante papel nas doenças alérgicas das vias aéreas. Inicialmente, quando foi descrita em meados do ano de 1980, a IL-9 foi identificada em células TCD4+ ativadas, e sua produção era associada com a família de citocinas Th2 (15, 16) Nesse período de descobrimento da IL-9, ela foi caracterizada como um fator de crescimento, diferenciação de células T e de mastócitos (15) em modelos murinos (17).

IL-9 é uma citocina derivada de células T com atividades pleiotrópicas e que promove a proliferação e diferenciação de mastócitos e progenitores eritróides, a sobrevivência de eosinófilos *in vitro*, a proliferação de células T ativadas e diferenciadas, e a produção de imunoglobulinas de células B. Além dessas atividades, a IL-9 ainda

regula a expressão do receptor da IL-5 na superfície das células, causa hipersecreção de muco por estimulação de metaplasia das células calciformes e a expressão do gene mucina (9, 12).

Com o objetivo de maior esclarecimento em torno dessa interleucina, ela foi mapeada juntamente com outras citocinas do tipo Th2, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, e identificou-se que ela está localizada na região 5q31-q33 do cromossomo 5 (18). Em humanos, a proteína IL-9 é compreendida por 144 aminoácidos e tem 4 potenciais locais de glicosilação, tem 5 éxons e 4 íntrons, que se estendem por cerca de 4kB, assim como em camundongos (17). A partir disso, um novo grupo de células T CD4 foi designado de células Th9, por também secretar IL-9. Esse novo fenótipo celular tem atraído a atenção de pesquisadores do mundo todo, pelo fato da IL-9 estar associada com atividade pleiotrópica, a qual favorece a asma alérgica (7).

Descritas recentemente, as células Th9 são consideradas as mais consistentes células T secretoras de IL-9, que são geradas pela combinação dos efeitos das citocinas TGF- β e IL-4. Essas células são pró-inflamatórias e parecem estar presentes em um amplo espectro de doenças autoimunes e inflamatórias, além de produzirem grandes quantidades de IL-9 e IL-10 (19). Pelo fato do papel da Th9 ainda não ser bem esclarecido no sistema imune, alguns estudos, mostraram que a IL-9 pode provocar inflamação, em particular após a re-estimulação de Th9, e que a existência de células Th9 se dá pela presença do fator de transcrição PU.1, para que as linhagens Th9 possam se desenvolver (20-22).

Segundo o estudo de Horka, os dados apresentados esclarecem que IL-9 derivada de Th9 está envolvida no desenvolvimento das inflamações alérgicas dos pulmões (7), além de confirmar que a principal fonte de IL-9 é a mucosa brônquica asmática (23). Como as células Th9 que secretam IL-9 afetam a ocorrência de

inflamações alérgicas, estudos sobre o desenvolvimento dessas células foram realizados. Os dados dos mesmos apresentam que, para essas células Th9 se desenvolverem, necessita de múltiplos sinais de equilíbrio, tais como os fatores de transcrição Interferon regulatory factor (IRF4), PU.1, os quais são essenciais além da exposição a TGF- β e IL-4 (24).

O TGF- β é descrito como um direcionador no desenvolvimento das células Th1 e Treg (5), mas seu papel crucial está na principal característica de células Th2 e Th9, que é redirecionar a reprogramação das células Th2 em direção ao fenótipo Th9 (25) Essa capacidade de reprogramação, chamada de plasticidade, é mais evidente entre programas efetores, que são intensivamente relatados funcionalmente com Th2 e Th9 e que ocorre pela capacidade de emitir uma sintonia de repostas entre as duas células na decisão da resposta imunitária (5). Pelo fato do TGF- β ser a chave para derivar células Th2 para o destino Th9, Veldhoen et al pesquisaram a dependência de TGF- β e IL-4 pelas células T secretoras de IL-9, através de células TCD4 naive isoladas de camundongos. Segundo esse autor, a deficiência na sinalização em TGF- β faz com que não ocorra desenvolvimento de células Th9, como fizeram com células TCD4+ isoladas a partir de camundongos STAT6 knockout (5)

Além de todas as funções envolvidas em torno do desenvolvimento de células Th9 secretoras de IL-9, o TGF- β é sugerido como inibidor da super-regulação de IL-4 mediada por GATA-3, que depende da expressão de STAT6. Pelo fato das células Th9 secretoras de IL-9 ser um importante indutor dos sintomas asmáticos dependentes de IL-4 (17), Goswami et al mostraram que IL-4 e STAT6 são requeridos para ativar IRF4 e potencializar outros fatores, tais como PU.1, o fator de

transcrição de células Th9 (26), o qual se liga diretamente no promotor IL-9 nas células Th9 (21).

STAT6 tem a capacidade de neutralizar TGF- β e de dirigir a expressão de IRF4, a qual é indispensável para o desenvolvimento de células Th9. Isso é notável em camundongos deficientes de IRF4, que não são capazes de expelir *Nippostrongylus brasiliensis*, sugerindo que a produção de IL-9 protetora, presumidamente por células Th9, não é presente na ausência de IRF4, podendo ser a IRF4 um alvo promissor para o tratamento das doenças crônicas pulmonares (27, 28).

Segundo Goswami et al, o fator de transcrição IRF4 mostrou um padrão parecido de indução em células Th2 e Th9, embora a expressão desse fator fosse mais elevada na diferenciação de células Th9 (29). O IRF4 é essencial para o desenvolvimento de Th2, mas é crucial para o desenvolvimento e função da IL-9 produzida por células Th9. Em um estudo que avaliou a contribuição de IRF4 para o desenvolvimento de células Th9, foi observado que células Th9 expressaram aumento na proteína IRF4, além disso, essa proteína dirige o desenvolvimento de células Th9 por meio da ligação para o promotor de IL-9. Em camundongos heterozigotos com deficiência de IRF4, apresentou um fenótipo intermediário, concordando com os sintomas de asma (27).

Embora o fator de transcrição PU. 1 e IRF4 serem associados com Th9, eles não são específicos de células Th9 e estão envolvidos na indução de outras células T, incluindo células Th2. Pensando nisso, num recente estudo realizado por Xiao et al, uma nova molécula co-estimulatória foi encontrada, a chamada OX40, a qual potencializou e favoreceu a indução de células Th9. Foi visto que a ligação da OX40 com TGF- β e IL-4 converteu em torno de 80% de células TCD4+ em células Th9.

Também foi observado que OX40 é um suporte de sobrevivência e proliferação de células Th9, assim como também inibe Foxp3+Treg, por meio de uma variedade de mecanismos para o controle da imunidade e da imunopatologia. Ela é associada com a patogênese da colite auto-imune, encefalite auto-imune experimental, artrite, asma e rejeição de transplante. As células Th9 induzidas por OX40 foram diferentes de outras células Th9 relatadas, que tinham expressões elevadas de IL-9, sem expressão de outras citocinas Th2 ou Th9 (30).

Assim, as células Th9 podem desempenhar um papel de reguladoras da patogênese versus mecanismo de proteção em respostas imunes (31), além de contribuir para a patologia da asma (27), sendo um importante estimulador para a infiltração de mastócitos, bem como promotor de inflamação tecidual e produção de muco (32)

A hipótese de que a IL-9 pode desempenhar um papel prejudicial na patologia da asma (33) se reforça pelo fato de que essa interleucina tem a possibilidade de aumentar a hiperresponsividade (10). A ação que a IL-9 exerce na hiperresponsividade se dá pelo mecanismo de interação entre o receptor da IL-9 (IL-9R) e seu próprio cognato, associado a receptores distintos (34), sugerindo assim o efeito direto da IL-9 nos músculos das vias aéreas, além de sua influência na liberação da eotóxina pelas células epiteliais dos pulmões. Isso se confirma com a aumentada expressão de IL-9 em pacientes asmáticos, quando comparados com não asmáticos (9), além de estar envolvida na resistência a parasitas, como *Trichuris muris*(33).

O IL-9R é um heterodímero, constituído de ligante específico de subunidade de cadeia α (IL-9R α) (34) e uma cadeia γ comum, a qual é compartilhada com IL-2, IL-7 e IL-15(5). Esse receptor está localizado na região pseudo-autossômica do

cromossomo Y e X (xq28 e yq12). O IL-9R pertence à super família do receptor da hematopoetina e é expresso em células T, mastócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos e que também vem sendo implicado na asma por essas suas características (9). Segundo Böttcher et al, a IL-9 e IL-9R podem ser lesivos à diferenciação de células T humanas, eosinófilos e mastócitos. Esse receptor é expresso em células B de tonsilas (34), além da superfície das células dos músculos lisos bronquiais das vias aéreas humanas, as quais são sintetizadas pelos músculos liso bronquial de pacientes asmáticos (12).

Uma característica específica do IL-9R é que ele ativa Janus Kinase e fatores STATs, e esse receptor vem sendo demonstrado ser crucial no desenvolvimento de células T e prevenção de apoptose. No entanto, seu papel mais específico é na estimulação de fatores quimiotáticos pelas células epiteliais brônquicas e células dos músculos lisos. Porém, processos derivados de mudanças funcionais no IL-9R podem surgir de alterações do aminoácido essencial para ativação de STAT e sua sinalização, tais como Tirosina 116 e 336. Tais mudanças têm impacto nas doenças alérgicas, como o aumento da expressão de mRNA IL-9 e aprimoram a imunoreatividade de IL-9 e IL-9R (35).

Análises recentes em modelos animais, sobre a região promotora do gene IL-9, associam níveis de IgE e IL-9 e hiperresponsividade brônquica, sugerindo que certas variações genéticas no gene IL-9 podem predispor à asma (17). Tendo um papel chave no desenvolvimento da alergia, a IL-9 pode atuar diretamente sobre o IL-9R nos linfócitos B e regular a síntese de IgE (35). Por esse motivo, a IL-9 é sugerida como uma candidata para a patologia da asma, baseando-se no desequilíbrio entre o total sérico de IgE e em marcadores relacionados com a expressão desse gene (10).

Produzidas nas vias aéreas dos asmáticos, a IL-9 dos mesmos foi avaliada por detecção do mRNA de IL-9 nos tecidos pulmonares, após serem desafiados com alérgenos, segundo Devos et al. Nesse estudo, 24 voluntários identificados como asmáticos, utilizando RAST e imunoensaio de fluorezima específica de IgE, tiveram as determinações das interleucinas IL-5, IL-13 e IL-9 realizadas por ELISA. Os resultados desse estudo sugeriram que a produção de IL-9 foi especialmente induzida em PBMC de adultos hipersensíveis por estimulação com alérgenos e associada com os títulos de IgE de alérgenos específicos. Identificou-se que a produção de IL-9 foi mais alta em indivíduos asmáticos que em atopia sem asma (36).

Já o estudo de Böttcher analisou os PBMCs de 18 crianças identificadas como asmáticas, utilizando critérios definidos pelo estudo ISAAC (**I**nternational **S**tudy of **A**sthma and **A**llergies in **C**hildhood), além de crianças controles. Utilizando o método de ELISA, após a estimulação das células com alérgenos, as citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 foram determinadas (13). Os resultados desse estudo corroboram com os resultados obtidos por Devos et al, em que a produção de IL-9 apresentou maior nível nas crianças atópicas, sendo associada apenas com a asma atópica, provavelmente devido às suas propriedades indutoras de IgE (36). Tendo como eixo os resultados desses dois estudos em humanos, observa-se que a produção de IL-9 tende a ser mais alta em indivíduos asmáticos do que em indivíduos não asmáticos (13, 36), reforçando a interação entre a expressão de IL-9 e atopia e asma (20).

Diversos estudos em camundongos foram realizados em torno da IL-9, sugerindo o seu papel para predispor à asma. Segundo Namkung et al, a redução na produção de IgE foi apresentada em camundongos transgênicos devido à

deficiência na IL-9 (17). Já outro estudo, em camundongos transgênicos e super-expressando IL-9, sugeriu que essa citocina tem papel no desenvolvimento da eosinofilia e hiperresponsividade nas vias aéreas e hiperplasia de mastócitos (12). Para ressaltar que a IL-9 é um importante mediador na patogênese da asma, Chiba et al administraram intratraqueal IL-9 recombinante em camundongos *naive* após o desafio com OVA, para avaliar a função de IL-9 e correlacionar IL-9 com UGRP1, uma proteína relacionada à uteroglobina secretada, de alta expressão na traquéia, brônquios e bronquíolos, porém seu papel funcional na fisiologia das vias aéreas ainda é desconhecido. Sugere-se que possivelmente ela esteja envolvida na patogenia da asma. Além de envolvida na asma, o estudo de Chiba mostrou que a IL-9 está envolvida na regulação básica da UGRP1 nas vias aéreas de camundongos e ainda regula a expressão UGRP1 nesses animais, quando a IL-9 é administrada pela via intranasal. Esses resultados aumentam a evidência de que IL-9 é um importante mediador da patogênese da asma brônquica alérgica (14).

TRATAMENTO COM IL-9

Na asma alérgica, a inflamação é causada por diversas células, e as mudanças ocorridas na asma incluem deposição de proteínas na matriz extracelular, tal como fibronectina, colágeno e tenascina, hipersecreção de muco e remodelamento das vias aéreas. No entanto, atualmente, o tratamento tem efeito potencial somente no remodelamento das vias aéreas e é feito com drogas anti-inflamatórias, como os corticóides. Além do uso de corticóides, o tratamento de pacientes asmáticos envolve o uso de anti-histamínicos e anti-leucotrienos (11, 37).

Além disso, segundo relatos, o que tem sido utilizado em crianças é o Omalizumab, um anticorpo monoclonal recombinante humanizado anti-IgE, recomendado para o tratamento de doenças mediadas por IgE, e que foi aprovado em 2005 (38). Além desses tratamentos, foi descrita também a terapia com citocinas, principalmente com IL5, a qual é um inibidor de infiltração de eosinófilos (39) bloqueada, e é a mais utilizada, por ser secretada pela principal célula envolvida na patologia da asma. No entanto, ainda é necessário descobrir novos alvos terapêuticos para a asma. (11). Pensando a respeito do tratamento e do fato de que a IL-9 é especificamente super-regulada nos pulmões após a estimulação com alérgenos (18), todos os estudos prévios foram limitados a examinarem os efeitos, bloqueando a IL-9 em modelos inflamatórios agudo. No estudo de Kearley et al, após uma prolongada exposição à OVA, eles encontraram que os níveis de TGF- β , VEGF- β e FGF-2 ativados foram elevados nos tecidos pulmonares, e que a neutralização de IL-9 reduziu marcadamente a expressão dessas três citocinas, sugerindo que isso seja um mecanismo modular potencial para efeito antifibrótico de pré-tratamento com anti-IL-9 (11). Já Staudt et al sugerem que a neutralização de IL-9 pode apenas revogar as propriedades indutoras da asma relacionadas às células Th9, enquanto que as propriedades das células Th2 foram marginalmente afetadas.

Os resultados do estudo de Horka e colegas indicam que a inibição da IL-9 é uma abordagem mais própria para o tratamento da asma. Outro estudo sobre o tratamento, de Kearley et al, relatou que os camundongos pré-tratados com anti-IL-9 foram completamente protegidos contra o aumento da resistência total das vias aéreas e resistência tecidual causado pela doença, sugerindo que a inibição do remodelamento das vias aéreas é associada com a melhora da função pulmonar,

isso, porque o bloqueio da IL-9 inibiu o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas em modelos animais de asma (7).

Outro achado interessante é que os camundongos com a IL-9 bloqueada fez com que o remodelamento das vias aéreas fosse prevenido, pois camundongos tratados com anticorpo anti-IL-9 permaneceram completamente protegidos pelas mudanças na deposição de colágeno e resistência das vias aéreas. Isso ocorre porque a IL-9 regulou o recrutamento de mástocitos progenitores (11), e porque o tratamento com anticorpo anti-IL-9 inibe a inflamação eosinofílica e reduz a hiperreatividade das vias aéreas em modelos animais com asma desafiados com OVA (18). Esses dados sugerem que a inibição prolongada de IL-9 é requerida para reduzir a atividade dos mastócitos e mediar os efeitos significativamente benéficos nos pulmões. O pré-tratamento anti IL-9 também protegeu camundongos do remodelamento em indução crônica de HDM e inibiu o número de mastócitos, o qual é o eixo que regula a fibrose das vias aéreas (11).

Porém, novos tratamentos vêm sendo estudados em torno da IL-9 e do novo grupo de células T, pois, no estudo de Horka et al, os dados deixam claro que a IL-9 derivada de Th9 é proeminentemente envolvida no desenvolvimento das inflamações alérgicas dos pulmões.

CONCLUSÃO

A identificação desse novo subtipo de células T e suas funções e influência no desenvolvimento da asma trouxeram um maior entendimento de seu mecanismo. Além disso, esclareceu sobre a plasticidade de células Th2 e Th9. Outro ponto

positivo foi a sugestão de novos tratamentos por meio da inibição com anticorpo anti-IL-9 para o bloqueio da inflamação nas vias aéreas.

REFERÊNCIAS

1. 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.
 2. Menz G, Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Robinson DS, Hamid Q, et al. Molecular concepts of IgE-initiated inflammation in atopic and nonatopic asthma. *Allergy*. 1998;53(45 Suppl):15-21.
 3. Machura E, Mazur B, Rusek-Zychma M, Barć-Czarnecka M. Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:606139.
 4. Malmhäll C, Bossios A, Råding M, Sjöstrand M, Lu Y, Lundbäck B, et al. Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans--possible role in asthma. *PLoS One*. 2012;7(6):e40012.
 5. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmbly H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1341-6.
 6. Fujisawa T, Katsumata H, Kato Y. House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils. *Allergol Int*. 2008;57(2):141-6.
 7. Horka H, Staudt V, Klein M, Taube C, Reuter S, Dehzad N, et al. The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *J Immunol*. 2012;188(6):2669-76.
 8. Tan C, Aziz MK, Lovaas JD, Vistica BP, Shi G, Wawrousek EF, et al. Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site. *J Immunol*. 2010;185(11):6795-801.
 9. Baraldo S, Faffe DS, Moore PE, Whitehead T, McKenna M, Silverman ES, et al. Interleukin-9 influences chemokine release in airway smooth muscle: role of ERK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(6):L1093-102.
 10. Reader JR, Hyde DM, Schelegle ES, Aldrich MC, Stoddard AM, McLane MP, et al. Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(6):664-72.
 11. Kearley J, Erjefalt JS, Andersson C, Benjamin E, Jones CP, Robichaud A, et al. IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(7):865-75.
-

12. Gounni AS, Hamid Q, Rahman SM, Hoeck J, Yang J, Shan L. IL-9-mediated induction of eotaxin1/CCL11 in human airway smooth muscle cells. *J Immunol.* 2004;173(4):2771-9.
 13. Böttcher MF, Bjurström J, Mai XM, Nilsson L, Jenmalm MC. Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003;14(5):345-50.
 14. Chiba Y, Kusakabe T, Kimura S. Decreased expression of uteroglobin-related protein 1 in inflamed mouse airways is mediated by IL-9. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(6):L1193-8.
 15. Bhatena PR, Comhair SA, Holroyd KJ, Erzurum SC. Interleukin-9 receptor expression in asthmatic airways *In vivo*. *Lung.* 2000;178(3):149-60.
 16. Hültner L, Druetz C, Moeller J, Uyttenhove C, Schmitt E, Rude E, et al. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol.* 1990;20(6):1413-6.
 17. Namkung JH, Lee JE, Kim E, Park GT, Yang HS, Jang HY, et al. An association between IL-9 and IL-9 receptor gene polymorphisms and atopic dermatitis in a Korean population. *J Dermatol Sci.* 2011;62(1):16-21.
 18. Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Volkmann B, Hagenberg A, Geldmacher H, Braun A, et al. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(6):1319-27.
 19. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):12885-90.
 20. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347-55.
 21. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* 2009;183(11):7169-77.
 22. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol.* 2010;11(6):527-34.
 23. Kajiyama Y, Umezu-Goto M, Kobayashi N, Takahashi K, Fukuchi Y, Mori A. IL-2-induced IL-9 production by allergen-specific human helper T-cell clones. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143 Suppl 1:71-5.
-

24. Knoops L, Louahed J, Van Snick J, Renauld JC. IL-9 promotes but is not necessary for systemic anaphylaxis. *J Immunol.* 2005;175(1):335-41.
 25. Beriou G, Bradshaw EM, Lozano E, Costantino CM, Hastings WD, Orban T, et al. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol.* 2010;185(1):46-54.
 26. Goswami R, Jabeen R, Yagi R, Pham D, Zhu J, Goenka S, et al. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol.* 2012;188(3):968-75.
 27. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 2010;33(2):192-202.
 28. Honma K, Kimura D, Tominaga N, Miyakoda M, Matsuyama T, Yui K. Interferon regulatory factor 4 differentially regulates the production of Th2 cytokines in naive vs. effector/memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(41):15890-5.
 29. Goswami R, Jabeen R, Yagi R, Pham D, Zhu J, Goenka S, et al. STAT6-Dependent Regulation of Th9 Development. *J Immunol.* 2012;188(3):968-75.
 30. Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, et al. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol.* 2012;13(10):981-90.
 31. Cortelazzi C, Campanini N, Ricci R, De Panfilis G. Inflamed skin harbours Th9 cells. *Acta Derm Venereol.* 2012.
 32. Ciprandi G, De Amici M, Giunta V, Marseglia A, Marseglia G. Serum Interleukin-9 Levels Are Associated With Clinical Severity in Children With Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 2012.
 33. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 2010;33(2):192-202.
 34. Fawaz LM, Sharif-Askari E, Hajoui O, Soussi-Gounni A, Hamid Q, Mazer BD. Expression of IL-9 receptor alpha chain on human germinal center B cells modulates IgE secretion. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):1208-15.
 35. Melén E, Gullstén H, Zucchelli M, Lindstedt A, Nyberg F, Wickman M, et al. Sex specific protective effects of interleukin-9 receptor haplotypes on childhood wheezing and sensitisation. *J Med Genet.* 2004;41(12):e123.
 36. Devos S, Cormont F, Vrtala S, Hooghe-Peters E, Pirson F, Snick J. Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(2):174-82.
 37. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(6):872-97.
-

38. Okude A, Tagaya E, Kondo M, Nonaka M, Tamaoki J. A Case of Severe Asthma with Eosinophilic Otitis Media Successfully Treated with Anti-IgE Monoclonal Antibody Omalizumab. *Case Rep Pulmonol.* 2012;2012:340525.
 39. Büttner C, Lun A, Splettstoesser T, Kunkel G, Renz H. Monoclonal anti-interleukin-5 treatment suppresses eosinophil but not T-cell functions. *Eur Respir J.* 2003;21(5):799-803.
-

3 CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL

3.1 ARTIGO ORIGINAL

**Caracterização de Diferentes Expressões Fenotípicas de
Células T CD4 na Asma Atópica e Não-atópica de Uma
População de Escolares de Porto Alegre/RS**

RESUMO

Introdução: A asma é uma doença com predominância da presença das células T CD4 do tipo Th2, que afeta das crianças e tem como principais características a inflamação e hiperreatividade das vias aéreas. A asma apresenta dois fenótipos principais dependendo da presença de atopia. Ainda não foi totalmente descrito em crianças asmáticas com idade escolar a presença dos diferentes perfis de células Th1, Th2, Th17 e Treg no sangue periférico, que podem estar relacionados com a patogênese da doença.

Objetivo: Avaliar o perfil fenotípico de células T CD4 em pacientes asmáticos escolares do município de Porto Alegre/RS.

Métodos: Este foi um estudo transversal realizado com o recrutamento de crianças com 09 a 15 anos de idade, asmáticas e controles. O sangue periférico foi coletado e as células mononucleares foram separadas utilizando Ficoll e colocadas em cultura com anticorpos anti-CD3/CD28 por 24 hrs. Após este tempo as células foram marcadas com anticorpos específicos para fatores de transcrição para análise do perfil Th1, Th2, Th17 e Treg por citometria de fluxo e o sobrenadante foi recolhido para análise de citocinas por CBA. No plasma foi realizada a análise de IgE específicas.

Resultados: Foram analisados 104 pacientes, sendo 12 controles e 92 asmáticos. Os pacientes asmáticos atópicos apresentaram um perfil Th2 mais acentuado, comparado com os não-atópicos e controles atópicos. Quando analisamos as células que expressam mais de um fator de transcrição foi observado que os pacientes asmáticos atópicos apresentam maior frequência de células T CD4 positivas GATA3+FOXP3+, ROR γ T+GATA3+, GATA3+Tbet+ comparada com pacientes não-atópicos e controles atópicos. Analisando a severidade foi observado uma frequência maior de células T CD4+ ROR γ T+ GATA3+ em pacientes com asma moderada comparado com pacientes com asma leve. O estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 nas células dos pacientes asmáticos atópicos induziu mais um perfil Th1 enquanto que estímulo com DerP1 mudou o perfil de algumas células principalmente de células Tregs e Th17.

Conclusão: Este é o primeiro estudo em crianças que analisa o perfil Th1, Th2, Th17 e Treg utilizando a marcação de fatores de transcrição por citometria de fluxo em crianças asmáticas atópicas ou não-atópicas e controles. Encontramos um perfil mais Th2 em crianças asmáticas atópicas de acordo com a literatura. Interessantemente as crianças não-atópicas não apresentaram nenhum perfil predominante. As crianças com asma moderadas apresentam um perfil que expressa ao mesmo tempo o fator de transcrição ROR γ T e GATA3. Dependendo do estímulo são induzidas diferentes fenótipos nas células deste grupo de pacientes com asma

ABSTRACT

Introduction: Asthma is a disease with predominant presence of CD4 Th2 cells that affects children. The disease main characteristics is inflammation and airway hyperreactivity. Asthma has two main phenotypes depending on the presence of atopy. It was not yet fully described in asthmatic children of school age the presence of different profiles of Th1, Th2, Th17 and Treg cells in peripheral blood, which may be related to the pathogenesis of the disease.

Aims: To analyze the phenotypic of CD4 T cells in asthmatics children in Porto Alegre/RS.

Methods: This was a cross-sectional study when it was recruited children between 9 to 15 years old, asthmatics and controls. The PBMCs were isolated using Ficoll and the cells were cultured with anti-CD3/CD28 antibodies, Derp1 or left unstimulated. After 24hs the cells were stained with antibodies specific for transcription factors in order to analyze Th1, Th2, Treg and Th17 cells by flow cytometry and the supernatant was collected for cytokine analysis by CBA assay. Plasma was used to perform analysis of specific IgE.

Results: It was analyzed 104 patients, 12 controls and 92 asthmatics. Atopic asthmatic patients presented higher frequency of Th2 cells compared with non-atopic and atopic controls. When we analyzed cells expressing more than one transcription factor it was observed that atopic asthmatics patients have a higher frequency of CD4+GATA3+FOXP3+, CD4+ROR γ T+GATA3+ and CD4+GATA3+Tbet+ compared with non-atopic patients and controls atopic. Analyzing the asthma severity it was seen a higher frequency of CD4+ROR γ T+GATA3+ in patients with moderate asthma compared with patients with mild asthma. Stimulating the cells from atopic asthma patients with anti-CD3 and anti-CD28 induced more Th1 profile while stimulating with DerP1 protein changed the profile of the cells mainly to Th17 and Treg cells.

Conclusion: This is the first study in children that analyzes Th1, Th2, Treg and Th17 cells using the tag transcription factor by flow cytometry in asthmatic or atopic and non-atopic controls. We found a Th2 profile in atopic asthmatic children according to the literature. Interestingly non-atopic children showed no predominant profile. Children with moderate asthma have a profile that expresses both the transcription factor GATA3 and ROR γ T. Depending on the stimulus used it was induced different phenotypes in the cells of this group of patients with asthma.

INTRODUÇÃO

A asma é uma desordem heterogênea das vias aéreas, em que as interações genéticas e ambientais estão envolvidas (1, 2), tendo como características fundamentais, a inflamação, a hiperreatividade das vias aéreas, hipersecreção de muco e fibrose subepitelial, resultando em perda da função pulmonar (2, 3). Devido a esse desfecho, pacientes asmáticos apresentam: dispnéia, sibilância, dor no peito, tosse e espirros contínuos, sendo conseqüência da obstrução das vias aéreas (2, 4), outra característica da doença é a liberação de potentes mediadores inflamatórios (5). Porém, além dessas características, a principal característica é o remodelamento das vias aéreas, o qual foi denominado assim, pelo fato de alterações coletivas ocorrerem, tais como muco epitelial, metaplasia, a hipertrofia do músculo liso e deposição aumentada de glicoproteínas de matriz subepitelial (4). Por esse motivo que a manifestação clínica da asma é dependente da severidade da inflamação (6).

Por ser uma doença heterogênea, a asma induz a expressão de diferentes fenótipos, severidades, história natural, atopia e resposta aos tratamentos (7). O processo de desenvolvimento da asma inicia pelo contato de um alérgeno com a mucosa, a qual instrui as células B a produzir anticorpos IgE, porém esse processo é dependente das células apresentadoras de antígenos (APCs) e da cooperação entre as células B e células Th2 (6). Este processo de progresso inicial para asma é relatada tipicamente como precoce, e emerge como a doença mais comum entre as crianças que geralmente irá persistir até a adolescência (8, 9).

Na asma a própria natureza da doença influencia nos diferentes fenótipos de células TCD4, além da magnitude da resposta imune e pelas citocinas que por elas são secretadas (10). Estão envolvidas na fisiopatologia da asma, as linhagens de células T *helper*, tais como Th1, Th2, Th17 e Tregs, atuam de diversas maneiras na patologia da asma, o que pode ser exibido pela plasticidade de seus fatores de transcrição (11, 12). Acreditava-se que apenas as células Th1 e células Th2, as quais foram sub-classificadas em meados dos anos de 1980 conforme suas atividades efetoras estivessem envolvidas, porém essa idéia mudou com as novas células efetoras descritas nos últimos anos, como, Th17 e Treg (13).

A plasticidade das células envolve a expressão coordenada dos seus respectivos fatores de transcrição, onde todas as células necessitam de um fator de transcrição para sua ativação (7). As células Th2 é o fenótipo de células mais estudadas na asma, entretanto evidências mostram que células Th1 possam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Esta hipótese foi demonstrada em um estudo, onde ocorreu o aumento dos níveis de INF- γ em pacientes com asma, sugerindo uma resposta Th1 (14, 15). Células Th1 são dirigidas por estimulação do INF- γ e IL12 que ativam STAT1 e STAT4, resultando na ativação do fator de transcrição Tbet, que por fim estimula as células T naive a tornarem-se células Th1. A resposta destas células é em torno da imunidade de células contra patógenos intracelulares (13).

Na patologia da asma as células T helper estão envolvidas, porém a principal fenótipo relatado no processo da doença são as células Th2, as quais têm um papel chave na patogenia da doença, bem como as citocinas por elas secretadas: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A IL-4 é uma importante citocina para a sensibilização alérgica e produção de IgE, já a IL-5 é uma citocina crucial para a sobrevivência eosinofílica (16). Estas citocinas secretadas por células Th2 são codificadas em agrupamento de genes no cromossomo 5 em humanos (17), e seu desenvolvimento ocorre por meio da IL-4 que induz a ativação de STAT6 e a expressão do fator de transcrição GATA3. Estas células Th2 estão implicadas principalmente nas respostas alérgicas (13).

O terceiro subtipo de células efetoras envolvidas na patogênese da asma são as células Th17, uma linhagem de células TCD4 que secreta as citocinas IL17A a F (18) e desempenham um importante papel nas várias doenças imunes. O papel principal das Th17 é a habilidade direta no recrutamento e ativação de neutrófilos e produção de IL-8, já indiretamente as células Th17 induzem citocinas pró-inflamatórias de epitélios das vias aéreas (13, 18). Estas células podem ser consideradas como promotoras das respostas imunes e como uma célula sinalizadora na alergia das vias aéreas e da asma, bem como relacionada com a severidade da asma conduzindo para a inflamação neutrofílica na asma. Estas células originam-se da ativação de TGF- β , IL-6, IL-1 β , e IL-23 que induz o STAT3 que por sua vez induz a ativação do fator de transcrição ROR γ t, induzindo a produção de células Th17 (13, 18).

Outro subtipo de células T que têm sido sugeridos pelo seu papel na patogênica da asma, são as células TCD4 regulatórias (Treg), as quais são consideradas como as principais reguladoras da resposta imune (15). Elas são caracterizadas pelos marcadores CD4 e CD25, e pelo fator de transcrição FOXP3. O efeito de supressão destas células é importante no controle da resposta inflamatória na asma, reduzindo a asma severa (13, 19). Além do envolvimento das células T na asma, outra característica da doença é sua classificação em asma atópica e não atópica de acordo com a predisposição a IgE, conforme a presença ou não de atopia(10, 11).

Uma das características da patogênica da asma como já citado acima, se diz respeito à inflamação crônica, que em pacientes atópicos é mais potencializada quando são expostos ao alérgeno *Dermatophagoides sp.* (HDM). Este ácaro é um das fontes mais comuns de alérgenos em todo o mundo e considera-se que ele atinge mais de 15-20% da população dos países industrializados (20, 21). Estudos experimentais sugerem que o alérgeno HDM específico para células Th2 desempenham um papel central na resposta inflamatória alérgica induzindo a produção de alérgenos específicos para IgE, para o recrutamento de eosinófilos nos tecidos, a facilidade do endotélio para o recrutamento de células inflamatórias para os pulmões inflamados, a produção de muco e a modulação do músculo liso das vias aéreas (22).

Pensando no que vêm sendo sugerido sobre a plasticidade na diferenciação das células T e no papel na modulação de doenças inflamatórias, nossa hipótese é caracterizar os subtipos e células T, por meio dos seus fatores de transcrição em grupos de asmáticos não-atópicos, atópicos e grupo controle, bem como correlacionar com a severidade da asma de crianças escolares da cidade de Porto Alegre/RS.

MÉTODOS

Realizamos um estudo experimental transversal com o objetivo de caracterizar os fenótipos de células T CD4 em uma população de crianças asmáticas, por meio dos fatores de transcrições destas células. O estudo foi

conduzido no Centro Infant, localizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUC - RS- Brasil. O centro é referência em pesquisas de alta qualidade em doenças respiratórias, tecnologia e conhecimento. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número CEP10/05084.

Foram incluídos no estudo escolares de 09 a 15 anos de idade da rede pública e particular de ensino básico do município de Porto Alegre. Essas escolas foram selecionadas a partir de sorteios realizados pelos próprios pesquisadores. Após o sorteio, questionários foram enviados aos responsáveis do escolar com perguntas sobre o tema abordado. Neste questionário a asma foi definida como uma tosse ou sibilância sem resfriado nos últimos doze meses, bem como o uso de medicamentos para asma, sendo assim melhor caracterizada a seleção da população asmática do estudo.

Os critérios de inclusão para o estudo foram crianças diagnosticadas com asma segundo os critérios apresentados pelos responsáveis após o preenchimento do questionário, as quais foram convidadas a participarem do estudo imunofenotípico. Após esta etapa, os responsáveis que concordaram a participação da criança no estudo, realizaram uma entrevista e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de qualquer procedimento com o infantil. O questionário dos aspectos clínicos das crianças foi baseado o usado pelo estudo de ISAAC-fase II, após respondidos os questionários, os estudantes foram submetidos à coleta de sangue periférico.

Os critérios de exclusão do estudo foram crianças em que os responsáveis não concordaram com a participação das mesmas no estudo, as crianças que se recusaram a coleta de sangue e aquelas em que a quantidade de sangue não foi suficiente para as realizações das análises.

Coleta sanguínea: A coleta sanguínea foi realizada no próprio Instituto de Pesquisas Biomédicas onde foram coletados 10 mL de sangue periférico venoso com o uso de seringas heparizadas.

Preparação das populações de células mononucleares: O procedimento de separação das células por gradiente de densidade ocorreu no fluxo laminar, com Histopaque 1119 e Histopaque 1077, com centrifugação a 700xg por 30 minutos à

18°C. Após a centrifugação foram coletados 3mL de plasma em eppendorfs identificados para a análise de IgE específica, a qual foi realizada pelo laboratório Imuno da cidade de Porto Alegre. Os alérgenos que foram analisados foram: *Periplaneta americana*; pêlo de cão, gato, gramíneas, fungos, *Dermatofagoide spteronysinus*, *Dermatofagoide farinae*, pólen, poeira e *Blomiatropicalis*. Foi considerado paciente atópico, aqueles que apresentaram valor semi-quantitativo acima de 0,79 para qualquer um dos alérgenos, através do teste doRAST *in vitro* no soro. Além disso, foram coletadas as células mononucleares as quais foram transferidas para tubos de Falcon de 15mL, e acrescentado sobre elas meio RPMI1640 e centrifugadas por 10min a 1800rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e a viabilidade das células foi avaliada através do ensaio de exclusão com corante vital azul de trypan diluição 1:10 em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas e congeladas em 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal (SBF) na concentração de 8×10^6 células mononucleares por criotubo em 1mL, e armazenadas a -80°C até o próximo processo.

Cultura de células: Para a cultura das células, as células mononucleares foram descongeladas rapidamente á 37°C e o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo com 10 mL de meio RPMI sem soro, e centrifugadas por 10 min a 1800 rpm à temperatura ambiente. O pellet das células foi suspenso em 1mL de meio RPMI (Cultilab) com 2% de SBF, e a viabilidade celular foi avaliada novamente através do ensaio de exclusão com corante azul de Trypan. As células mononucleares foram suspensas na concentração de 8×10^6 mL em meio RPMI 2% de SBF, e em seguida foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células por poço em meio RPMI com 2% de SBF em 100µL totalizando 3 poços por paciente. Um dos poços as células foram estimuladas por 24hrs com LPS (500ng/ml) para guardar o sobrenadante, outro com a proteína DerP1 (11µg/ml), e outro poço as células foram estimuladas por 24 hs com anticorpos anti CD3/antiCD28 (2µg/ml) por 24 horas. Após o tempo de incubação o sobrenadante foi recolhido e armazenado em eppendorffs de 0,5mL para a posterior análise das citocinas e com as células mononucleares realizamos a marcação celular de citometria de fluxo.

Marcação para análises de citometria de fluxo: As células mononucleares foram marcadas com anticorpos para a identificação dos fenótipos de células Th1, Th2, Th17 e Treg. Em cada poço da placa que as células estavam em cultura, foi retirado o sobrenadante e foi acrescentado sobre as células 100µL de PBS 2% de SBF contendo os anticorpos que marcam superfície: anti-CD4 PE Cy7 e anti-CD25 APCH7. As células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro, após foi adicionado 100µL de tampão de citometria em cada amostra, centrifugamos por 5 minutos à 1500rpm. Desprezamos o sobrenadante e sobre as amostras foram acrescentamos 200µL de tampão de A de Foxp3 1X (BD bioscience). Então as células foram incubadas por mais 10 minutos à temperatura ambiente no escuro, e centrifugadas por 5 minutos à 1500rpm e desprezamos o sobrenadante. Foram adicionados 200µL de tampão de citometria em cada amostra, e centrifugado por 5 minutos à 200rpm e desprezado o sobrenadante. O tampão C foi adicionado ao pellet em um volume de 50µL e incubamos por 20min à temperatura ambiente no escuro. Realizada esta incubação, adicionamos sobre as amostras 100µL de tampão de citometria e centrifugamos à 1500rpm por 5 minutos, após, o sobrenadante foi desprezado e acrescentados 100uL de PBS 1X contendo 2% de SBF, com anticorpo que marcam os fatores de transcrição: anti-Foxp3 Alexa 488, anti-GATA3 Alexa 648, anti-RORyT PE, anti-Tbet PerCP Cy5.5. As células foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente no escuro, e acrescentados 200µL de tampão de citometria em cada amostra. Novamente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm e o sobrenadante foi desprezado e acrescentados 150µL de tampão de citometria em cada amostra e foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo FACS Cantoll (BD bioscience).

Análises dos dados de citometria de fluxo: Os dados da citometria de fluxo foram analisados e interpretados com o auxílio do programa FlowJo (TreeStar).

Cytometric Bead Array (CBA) Kit: Os sobrenadantes das células após a cultura celular foram utilizados para a realização deste experimento. Primeiramente, os padrões (*'standards'*) de citocinas Th1, Th2 e Th17 foram reconstruídos em *'Assay Diluent'*- 2mL, que descansaram durante 15 minutos, a fim que os padrões reconstituídos se equilibrem antes de fazer as diluições. A diluição dos padrões foi seriada usando o *'Assay Diluent'*. As proteínas reconstituídas foram gentilmente misturadas com auxílio da pipeta. Então, identificamos oito tubos de citometria,

identificando-os na ordem: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, e em seguida foi pipetado 300 μ L de *Assay Diluent* em cada tubo, e a diluição seriada foi realizada conforme a figura abaixo, homogeneizando delicadamente.

Realizamos a preparação das *beads* adicionando 5 μ L de cada *bead* de captura por tubo e identificamos, homogeneizamos com auxílio de um vortex e pipetamos 25 μ L de *mixed capture beads* por tubo. No procedimento do ensaio, adicionamos 25 μ L de *beads* para cada amostra nos tubos e adicionamos 25 μ L de *PE detection reagent*, 25 μ L da diluição de *Cytokine Standard* (tubos dos controles positivos), e 25 μ L de cada amostra aos respectivos tubos. Incubamos por 3 horas em temperatura ambiente, protegendo da exposição direta da luz. Enquanto estava incubando, preparamos o *Cytometer setup*. Após as 3h de incubação: adicionamos 500 μ L de *Wash buffer* e centrifugamos a 200 *xg* por 5 minutos, e aspiramos cuidadosamente o sobrenadante e desprezamos. Após adicionamos 150 μ L de *Wash buffer* em cada tubo para re-suspender o pellet, e por fim analisamos no citômetro de fluxo.

Análises dos dados do CBA: Os dados do CBA foram analisados e interpretados com auxílio do programa do próprio fabricante (FCAP array).

Análises Estatísticas: Para verificação de a amostra ter distribuição normal ou não-normal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis qualitativas ordinais com distribuição normal foram expressas através de médias com o respectivo desvio-padrão. As variáveis quantitativas não-paramétricas entre grupos independentes foram comparadas através do teste U Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com posttest de Dunn's, e em amostras relacionadas foi utilizado o teste de Friedman com posttest de Dunn's. Os dados foram transcritos em uma planilhas Excell Microsoft Office e posteriormente analisados através do programa SPSS versão 20.0 e pelo programa GraphPad® Prism 5 Software (USA).

RESULTADOS

Características dos pacientes

O total de pacientes deste estudo foi de 108 pacientes, porém dois foram excluídos por amostra insuficiente. As características clínicas e demográficas dos 106 pacientes participantes do trabalho estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes

	Pacientes Controles (n=12)	Pacientes Asmáticos (n=94)		
		Intermitentes (n=36)	Leves (n=41)	Moderados (n=17)
Idade (anos)	11.20±1.34	11.96±1.27	11.90±1.32	12.47±0.82
Sexo masculino/feminino	6/6	20/16	17/24	12/5
Não atópicos/atópicos *	4/8	18/74		

* Para definir a atopia foi avaliado pelo exame de RAST o valor semi-quantitativo para a quantidade de IgE específica, referente aos alérgenos pesquisados, sendo classificado em classes, considerado negativo para quantidades inferiores que 0,35, indefinido até valor 0,69 e acima deste valor classificado como positivo. Valores das idades descritos em média e desvio padrão.

Frequência de células Th1, Th2, Th17 e Treg em pacientes asmáticos e controles

A expressão dos fatores de transcrição das células analisadas foi realizada após isolamento células mononucleares de pacientes. Na figura 1A está demonstrado em gráficos de pontos a estratégia de *Gates* que foi utilizada para fazer a análise da expressão dos fatores de transcrição nas células T dos pacientes e controles.

Os pacientes foram subdivididos em pacientes não-atópicos e atópicos, conforme a presença de atopia. As células dos pacientes foram estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28 ou com somente meio de cultura como controle. Nos pacientes asmáticos observamos uma maior frequência das células Th1 após estímulo comparando com o controle (Figura 1B). Já em relação às células Th2 a estimulação com anti-CD3/CD28 não altera a expressão do fator de transcrição GATA3 quando comparada com o controle (Figura 1C). Porém, quando analisadas

as células entre os grupos, observamos que os pacientes asmáticos atópicos tem uma expressão superior do fator de transcrição GATA3 comparado com os pacientes não atópicos e com controles atópicos (Figura 1C). As células Th17 não apresentaram diferença significativa entre nenhum dos grupos (Figura 1D). Em relação às células Treg, observamos que a estimulação com anticorpo anti-CD3/CD28 aumenta a expressão do fator de transcrição foxp3 comparado com o controle (Figura 1E). Além disso, os pacientes asmáticos atópicos apresentaram uma frequência de células T CD4 Foxp3+ aumentadas significativamente em relação aos pacientes asmáticos não-atópicos quando estimuladas (Figura 1E).

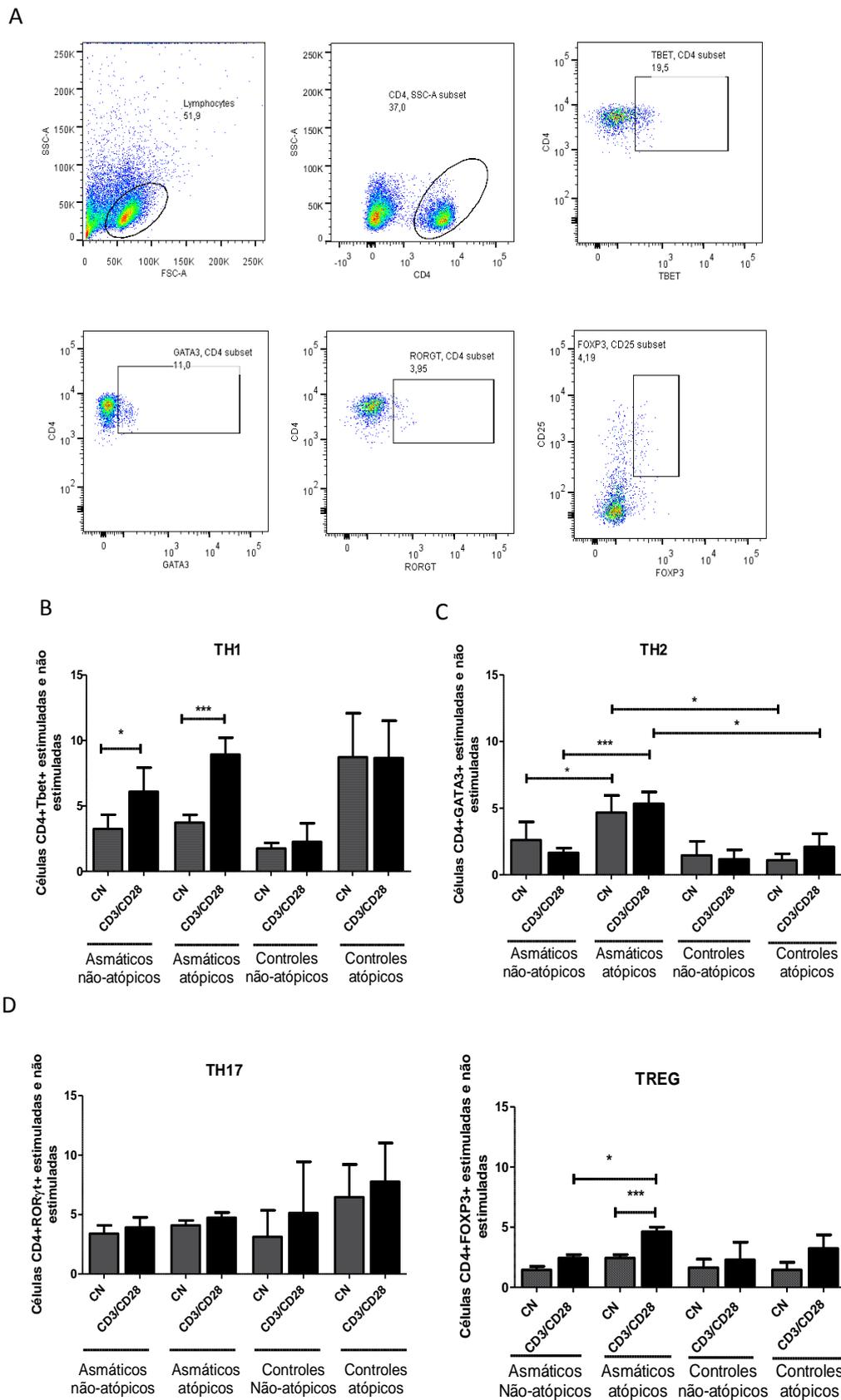


Figura 1: Expressão dos fatores de transcrição que determinam a diferenciação das células Th1, Th2, Th17 e Treg em pacientes asmáticos e controles. Células mononucleares foram purificadas do sangue periférico dos pacientes e cultivadas com ou sem estímulo de anti-CD3 e anti-CD28 e posteriormente marcadas com anticorpos marcadores de superfície para os subtipos de células estudadas. A Frequência da expressão de fatores de transcrição Tbet, GATA3, RORγt e Foxp3 em PBMCs em plots de citometria de fluxo. B Gráfico demonstrando as porcentagens de células Th1, em pacientes asmáticos não-atópicos e atópicos com células não estimuladas e estimuladas. C Gráfico demonstrando a porcentagem de célulasTh2, em pacientes não-atópicos e atópicos com células estimuladas e não estimuladas. D Gráfico apresentando as porcentagens de células Th17 em grupos de pacientes não-atópicos e atópicos e entre células estimuladas e não estimuladas. E Gráfico demonstrando a porcentagem de células Tregs em pacientes não-atópicos e atópicos e células com estímulo e sem estímulo.

Análise dos fatores de transcrições relacionados com a severidade da asma

A frequência das células Th1 está aumentada significativamente quando estimulada com anticorpos anti-CD3/CD28 em comparação com o controle sem estímulo nos pacientes asmáticos intermitentes não-atópicos e atópicos, nos leves atópicos e no moderado atópicos (Figura 2A). Além disso, os pacientes asmáticos leves atópicos apresentaram uma maior frequência de células Th1 estimuladas comparando com pacientes leves não-atópicos (Figura 2A).

Quando analisamos as células Th2 observamos uma porcentagem de expressão maior do fator de transcrição GATA3 nos pacientes atópicos leves comparados com pacientes não-atópicos leves (Figura 2B). Além disso, observamos que os pacientes intermitentes possuem uma maior frequência de células TCD4+GATA3+ quando estimuladas comparado com o controle sem estímulo (Figura 2B).

As células Th17 não apresentaram diferença alguma entre os grupos nem entre a estimulação celular (Figura 3C). A frequência das células Treg está aumentada significativamente quando estimulada com anticorpos anti-CD3/CD28 em comparação com o controle sem estímulo nos pacientes asmáticos intermitentes não-atópicos e atópicos, nos leves atópicos e no moderado atópicos (Figura 3D). Além disso, na figura 3D, os pacientes asmáticos leves atópicos apresentaram uma maior frequência de células Treg estimuladas comparando com pacientes leves não-atópicos.

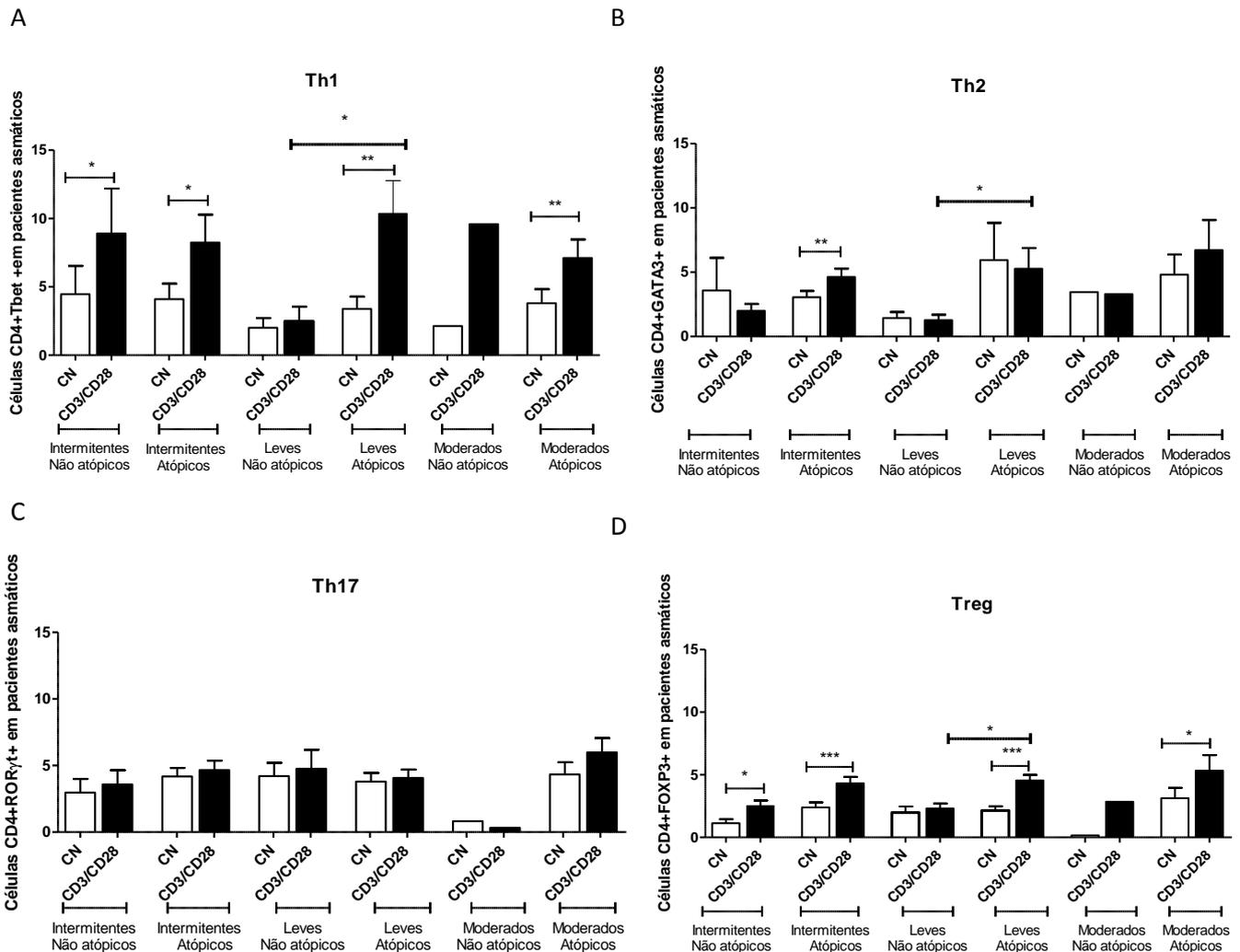


Figura 2: Análise da expressão de fatores de transcrição conforme a severidade da asma. Células mononucleares foram purificadas do sangue periférico dos pacientes e cultivadas com ou sem estímulo de anti-CD3 e anti-CD28 e posteriormente marcadas. A Gráfico demonstrando a porcentagem das células CD4+ Tbet+ em pacientes asmáticos atópicos e não atópicos. B. Gráfico apresentando a porcentagem de células TCD4+GATA3+ e, pacientes asmáticos. C. Gráfico demonstrando a porcentagem de células TCD4+ RORγt+ em pacientes asmáticos não-atópicos e atópicos. D. Gráfico apresentando a porcentagem de células TCD4+ Foxp3 + em pacientes asmáticos.

A relação entre a frequência de pacientes atópicos e não-atópicos com a gravidade da doença está demonstrado na tabela 2.

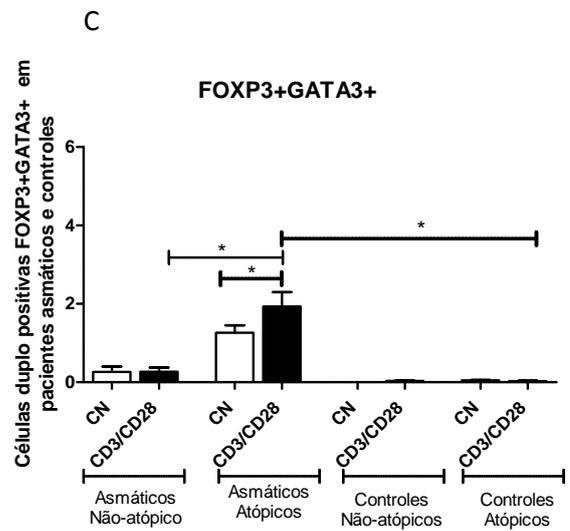
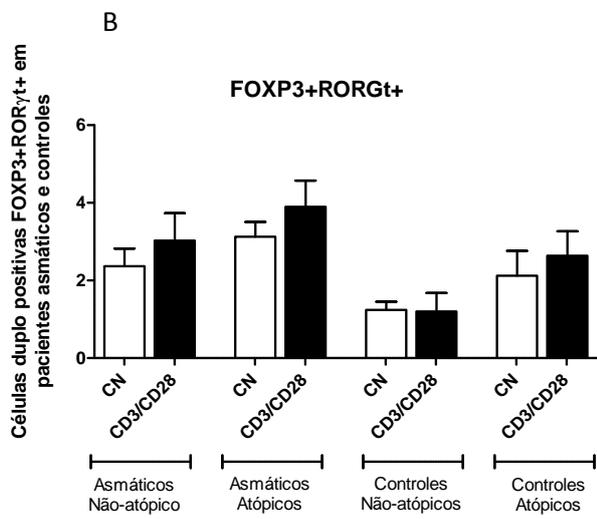
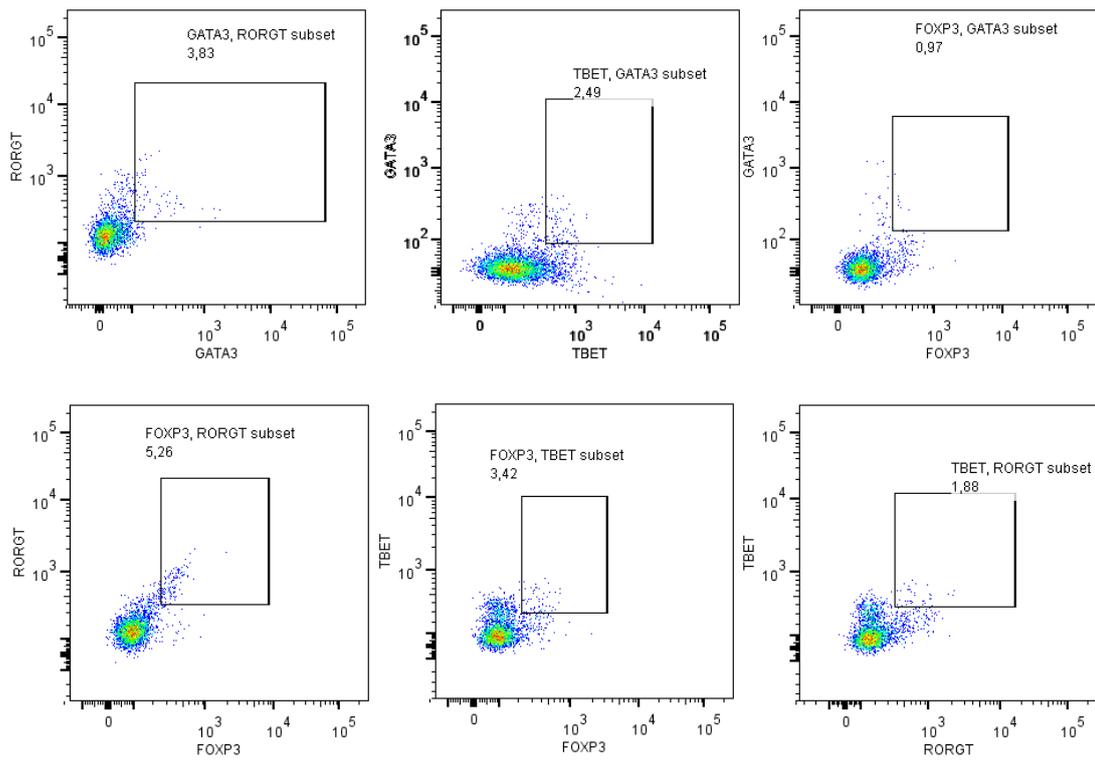
Tabela 2 - Dados relacionando a atopia e gravidade da doença

Grupos	Gravidade da doença	Intermitentes	Leves	Moderados
		50% (n=9)	44,4% (n=8)	5,6 (n=1)
Asmáticos não-atópicos		35,2% (n=26)	43,2% (n=32)	21,6% (n=16)
Asmáticos atópicos				

Expressão da frequência de células TCD4+ positivas para mais de um fator de transcrição em pacientes asmáticos e controle

Recentemente ficou-se sabendo da plasticidade das células TCD4+ em relação a expressão do seu fator de transcrição e da sua influência na modulação das doenças inflamatórias, deste modo, decidimos avaliar a expressão de células positivas para mais de um fator de transcrição nestes pacientes. A figura 3A demonstra a estratégia de gates utilizada para análise das células duplo-positivas para os fatores de transcrição. Observamos que a frequência das células duplo-positivas que expressavam o fator de transcrição GATA3 independente do outro fator de transcrição concomitante expresso estava aumentada nos pacientes asmáticos atópicos comparado com como no grupo dos controles atópicos e asmáticos não-atópicos. Além disso, observamos que a frequência das células T CD4 duplo-positivas para ROR γ t+ e Tbet+; Foxp3e Tbet+ quando estimuladas estão significativamente aumentadas em relação ao controle sem estímulo nos grupos de pacientes asmáticos não-atópicos e atópicos (Figura 3D e 3F).

A



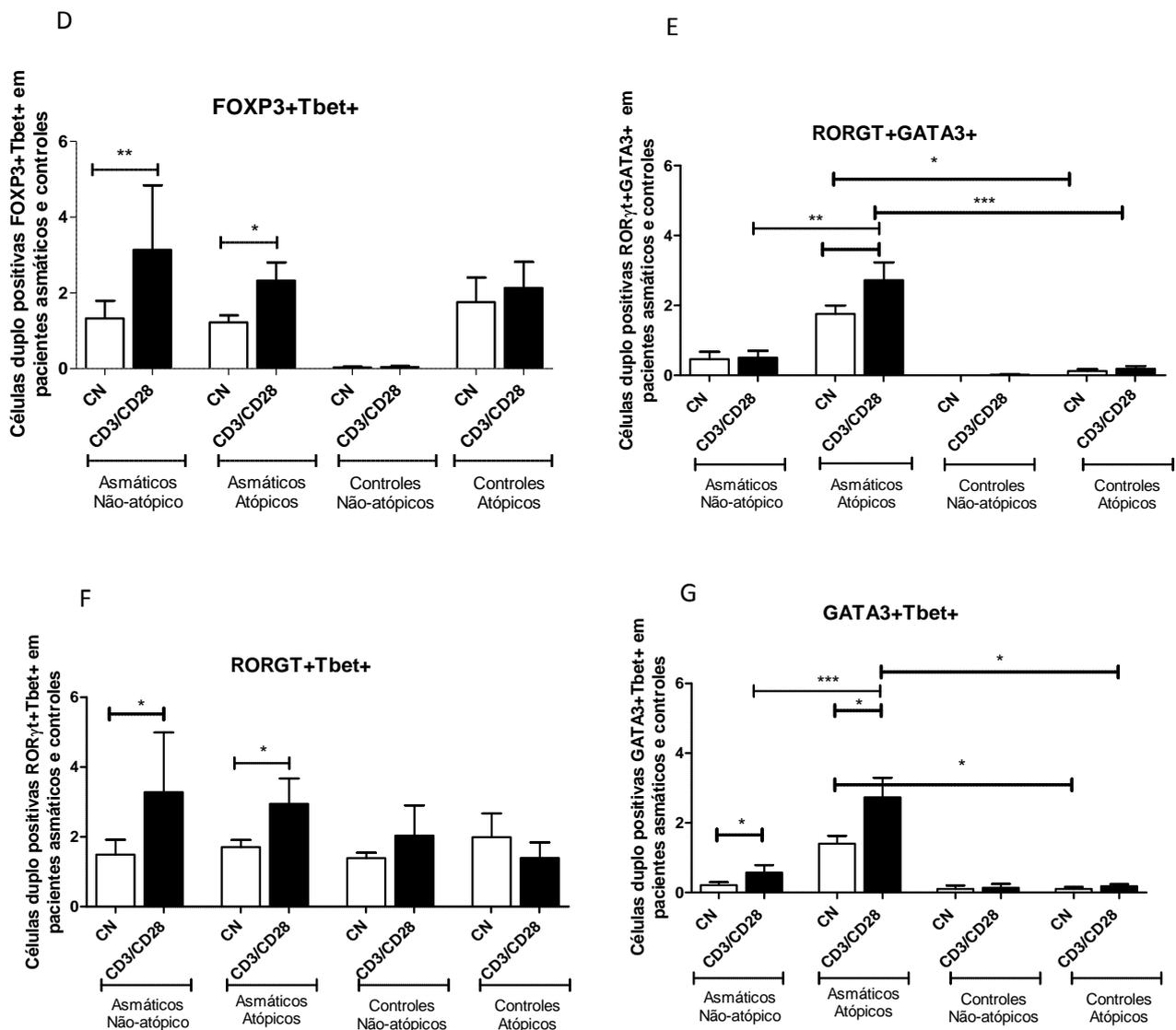


Figura 3. Análise das células duplo-positivas para fatores de transcrição em pacientes asmáticos e controles, não-atópicos e atópicos. Células mononucleares foram purificadas do sangue periférico dos pacientes e cultivadas conforme descritos na legenda da Figura 1, e então analisadas as porcentagens de células duplo-positivas. A. Figura demonstrando a expressão de células duplo-positivas por citometria de fluxo. B. Porcentagem de células duplo-positivas Foxp3+RORγt+ em pacientes asmáticos e controles. C. Gráficos apresentando a porcentagem de células duplo-positivas Foxp3+GATA3+ em pacientes asmáticos e controles. D. Porcentagem de células Foxp3+Tbet+ em pacientes asmáticos e controles. E. Este gráfico apresenta a porcentagem de células duplo-positivas RORγt+GATA3+ em pacientes asmáticos e controles. F. Porcentagem de células duplo-positivas RORγt/Tbet em pacientes controles e asmáticos. G. Gráfico com as porcentagem de células duplo-positivas GATA3+Tbet+ em pacientes asmáticos e controles.

Caracterização da relação das células duplo-positivas para mais de um fator de transcrição com a severidade da asma

Como as células T CD4 duplo-positivas para fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação dos fenótipos celulares podem estar envolvidas na

modulação da asma, nós avaliamos estas células em relação à gravidade da doença. Na figura 4, observamos uma maior frequência das células T CD4 ROR γ t+Foxp3+; Foxp3+GATA3+; Foxp3+Tbet+; ROR γ T+GATA3+; ROR γ T+Tbet+; GATA+Tbet+ quando estimuladas com os anticorpos anti-CD3/CD28 comparada com controle sem estímulo nos três grupos de gravidade da asma avaliados. A frequência das células duplo-positivas Foxp3+Tbet+ estimuladas está diminuída nos pacientes asmáticos leves comparados com paciente asmáticos moderados, sugerindo que a diminuição desta população esteja relacionada com uma maior severidade da doença (Figura 4C). Na figura 4D está demonstrado a frequência das células duplo-positivas ROR γ t+GATA3+, onde foi observado um aumento da expressão destes fatores de transcrição nas células não estimuladas no grupo dos pacientes moderados em relação aos pacientes leves sugerindo que o aumento desta população possa estar envolvido com a maior severidade da doença.

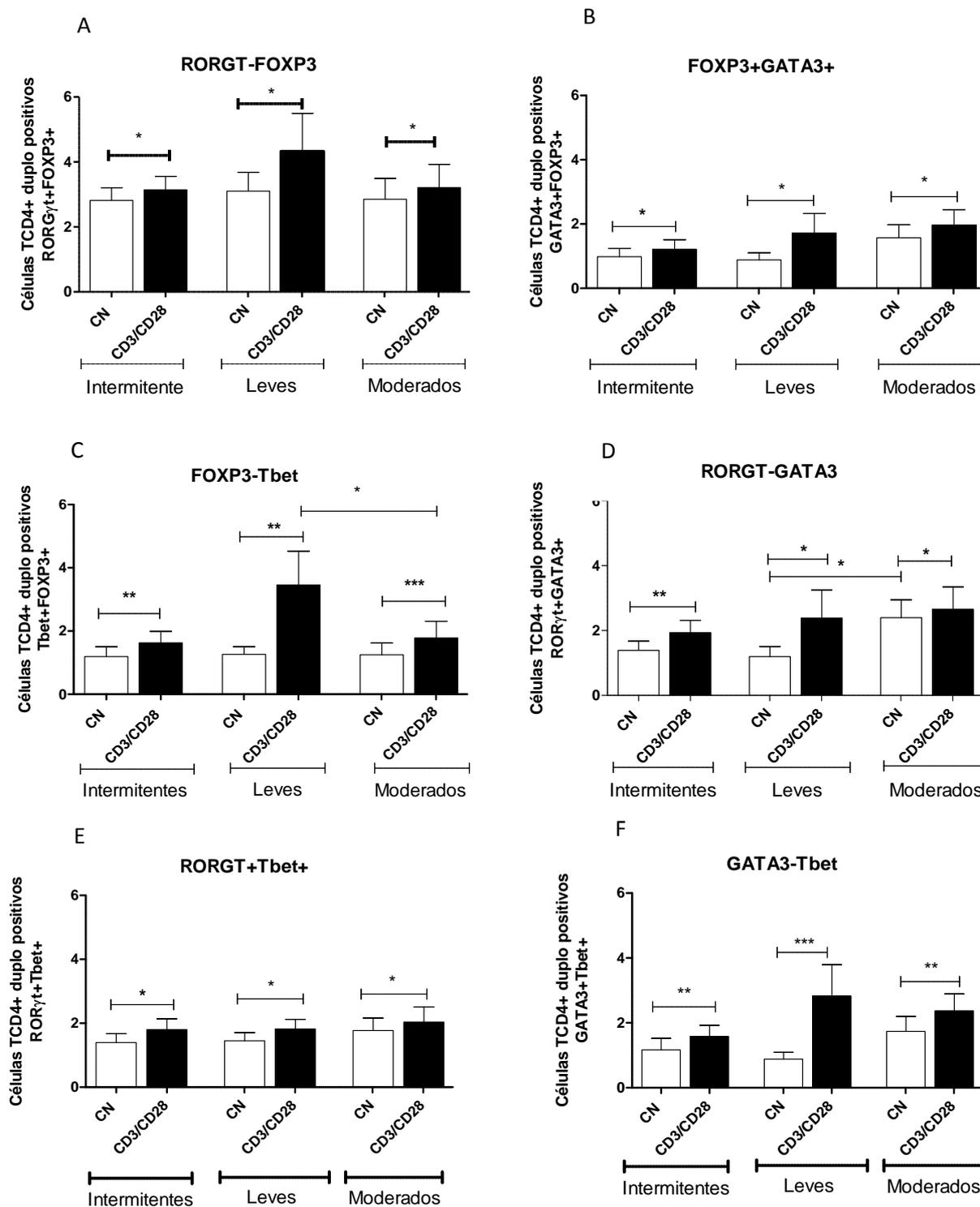


Figura 4. Análise das células duplo-positivas para fatores de transcrição em pacientes asmáticos de acordo com a severidade. Células mononucleares foram purificadas do sangue periférico dos pacientes e cultivadas conforme descritos na legenda da Figura 1. A. Porcentagem de células duplo-positivas RORγt+Foxp3+ estimuladas e não estimuladas de pacientes com asma intermitente, leve e moderada. B. Gráfico de células duplo-positivas Foxp3+GATA3+ com estímulo e sem estímulo de pacientes asmáticos com diferentes graus de severidade. C. Células duplo-positivas Foxp3+Tbet+ em pacientes asmáticos com severidades distintas. D. Gráficos demonstrando células duplo-positivas RORγt+GATA3+ em pacientes com asma, intermitente, leve e moderada, estimuladas e não estimuladas. E. Porcentagem de células duplo-positivas RORγt+Tbet+ estimuladas e não estimuladas de pacientes asmáticos intermitente, leve e moderado. F. Gráfico apresentando a porcentagem de células duplo-positivas GATA3+Tbet+ em pacientes asmáticos com grau de severidade distintos.

Concentração de citocinas no soro de citocinas de pacientes asmáticos e controles

A análise da concentração de citocinas secretadas pelas células Th1, Th2, Th17 e Treg, foram realizadas com um número inferior que as análises anteriores, sendo analisados 14 pacientes asmáticos e 15 pacientes controles. As células dos pacientes foram estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28 ou com somente meio de cultura, como controle e o sobrenadante da cultura foi coletado após 24hs para análise de citocinas por citometria de fluxo. Ao analisar a concentração da citocina IL-2, observamos que as células estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28, apresentaram uma maior concentração desta citocina em relação às células não estimuladas, independente se o paciente é asmático ou controles. Porém, ao comparar a concentração desta citocina entre os dois grupos, notamos que a quantidade de IL-2 foi superior nas células sem estímulo dos pacientes asmáticos, em relação aos pacientes controles (Figura 5A).

A IL-4 apresentou uma maior expressão nas células que receberam estimulação com anticorpo anti-CD3/CD28, comparado com as células não estimuladas, tanto em pacientes asmáticos como nos controles (Figura 5B). Analisando citocina IL-6, observamos uma maior concentração no sobrenadante quando células são estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28 em pacientes asmáticos comparado com controles (Figura 5C). Na figura 5D, observamos que a diferença na maior concentração de IL-10 ocorreu no sobrenadante de células sem estímulo de pacientes asmáticos comparado com pacientes controles.

Quando analisada a produção de IL-17A, observamos que as células estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28 apresentaram uma maior concentração desta citocina no sobrenadante quando comparada com células sem estímulo de pacientes asmáticos (Figura 5E). Além disso, esta citocina apresentou uma maior concentração no sobrenadante de células sem estímulo de pacientes asmático, quando comparado com pacientes controles (Figura 5E). Na figura 5F notamos que o INF- γ , apresentou maior concentração no sobrenadante das células que sofreram estimulação com anticorpo anti-CD3/CD28, quando comparadas com células sem estímulo, independentemente se o paciente era asmático ou controle.

Completando as análises das citocinas produzidas por células TCD4+ no presente estudo, analisamos a citocina TNF- α , e observamos que as células quando estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28, apresentaram uma maior concentração no sobrenadante desta citocina, quando comparado com células controles tanto em pacientes asmáticos como em pacientes controles (Figura 5G).

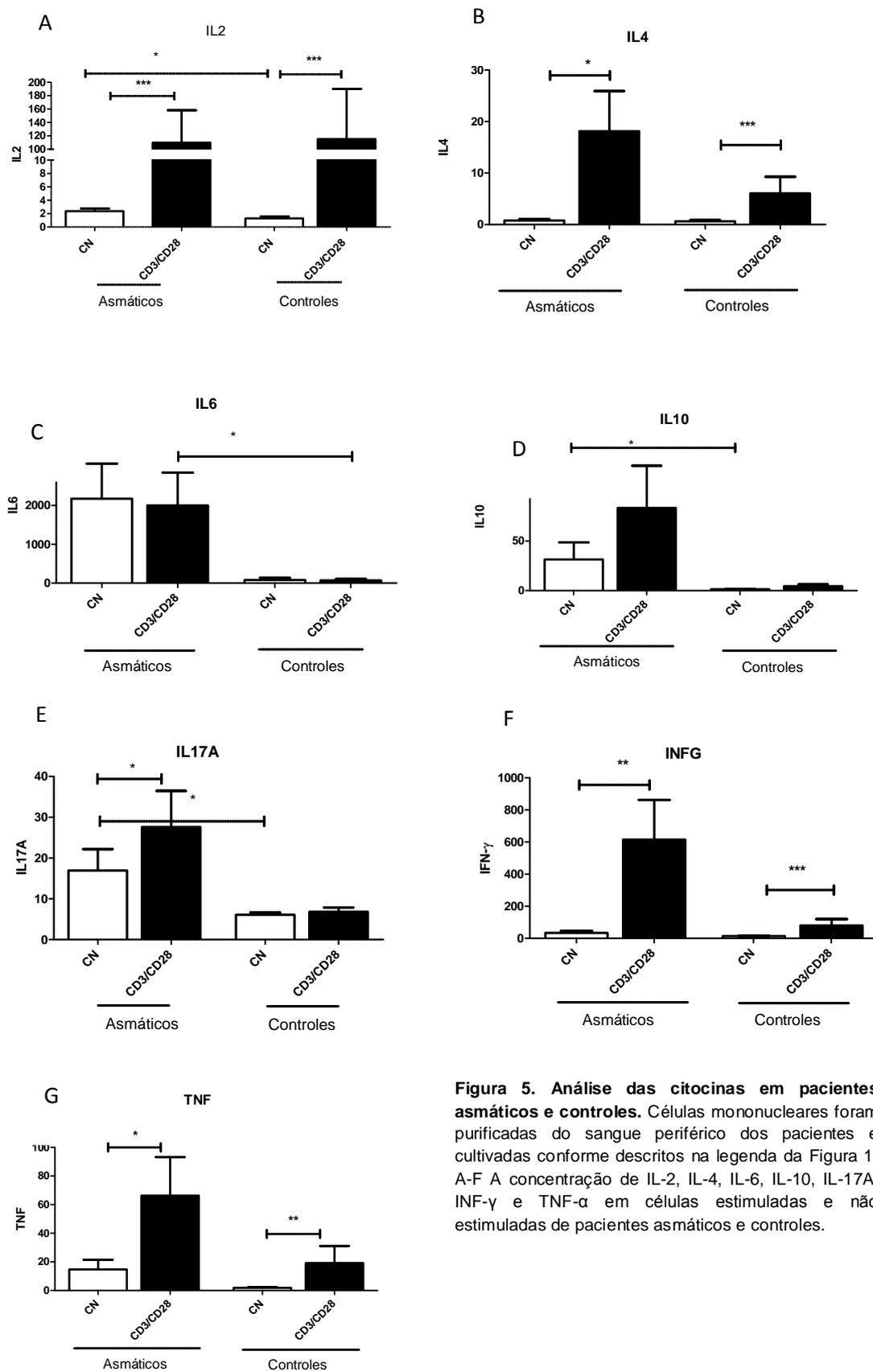


Figura 5. Análise das citocinas em pacientes asmáticos e controles. Células mononucleares foram purificadas do sangue periférico dos pacientes e cultivadas conforme descritos na legenda da Figura 1. A-F A concentração de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF- γ e TNF- α em células estimuladas e não estimuladas de pacientes asmáticos e controles.

Avaliação do perfil das células Th1, Th2, Th17 e Treg com estímulo da proteína DerP1 em pacientes asmáticos atópicos

Avaliamos a alteração do perfil de células TCD4+ quando estimuladas com a proteína DerP1 do HDM. Foram analisados 5 pacientes sabidamente positivos para IgE específica para HDM. A análise realizada de células TCD4+Tbet+, demonstrou que a estimulação celular com anticorpo anti-CD3/CD28, leva a uma maior frequência do fator de transcrição Tbet+ quando comparada com células sem estímulo como com células estimuladas com a proteína Derp1 (Figura 6A). Porém, analisando as células Th2, observamos que a estimulação com anticorpo anti-CD3/CD28, ou a estimulação com a proteína Derp1 não altera a expressão destas (Figura 6B). As células Th17 apresentaram uma maior expressão do seu fator de transcrição ROR γ t, quando as células foram estimuladas com a proteína Derp1 comparando com as células sem estímulo (Figura 6C). Quando analisamos as células Tregs, observamos que as células estimuladas com a proteína Derp1 aumentam a frequência de expressão de Foxp3 tanto quando comparadas com as células estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28, como com as células sem estímulo (Figura 6D).

Do mesmo modo analisamos as alterações do perfil das células duplo-positivas para mais de um fator de transcrição quando estimuladas com a proteína Derp1. Observando o perfil celular, constatamos que após estimulação com a proteína Derp1 ocorreu um aumento da frequência das células duplo-positivas FOXP3+ROR γ t+ quando comparado com as células estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28 (Figura 6E). Outro perfil analisado foi das células duplo-positivas para os fatores de transcrição ROR γ t+GATA3+, as quais apresentaram uma maior frequência quando estimuladas com a proteína Derp1 comparada com células estimuladas com anticorpo anti-CD3/CD28 (Figura 6F).

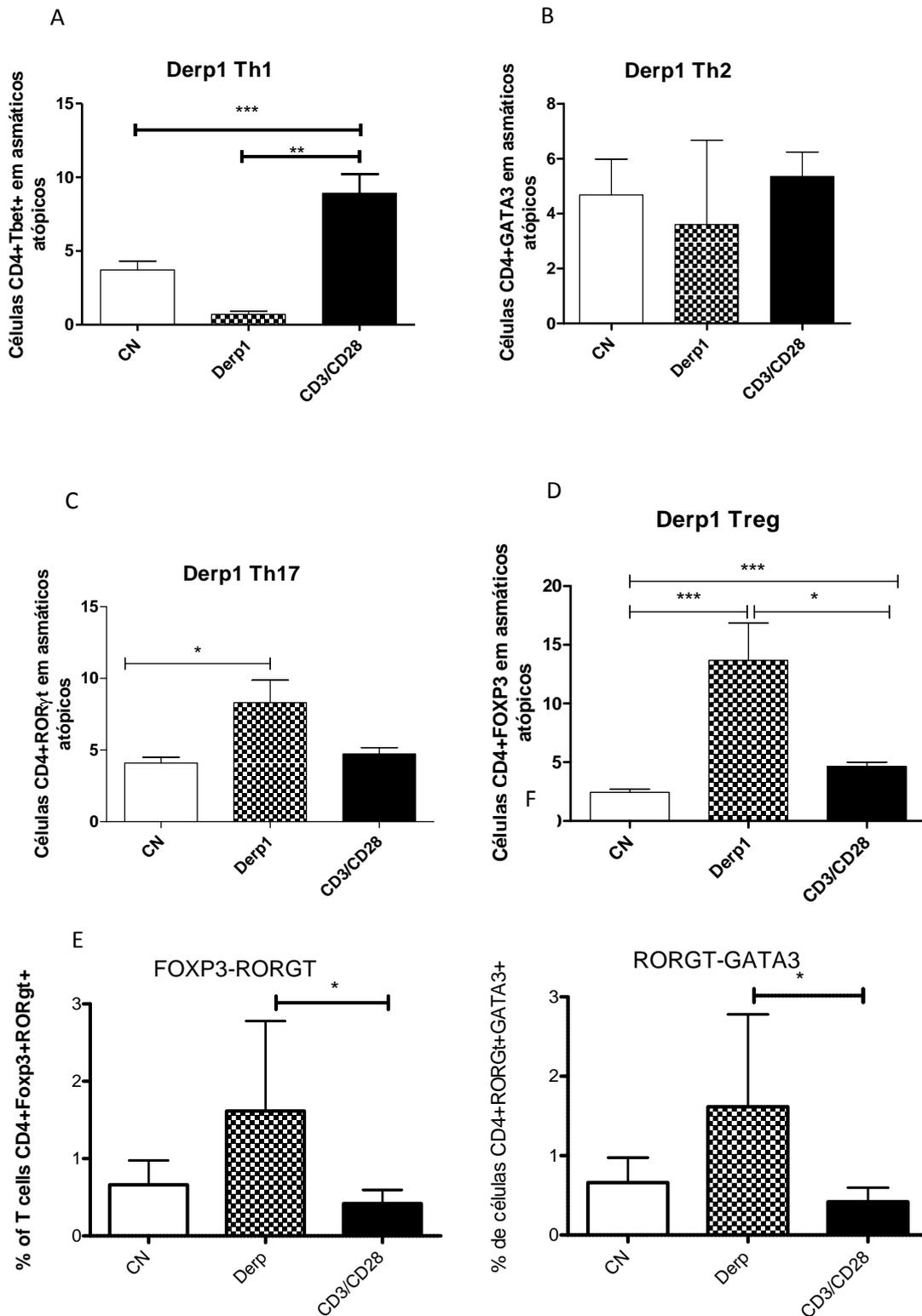


Figura 6. Análise das células estimuladas com DerP1 em pacientes asmáticos e controles. Células mononucleares foram purificadas do sangue periférico dos pacientes e cultivadas conforme descritos na legenda da Figura 1. A-D. Gráficos demonstrando a porcentagem Th1, Th2, Th17 e Tregs em pacientes asmáticos atópicos, com células estimuladas com DerP1, anticorpo antiCD3/antiCD28 e sem estímulo algum. E-F. Gráficos apresentando a porcentagem de células duplo-positivas Foxp3/RORγt e RORγt/GATA3 respectivamente, sem estímulo e com células estimuladas com anticorpo antiCD3/antiCD28 e estimuladas com DerP1.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avalia células T helper circulantes de pacientes asmáticos subdivididos entre atópicos e não-atópicos. A análise foi realizada através de citometria de fluxo, para identificar a expressão de seus fatores de transcrição: Tbet, GATA3, ROR γ T e FOXP3 ou aquelas células que co-expressavam dois desses fatores de transcrição, e avaliou as citocinas mais prevalentes secretadas por células estimuladas com anti-CD3/CD28 pelo método de CBA. Sabemos que as células T desempenham diversos fatores na asma e exercem um papel fundamental na patogenia da mesma. Além disso, segundo Lloyd, a plasticidade das células T pode ser definida por um simples fator de transcrição, podendo ocorrer durante o estágio da doença depois da estimulação alérgica ou depois da exacerbação, sendo que o risco dessas crianças desenvolverem ou não hiperreatividade alérgica depende diretamente da diferenciação e função das sub-populações de células T (23, 24).

No presente estudo mostramos que apenas a expressão de GATA3 ou múltipla expressão deste fator de transcrição foram os que apresentaram diferenças significativas entre pacientes asmáticos e controles. Também apresentando maior expressão em pacientes asmáticos atópicos em relação não tópicos independente do estímulo empregado. Confirmando que asmáticos atópicos têm um perfil Th2. Um estudo realizado no ano de 2012 confirmou o presente estudo, pois eles apresentaram a super-expressão tanto do fator de transcrição GATA3 em células T, a qual é uma marca da resposta Th2 em pacientes asmáticos atópicos, assim como a expressão de citocina IL-4. E este aumento de células Th2 pode causar desequilíbrio nas Th1/Th2 e nos pacientes controles (7).

Ao analisar a expressão de células Th1, observamos que em pacientes controles atópicos e não atópicos a expressão dessas células se manteve no estado basal tanto em células estimuladas quanto a células não-estimuladas. Porém quando analisamos este processo em pacientes asmáticos, constatamos que o estímulo anti-CD3/CD28, tende a aumentar a expressão de células Th1, tanto em asmáticos atópicos como em asmáticos não-atópicos. Já Malmhäll et al, não encontrou diferença significativa entre os níveis de células Th1 de pacientes

asmáticos e controles (7). O estudo de Pereira relatou apenas que células Th1, está associada a asma não tóxica e com controles, o que foi diferente em nosso estudo, pois o aumento da expressão de Tbet ocorreu em asmáticos após o estímulo (15). Se tratando de expressão de fator Tbet e severidade da doença, as células Th1 foram mais evidentes em pacientes com severidade leve. Este episódio pode ser devido ao desequilíbrio Th1/Th2 relatado anteriormente. Além disso, isto pode estar relacionado com o estímulo empregado, pois quando estimulamos as células de pacientes asmáticos com a proteína Derp1 encontramos uma diminuição da expressão de Tbet comparado ao controle. Sugerindo que o estímulo do anti-CD3/CD28 direciona as células dos pacientes para um perfil Th1.

Analisando as células Th17 observamos que não ocorreu diferença entre os pacientes asmáticos e controles. Também não encontramos diferenças quando analisamos pacientes asmáticos atópicos e não-atópicos em relação a frequência destas células. Este resultado contradiz o estudo de Wei et al, onde a expressão de células Th17 estava aumentada em pacientes asmáticos comparadas com os controles. Neste mesmo estudo foi analisada a IL-17 no plasma, assim como no fluido bronco-alveolar de pacientes asmáticos e controles, e foi constatado que a concentração de IL17 foi maior nos pacientes com asma. Estes dados corroboram com o presente estudo em que a concentração de IL-17 foi maior em pacientes asmáticos quando comparados com controles (25).

Recentemente em estudos com modelos murinos, foi mostrado que as células Tregs suprimem as células Th17 que medeiam à inflamação pulmonar, regulado assim a inflamação neutrofílica. No nosso estudo, observamos que a expressão do fator de transcrição FOXP3+ foi expressiva em pacientes asmáticos atópicos após a estimulação. Porém quando observamos a expressão de células Tregs entre pacientes asmáticos atópicos e não-atópicos, verificamos que as células dos asmáticos atópicos têm um nível de expressividade de FOXP3+ maior que as células dos não atópicos quando estimuladas. Corroborando com o estudo de Palomares et al, que apresentou dados semelhantes aos nossos, podemos sugerir que a baixa expressão de células Th17 tanto em pacientes asmáticos como em controles, pode ser explicada pelo fato da função supressora que as células Tregs exerce sobre as células Th17, resultando em seu baixo nível de expressão (26).

A fim de analisar a plasticidade das células T no presente estudo verificamos a presença de células duplo-positivas nos pacientes asmáticos e controles. Analisamos a expressão de células duplo-positivas Tbet+ROR γ T+, e verificamos que a expressividade da dupla-positividade destas células em pacientes asmáticos apresentou um aumento significativo após o estímulo com anti-CD3/CD28. Estudos realizados, relatando a expressão transcricionais de células Tbet e Th17 em encefalomielite autoimune, relataram que células Th17 inflamatórias podem expressar ROR γ T juntamente com T-bet ou GATA3. Sendo constatado que nestes estudos experimentais Tbet+ROR γ T+ são altamente patogênicas, onde T-bet está associada com a patogenicidade, mesmo quando não há INF γ , o que pode ser observado em nosso estudo, já que a expressão duplo-positiva destas células foram significativas apenas em pacientes asmáticos (27, 28).

Sabe-se que células FOXP3+ podem expressar fatores de transcrição como T-bet, GATA3 e ROR γ T (29), o que foi constatado no presente estudo. Porém, quando analisamos as possíveis diferenças de expressividade entre pacientes asmáticos e controles co-expressando FOXP3+ ROR γ T+, podemos observar que não ocorreu diferença significativa entre eles, tanto com células estimuladas como em não estimuladas, o que não foi concordante com o estudo de Malmhäll, em que a co-expressão destas células foram somente aumentadas em pacientes asmáticos (7).

Para confirmar então a hipótese que o fator de transcrição FOXP3+ co-expressar outros fatores de transcrições, analisamos também FOXP3+T-bet+. Em nosso estudo, esta co-expressividade foi aumentada em pacientes asmáticos atópicos e não-atópicos quando as células destes eram estimuladas com anti-CD3/CD28, diferentemente do estudo de Malmhäll em que este dado não foi aumentado em nenhum dos grupos de pacientes asmáticos analisados. Além disso, nossos resultados foram diferentes de estudos em animais que mostraram que a expressão de T-bet nas células Tregs depois da infecção, facilitou que estas células suprissem células Th1 inflamatórias (29, 30). Porém, se comparando outros estudos, nossos resultados reforçaram o fato, de que as células podem perder a expressão FOXP3 e adquirir a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias (31, 32).

Pelo fato, do não requerimento de células Treg para a homeostase basal e funcional, a expressão de GATA3 em células Treg é crucial durante a resposta

inflamatória, onde é mantida a expressão de FOXP3 e limita a conversão de células Treg para um fenótipo de células T efectoras (33). Pensando nisto, analisamos a expressão duplo-positiva de fatores de transcrição FOXP3+GATA3+, a qual apresentou uma expressão superior em células de pacientes asmáticos atópicos quando estimuladas, além disso, em pacientes controles esta expressão foi quase nula. Este ocorrido é analisado em outro estudo, que mostram que a expressão de GATA3+ em células Tregs é proposta por ser uma falta na resposta da estimulação do TCR sob condições neutras, enquanto que em condições inflamatórias, a expressão de GATA3+ em Tregs limita a expressão de fatores de transcrição associado com diferenciação de células T(34).

A plasticidade dos fenótipos de células T é ditada por influências ambientais, sendo que no contexto de doenças alérgicas a exposição a alérgicos/atopia, a genética, idade, histórico de infecções, poluição ou dieta pode afetar a natureza dos fenótipos de células T helper que desenvolve após a exposição à alérgenos(24). A partir disto, também foi analisado a dupla-expressão de fatores de transcrição ROR γ t+GATA3+, pois os dois subtipos celulares promovem o recrutamento da maioria de infiltrados inflamatórios ambos neutrofílicos e eosinofílicos, juntamente a patologia pulmonar (35). Foi apresentado no presente estudo que a expressão dupla destes fatores de transcrição foi superior em pacientes asmáticos atópicos em relação aos demais grupos, bem como entre suas células quando estimuladas com anti-CD3/CD28.

Pensando na primeira hipótese das funções de células T que seria entre células Th1/Th2, a qual é um dos principais exemplos de co-expressão de fatores de transcrição, em que células GATA3+ podem se reprogramar-se para expressar T-bet e INF- γ , em locais de infecções virais, resolvemos analisar esses achados em nosso estudo (36). Analisamos que a expressão de duplo-positiva destes dois fatores de transcrições foi altamente expressiva em pacientes asmáticos atópicos quando comparados com não atópico, assim como o estudo de Manhäll et al. Outro estudo que analisou especificamente a reprogramação de células Th2 e Th1, em animais infectados com vírus linfocítico coriomeningitis, demonstrou que após 9 dias de infecção com LCVM, a expressão de IFN- γ reduziu pela metade, possivelmente pelo efeito inibidor de GATA3+, pois a expressão de GATA3+ na presença de IFN γ em células Th2 foi alta, assim como na ausência do mesmo fator de transcrição (36).

Este é o primeiro estudo que avaliou células duplo-positivas em relação a severidade da asma. Foi demonstrado recentemente que existe uma maior expressão das células Tbet+GATA3+ em pacientes com asma com eosinofilia e uma diminuição das células T GATA+RORγT+FOXP3+ (7). Foi demonstrado por Wang et al em camundongos que células Th2 de memória que produzem IL-17 promovem a exacerbação da asma, além disso, estas células Th2 produtoras de IL-17 estão presentes em maior frequência em asmáticos atópicos que controles (35). Nosso estudo demonstrou que pacientes asmáticos moderados apresentam maior frequência de células duplo-positivas RORγt/GATA3 em células não estimuladas, e ocorre um maior aumento destas células quando estimuladas com Derp1, sugerindo um maior envolvimento destas células com a severidade e corroborando de certo modo com o estudo de Wang.

Sabe-se que inalação de HDM causa o recrutamento de eosinófilos para os pulmões (37). A estimulação de células com a proteína DerP1, mostrou que quando estimulada com este alérgeno, o perfil das células Th1 estimuladas mudam, passando a não expressar níveis altos de T-bet. Esta característica de supressão da expressão de células Th1 quando estimulada com este alérgeno, torna uma característica de alta expressão do fator de transcrição T-bet apenas quando estas células são estimuladas com anti-CD3/CD28, e não com um alérgeno específico de atopia. O grupo contendo apenas fator de transcrição GATA3, quando estimulado com Derp1 não alterou seu perfil e nem mudou suas características basais entre células estimuladas ou não estimuladas. Porém, quando analisadas as células co-expressando outro fator de transcrição tal como RORγT+GATA+, o perfil destas células apresenta uma expressão superior quando estimuladas com Derp1 se comparando com células não estimuladas, ou estimuladas com anti-CD3/CD28, assim como quando analisado os fatores de transcrição FOXP3+RORγT. Nossos dados sugerem que dependendo do estímulo que as células recebem a modulação do perfil de células T CD4 pode ser alterado inclusive das células duplo-positivas. Mais estudos são necessários para entender todos os mecanismos e as rotas celulares envolvidas nesse processo de modulação do fenótipo das células T CD4 na asma e a real função das células duplo-positivas na severidade da doença. Entendendo melhor os mecanismos envolvidos podem ser desenvolvidos novos medicamentos tendo como alvo a modulação dos fenótipos das células T CD4.

REFERÊNCIAS

1. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(6):872-97.
 2. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(5):388-94.
 3. Durrant DM, Metzger DW. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. *Immunol Invest*. 2010;39(4-5):526-49.
 4. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. *Cell*. 2010;140(6):777-83.
 5. Organization WH. Chronic Respiratory Diseases- Asthma 2011 [cited 2011 26/05/2011]. Available from: <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>.
 6. Machura E, Mazur B, Rusek-Zychma M, Barć-Czarnecka M. Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. *Clin Dev Immunol*. 2010;2010:606139.
 7. Malmhäll C, Bossios A, Rådinger M, Sjöstrand M, Lu Y, Lundbäck B, et al. Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans--possible role in asthma. *PLoS One*. 2012;7(6):e40012.
 8. Lozza MJ, Foster S, Bleecker ER, Peters SP, Penn RB. Asthma and gender impact accumulation of T cell subtypes. *Respiratory Research*. 2010;11(1).
 9. Strickland DH, Holt PG. T regulatory cells in childhood asthma. *Trends Immunol*. 2011;32(9):420-7.
 10. 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.
 11. Holt PG, Sly PD. Non-atopic intrinsic asthma and the 'family tree' of chronic respiratory disease syndromes. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):807-11.
 12. Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, de Klerk N, Suriyaarachchi D, et al. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. 2005;365(9454):142-9.
 13. Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011.
 14. Dehzad N, Bopp T, Reuter S, Klein M, Martin H, Ulges A, et al. Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2. *J Immunol*. 2011;186(4):2238-44.
 15. Vale-Pereira S, Todo-Bom A, Geraldles L, Schmidt-Weber C, Akdis CA, Mota-Pinto A. FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(4):490-6.
-

16. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838-48.
 17. Pinto LA, Stein RT, Ribeiro JD. Genetic associations with asthma and virus-induced wheezing: a systematic review. *J Bras Pneumol*. 2009;35(12):1220-6.
 18. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011.
 19. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):1185-7.
 20. Zock JP, Heinrich J, Jarvis D, Verlato G, Norbäck D, Plana E, et al. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):682-90.
 21. Arshad SH. Does exposure to indoor allergens contribute to the development of asthma and allergy? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10(1):49-55.
 22. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):445-54.
 23. Herberth G, Daegelmann C, Weber A, Röder S, Giese T, Krämer U, et al. Association of neuropeptides with Th1/Th2 balance and allergic sensitization in children. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(11):1408-16.
 24. Lloyd CM, Saglani S. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(5):1267-74; quiz 75.
 25. Wei B, Zhang H, Li L, Li M, Shang Y. T helper 17 cells and regulatory T-cell imbalance in paediatric patients with asthma. *J Int Med Res*. 2011;39(4):1293-305.
 26. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol*. 2010;40(5):1232-40.
 27. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-71.
 28. Yeh WI, McWilliams IL, Harrington LE. Autoreactive Tbet-positive CD4 T cells develop independent of classic Th1 cytokine signaling during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2011;187(10):4998-5006.
 29. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10(6):595-602.
 30. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, et al. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science*. 2010;329(5999):1667-71.
 31. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med*. 2011;17(6):673-5.
-

-
32. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity*. 2009;31(5):772-86.
 33. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Arima K, Bover L, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4793-8.
 34. Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, et al. GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4503-15.
 35. Wang YH, Voo KS, Liu B, Chen CY, Uygungil B, Spoede W, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med*. 2010;207(11):2479-91.
 36. Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Fröhlich A, Bergthaler A, et al. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*. 2010;32(1):116-28.
 37. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011;32(9):402-11.
-

4 CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste estudo reforçam a questão de a asma atópica é designada uma “doença Th2”, porém reforça a questão de que a fisiopatologia da asma tem mais grupos de células T *helper* envolvidas. Além disso, a questão da atopia influencia muito na patologia da asma, assim como a maior expressão de determinadas células assim como a plasticidade das mesmas.

A plasticidade das células T pode auxiliar a elucidar a heterogeneidade e a variação no fenótipo clínico que é observado em pacientes com asma como as respostas imunes individuais adotadas. Pesquisas futuras nesta área poderão encontrar alvos específicos celulares bem como suas funções em relação a terapias. Estes encontrados apontam que as células T *helper* são fenotipicamente distintas, porém a capacidade delas para a plasticidade não deve ser ignorada nas doenças inflamatórias.

Nossos dados sugerem que dependendo do estímulo que as células recebem a modulação do perfil de células T CD4 pode ser alterado inclusive das células duplo-positivas. Quando não estimuladas as células tem um perfil específico, a estimulação com anticorpo anti-CD3/CD28 ou com DerP1, induz mudança de perfil. As citocinas nos demonstraram muito pouco ainda, pois o n precisa ser aumentado para obtermos conclusões mais concisas.
