

## **Avaliação da produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com asma.**

### **1. RESUMO**

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela inflamação das vias aéreas, levando a sua obstrução. De modo geral essa patologia pode ser classificada em dois tipos principais, tendo como base os mecanismos imunopatológicos que levam ao seu desenvolvimento: a asma atópica e a asma não-atópica. A asma atópica se caracteriza por uma reação de hipersensibilidade do tipo I iniciada pela exposição a alérgenos que induzem a diferenciação de linfócitos Th2 e Th9 (produtoras de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9), produção de IgE, sensibilização e ativação de mastócitos e posterior quimioatração e ativação de eosinófilos. A asma não-atópica normalmente está associada à exposição a infecções pulmonares e poluentes que iniciam um processo inflamatório crônico com a participação ativa de linfócitos Th17 e Th22 (produtores de IL-17 e IL-22) e a ativação e quimioatração de neutrófilos. Dessa forma, as diferentes citocinas produzidas pelos linfócitos T desempenham papel fundamental no desenvolvimento da asma e, dessa forma, uma melhor compreensão de sua participação na evolução da doença pode ajudar na terapêutica adotada. Neste estudo, tivemos por objetivo avaliar a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) presentes na circulação de pacientes com asma controlada e não-controlada. CMSPs foram isoladas do sangue de pacientes com asma ou de indivíduos saudáveis por meio de centrifugação em gradiente de ficoll-hipaque. As CMSPs foram mantidas sem estímulo ou estimuladas com LPS (lipopolissacarídeo) ou PHA (fitohemaglutinina), e as citocinas (IL17, IL-22, IFN-gama, IL-4 e IL-9) presentes nos sobrenadantes de cultura foram quantificadas por ELISA. Nossos resultados mostraram que CMSPs de pacientes com asma produzem maiores quantidades de IL-4, IL-9, IL22 e IL-17 e menor quantidade de IFNgama após estímulo, quando comparadas a células de indivíduos controle. Em conjunto nossos resultados corroboram dados anteriores da literatura e indicam que essas citocinas podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da asma.

Palavras-chave: asma, células mononucleares do sangue periférico, citocinas.

## 2. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela inflamação das vias aéreas, levando a uma obstrução generalizada que reduz o fluxo de ar, resultando em sintomas como dispneia/dificuldade respiratória, sibilos, aperto no peito e tosse [1, 2]. É uma das doenças crônicas, não comunicáveis mais comuns em crianças e adultos, e afeta aproximadamente 330 milhões de pessoas ao redor do planeta. A prevalência aproximada de asma diagnosticada e notificada gira em torno de 4,3%, com uma variação importante entre os países, sendo bem mais comum em países desenvolvidos, quando comparado a países em desenvolvimento [1, 2].

A asma é uma doença com potencial de causar incapacidades, invalidez, prejuízos na qualidade de vida, além de mortes evitáveis em crianças e adultos jovens. Os prejuízos por essa patologia são desproporcionalmente maiores em famílias de baixa e média renda, devido às dificuldades de acesso ao tratamento adequado. Apesar disso, a mortalidade por asma ao redor do planeta, nos últimos 25 anos, vem sendo reduzida muito graças ao advento dos glicocorticoides inalatórios, porém ainda há uma disparidade de anos de vida perdidos ao redor do mundo por conta da asma [2-5].

O desenvolvimento da asma é consequência de uma complexa interação genética ambiental, com diferenças na apresentação clínica dos pacientes e o tipo e intensidade da inflamação das vias aéreas e o remodelamento dessas. Em geral, o estreitamento das vias respiratórias é reversível, mas alguns pacientes com asma crônica podem ter um componente de obstrução ventilatória irreversível [2, 8]. De modo geral essa patologia pode ser classificada em dois tipos principais, tendo como base os mecanismos imunopatológicos que levam ao seu desenvolvimento: a asma alérgica, extrínseca ou atópica e a asma não alérgica, intrínseca ou não-atópica [1, 2]. O primeiro é associado à participação de linfócitos TCD4+ do tipo Th2 e Th9 (produtores de citocina IL-4 e IL-19 respectivamente) e de eosinófilos e o segundo com a participação de linfócitos Th17 (produtores de IL-17 e IL-22) e infiltrado de neutrófilos [1, 2, 9, 10]. A asma atópica normalmente se manifesta na infância e tende a desaparecer com os anos, enquanto que a não-atópica costuma aparecer mais tardiamente podendo ser mais prejudicial, levando a maior mortalidade e morbidade em comparação à asma atópica [1, 2, 9, 10].

A hiper-responsividade brônquica, das vias aéreas, é um quadro presente nos dois fenótipos da asma, tanto em crianças quanto em adultos. Na asma, a musculatura lisa brônquica é hipercontrátil, em decorrência do remodelamento das vias aéreas. Esse remodelamento é caracterizado como dano epitelial, associado a disfunção dos cílios, hiperplasia das células caliciformes, espessamento da lâmina reticular e da membrana basal, aumento da vascularização, aumento do número dos miofibroblastos subepiteliais e da massa muscular lisa [2, 8]. Esse aumento de massa muscular é o principal responsável pela limitação de fluxo das vias aéreas [2, 8].

A asma atópica é a mais frequente e está presente em aproximadamente 50-60% dos adultos e crianças com asma, mas é mais comum em crianças com asma grave e em adultos com a doença iniciada na infância. Se caracteriza por uma reação de hipersensibilidade do tipo I cujos agentes desencadeantes levam a uma cascata de mecanismos imunológicos que envolvem o recrutamento e a ativação de células inflamatórias e estruturais [1, 2]. Normalmente, esse tipo se desenvolve em indivíduos atópicos (com predisposição genética para o desenvolvimento de respostas alérgicas), nos quais a exposição a substâncias conhecidas como alérgenos levam à liberação de citocinas como IL-33 e TSLP (linfopoiética estromal tímica) pelas células epiteliais. Essas citocinas, funcionam como sinais de alarme (sendo também denominadas de alarminas) que estimulam a ativação de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) [11], produtoras de IL-4, e contribuem para a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo Th2 ou Th9, após a apresentação dos alérgenos pelas células dendríticas [2, 8]. Além disso, produzem IL-5 que irá aumentar a produção e ativação de eosinófilos, células responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas responsáveis pelos danos teciduais observados nos pulmões de indivíduos com asma atópica [2, 8].

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea, em resposta a citocinas como a IL-5 [20], e liberadas na corrente sanguínea, sendo atraídas para o sítio de inflamação em resposta a quimiocinas liberadas no ambiente [21]. Essas células possuem grânulos contendo diversos mediadores inflamatórios como proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) [21]. A MBP está relacionada ao desencadeamento da

hiperreatividade das vias aéreas, assim como a ECP, por estimular a liberação de histamina dos mastócitos e basófilos, ela também atua em neutrófilos estimulando a liberação de superóxido e IL-8 (CXCL8). Já a EDN promove a ativação de células dendríticas, as quais apresentam antígenos para as células T, o que leva a diferenciação em Th2 [21]. No caso dos corpos lipídicos dos eosinófilos, estes estão relacionados à produção de eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas, e tromboxano [21]. Essas substâncias são liberadas quando a célula é ativada o que ocasiona uma rápida resposta inflamatória e geram a hiperreatividade brônquica [21, 22] .

Por outro lado, indivíduos com asma não-atópica não apresentam elevação da IL-4 e IL-5, o que explica as baixas concentrações de IgE e de eosinófilos nesse tipo de asma. A imunopatologia desse tipo de asma é menos conhecida, mas normalmente está associada à exposição a infecções pulmonares e poluentes que iniciam um processo inflamatório crônico com a participação de células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) produtoras de IL-17 e IL-22, ativação de linfócitos TCD4+ do tipo Th17 e Th22 (também produtores de IL-17 e IL-22) e a ativação de neutrófilos, responsáveis pela produção de enzimas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas inflamatórias, que irão promover o remodelamento tecidual responsável pela obstrução das vias aéreas [1, 2, 18, 19].

Dessa forma, os eosinófilos e neutrófilos (células polimorfonucleares) são os principais tipos celulares efetores do processo de remodelamento tecidual observado na asma atópica e não-atópica respectivamente [1, 2].

Tendo em vista a complexidade da doença, ainda não existe tratamento que leve à cura da asma (atópica ou não-atópica). Os tratamentos atuais tem como objetivos o controle dos sintomas apresentados pelos pacientes, com a inibição dos processos inflamatórios que promovem o remodelamento tecidual com o uso de medicamentos anti-inflamatórios (principalmente glicocorticoides locais, e nos casos mais graves sistêmicos) e/ou controle dos sintomas (uso de bronco dilatadores como agonistas adrenérgicos  $\beta_2$  ou bloqueadores de leucotrienos) [28]. Além dos tratamentos convencionais, o melhor entendimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença permitiram o desenvolvimento de medicamentos com ação mais específica que agem sobre os mediadores da resposta imune denominados de imunobiológicos [29-31]. Estes

medicamentos já estão em uso clínico, como por exemplo anti-IgE (omalizumab) ou em testes clínicos com possível aplicação nos próximos anos (anti-IL-5, anti-IL-13 e anti-TSLP) [29-31].

Como evidenciado acima, os diferentes tipos de asma (atópica e não-atópica) podem apresentar diferentes mecanismos efetores. Esses mecanismos influenciam diretamente no tratamento dos pacientes e na evolução da doença. O conhecimento desses mecanismos tem levado ao desenvolvimento de novas forma terapêuticas, e dessa forma contribuído para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes afetados. Apesar disso, ainda existem diversos mecanismos a serem melhor desvendados. As citocinas produzidas pelas diferentes subpopulações de linfócitos T durante a resposta imunológica, desempenham papel fundamental no desenvolvimento da asma e dessa forma, uma melhor compreensão de sua participação na evolução da doença pode ajudar na terapêutica adotada.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o perfil de citocinas produzidas por células mononucleares do sangue periférico presentes na circulação de pacientes com asma.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar a produção de citocinas por linfócitos T (IL-4, IFN-gama, IL-9, IL-17 e IL22) presentes na fração de células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) de pacientes com asma.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1. Casuística**

Este é um subprojeto do projeto intitulado: "Fatores de risco para perda acelerada de função pulmonar, obstrução irreversível de vias aéreas e doença refratária em indivíduos com asma", desenvolvido pelo Prof. Dr. Eduardo Vieira Ponte, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Jundiaí, com número CAAE: 70427317.8.0000.5412, parecer número: 2.198.023. Cada indivíduo foi informado sobre sua participação na pesquisa, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,

de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Jundiaí.

Nesse estudo foram incluídos 15 pacientes adultos (>18 anos) asmáticos. Os pacientes foram selecionados dentre aqueles atendidos no Ambulatório de Pneumologia do Hospital São Vicente/Jundiaí (colaboração do Prof. Dr. Eduardo Vieira Ponte). Foram incluídos pacientes asmáticos com histórico documentado de obstrução reversível de vias aéreas (mínimo de 12% de melhora no Volume Expiratório Forçado em 1 segundo (FEV1), espontaneamente ou após a administração de  $\beta$ 2-agonista inalado). Não foram incluídos pacientes fumantes ou com histórico de outras doenças respiratórias infecciosas ou inflamatórias crônicas (DPOC, neoplasias, tuberculose, etc), assim como aqueles que com histórico de infecções respiratórias virais 1 mês antecedendo a coleta de material. Também foram incluídos 15 indivíduos adultos (>18 anos) saudáveis (controles), não fumantes e que não apresentavam nenhuma doença infecciosa, autoimune ou alérgica e que não utilizaram nos últimos 15 dias nenhum medicamento anti-inflamatório.

	Sexo – n (%)		Idade – Média $\pm$ DP
	Feminino	Masculino	
<b>Controles</b>	11 (73,3%)	4 (26,7%)	27,8 $\pm$ 8,2
<b>Pacientes</b>	10 (66,7%)	5 (33,3%)	44,3 $\pm$ 14,9

**Tabela 1:** Distribuição dos pacientes e controles de acordo com sexo e idade.

A avaliação clínica e a avaliação da função pulmonar (espirometria) foram realizadas pelo Prof. Dr. Eduardo Vieira Ponte.

#### **4.2. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs).**

O sangue periférico dos indivíduos adultos saudáveis foi coletado (aproximadamente 30 mL) em tubos contendo heparina sódica. Para a separação da fração de células mononucleares (CMSPs) as amostras foram centrifugadas sobre uma solução de ficoll-hypaque (densidade 1,077 - 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente). As CMSPs foram submetidas a duas lavagens em PBS estéril (300g por 10 minutos a 4°C). Após a lavagem, as CMSPs tiveram seu número e viabilidade estimados (câmara de Neubauer e azul de Tripán) e então foram transferidas para tubos tipo falcon de 15 mL.

### **4.3. Condições de cultura para avaliação da produção de citocinas.**

As CMSPs obtidas do sangue periférico como descrito acima foram avaliadas quanto à produção de citocinas. Para isso, após a separação e contagem, as células foram ressuspensas a  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino, L-glutamina e gentamicina e colocadas em placas de 24 cavidades com fundo em U, as células foram mantidas sem estímulo ou estimuladas com fitohemaglutinina (PHA - a  $10 \mu\text{g/mL}$  - Sigma = estímulo para linfócitos T) ou com LPS (a  $100 \text{ng/mL}$  - Sigma = estímulo para monócitos) por 48 horas, em estufa de  $\text{CO}_2$  (5%) a  $37^\circ\text{C}$ . Após esse período, o sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado para dosagem posterior de citocinas por ELISA (ver abaixo).

### **4.4. Dosagem de citocinas por ELISA**

A dosagem de citocinas (IL-4, IFN-gama, IL-9, IL-17 e IL-22) nos sobrenadantes de cultura foi feita utilizando-se “kits” comerciais específicos para cada citocina conforme as instruções dos fabricantes (Biolegend). De maneira geral: placas de ELISA de 96 poços de alta afinidade (Nunc) foram recobertas com anticorpo monoclonal de captura (específicos para cada citocina) diluídos em solução salina tamponada com fosfato (SST - pH 7,2) e incubadas por uma noite à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas 3 vezes com SST contendo 0,05% de Tween20 (SST-T) e bloqueadas com SST contendo 1% de Soro Albumina Bovina(BSA) e 0,05% de Tween20 por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas novamente (3 vezes com SST-T), sendo então incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com as amostras e com uma curva padrão (concentrações variando de  $2000 \text{pg/mL}$  a  $31,3 \text{pg/mL}$  para IL-22, de  $250 \text{pg/mL}$  a  $3,9 \text{pg/mL}$  para IL-17 e IL-4, de  $500 \text{pg/mL}$  a  $7,8 \text{pg/mL}$  para IFN-gama, de  $1000 \text{pg/mL}$  a  $15,6 \text{pg/mL}$  para IL-9). As placas foram, então lavadas (3 vezes) e incubadas por 2 horas com anticorpo monoclonal de detecção conjugado à biotina (específicos para cada citocina) diluídos em SST-BSA (0,1%). Após incubação, foi realizada novamente a lavagem (3 vezes) e, em seguida, as placas foram incubadas com solução contendo estreptoavidina conjugada à peroxidase diluída (1/200) (para IFN-gama, IL-22, e IL-17) ou com polímero de estreptoavidina conjugada à peroxidase (Pierce - para IL-4 e IL-9) em SST-BSA por 1 hora à temperatura ambiente no abrigo da luz. Novamente, as placas foram

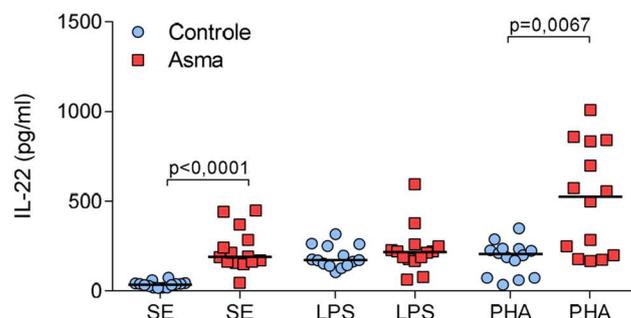
lavadas (4 vezes) e, por fim, incubadas (15 minutos) com solução cromógeno/substrato (Tetrametilbenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão acetato pH 5,5). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) e realizada a leitura em Leitora de ELISA (absorbância a 450nm com correção a 655nm). Os resultados foram calculados à partir da comparação das absorbâncias nas amostras obtidas com as absorbâncias obtidas com a curva padrão feita com citocina recombinante em concentrações conhecidas.

#### 4.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism (v.5.0). A comparação dos níveis de citocinas entre os grupos foi feita utilizando-se o método não paramétrico de Mann-Whitney. Foram consideradas significantes diferenças com valor de  $p < 0,05$ .

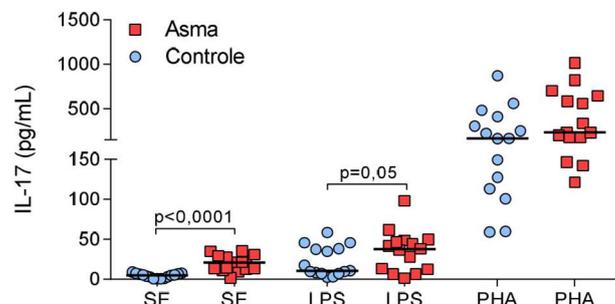
### 5. RESULTADOS

Após a análise dos resultados obtidos, foi possível observar que Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSPs) de pacientes com asma produzem maiores quantidades de IL-22 em células não estimuladas ou estimuladas com PHA (figura 1).



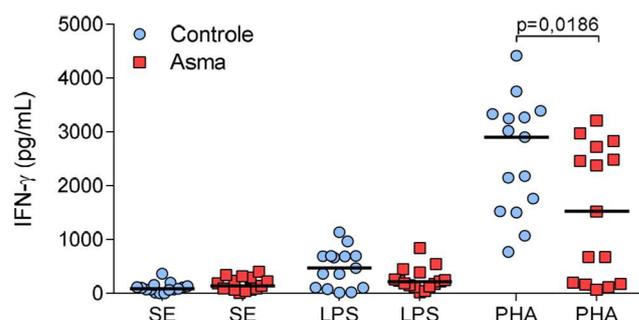
**Figura 1:** Dosagem de IL-22 no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com asma ou de indivíduos controle (n=15). Após obtenção a partir do sangue periférico, as CMSPs foram mantidas sem tratamento (SE) ou tratadas com LPS a 100ng/mL ou com PHA (10µg/mL) por um período de 48 horas. As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney. Os valores de p estão apresentados sobre os colchetes.

Em relação à produção de IL-17, observamos que somente nas células não estimuladas, ou estimuladas com LPS houve diferença estatisticamente significativa, sendo que as amostras do grupo de pacientes com asma apresentaram os maiores valores (figura 2).



**Figura 2:** Dosagem de IL-17 no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com asma ou de indivíduos controle (n=15). Após obtenção a partir do sangue periférico, as CMSPs foram mantidas sem tratamento (SE) ou tratadas com LPS a 100ng/mL ou com PHA (10µg/mL) por um período de 48 horas. As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney. Os valores de p estão apresentados sobre os colchetes.

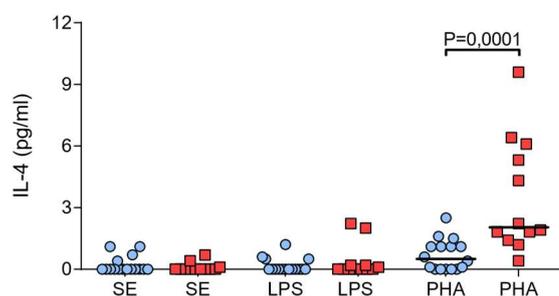
Já em relação à produção de IFN-gama, nossos resultados mostraram que após o estímulo com PHA, as CMSPs de indivíduos controle apresentam maior produção dessa citocina quando comparadas às células de pacientes com asma (figura 3).



**Figura 3:** Dosagem de IFN-gama no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com asma ou de indivíduos controle (n=15). Após obtenção a partir do sangue periférico, as CMSPs foram mantidas sem tratamento (SE) ou tratadas com LPS a 100ng/mL ou com

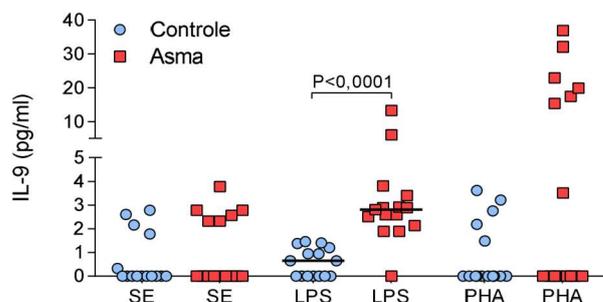
PHA (10µg/mL) por um período de 48 horas. As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney. Os valores de p estão apresentados sobre os colchetes.

Quando refizemos as dosagens de IL-4 utilizando um sistema de amplificação de sinal, pudemos observar que embora a maioria das amostras (principalmente sem estímulo ou estimuladas com LPS) ainda apresentassem resultados inferiores ao limite de detecção do teste (0,1pg/mL), as amostras de pacientes com asma estimuladas com PHA apresentaram níveis estatisticamente superiores às amostras de indivíduos controle (figura 4).



**Figura 4:** Dosagem de IL-4 no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com asma ou de indivíduos controle (n=15). Após obtenção a partir do sangue periférico, as CMSPs foram mantidas sem tratamento (SE) ou tratadas com LPS a 100ng/mL ou com PHA (10µg/mL) por um período de 48 horas. As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney. Os valores de p estão apresentados sobre os colchetes.

Por fim, quantificamos a produção de IL-9 nos sobrenadantes de cultura, e observamos que células de pacientes com asma, estimuladas com LPS apresentaram quantidades maiores dessa citocina em relação às células de indivíduos saudáveis submetidas às mesmas condições (figura 5.)



**Figura 5:** Dosagem de IL-9 no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com asma ou de indivíduos controle (n=15). Após obtenção a partir do sangue periférico, as CMSPs foram mantidas sem tratamento (SE) ou tratadas com LPS a 100ng/mL ou com PHA (10µg/mL) por um período de 48 horas. As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann-Whitney. Os valores de p estão apresentados sobre os colchetes.

## 6. DISCUSSÃO

A prevalência da asma nos países desenvolvidos encontra-se, atualmente, estável ou até mesmo em decréscimo, enquanto que nos países em desenvolvimento esses números crescem, provavelmente em decorrência da ocidentalização e modernização do estilo de vida [1, 2]. O Brasil é um dos países mais afetados pela asma na infância, acometendo aproximadamente 20% das crianças em idade escolar [3, 6, 7], resultando em inaptidão para a prática de atividades físicas, absenteísmo da escola e hospitalizações. Em 2013 o número de óbitos atribuídos a asma no Brasil foi de 2.047 pessoas, o que equivale a 5 óbitos por dia e o número de hospitalizações foi de aproximadamente 120.000, sendo que o tempo médio de hospitalização é de 3 dias, o que desencadeia um grande custo para o sistema de saúde [3].

A resposta imunológica adaptativa promovida por diferentes subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (auxiliares) desempenham papel preponderante no desenvolvimento da asma. Nossos resultados mostraram que CMSPs de pacientes com asma apresentam maior capacidade de produzirem IL-4 e IL-9 do que células de indivíduos controle. Essas citocinas são características das populações Th2 e Th9 respectivamente.

Na asma atópica, linfócitos Th2 irão produzir IL-4, IL-5 e IL-13, enquanto que os linfócitos Th9 produzem IL-9 [12-14], que em conjunto serão responsáveis pelo auxílio a linfócitos B na produção de anticorpos específicos a esses alérgenos, predominantemente da classe IgE. A IgE produzida pelos linfócitos B, então se liga à receptores específicos presentes em mastócitos (receptores Fc $\gamma$ RI) sensibilizando-os [15]. Após a reexposição ao mesmo alérgeno, ocorre a ativação dos mastócitos sensibilizados e liberação de mediadores como histamina, prostaglandinas e citocinas como IL-5, IL-13 e IL-4. Esses

mediadores liberados pelos linfócitos Th2 e pelos mastócitos (em particular a IL-5) são responsáveis pelo aumento da produção de eosinófilos (causando eosinofilia) e a migração dessas células para o tecido pulmonar. Ao serem ativados no tecido, os eosinófilos irão liberar mais mediadores inflamatórios, citocinas, enzimas e substâncias tóxicas que iniciam e perpetuam um ciclo que se retroalimenta e resultam em inflamação crônica e alterações patológicas [1, 2]. Como consequência há lesão, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa (remodelamento tecidual e hiper-reatividade) e das células produtoras de muco (principalmente pela ação da IL-13), responsáveis pelo declínio da função pulmonar e obstrução das vias aéreas [1, 10, 15-17].

É interessante notar, que o IFN-gama foi produzido em menor quantidade pelas CMSPs de pacientes com asma em comparação com indivíduos saudáveis. Esses resultados podem indicar que em indivíduos não asmáticos há um predomínio de células Th1 (produtoras de IFN-gama), que inibem a diferenciação de linfócitos Th2.

Nossos resultados também mostraram que as células de pacientes com asma apresentam produção estatisticamente maior de IL-17 e IL-22, característicos de células Th17. Como mencionado, os neutrófilos, presentes na asma não-atópica, são recrutados para o tecido pulmonar em resposta à ativação de linfócitos T do tipo Th17 e Th22 (produtoras de IL-17 e IL-22) [18, 19, 23, 24]. As células Th17 e Th22, por sua vez, são diferenciadas em resposta a estímulos inflamatórios locais em resposta a danos teciduais, que podem ser causados por infecções ou por exposição à poluentes [18, 19]. A resposta inflamatória desencadeada localmente induz a produção de GM-CSF e liberação de CXCL8 que irão atuar sistemicamente induzindo o aumento do número e posterior atração de neutrófilos para o tecido inflamado. Esses neutrófilos ao chegarem no tecido pulmonar são ativados e amplificam o processo inflamatório pela produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-6 e IL-18, e mediadores lipídicos como leucotrieno B4 (LTB4) e fator de ativação de plaquetas [25]. Além disso, essas células irão liberar no ambiente enzimas com atividade proteolítica incluindo metaloproteinases de matriz (MMP-9), elastase de neutrófilos e mieloperoxidase [25]. Os neutrófilos ativados também irão liberar no tecido pulmonar espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (óxido nítrico - NO) que possuem um papel fundamental no desencadeamento da doença, por

induzirem a morte de células do estroma. Em conjunto as substâncias liberadas serão responsáveis pelo remodelamento do tecido pulmonar responsável pela hiperplasia e consequente obstrução das vias aéreas [8, 25-27].

## **7. CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostraram que CMSPs de pacientes com asma produzem maiores quantidades de IL-4, IL-9, IL22 e IL-17 e menor quantidade de IFN-gama após estímulo, quando comparadas a células de indivíduos controle. Em conjunto nossos resultados corroboram dados anteriores da literatura e indicam que essas citocinas podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da asma.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Barnes, P.J., Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(3): p. 183-92.
2. Holgate, S.T., et al., Asthma. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15025.
3. Cardoso, T.d.A., et al., The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2017. 43: p. 163-168.
4. Terzano, C., et al., 1-year prospective real life monitoring of asthma control and quality of life in Italy. *Respiratory Research*, 2012. 13: p. 1-11.
5. Lai, C.K.W., et al., Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, 2009. 64: p. 476-483.
6. Chong Neto, H.J., N.A. Rosário, and D. Solé, Asthma and Rhinitis in South America: How Different They are From Other Parts of the World. *Allergy, asthma & immunology research*, 2012. 4: p. 62-7.
7. Souza, S.D., et al., Tendência epidemiológica das prevalências de doenças alérgicas em adolescentes. 2017. 43: p. 368-372.
8. Kudo, M., Y. Ishigatsubo, and I. Aoki, Pathology of asthma. *Front Microbiol*, 2013. 4: p. 263.

9. Kim, H.Y., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 2010. 11(7): p. 577-84.
10. Lloyd, C.M. and E.M. Hessel, Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(12): p. 838-48.
11. Mitchell, P.D., et al., IL-33 and Its Receptor ST2 after Inhaled Allergen Challenge in Allergic Asthmatics. *Immunol Rev*, 2018. 176(2): p. 133-142.
12. Koch, S., N. Soper, and S. Finotto, Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Semin Immunopathol*, 2017. 39(1): p. 55-68.
13. Stassen, M., E. Schmitt, and T. Bopp, From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. 1247: p. 56-68.
14. Xing, J., Y. Wu, and B. Ni, Th9: a new player in asthma pathogenesis? *J Asthma*, 2011. 48(2): p. 115-25.
15. Gould, H.J. and B.J. Sutton, IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(3): p. 205-17.
16. Holgate, S.T. and R. Polosa, Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(3): p. 218-30.
17. Rosenberg, H.F., K.D. Dyer, and P.S. Foster, Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(1): p. 9-22.
18. Tamasauskienė, L. and B. Sitkauskienė, Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: Pro-inflammatory or anti-inflammatory effect? *Pediatr Neonatol*, 2017.
19. Newcomb, D.C. and R.S. Peebles, Jr., Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol*, 2013. 25(6): p. 755-60.
20. Kotsimbos, A.T.C. and Q. Hamid, IL-5 and IL-5 Receptor in Asthma. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1997. 92 SUPPL. : p. 75-91.
21. Blanchard, C. and M.E. Rothenberg, Biology of the eosinophil. *Adv Immunol*, 2009. 101: p. 81-121.
22. McBrien, C.N. and A. Menzies-Gow, The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 2017. 4.

23. Hirose, K., et al., Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Respir Res*, 2017. 278(1): p. 145-161.
24. Manni, M.L., K.M. Robinson, and J.F. Alcorn, A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. *Expert Rev Respir Med*, 2014. 8(1): p. 25-42.
25. Monteseirín, J., Neutrophils and asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2009. 19: p. 340-354.
26. Mann, B.S. and K.F. Chung, Blood neutrophil activation markers in severe asthma: Lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respiratory Research*, 2006. 7: p. 1-10.
27. Marçal, L.E., et al., Superoxide release and cellular glutathione peroxidase activity in leukocytes from children with persistent asthma. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 2004. 37: p. 1607-13.
28. [IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]. *J Bras Pneumol*, 2006. 32 Suppl 7: p. S447-74.
29. Caruso, M., et al., Biologic agents for severe asthma patients: clinical perspectives and implications. *Intern Emerg Med*, 2018. 13(2): p. 155-176.
30. Meteran, H., et al., Novel monoclonal treatments in severe asthma. *J Asthma*, 2017. 54(10): p. 991-1011.
31. Mitchell, P.D., A.I. El-Gammal, and P.M. O'Byrne, Emerging monoclonal antibodies as targeted innovative therapeutic approaches to asthma. *Clin Pharmacol Ther*, 2016. 99(1): p. 38-48.
32. Tisiologia, S.B.d.P.e., Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012 Free Full Text in English. *J Bras Pneumol*, 2012. 38: p. S1-S46.