

Avaliação dos níveis plasmáticos de quimiocinas (CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) em pacientes com asma controlada e asma de difícil controle.

RESUMO:

Introdução: A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela inflamação e obstrução das vias aéreas. Na asma atópica o remodelamento tecidual é causado por um processo inflamatório crônico decorrente da exposição a alérgenos, diferenciação de linfócitos Th2, produção de IgE, sensibilização e ativação de mastócitos e posterior quimioatração e ativação de eosinófilos. Por outro lado, na asma não-atópica a inflamação é mediada pela quimioatração e ativação de neutrófilos, com participação de linfócitos Th1/Th17, após exposição a poluentes. A migração das diferentes células para o tecido pulmonar depende da produção de quimiocinas que atuam sobre os eosinófilos (CCL5), neutrófilos (CXCL8) e linfócitos T (CXCL10 e CXCL9). **Objetivos:** Avaliar os níveis plasmáticos das quimiocinas CXCL8, CCL5, CXCL10 e CXCL9 em pacientes com asma controlada e não-controlada. **Método:** O sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles - n=34) e de pacientes com asma controlada (n=34) e asma não-controlada (n=40) foi coletado por punção venosa, em tubos contendo heparina sódica e as amostras de plasma obtidas por centrifugação. A dosagem de quimiocinas (CXCL8, CCL5, CXCL10 e CXCL9) foi feita por ELISA com “kits” comerciais específicos para cada citocina. **Resultados:** Pacientes com asma apresentaram níveis plasmáticos estatisticamente maiores de CCL5 e CXCL8 e menores níveis de CXCL9 e CXCL10 em comparação a indivíduos do grupo controle. Não observamos diferenças nos níveis de nenhuma das quimiocinas avaliadas entre os pacientes com asma controlada e não-controlada. **Conclusões:** A produção diferencial de quimiocinas poderia resultar na maior capacidade de migração de eosinófilos (CCL5) e neutrófilos (CXCL8) responsáveis pela inflamação e remodelamento tecidual observada na asma. Além disso, podemos inferir que a menor produção de quimiocinas responsáveis pela quimioatração de linfócitos (particularmente do tipo Th1 - CXCL9 e CXCL10) poderia contribuir para o desequilíbrio na modulação da resposta imunológica característica da asma. **Palavras-Chave:** asma controlada, asma não controlada, quimiocinas.

1. 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, sibilo, aperto no peito e tosse,

particularmente à noite ou no início da manhã [1, 2]. É uma doença de alta prevalência mundial que atinge todas as faixas etárias, estima-se que afete aproximadamente 11,6% das crianças de 6 e 7 anos e 13,7% entre 13 e 14 anos [2]. A asma também interfere na mortalidade e morbidade, o que prejudica a qualidade de vida, e resulta em custos sociais de forma direta e indireta [3-5]. O Brasil é um dos países mais afetados pela asma na infância, acometendo 20% das crianças em idade escolar [3, 6, 7]. Tal doença resulta 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].

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 de eosinófilos e o segundo com a participação de linfócitos Th17, de linfócitos T regulatórios e infiltrado de neutrófilos [1, 2, 8, 9]. A asma atópica começa na juventude e tende a desaparecer com os anos, já a não-atópica costuma aparecer mais tardiamente podendo ser mais prejudicial, levando a maior mortalidade e morbidade em comparação à asma atópica [1, 2, 8, 9].

A asma atópica 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 (linfopoiétina estromal tímica) que estimulam a ativação e diferenciação de linfócitos TCD4+ do tipo Th2 ou Th9, após a apresentação dos alérgenos pelas células dendríticas [2, 10]. Os linfócitos Th2 irão produzir IL-4, IL-5 e IL-13, enquanto que os linfócitos Th9 produzem IL-9 [11-13], 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 ϵ RI) sensibilizando-os [14]. 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, 9, 14-16].

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. Normalmente está associada à exposição a infecções pulmonares e poluentes que iniciam um processo inflamatório crônico com a participação ativa de linfócitos TCD4+ do tipo Th17 e Th22 (produtores de IL-17 e IL-22) e a ativação de neutrófilos, responsável 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, 17, 18].

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

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea, em resposta a citocinas como a IL-5 [19], e liberadas na corrente sanguínea, e são atraídos para o sítio de inflamação em resposta a quimiocinas liberadas no ambiente [20]. Essas células possuem grânulos em que há a produção de mediadores inflamatórios como proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) [20]. No caso dos corpos lipídicos dos eosinófilos, estes estão relacionados à produção de eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas, e tromboxano [20]. Essas substâncias são liberadas quando a célula é ativada o que ocasiona uma rápida resposta inflamatória e geram a hiper-reatividade brônquica [20, 21].

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) [17, 18, 22, 23]. 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 [17, 18]. 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-1 beta, e mediadores lipídicos como leucotrieno B4 (LTB4) e fator de ativação de plaquetas [24]. Além disso, essas células irão liberar no ambiente enzimas com atividade proteolítica incluindo metaloproteinases de matriz (MMP-9), elastase de neutrófilos e mieloperoxidase [24]. 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 [10, 24-26].

Como pode ser observado acima o desenvolvimento dos diferentes tipos de asma está associado com a ativação, atração e migração de diferentes tipos celulares para o tecido pulmonar. Essa migração diferencial depende da produção de substâncias com atividade quimiotática após os estímulos iniciais, conhecidas como quimiocinas [27, 28]. As principais quimiocinas que agem sobre os eosinófilos são as eotaxinas e a CCL5 (RANTES) que se ligam ao receptor CCR3 expresso em eosinófilos [20, 27-29]. Enquanto que a quimioatração de neutrófilos depende principalmente da CXCL8 (IL-8), atuando nos receptores CXCR1 e CXCR2 [24, 30, 31]. Além dessas, outras quimiocinas podem atuar na asma, levando à migração de linfócitos T para o tecido pulmonar como a CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig) [27, 28].

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 glicorticoides locais, e nos casos mais graves sistêmicos) e/ou controle dos sintomas (uso de bronco dilatadores como agonistas adrenérgicos β_2 ou bloqueadores de leucotrienos) [32]. 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 [33-35]. 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) [33-35].

Apesar desses avanços, nem todos os pacientes respondem de maneira adequada ao tratamento e, dessa forma, os pacientes com asma (atópica ou não-atópica) podem ser

classificados em relação à essa resposta em pacientes com asma controlada, parcialmente controlada e não controlada, de acordo com critérios estabelecidos e relacionados na tabela abaixo (tabela 1) [36], embora ainda não se saiba ao certo quais os mecanismos imunopatológicos que levam a essas diferenças.

Tabela 1. Classificação de pacientes asmáticos de acordo com os níveis de controle [36].

Parâmetros	Controlado	Parcialmente controlado	Não Controlado
Sintomas diurnos	Nenhum ou mínimo	2 ou mais/semana	3 ou mais parâmetros presentes em qualquer semana.
Despertares noturnos	Nenhum	Pelo menos 1/semana	
Necessidade de medicamentos de resgate	Nenhuma	2 ou mais/semana	
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente em qualquer momento	
PFE ou VEF1*	Normal ou próximo do normal	<80% predito	
Exacerbação	Nenhuma	1 ou mais/ano	1 em qualquer semana

*PFE = pico de fluxo expiratório; VEF1 = volume expiratório forçado no primeiro segundo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de quimiocinas presentes na circulação de pacientes com asma controlada e não-controlada.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os níveis séricos de CXCL8 (IL-8), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig) de pacientes com asma controlada e não controlada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. 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**", submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, 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.

Nesse estudo foram incluídos 74 pacientes adultos (> 18 anos) asmáticos. Os pacientes foram selecionados dentre aqueles que forem atendidos no Ambulatório de Pneumologia. 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 β 2-agonista inalado). Os pacientes foram distribuídos em 2 grupos em: 1- Asma controlada (n=34) e 2 - Asma de difícil controle (parcialmente controlada ou Não controlada - n=40), seguindo os critérios previamente estabelecidos e descritos na tabela 1 da introdução [36]. Não foram incluídos pacientes fumantes ou com histórico de outras doenças respiratórias infecciosas ou inflamatórias crônicas (DPOC, neoplasias, tuberculose, etc), assim como aqueles que tiverem histórico de infecções respiratórias virais 1 mês antecedendo a coleta de material. Também foram incluídos 34 indivíduos adultos (>18 anos) saudáveis (controles), não fumantes e que não apresentavam nenhuma doença infecciosa, autoimune ou alérgica e que não tivessem utilizado nos últimos 15 dias nenhum medicamento anti-inflamatório.

3.2. Obtenção do soro de pacientes e controles.

O sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles) e de pacientes com asma foi coletado (aproximadamente 10 mL) por punção venosa, em tubos contendo heparina sódica. Sendo então submetidos à centrifugação (2000 RPMs por 15 minutos à temperatura ambiente) para a separação do plasma. Após a centrifugação o plasma foi imediatamente aliquotado (3-4 alíquotas) e armazenados a -20°C até o momento da dosagem das quimiocinas.

3.3. Dosagem de quimiocinas por ELISA

A dosagem de quimiocinas (CXCL8, CCL5, CXCL10 e CXCL9) nos soros de pacientes e de indivíduos saudáveis foi feita utilizando-se "kits" comerciais específicos para cada citocina conforme as instruções dos fabricantes (R&D Systems). De maneira geral: placas de ELISA de 96 poços de alta afinidade (Nunc) foram recobertas com anticorpo

monoclonal de captura (específicos para cada quimiocina) 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 2000pg/mL a 31,3 pg/mL para CXCL8 e CXCL10, de 1000 pg/mL a 15,6 pg/mL para CCL11 e CCL5 e de 4000pg/mL a 62,5pg/mL para CXCL9). As placas foram, então lavadas (3 vezes) e incubadas por 2 horas com anticorpo monoclonal de detecção conjugado à biotina (específicos para cada quimiocina) 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) 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/H₂O₂ em tampão acetato pH 5,5). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de solução de H₂SO₄ (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.

3.4. Análise estatística.

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism (v.5.0). A comparação dos níveis de citocinas entre os grupos controle e asma foi feita utilizando-se o método de ANOVA com pós-teste de Tukey (3 grupos) ou t de Student (2 grupos). Foram consideradas significativas diferenças com valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS.

No período que compreende o relatório finalizamos a dosagem de quimiocinas, conforme previsto no cronograma original. Os resultados obtidos são descritos a seguir.

A análise dos dados foi feita de duas formas, comparando-se as amostras de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com asma, sem considerar a forma da doença, ou comparando-se o grupo controle com os pacientes subdivididos de acordo com a forma (asma controlada ou asma não controlada).

Quando analisamos os níveis séricos de quimiocinas responsáveis pela atração de eosinófilos (CCL5 - figura 1A) e neutrófilos (CXCL8 - Figura 2A) pudemos observar que

pacientes com asma apresentam maior quantidade circulantes dessas quimiocinas quando comparadas a indivíduos do grupo controle (figuras 1A e 2A).

A análise dos pacientes com asma classificados de acordo com a gravidade da doença, mostrou que em ambos os grupos tanto a produção de CCL5 (figura 1B), quanto a produção de CXCL8 (figura 2B) foi maior nos pacientes com asma, independentemente da forma) em comparação com o grupo controle. Para as duas quimiocinas não observamos diferenças significativas entre os dois subgrupos de pacientes (figuras 1B e 2B)

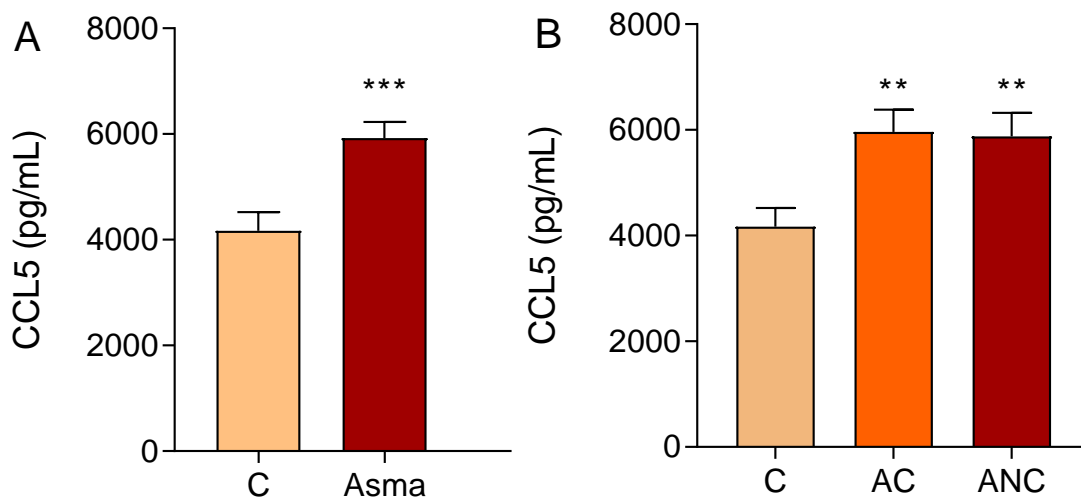


Figura 1 – Quantificação de CCL5 (RANTES) em amostras de soro de pacientes com asma e indivíduos controle. **A)** Comparação entre os níveis de CCL5 entre amostras de indivíduos saudáveis (C - n=34) e pacientes asmáticos sem considerar a forma clínica (asma - n=74). Análise estatística: teste t de Student. ***p<0,05. **B)** Comparação entre os níveis de CCL5 entre amostras de indivíduos saudáveis (C) e pacientes com asma controlada (AC - n=34) ou não controlada (NC - n=40). Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. **p<0,001 em comparação ao grupo controle. Os dados representam a média±EPM.

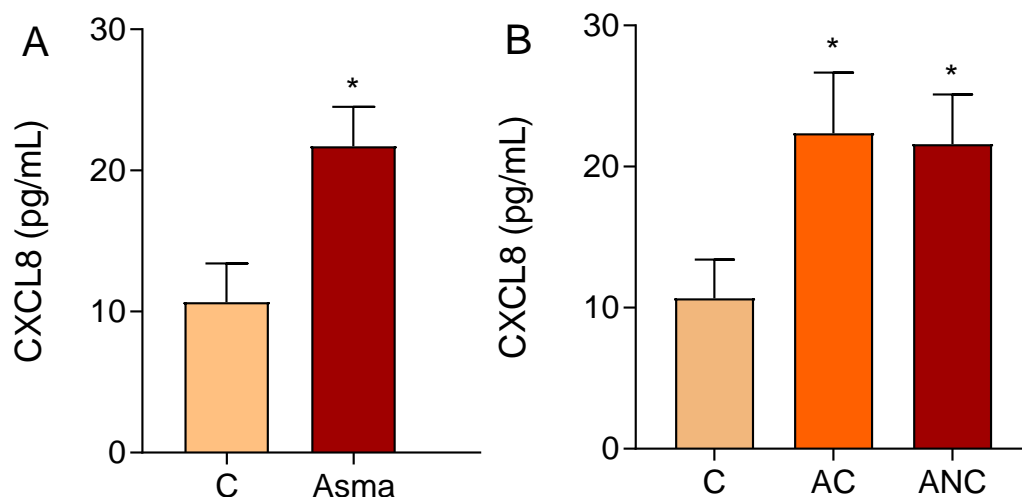


Figura 2 – Quantificação de CXCL8 (IL-8) em amostras de soro de pacientes com asma e indivíduos controle. **A)** Comparação entre os níveis de CXCL8 entre amostras de indivíduos saudáveis (C - n=34) e pacientes asmáticos sem considerar a forma clínica (asma - n=74). Análise estatística: teste t de Student. *p<0,05. **B)** Comparação entre os níveis de CXCL8 entre amostras de indivíduos saudáveis (C) e pacientes com asma controlada (AC - n=34) ou não controlada (NC - n=40). Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey.*p<0,05 em comparação ao grupo controle. Os dados representam a média±EPM.

Em relação às quimiocinas responsáveis pela quimioatração de linfócitos para sítios inflamatórios (CXCL9 e CXCL10). Observamos uma inversão nos resultados, ou seja, nossos dados mostraram que pacientes com asma (analisados em conjunto ou separados nos subgrupos) apresentaram quantidades estatisticamente menores de CXCL9 (figura 3) e CXCL10 (figura 4) circulantes em comparação ao grupo de indivíduos controle. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes asmáticos em nenhuma das duas quimiocinas (figuras 3 e 4).

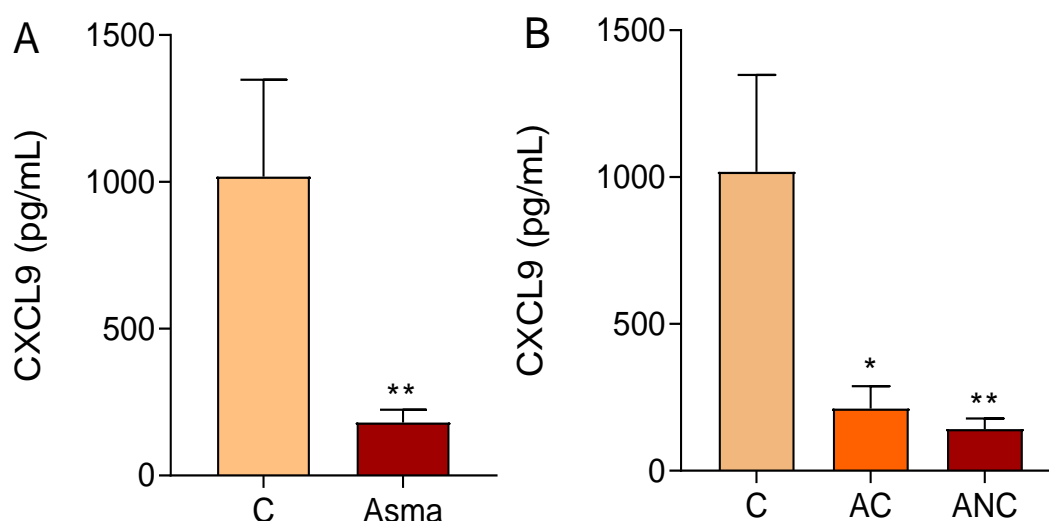


Figura 3 – Quantificação de CXCL9 (Mig) em amostras de soro de pacientes com asma e indivíduos controle. **A)** Comparação entre os níveis de CXCL9 entre amostras de indivíduos saudáveis (C - n=34) e pacientes asmáticos sem considerar a forma clínica (asma - n=74). Análise estatística: teste t de Student. **p<0,001. **B)** Comparação entre os níveis de CXCL9 entre amostras de indivíduos saudáveis (C) e pacientes com asma controlada (AC - n=34) ou não controlada (NC - n=40). Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey.*p<0,05; **p<0,001 em comparação ao grupo controle. Os dados representam a média±EPM.

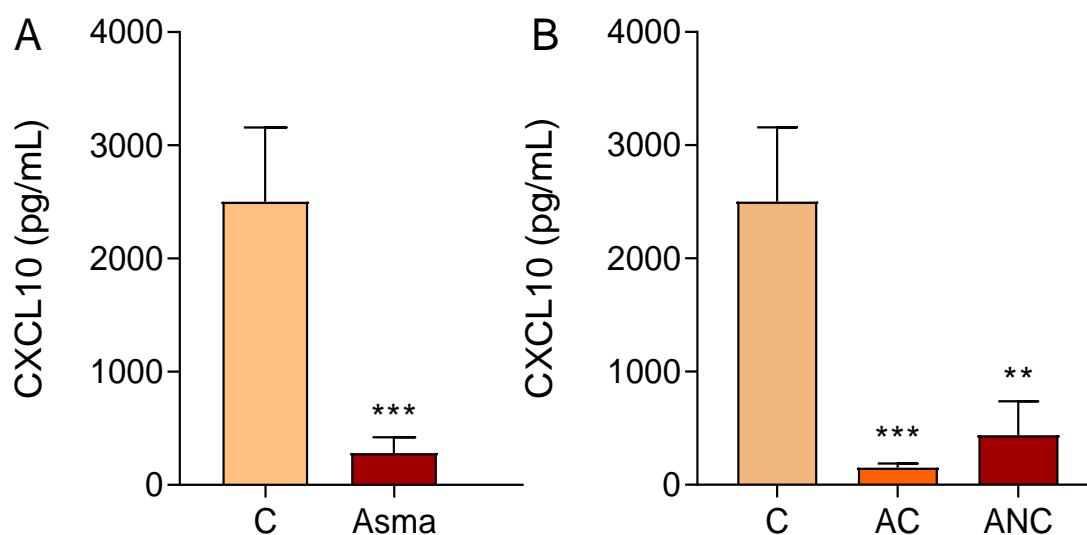


Figura 4 – Quantificação de CXCL10 (IP-10) em amostras de soro de pacientes com asma e indivíduos controle. **A)** Comparação entre os níveis de CXCL10 entre amostras de indivíduos saudáveis (C - n=34) e pacientes asmáticos sem considerar a forma clínica (asma - n=74). Análise estatística: teste t de Student. ***p<0,0001. **B)** Comparação entre os níveis de CXCL10 entre amostras de indivíduos saudáveis (C) e pacientes com asma controlada (AC - n=34) ou não controlada (NC - n=40). Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey. **p<0,001; ***P<0,0001 em comparação ao grupo controle. Os dados representam a média±EPM.

5. DISCUSSÃO

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 formas 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, principalmente os relacionados às diferenças observadas na resposta aos tratamentos disponíveis. As diferentes quimiocinas produzidas 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.

No presente estudo pudemos identificar que pacientes asmáticos, independentemente da forma clínica, apresentam maiores níveis circulantes de CCL5 (RANTES). Essa citocina é uma das principais quimiocinas que atuam na atração de eosinófilos para os sítios inflamatórios [37, 38]. Dessa forma, a maior produção dessa quimiocina poderia contribuir para aumentar a migração dessas células para o tecido pulmonar dos indivíduos asmáticos.

Os eosinófilos ao serem ativados nos sítios inflamatórios liberam uma série de substâncias no local, entre elas a MBP (Proteína Básica Principal). A MBP está relacionada ao desencadeamento da hiper-reatividade 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) [20, 21].

Por sua vez a CXCL8 é a principal quimiocina responsável pela quimioatração de neutrófilos. Células que também desempenham papel importante, junto com os eosinófilos, na destruição e remodelamento tecidual responsável pela obstrução das vias aéreas observadas na asma. Nossos resultados corroboram essas características, uma vez que também observamos maior quantidade de CXCL8 nas amostras de pacientes asmáticos.

Por outro lado, encontramos menores quantidades de CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) nos soros de pacientes com asma (também de forma independente da gravidade). Essas quimiocinas atuam atraindo linfócitos T para os sítios inflamatórios [27, 28], particularmente linfócitos Th1, produtores de IFN-gama. As células Th1, embora tenham atividade inflamatória, apresentam papel inibitório na diferenciação de células Th2 (principais mediadoras da asma atópica) e de células Th17 (mediadoras da asma não-atópica) [39]. Dessa forma, uma menor produção dessas quimiocinas poderia estar relacionada ao desequilíbrio na modulação da resposta imunológica na asma.

6. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que pacientes com asma (independente da gravidade da doença) apresentam maiores níveis circulantes de CCL5 e CXCL8 do que indivíduos saudáveis. O aumento dessas citocinas poderia contribuir para uma maior capacidade de migração de eosinófilos (CCL5) e neutrófilos (CXCL8) responsáveis pela inflamação e remodelamento tecidual observada na asma.

Além disso, podemos inferir que a menor produção de quimiocinas responsáveis pela quimioatração de linfócitos (particularmente do tipo Th1 - CXCL9 e CXCL10) poderiam contribuir para o desequilíbrio na modulação da resposta imunológica observada na asma, uma vez que células Th1 inibem as respostas características da asma atópica (Th2) e não-atópica (Th17).

7. 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. 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.
9. 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.

10. Kudo, M., Y. Ishigatsubo, and I. Aoki, *Pathology of asthma*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 263.
11. Koch, S., N. Sopel, and S. Finotto, *Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(1): p. 55-68.
12. 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.
13. Xing, J., Y. Wu, and B. Ni, *Th9: a new player in asthma pathogenesis?* J Asthma, 2011. **48**(2): p. 115-25.
14. Gould, H.J. and B.J. Sutton, *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 205-17.
15. Holgate, S.T. and R. Polosa, *Treatment strategies for allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 218-30.
16. 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.
17. 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.
18. Newcomb, D.C. and R.S. Peebles, Jr., *Th17-mediated inflammation in asthma*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(6): p. 755-60.
19. Kotsimbos, A.T.C. and Q. Hamid, *IL-5 and IL-5 Receptor in Asthma*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1997. **92 SUPPL.** : p. 75-91.
20. Blanchard, C. and M.E. Rothenberg, *Biology of the eosinophil*. Adv Immunol, 2009. **101**: p. 81-121.
21. McBrien, C.N. and A. Menzies-Gow, *The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma*. Frontiers in Medicine, 2017. **4**.
22. Hirose, K., et al., *Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway*. Respir Res, 2017. **278**(1): p. 145-161.
23. 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.
24. Monteseirín, J., *Neutrophils and asthma*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2009. **19**: p. 340-354.
25. 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.

26. 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.
27. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-15.
28. Lukacs, N.W., *Role of chemokines in the pathogenesis of asthma*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 108-16.
29. Ying, S., et al., *Eosinophil Chemotactic Chemokines (Eotaxin, Eotaxin-2, RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C Chemokine Receptor 3 Expression in Bronchial Biopsies from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics*. 2018. **3**.
30. Richardson, R.M., et al., *Role of the Cytoplasmic Tails of CXCR1 and CXCR2 in Mediating Leukocyte Migration, Activation, and Regulation*. The Journal of Immunology, 2003. **170**: p. 2904-2911.
31. Johnston, R.A., J.P. Mizgerd, and S.A. Shore, *CXCR2 is essential for maximal neutrophil recruitment and methacholine responsiveness after ozone exposure*. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2005. **288**: p. L61-L67.
32. *[IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]*. J Bras Pneumol, 2006. **32 Suppl 7**: p. S447-74.
33. Caruso, M., et al., *Biologic agents for severe asthma patients: clinical perspectives and implications*. Intern Emerg Med, 2018. **13**(2): p. 155-176.
34. Meteran, H., et al., *Novel monoclonal treatments in severe asthma*. J Asthma, 2017. **54**(10): p. 991-1011.
35. 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.
36. 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.
37. Allen, J.S., et al., *Characterization of the eosinophil chemokine RANTES in nasal polyps*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1998. **107**(5 Pt 1): p. 416-20.

38. Venge, J., et al., *Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(5): p. 1110-5.
39. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.