

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE LINFOCITÁRIA AOS  
GLICOCORTICÓIDES E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM  
CRIANÇAS COM ASMA

Autor

Guilherme Cerutti Müller

Porto Alegre, Abril de 2009



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE LINFOCITÁRIA AOS  
GLICOCORTICÓIDES E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM  
CRIANÇAS COM ASMA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular  
como requisito para a obtenção  
do grau de Mestre.

Autor

**Guilherme Cerutti Müller**

Orientador

**Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer**

Porto Alegre, Abril de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais e minha irmã, pelo incentivo, compreensão e paciência em mais esta importante etapa da minha vida.*

*Ao meu orientador, Móisés Evandro Bauer, que colaborou nesta construção, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.*

*Às colegas Micheli Pillat e Bruna Luz que tanto me ajudaram nas incontáveis horas de trabalho dentro do laboratório, e a todo o pessoal do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pela força e paciência no decorrer do curso.*

*Ao professor Paulo Márcio Pitrez e ao grupo do Laboratório de Fisiologia Respiratória por toda a colaboração durante a realização desta pesquisa.*

*À professora Cristina Bonorino pelos conselhos e pela supervisão no estágio em docência.*

*Enfim, um Muito Obrigado a todos que direta ou indiretamente me apoiaram nessa jornada.*

## RESUMO

**Introdução:** A asma é uma doença inflamatória crônica e os glicocorticóides (GCs) são a terapia mais efetiva para o controle da doença. Um subgrupo de paciente com asma severa é resistente aos GCs, mas não há dados a respeito da sensibilidade aos GCs em crianças com essa doença. **Objetivos:** A intenção deste estudo é analisar a sensibilidade das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) aos GCs além de marcadores inflamatórios no plasma de crianças com asma persistente. **Métodos:** Os pacientes com asma persistente (n=57) foram divididos em três grupos (severa, moderada e leve), e comparados com crianças saudáveis (n=18). PBMCs foram isoladas e postas em cultura *in vitro* para testar a proliferação induzida por mitógeno assim como a sensibilidade celular à dexametasona. Quimiocinas do plasma (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL22, CCL24, CXCL9, CXCL10 e IL-8), receptores solúveis de TNF e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foram analisados com ELISA. **Principais Resultados:** Pacientes com asma leve apresentaram uma relativa resistência à dexametasona. Pacientes com asma moderada e severa mostraram ter níveis de BDNF mais elevados ( $p < 0.01$ ) quando comparados com os pacientes com asma leve e controles, sendo o melhor marcador de severidade neste estudo. **Conclusões:** PBMCs derivadas de crianças com asma severa não são resistentes aos GCs *in vitro*. BDNF Plasmática é um potencial marcador da progressão da doença em crianças asmáticas. Nossos achados sugerem que a resistência aos GCs em adultos com asma severa possa ser um processo adquirido.

**Palavras chave:** Glicocorticóide, Asma Severa, Células T, Proliferação, BDNF

## ABSTRACT

**Rationale:** Asthma is a chronic inflammatory disease and glucocorticoids (GCs) are a very effective therapy. A subset of adult patients with severe asthma are resistant to GCs, but there is no data on sensitivity to GCs in children with this illness. **Objectives:** The aim of the present study is to analyze peripheral blood mononuclear cell (PBMC) sensitivity to GCs as well as inflammatory markers in children with persistent asthma plasma. **Methods:** patients with persistent asthma (n=57) were divided into three groups (severe, moderate and mild), and compared with healthy children (n=18). PBMCs were isolated and cultured *in vitro* to assess mitogen-induced proliferation as well as cellular sensitivity to dexamethasone. Plasma chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL22, CCL24, CXCL9, CXCL10 and IL-8), soluble TNF receptors and brain derived neurotrophic factor (BDNF) were assessed by ELISAs. **Main Results:** Patients with mild asthma showed significantly less stimulated T-cell proliferation and a relative insensitivity to dexamethasone. The asthmatic patients had mostly unchanged chemokine levels when compared with controls and IL-8 was negatively associated to pulmonary function. Moderate and severe asthma patients had higher BDNF levels ( $p < 0.01$ ), being the best asthma severity marker in this study. **Conclusions:** Children with severe asthma are not resistant to GCs *in vitro*. Plasma BDNF is a potential marker of disease progression in childhood asthma. Our findings suggest that the resistance to GCs in adults with severe asthma could be an acquired process.

**Key words:** Corticosteroids, Severe Asthma, T-cell, Proliferation, BDNF

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>7</b>
1.1	CONCEPÇÕES SOBRE ASMA .....	7
1.2	PATOFISIOLOGIA DA ASMA .....	9
1.3	MECANISMOS DE AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES .....	10
1.4	RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS GLICOCORTICÓIDES .....	14
1.5	MARCADORES INFLAMATÓRIOS .....	15
1.5.1	<i>Citocinas</i> .....	16
1.5.2	<i>TNF e seus receptores solúveis</i> .....	18
1.5.3	<i>Quimiocinas</i> .....	19
1.5.4	<i>Neurotrofinas</i> .....	22
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	GERAL.....	26
3.2	ESPECÍFICOS .....	26
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>27</b>
4.1	ABSTRACT .....	28
4.2	INTRODUCTION .....	29
4.3	METHODS .....	30
4.3.1	<i>Subjects</i> .....	30
4.3.2	<i>Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells</i> .....	31
4.3.3	<i>Lymphocyte proliferation/viability and steroid sensitivity assays</i> .....	31
4.3.4	<i>Plasma cytokines and BDNF</i> .....	32
4.3.5	<i>Statistical analysis</i> .....	32
4.4	RESULTS .....	33
4.4.1	<i>Subject characteristics</i> .....	33
4.4.2	<i>Lymphocyte proliferation and sensitivity to glucocorticoids</i> .....	33
4.4.3	<i>Peripheral inflammatory markers</i> .....	34
4.5	DISCUSSION.....	35
4.6	REFERENCES.....	39
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

# 1 CARACTERIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

## 1.1 CONCEPÇÕES SOBRE ASMA

A asma é uma doença inflamatória que ocorre devido a uma desregulação da resposta imune no trato respiratório, caracterizada por hiper-responsividade e pela limitação variável do fluxo aéreo, podendo ser reversível, com ou sem tratamento (1-3). Essa limitação do fluxo aéreo ocorre principalmente devido à inflamação brônquica que está presente em todos os pacientes asmáticos, mesmos nos quadros mais leves, e nos assintomáticos (3).

Com cerca de 350 mil internações anuais, essa doença constitui a quarta causa de hospitalização pelo SUS, e a terceira causa entre crianças e adultos jovens. (3). Com o crescimento da incidência da asma, houve uma grande colaboração internacional visando analisar a epidemiologia da asma, e esse foi o estudo ISAAC - "*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*", onde entre diversos países, o Brasil foi o oitavo país com maior prevalência de asma (4), embora o crescimento da asma no Brasil se mantenha estável (3). A asma não é uma patologia simples e bem definida, e sim multifatorial e com diferentes subtipos, podendo ser leve, moderada ou severa, intermitente ou persistente, podendo apresentar atopia ou não, mas alguns autores acreditam que a asma severa possa ser uma forma diferente de patologia, distinta da leve e moderada (5, 6).

Devido aos diversos fenótipos e características da asma, e de suas diferentes formas de sintomas desencadeados, se torna muito difícil de realizar uma classificação padronizada, e não há uma classificação completamente aceita. A grande maioria dos pacientes apresenta o quadro asmático juntamente com a presença de atopia – com uma maior relevância nos pacientes pediátricos em comparação aos adultos. Já o termo “asma refratária”, utilizado pela *American Thoracic Society*, engloba diferentes subtipos de asma,

como: asma severa, esteróide dependente, esteróide resistente, asma de difícil controle, e asma irreversível. Então, a asma refratária pode ser definida com base na medicação requerida, nos sintomas, na frequência das crises e no grau de limitação pulmonar (1). Não há uma idade certa para o início dos sintomas, no entanto, a doença inicia muito cedo, cerca de 70% dos casos antes mesmo dos seis anos, podendo persistir no decorrer da sua vida (7-10), e em 1/3 dos pacientes os primeiros sintomas começam antes de completar um ano de vida (10).

O seu diagnóstico deve ser baseado, principalmente, na anamnese e no exame clínico, mas as provas de função pulmonar e de avaliação alérgica são muito importantes também (3). Infecções virais causadas por rinovírus, coronavírus, influenza, parainfluenza e RSVs (vírus sincício respiratório) são importantes ativadoras de ataques de asma (11), e mais de 70% das ocorrências de sibilância nos primeiros anos de vida estão relacionadas com elas (12). Sibilâncias essas que juntamente com a dispnéia, tosse crônica e desconforto torácico (no início ou final do dia), são sintomas indicativos de asma (3).

A espirometria é utilizada para analisar a limitação do fluxo de ar, sendo uma excelente ferramenta no diagnóstico da asma. Um quadro de obstrução das vias aéreas devido à redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $FEV_1$ ) abaixo de 80% do previsto e da sua relação com a capacidade vital forçada para abaixo de 86% em crianças é indicativo de asma (13, 14). Enquanto que, na asma severa, valores consideravelmente mais baixos de  $FEV_1$  são encontrados (5). Para o diagnóstico de alergia, pode-se utilizar de técnicas *in vivo* (teste cutâneo) e *in vitro* (IgE) (15), além de analisar o grau de eosinofilia (1).

Os corticosteróides inalados são o meio mais efetivo de tratamento para o controle de asma, em qualquer idade ou grau de severidade da doença. O seu uso melhora consideravelmente a qualidade de vida do paciente, tornando desnecessário o uso do medicamento por via oral na maioria dos casos (16). Esse recurso é de manutenção



profilática, sendo utilizado em pacientes acima de quatro anos concomitantemente com  $\beta$ -agonistas de ação prolongada. Em certos pacientes com asma persistente, anti-leucotrienos podem ser utilizados ao invés dos  $\beta$ -agonistas (3). A maior parte dos pacientes asmáticos responde às baixas doses de GCs inalados, mas em casos de asma severa, de difícil controle, o uso desse medicamento é mais intenso, e por vezes, em conjunto com corticosteróides de via oral, tratamento esse que em alguns pacientes não surte efeito (asma corticosteróide resistente) (3, 16). Dados farmacogenéticos relacionando o uso crônico de  $\beta$ -agonistas e a eficácia dos corticosteróides têm demonstrado novos indícios sobre a variabilidade da resposta em asmáticos (7).

## ***1.2 PATOFISIOLOGIA DA ASMA***

A limitação do fluxo aéreo que ocorre nos pacientes asmáticos ocorre principalmente devido à broncoconstrição, à inflamação, à hipersensibilidade/hiperresponsividade e ao remodelamento brônquico. A asma é uma patologia altamente complexa, que pode ser desencadeada por diversos fatores, e a resposta inflamatória depende de uma vasta gama de células e mediadores inflamatórios. Basicamente podemos dizer que a asma é caracterizada pela inflamação eosinofílica com um perfil de secreção de células Th2, que associadas a mastócitos ativados, causam broncoconstrição, e conseqüentemente a limitação do fluxo aéreo (17).

É característica dessa resposta inflamatória a infiltração eosinofílica, a degranulação de mastócitos, lesão intersticial das paredes das vias aéreas e a ativação dos linfócitos Th2 (3). Os mastócitos também têm alta importância nesse processo broncoconstritor, uma vez que secretam diferentes mediadores, como histamina, leucotrienos e prostaglandinas que são sintetizados após a ativação dessa célula, acarretando nessa broncoconstrição (17).

O remodelamento brônquico é um processo que envolve fatores da inflamação brônquica, que acarretam alterações estruturais e funcionais. Entre os principais fatores do remodelamento brônquico da asma, podemos citar a alteração da degradação de componentes da matriz extracelular, a neovascularização da submucosa, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hiperplasia de glândulas mucosas, hiperplasia de células caliciformes e alterações do epitélio brônquico (18). Diversos mediadores são liberados por diferentes células, como os mastócitos brônquicos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais. E assim a integridade epitelial poderá estar ameaçada durante este processo inflamatório. Alterações na permeabilidade vascular, no tônus das vias aéreas e anormalidades no controle neural também podem ocorrer em decorrência da liberação desses mediadores (3).

A reação de hipersensibilidade é mediada, inicialmente, por mastócitos e IgE, com posterior recrutamento de leucócitos, tais como, os linfócitos T, eosinófilos, neutrófilos e basófilos. Vários estudos também já relataram o aumento de células T CD4+ ativadas nos pulmões de pacientes asmáticos, sendo que a maioria constatou a prevalência de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$ ) sobre as citocinas Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ ) (19-21). Essa característica Th2 está diretamente relacionada com a hiperresponsividade e a produção excessiva de muco (19). Embora as citocinas do perfil de secreção Th2 sejam de extrema importância, não são os únicos fatores importantes da hiperresponsividade.

Estudos recentes demonstram que a BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) tem grande importância também, possivelmente através de mudanças funcionais nos nervos sensoriais nos pulmões (22). Já entre as quimiocinas, a principal representante no processo de hipersensibilidade é a CCL11, ou eotaxina, cuja ação recrutadora de eosinófilos tem papel chave no processo, uma vez que essas células liberam diversos mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (17).

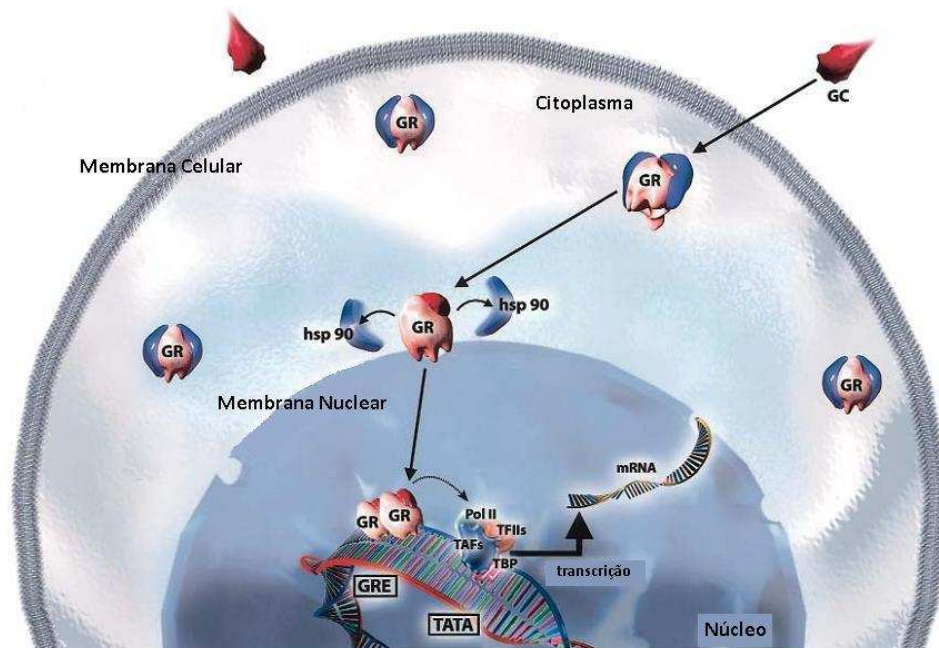
### **1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES**

Os glicocorticóides são compostos lipofílicos capazes de se difundir na membrana celular ligando-se em receptores citoplasmáticos (GR), ou de membrana, atuando como fator de transcrição regulando a expressão de genes alvo (23). O principal efeito dos corticosteróides é a supressão dos genes inflamatórios, como os que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, receptores e proteínas (24). Por conta dessa atividade antiinflamatória e imunossupressora, os glicocorticóides têm sido usados com sucesso no tratamento da asma, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, leucemias, linfomas, alergias e para combater a rejeição de órgãos transplantados. Eles representam os medicamentos mais importantes utilizados entre as drogas antiinflamatórias e seu uso terapêutico vem aumentando continuamente (25, 26), sendo a primeira linha de tratamento para adultos e crianças com asma persistente (16). Entretanto, foi observada uma ampla variação na sensibilidade dos linfócitos aos GCs entre indivíduos saudáveis (27) e, dessa forma, esta droga não representa sempre uma solução satisfatória (28).

Os mecanismos de ação dos GCs podem ser subdivididos em efeitos genômicos e não-genômicos (29). Eles ativam seus receptores, regulando direta ou indiretamente a transcrição de certos genes, sendo vários deles com ação antiinflamatória (24). Isso acontece após a ligação do hormônio com seu respectivo receptor na superfície celular ou no citoplasma (cGCR). O complexo hormônio: cGCR geralmente induz transativação ou inibe a síntese de proteínas regulatórias (30). Os cGCRs constituem um complexo de multiproteínas composto de várias proteínas de choque térmico (HSPs), conhecidas também como chaperonas, onde se incluem as proteínas HSP90, HSP70, HSP56 e HSP40. Após a ligação dos GCs com cGCRs, ocorre a dissociação das HSPs. A translocação para o núcleo celular é então possível e o complexo GC/GCR finalmente liga-se em sítios de DNA específico, nos elementos responsivos aos GCs (GREs) (30) (ver Figura 1). Dependendo do gene alvo, a transcrição é então ativada (transativação via GRE positivo) ou inibida (GRE

negativo) (31). A magnitude dos efeitos biológicos é determinada, entre outros fatores, pela densidade de receptores das células-alvo e a afinidade dos receptores aos GCs (32).

A maioria dos efeitos terapêuticos e imunológicos dos GCs é devida a ligação do ligante com o receptor intracelular GR $\alpha$ . Esta ligação induz a transcrição do inibidor de proteínas I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) que segura o fator nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) no citoplasma, em sua forma inativa, impedindo o NF $\kappa$ B de migrar para o núcleo, se ligar ao elemento de resposta apropriado no DNA e ativar as citocinas, contribuindo, dessa forma, para a imunossupressão mediada por esteróides (33, 34). O mecanismo de supressão dos receptores de citocinas é complexo, enquanto os receptores de IL-2, IL-4 e IL-12 são inibidos, os receptores de IL-6, GM-CSF e IL-7 são estimulados (23). Eles também suprimem a adesão celular, a marginação e migração, ativação dos macrófagos, apresentação de antígenos, expressão de receptores de células T, ativação dos linfócitos T, proliferação, diferenciação e função das células maduras, incluindo citotoxicidade e função das células B como a produção de anticorpos (35). Os GCs também induzem a apoptose de linfócitos e timócitos, mas estes efeitos podem ser secundários pela inibição da produção de citocinas e fatores de proliferação (35). Além da imunossupressão celular, os GCs também apresentam ações imunoestimulatórias (36-38), eles parecem aumentar a resposta imune inata embora reprimindo parte da resposta imune adaptativa em estado de repouso. Isto sugere que os GCs ajudam antígenos por estimulação do tráfego celular enquanto param as respostas imunes celulares por inibição da apresentação de antígenos e ativação das células T (39).



**Figura 1 – Complexo transcricional ativado por GCs.** Primeiramente, GR se apresenta como um complexo composto por duas moléculas de HSP90. No entanto, após a ligação com o GC, o GR se dissocia das chaperonas e é translocado para o núcleo. No núcleo, o complexo GC/GR se liga a uma região denominada GRE localizada em regiões reguladoras de genes-alvo. GC/GR interage com a o complexo de transcrição basal que inclui a proteína de ligação ao TATA Box, fatores de transcrição (TAFs e TFIIIs), e RNA polimerase II (pol II). Adaptado de (40).

Existem duas isoformas de receptores de GCs: GR $\alpha$  e GR $\beta$  (41). Ambos os subtipos de GCR mRNA possuem os exons 1-8, no entanto, como resultado de *splicing* alternativo, cada um possui uma versão diferente do exon 9 (42). Residindo no citoplasma, somente o GR $\alpha$  é capaz de ligar-se aos GCs, translocando-se posteriormente para o núcleo (43). O GR $\beta$  é incapaz de se ligar aos GCs e age como um inibidor negativo do GR $\alpha$  contribuindo para a resistência aos GCs (42, 44, 45). Alguns estudos mostram um aumento da expressão de GR $\beta$  em pacientes que apresentam resistência linfocitária aos GCs (45-47), assim como a importância dessa expressão aumentada na severidade da asma (47, 48). Outro estudo sugere um mecanismo molecular para a resistência ao glicocorticóide, onde o acúmulo dos níveis da isoforma GR $\beta$  poderia ocorrer devido a uma exposição prolongada a citocinas pró-inflamatórias (49).

#### ***1.4 RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AOS GLICOCORTICÓIDES***

Embora muitos pacientes respondam adequadamente a terapia com GCs, sendo então sensíveis a eles (CS), uma pequena subpopulação de indivíduos fracassa em responder aos efeitos terapêuticos desta classe de medicamentos e pode ser classificada como resistente aos corticosteróides (CR) (50). A maioria dos pacientes asmáticos respondem a pequenas doses de glicocorticóide, no entanto em alguns casos mais severos, doses maiores de glicocorticóide por via oral são necessárias com uso contínuo (asma corticosteróide-dependente) ou são ineficientes (corticosteróide-resistente) (16). A baixa sensibilidade a corticosteróides está presente em cerca de 5% dos asmáticos, enquanto que a resistência completa ao medicamento é muito rara, com prevalência em torno de 0,1% (40, 51). Além da asma, a resistência linfocitária a GCs pode ser demonstrada em outras patologias importantes incluindo a depressão maior, colite ulcerativa, artrite reumatóide e AIDS (52-55).

A resistência aos GCs pode ser uma propriedade intrínseca de cada indivíduo (50), provavelmente tendo uma base genética (56). Os mecanismos de resistência aos GCs relacionam-se em parte a alterações nas citocinas e hormônios (57). Ao nível molecular, podemos ressaltar as anormalidades nas vias de sinalização intracelular, defeitos no complexo proteína/receptor dos GCs e alterações na função do GR $\alpha$  bem como no balanço e na expressão celular de GR $\beta$  (57).

Alguns estudos mostram um aumento da expressão de GCR $\beta$  em pacientes que apresentam resistência linfocitária aos GCs (45-47), assim como a importância dessa expressão aumentada na severidade da asma (47, 48). O fato de existir uma relativa resistência em pacientes com asma severa adultos indica a possibilidade dessa menor sensibilidade estar presente em pacientes pediátricos também.

Para avaliar o potencial terapêutico individual para os GCs, é importante conhecer a farmacodinâmica e farmacocinética dos GCs no organismo. É necessário determinar a distribuição da população de pacientes resistentes aos GCs para diversas doenças imunológicas, o que pode ser útil para levar o paciente a uma terapia com GCs individualmente apropriada (28). As diferenças na disposição celular ou tecidual dos GCs podem afetar a farmacodinâmica celular. Pequenas mudanças na estrutura química dos GCs podem conduzir a grandes diferenças na distribuição da droga, eliminação e ligação ao receptor (58).

Certas citocinas, como a IL-2, IL-4 e IL-13, presentes em de biópsias brônquicas de asmáticos, podem reduzir a afinidade dos GR aos glicocorticóides em células inflamatórias (24). A combinação de IL-2 e IL-4 *in vitro* ativa p38 MAP quinase que fosforila os GRs reduzindo a sensibilidade aos GCs (59). Estudos em camundongos mostram que em diversos tecidos e culturas celulares, o uso contínuo de agonistas de GR pode acarretar uma menor expressão desses receptores (60).

Por fim, sabe-se que indivíduos adultos com asma severa apresentam uma relativa resistência aos glicocorticóides, de modo que eles respondem menos aos GCs do que os pacientes asmáticos com quadro clínico leve ou moderado (61), mas não sabemos se este fato está relacionado a algum dos mecanismos de resistência adquirida, ou se é uma predisposição genética própria da asma severa.

## **1.5 MARCADORES INFLAMATÓRIOS**

Atualmente, mais de 100 diferentes mediadores já foram relacionados com a asma e com a complexa resposta inflamatória das vias aéreas. Entre esses mediadores, podemos citar as citocinas (que orquestram a resposta inflamatória), as quimiocinas (que recrutam células envolvidas no processo inflamatório), receptores solúveis de citocinas (que atuam

regulando as atividades das citocinas) e as neurotrofinas (cuja importância relacionada ao sistema imune esta cada vez mais em evidência) (62-64).

### **1.5.1 Citocinas**

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular que ativam e modulam os leucócitos e diversas outras células durante uma resposta imune. Elas podem modular a expressão de moléculas de reconhecimento de patógenos pelos leucócitos, para a geração de uma resposta adequada (65). As quimiocinas atuam guiando o movimento leucocitário para sítios de inflamação ou infecção (66) bem como modulação das funções dos linfócitos T, portanto, são os principais reguladores do tráfego leucocitário.

A maioria dos estudos com a asma é realizado com pacientes adultos, mas acredita-se que, de modo geral, a patofisiologia da asma adulta seja similar à asma pediátrica, onde, assim como em outras diferentes patologias, a desregulação Th1/Th2 possui uma grande importância (67). No entanto, há diferenças da expressão de citocinas no decorrer do desenvolvimento humano, com uma tendência ao aumento de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 conforme a idade (68), o que evidencia a necessidade de mais estudos com asma pediátrica. A diferenciação de células Th1 e Th2 é determinada pela secreção de IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente (69). Diferentes células podem produzir citocinas Th1 e Th2 além das células T (66). Os eosinófilos são fatores chave na patogênese da asma secretando fatores inflamatórios, entre os quais se encontram TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (70).

Estudos em camundongos mostram resultados contraditórios com relação à atividade das citocinas Th1, onde podem tanto reduzir a inflamação alérgica das vias aéreas, como ter uma ação pró-inflamatória, de modo que pode-se dizer que os papéis do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  são complexos e dependem da localização das células e do estágio da doença (19). A TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória importante na imunidade inata e no processo inflamatório (71), com ação de recrutamento leucocitário através da estimulação



de moléculas de adesão no endotélio vascular, além da indução da secreção de citocinas e quimiocinas (72).

Dentro da asma pediátrica, as células T ativadas estão correlacionadas juntamente com eosinofilia e a severidade da doença (73). Citocinas geradas no útero regulam o desenvolvimento imunológico do feto, da mesma forma que o protegem de respostas imunes citotóxicas, de modo que altos níveis intrauterinos de citocinas Th2 poderiam induzir uma baixa resposta Th1 no feto, o que pode explicar porque a alergia na infância é mais relacionada à herança materna que à paterna (8). Assim sendo, uma resposta Th1/Th2 desbalanceada na infância pode alterar todo o desenvolvimento imune do indivíduo, onde uma baixa expressão de citocinas Th1 perdura acarretando um quadro de atopia, ou até asma severa (74).

Dentro da questão da exposição aos alérgenos e o desenvolvimento da atopia, encontramos uma teoria que tem recebido muita atenção, conhecida como a “hipótese da higiene”. Esta teoria se baseia no fato de que a polarização Th2 sofre forte influência de fatores ambientais, principalmente a incidência de infecções na infância. Conseqüentemente, com base nessa teoria, infecções no começo da vida preveniriam o desenvolvimento da atopia através da regulação da resposta Th1 e repressão da Th2, já que um quadro infeccioso estimula a expressão de células Th1, que por sua vez reprimem a expressão de Th2 (70, 75). Portanto, infecções bacterianas, e algumas virais, na infância são fatores que influenciam na patogênese da asma protegendo contra o desenvolvimento da mesma, uma vez que esses estímulos agiriam, de fato, na maturação do sistema imune proporcionando um sinal inicial para direcionar o sistema imune pós-natal a uma imunidade equilibrada (76-78). No entanto, algumas infecções virais têm a capacidade de influenciar no desenvolvimento da asma, como o vírus respiratório sincicial (RSV), que aparenta ser não apenas um fator de risco à asma (77), como também um possível fator de indução à resistência a glicocorticóide, juntamente com outras infecções virais devido à capacidade viral de ativar fatores de transcrição que poderiam alterar a ação dos GCs (79).

O perfil de secreção de citocinas nas mais diversas doenças alérgicas e inflamatórias vem sendo estudado, principalmente em relação ao balanço Th1/Th2 (67, 80-87). Sabe-se que uma deficiência em citocinas como IL-4 e IL-13 acarreta falhas na resposta Th2, mas favorece a resposta Th1 (66). A IL-4 está bem envolvida na patogênese das respostas inflamatórias alérgicas e mais especificamente na estimulação da produção de células produtoras de muco e fibroblastos, além de também ter ação na síntese de IgE. Já a IL-13 também é muito comum nas vias aéreas de pacientes asmáticos tendo uma ação muito semelhante à IL-4, mas aparentemente enquanto a IL-4 estaria mais atuante na primeira exposição a um antígeno, a IL-13 atuaria mais a partir da segunda exposição (71). Essa atuação semelhante de IL-4 e IL-13 poderia estar relacionada também à ação indutora da produção de quimiocinas para o recrutamento eosinofílico (88). A IL-13 ainda atua na redução da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e CCL5 (RANTES) (71).

### **1.5.2 TNF e seus receptores solúveis**

A citocina TNF- $\alpha$  atua ativando e auxiliando diversos tipos celulares no processo inflamatório, sendo uma molécula de elevada importância na patogênese da asma (89, 90). Esta citocina é capaz de amplificar a resposta inflamatória através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (62), tendo uma ação complexa e dependendo da localização das células analisadas e do estágio da doença podem-se ver ações distintas (19). É uma citocina atuante na imunidade inata, no processo inflamatório e no recrutamento leucocitário (71, 72).

Existem dois tipos de receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (sTNFR1 e 2) que podem ser detectados no plasma do indivíduo e inclusive na urina (91-93). Esses receptores limitam a inflamação através da diminuição da concentração da citocina nos tecidos (92, 94). Os receptores solúveis de citocinas derivam de clivagens enzimáticas do domínio extracelular

dos receptores de citocinas, contribuindo para a regulação da atividade das citocinas pela modulação da capacidade delas de ligar aos receptores de membrana e gerar o seu respectivo efeito (63, 95).

Assim como os receptores solúveis podem ser vistos como marcadores inflamatórios para o acompanhamento de diferentes patologias, eles também podem estar relacionados ao tratamento das mesmas, uma vez que altas concentrações de sTNFR podem reduzir os efeitos da TNF em pacientes que sofrem diversas patologias relacionadas ao processo inflamatório além da asma (96, 97), como a insuficiência cardíaca (98), choque séptico (99) e artrite reumatóide (100).

Embora em algumas patologias, como a artrite reumatóide, o tratamento já seja efetivo, não existem estudos demonstrando a expressão dos sTNFR 1 e 2 com relação à gravidade clínica e ao tratamento da asma pediátrica, o que indica a necessidade de mais estudos envolvendo esses receptores solúveis e a asma.

### **1.5.3 Quimiocinas**

As quimiocinas atuam diretamente no extravasamento e na migração leucocitária, sendo que diferentes tipos de células possuem seus receptores específicos (101), além de serem potentes ativadores celulares (102). Vários estudos vêm documentando os papéis dos receptores de quimiocinas, principalmente das famílias CC e CXC, nas doenças alérgicas, já que eles não são específicos a apenas um tipo de quimiocina, e nem as quimiocinas são específicas a um único receptor (103).

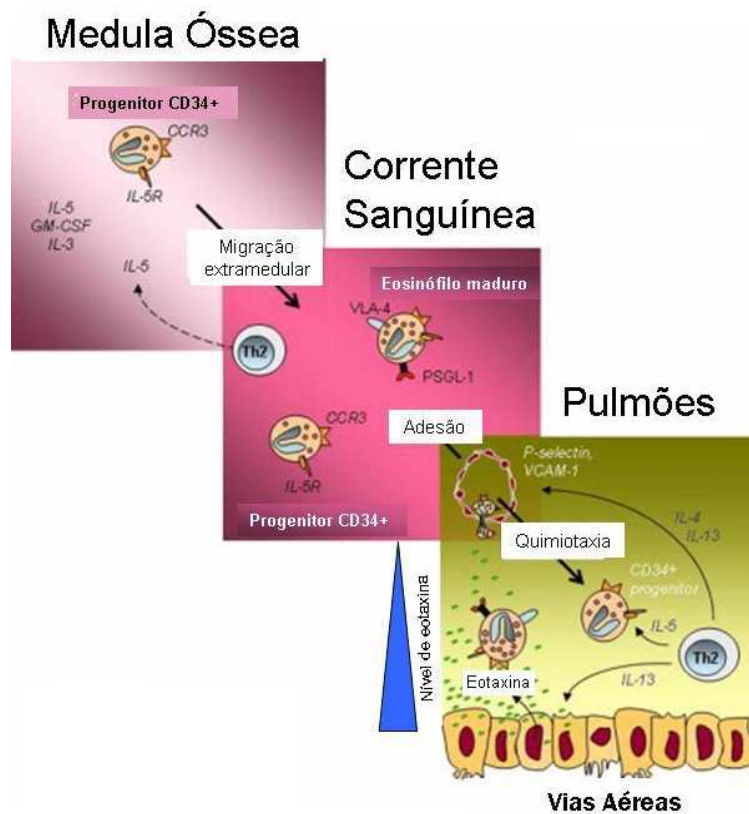
Os principais subtipos de célula T-helper (Th1 and Th2) expressam diferentes receptores de quimiocinas que podem estar relacionados com a polarização T-helper (104). As quimiocinas CXCL9 (MIG) e CCL24 (eotaxina-2) foram associadas com a polarização Th1/Th2, respectivamente (105-107) e podem ter grande importância na asma. Outras

quimiocinas como a CCL11 (eotaxina) e a CCL5 também estão envolvidas com a polarização T-helper, no entanto atuam em ambos perfis de célula T, além de ter importante papel no tráfego eosinofílico na asma pediátrica (107).

Uma das primeiras quimiocinas que teve a sua associação com a asma estudada foi a eotaxina, onde foi percebido um aumento de sua expressão na asma atópica (108). Ela induz a degranulação eosinofílica e causa a degranulação basofílica independente de IgE (102). A eotaxina atua nos eosinófilos e possui três variantes, a CCL11, CCL24 (eotaxina-2) e a CCL26 (eotaxina-3), embora sejam estruturalmente diferentes, elas atuam especificamente como quimioatraentes eosinofílicas, atuando concomitantemente com a IL-5 (103).

A quimiocina CCL5 foi a primeira quimiocina identificada com ação atrativa de eosinófilos (103), sendo a maior quimiocina com ação eosinofílica no lavado broncoalveolar (BAL) em asmáticos expostos ao alérgeno (109). Foi visto também um aumento da expressão do mRNA de CCL5 em biópsias brônquicas tanto em asmáticos com atopia, como em não-atópicos (110). Juntamente com a CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) e a CCL2 (MCP-1), após a sensibilização com alérgeno, a CCL5 se mantém elevada por quatro horas no BALF (fluido bronco-alveolar), retornando aos valores basais em 24 horas (111). Não foi encontrada diferença significativa na produção da CCL5 em indivíduos com asma severa e leve, mesmo com a estimulação *in vitro* com LPS, e a inibição com dexametazona (61).

As eotaxinas são quimiocinas específicas de eosinófilos que promovem o seu recrutamento para os tecidos através do receptor CCR3 (principal receptor expresso nos eosinófilos), assim os eosinófilos transitam para os tecidos, e interagem com o endotélio vascular pela ação das integrinas, selectinas e outros ligantes (ver Figura 3) (88).



**Figura 3.** Tráfego eosinofílico e a diferenciação e maturação do progenitor eosinofílico (CD34+IL-5R) na resposta a citocinas. Chegando à corrente sanguínea, há a resposta aos sinais quimiostáticos para a reação alérgica nas células epiteliais respiratórias, de modo que os eosinófilos saem da corrente sanguínea em resposta a interações mediadas pelas selectinas das superfícies celulares, integrinas, e sinais quimiostáticos, entrando no tecido pulmonar e vias aéreas. Adaptado de (88).

As quimiocinas de monócitos, conhecidas como MCPs se dividem em: CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4) e CCL12 (MCP-5), tendo grande importância na inflamação alérgica (103). As MCPs tem a propriedade de induzir a migração de monócitos, mas também atuam em relação aos eosinófilos e basófilos (103).

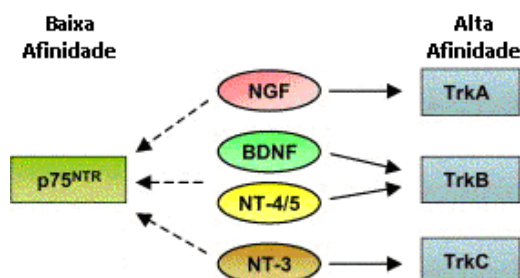
Dentro de um modelo de asma alérgica, juntamente com as citocinas Th2, os homólogos murinos de IL-8 (KC e MIP-2) modulam a resposta inflamatória nos pulmões e a produção de IgE atuando no desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas (112). Dessa forma, a IL-8 parece ter importância na patofisiologia da asma, como visto que *in*

*vitro*, pacientes com asma severa produzem mais IL-8 que pacientes com asma leve em resposta à dexametasona (61).

Portanto, há um padrão básico de secreção de citocinas e quimiocinas em asmáticos, no entanto, faltam dados que esclareçam as diferenças entre a asma leve e severa em crianças.

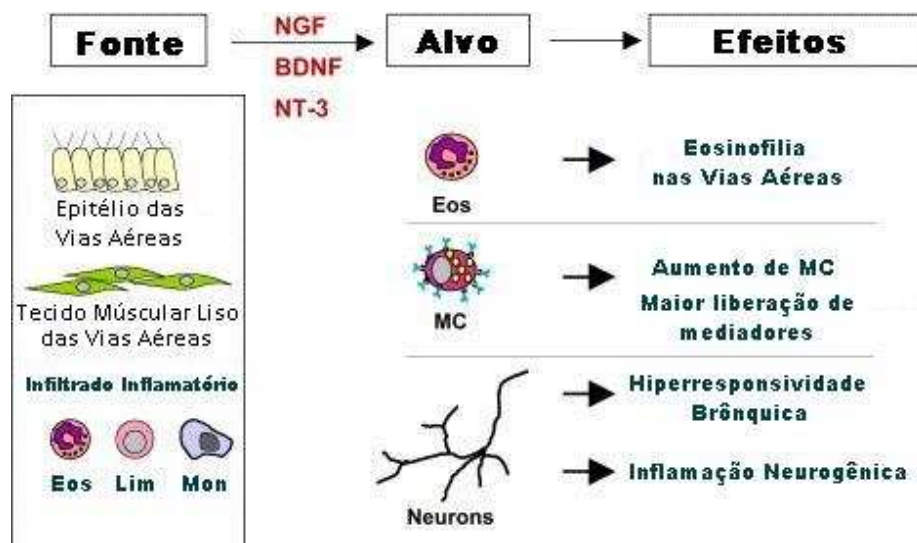
#### 1.5.4 Neurotrofinas

As neurotrofinas (também conhecidas como fatores neurotróficos) são peptídeos que de forma inicial, foram identificados como fatores de crescimento essenciais para a diferenciação, sobrevivência e plasticidade neuronal (113), regulando o desenvolvimento dos neurônios tanto na fase embrionária como após o nascimento, prosseguindo o trabalho de manutenção neuronal no decorrer de toda a vida do indivíduo (64). São crescentes as evidências de que essa classe de moléculas de sinalização celular multifuncional exerce seus efeitos em diversos tipos de tecidos, embora tenham sido descritas originalmente como fatores de sinalização restritos ao sistema nervoso (64). Todas as neurotrofinas possuem um grupo específico de receptores de alta afinidade na superfície celular: *tropomyosin-related tyrosine kinase receptors* (Trk), e um receptor de baixa afinidade: p75<sup>NTR</sup> (membro da superfamília TNF receptor/Faz/CD40) (113, 114) (ver Figura 4).



**Figura 4.** Interações de neurotrofinas e seus receptores. Adaptado de (114). NGF (Nerve Growth Factor). BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor). NT-3 (Neurotrophin-3). NT-4/5 (neurotrophin-4/5). TrkA (*Tropomyocin Receptor Kinase A*). TrkB (Tropomyosin Receptor Kinase B). TrkC (Tropomyocin Receptor Kinase C). P75<sup>NTR</sup> (p75 Neurotrophin Receptor).

A primeira referência indicando que as neurotrofinas poderiam ter algum envolvimento em doenças alérgicas surgiu ao acaso. Num estudo de mensuração dos níveis de NGF no soro de soldados após saltos de paraquedas, foi verificado que um dos soldados estudados, que teve uma forte reação alérgica um dia antes dos saltos, apresentava níveis muito elevados de NGF (22, 115). Estudos seguintes revelaram que não apenas a NGF, mas também a BDNF tinha importância na asma (22). Não está completamente definido quais mecanismos realizam o cruzamento entre o sistema imune e o sistema nervoso periférico na patologia da asma, mas existem fortes indícios de que as neurotrofinas têm um importante papel na regulação desse processo (64). As neurotrofinas estão naturalmente presentes tanto no epitélio das vias aéreas, como também nos macrófagos alveolares e intersticiais (114). Diferentes células do sistema imune estão aptas a produzir neurotrofinas (116). A Figura 5 representa as possíveis fontes de neurotrofinas no trato respiratório inferior, seus alvos, além de possíveis efeitos.



**Figura 5.** Produção e efeitos das neurotrofinas durante o processo inflamatório nas vias aéreas. Adaptado de (114). NGF (Nerve Growth Factor). BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor). NT-3 (Neurotrophin-3). Eos (Eosinófilo). MC (Mastócito). Neurons (Neurônios). Lim (Linfócitos). Mon (Monócitos).

Esses fatores neurotróficos podem influenciar a inflamação alérgica de diferentes formas, como pelo recrutamento local de células efetoras (como eosinófilos e mastócitos), ativação e manutenção dessas células no tecido das vias aéreas, direcionamento da resposta imune para um perfil Th2, embora não haja evidência de que as neurotrofinas interfiram diretamente na polarização Th1/Th2 (114). Ou então, podem influenciar através da inflamação neurogênica que ocorre durante a inflamação alérgica, quando os nervos sensoriais das vias aéreas amplificam a resposta imune através da liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores gerando um ciclo vicioso de interações que amplificam a hiperresponsividade na asma alérgica (114).

Então, existem evidências de que mecanismos neuronais interferem na hiperresponsividade nas vias aéreas, e considerando os efeitos das neurotrofinas no sistema nervoso, isso apenas aumenta a importância do seu estudo dentro da imunologia.

#### *1.5.4.1 Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)*

O BDNF foi sugerido anteriormente como sendo um mediador da patogênese da hiperresponsividade das vias aéreas, e conseqüentemente da limitação do fluxo aéreo, tendo seus níveis registrados como elevados nos pacientes asmáticos utilizando diferentes fontes como o lavado broncoalveolar, o soro e o plasma (117-119). No estudo de Noga et al., foi observado que a influência do tratamento profilático para asma com glicocorticóides por via inalatória era capaz de reduzir significativamente os níveis de BDNF (120).



Os monócitos têm alta importância no processo inflamatório e alérgico e também são capazes de produzir, armazenar e liberar neurotrofinas, incluindo o BDNF, e parecem ser responsáveis pelos altos níveis de BDNF encontrados em BALF (fluido do lavado broncoalveolar) e plasma de indivíduos asmáticos (121). A BDNF é expressa naturalmente pelos macrófagos intersticiais, no entanto a célula precisa ser ativada para que os macrófagos alveolares expressem BDNF (22). Outros tipos celulares também são capazes de secretar BDNF, como as células B (122), os eosinófilos (22) e células T (123).

## 2 HIPÓTESE

Os níveis dos marcadores inflamatórios (quimiocinas, BDNF e receptores solúveis de TNF) estarão mais elevados na asma severa e relacionados com uma menor sensibilidade aos GCs.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 GERAL

Avaliar a resposta imune celular e sensibilidade aos GCs em pacientes pediátricos com asma grave quando comparados aos pacientes com asma leve e controles saudáveis.

### 3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a proliferação de células T.
- Investigar a sensibilidade das células T aos GCs.
- Mensurar as quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL22, CCL24, CXCL9, CXCL10 e IL-8), receptores solúveis de TNF (1 e 2) e BDNF séricos.
- Observar a relação da severidade da doença com o perfil de secreção de quimiocinas e a sensibilidade das células T aos GCs.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Absence of peripheral glucocorticoid resistance in children with severe persistent asthma**

Guilherme C. Müller<sup>1</sup>, Paulo M. Pitrez<sup>2</sup>, Rejane F. Matias<sup>2</sup>, Bruna L. Correa<sup>1</sup>, Micheli M. Pillat<sup>1</sup>,  
Priscila Souza<sup>2</sup>, Antônio L. Teixeira<sup>3</sup>, Marcus H. Jones<sup>2</sup>, Renato T. Stein<sup>2</sup>  
and Moisés E. Bauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Immunology and <sup>2</sup>Laboratory of Pediatric Pulmonology, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

**Corresponding author:** Dr. Moisés E. Bauer, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Av. Ipiranga 6690, 2º andar. P.O. Box 1429. Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil. Tel.: +55 51 3320-3000 / x2725; Fax: +55 51 3320-3312. E-mail: [mebauer@pucrs.br](mailto:mebauer@pucrs.br)

**Financial support:** This research was funded by independent CNPq awards to MEB, PMP, ALT, MHJ, RTS and by CAPES studentships to GCM and to MMP.

**Running Head:** Glucocorticoid sensitivity in childhood asthma

Pediatric Lung Disease – 101

Word Count = 2613

#### **At a glance commentary**

*Scientific knowledge on the subject:* adult asthma has been associated with steroid resistance at the level of the lymphocyte. This condition has not been studied in children with asthma and its relationship with inflammatory markers is unknown at this age. This latter issue is important since cytokines have been proposed as potential regulators of steroid resistance, particularly in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

*What this study adds to the field:* Peripheral lymphocytes of children with severe asthma were not found to be resistant to steroids. Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) has shown to be a potential marker of disease severity in childhood asthma. Our findings suggest that the prevalent resistance to corticosteroids in adults with severe asthma might be an acquired process.

## 4.1 ABSTRACT

**Rationale:** Asthma is a chronic inflammatory disease and glucocorticoids (GCs) are currently recognized as a mainstay of its therapy. Although steroid resistance has been demonstrated in adult asthma, this observation has not been studied in asthmatic children, and its relationship with inflammatory markers is largely unknown. **Objectives:** To analyze peripheral blood mononuclear cell (PBMC) sensitivity to GCs and the levels of inflammatory markers from plasma of children with severe asthma, comparing with subjects with less severe asthma and healthy controls. **Methods:** patients with persistent asthma (n=57) were divided into three groups (severe, moderate and mild), and compared with healthy children (n=18). Lung function tests and skin-prick tests were performed in all studied asthmatic children. PBMCs were isolated and cultured *in vitro* to assess mitogen-induced proliferation as well as cellular sensitivity to dexamethasone. Plasma chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL22, CCL24, CXCL9, CXCL10 and IL-8), soluble TNF receptors and brain derived neurotrophic factor (BDNF) were assessed by ELISAs. **Main Results:** Patients with mild asthma showed significantly less proliferation of stimulated T-cells and a relative insensitivity to dexamethasone. Severe asthmatic children had similar sensitivity to GCs when compared to healthy children. Subjects with moderate and severe asthma presented with higher BDNF levels ( $p < 0.01$ ). **Conclusions:** Children with severe asthma are not resistant to GCs from an *in vitro* analysis. Plasma BDNF is a potential marker of disease severity in childhood asthma. Our findings suggest that the resistance to GCs in adults with severe asthma might be an acquired process.

246 words in the abstract

**Key words:** corticosteroids, severe asthma, inflammatory cytokines, proliferation, BDNF

## 4.2 INTRODUCTION

Asthma is a disease characterized by bronchial inflammation, hyper-responsiveness and variable limitation of airflow (1). This highly complex disease that may begin in early life, with 70% of cases starting before 6 years of age, has reached epidemic proportions, and it is a leading chronic condition in childhood and adolescence (2-4).

Glucocorticoids are widely used as effective agents in the treatment of asthma because of their anti-inflammatory action including modulation of cytokines and suppression of chemokines and cell-adhesion molecules (5). Glucocorticoid (GC) immune-modulation is orchestrated by the specific binding of GCs on membrane or cytoplasmic glucocorticoid receptors (GR). Although GCs are the first line of treatment for patients with asthma (6, 7), clinical and *in vitro* lymphocyte resistance have been reported in a subset of adolescents and adult patients with severe asthma (8-11). It remains to be established whether steroid resistance in severe asthmatics is acquired or innate.

Cellular sensitivity to steroids is influenced by several factors, including cytokines (12). For instance, IL-2, IL-4 and IL-13, found in bronchic biopsies of patients with asthma, are capable to reduce the GR affinity to GCs in inflammatory cells (5). Chemokines are cytokines related to the inflammatory process in asthma, playing a pivotal role on Th1-Th2 polarization (13-15) and redirecting leukocytes into inflamed areas, such as the pulmonary tissue (15, 16). Although cytokine profiles are associated with the inflammatory process and steroid resistance, most of these data come from studies in adults and little is known in pediatric asthma.

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin with roles in neuronal plasticity. BDNF has been described to modulate airway hyper-responsiveness and inflammation and was involved in late allergic reaction in asthma (17) and higher levels of circulating BDNF were present in adult asthma (18, 19). BDNF actions are due to the binding on two receptors (trkB and p75) expressed in lymphoid cells as well as cells of the respiratory tract. Previous studies have assessed this neurotrophin in animal models and in adult asthmatics, but its role in asthmatic children is largely unknown (18, 20).

This is the first report to evaluate cellular GC sensitivity and expression of inflammatory markers in children with persistent asthma. The aim of the present study is to analyze PBMC sensitivity to GCs as well as the association with inflammatory markers in children with severe asthma.

## **4.3 METHODS**

### **4.3.1 Subjects**

Fifty seven children between 6 and 15 years of age (mean age of 10.14 years), diagnosed by a physician with mild (n=19), moderate (n=24) and severe persistent asthma (n=14) by clinical evaluation were recruited according to guidelines based on ATS criteria (21). Patients were recruited from the Pediatric Pulmonology outpatient clinics from Hospital São Lucas of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), from July 2007 to July 2008. Excluding criteria were other cardiopulmonary or neurological diseases, acute infections and immunodeficiencies. Patients presenting with acute asthma at the time of recruitment or on the previous 3 weeks were also excluded. The use of inhaled GC was not

an exclusion criterion. Eighteen age- and sex-matched healthy controls (age  $9.28 \pm 0.63$  years) were also recruited. All controls were free of acute infections for 4 weeks previous to their inclusion in the study. Blood cell counts and total IgE levels in plasma were performed in all subjects. Lung function testing was performed only in patients with asthma. This study was approved by the Ethics Committee of PUCRS. Written informed consent was obtained from all the parents.

#### **4.3.2 Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells**

Ten milliliters of peripheral blood was collected by venopuncture in the morning. Samples were always collected at the same time of the day to minimize circadian variations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient (Ficoll-Hypaque, Sigma) centrifugation for 30 min at 900 g. Cells were counted by means of microscopy (100X) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude trypan blue (Sigma, USA).

#### **4.3.3 Lymphocyte proliferation/viability and steroid sensitivity assays**

Mitogen-induced T-cell proliferation was evaluated as an index of cell-mediated immunity. T-cell proliferation was evaluated by incubating PBMCs ( $1.5 \times 10^5$  cells / well) with phytohemagglutinin (PHA 2, 1 and 0.5%, Gibco, USA) in complete culture medium (RPMI-1640 supplemented with gentamicin 0.5%, glutamine 1%, hepes 1%, and fetal calf serum 10%; all from Sigma, USA) for 96 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Peripheral sensitivity to GCs was estimated by functional assays developed to measure the ability of steroids to suppress T-cell proliferation in vitro. DEX (selective glucocorticoid receptor agonist, Sigma, USA) was added in duplicates (50 µL/well) to mitogen-stimulated lymphocyte cultures (PHA %). Data are presented as percentage of basal proliferation (stimulated without steroids).

The proliferative responses were determined by a modified colorimetric assay as previously described (22). The optical density (OD) was determined using Biorad ELISA plate reader at a wavelength of 570 and 630 nm. Proliferation/viability was expressed as OD of stimulated – OD of nonstimulated cultures.

#### **4.3.4 Plasma cytokines and BDNF**

Plasma samples were stored at -50°C prior to analysis. For analysis, samples were thawed, and excess proteins removed by acid/salt precipitation, as routinely performed in our laboratory. Briefly, an equal volume of serum and 1.2% trifluoroacetic acid/1.35M NaCl were mixed and left at room temperature for 10 minutes. The samples were then centrifuged for 5 minutes at 10,000 rpm, and supernatants adjusted for salt content (0.14 M sodium chloride and 0.01 M sodium phosphate) and pH (7.4) for the determination of chemokine concentrations. Chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL22, CCL24, CXCL9, CXCL10 and CXCL8), soluble TNF receptors (1 and 2) and BDNF were measured according to the procedures supplied by the manufacturer and employed sandwich ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN and Pharmingen, San Diego, CA, USA). The absorbance was read on a plate reader at 492 nm wavelength (Emax, Molecular Devices, Minneapolis, MN, USA). All samples were assayed on duplicates and on the same plate. The detection limits for these assays were 5 pg/mL.

#### **4.3.5 Statistical analysis**

The proportion differences between groups were analyzed by chi-square tests. Analysis of variance (ANOVA) was performed to determine differences of inflammatory markers between the groups studied. Proliferation/sensitivity data was analyzed by repeated measures ANOVA that included one between-subjects variable (patients and



controls) and one within-subjects variable (mitogen or DEX concentrations). Multiple comparisons among levels were analyzed by Tukey *post hoc* test. Spearman's rank correlation coefficient was used to investigate any relationship between cell proliferation, clinical data and chemokine concentrations. Data are expressed as mean  $\pm$  SE in all figures and tables. All significance levels were two-tailed. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences, SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **4.4 RESULTS**

### **4.4.1 Subject characteristics**

Seventy-five subjects were recruited for the study. The comparison of the baseline data of patients with mild, moderate and severe asthma is presented in Table 1. Patients with mild asthma had higher serum IgE levels when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). All patients had similar lung function as assessed by FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC. Bronchodilator response was not observed in only 3 subjects with asthma (one moderate and two severe).

### **4.4.2 Lymphocyte proliferation and sensitivity to glucocorticoids**

We evaluated the lymphocyte proliferation/viability as an index of the cell-mediated immunity. Subjects with asthma showed a lower stimulated T-cell proliferation/viability (29% reduction,  $p < 0.05$ ) when compared to the controls (Figure 1). When severity of asthma was analyzed, patients with moderate asthma had lower stimulated proliferation/viability than the control group (40.75% reduction,  $p < 0.05$ ). There were no age-related differences in T-cell proliferation.

Peripheral sensitivity to glucocorticoids was estimated by functional assays developed to measure the ability of DEX to suppress T-cell proliferation *in vitro*. Patients with asthma had a similar sensitivity to glucocorticoids when compared to healthy children. However, we observed a lower cellular sensitivity to DEX in mild asthma when compared to patients with severe asthma ( $p<0.05$ ) (Figure 2). Interestingly, patients with severe asthma presented similar sensitivity to DEX, when compared to the control group.

#### **4.4.3 Peripheral inflammatory markers**

Inflammatory markers were measured in plasma to address their relationships with sensitivity to GC and disease severity. CCL5 (RANTES) was significantly lower in patients with asthma than controls ( $p<0.05$ ) and CCL2 (MCP-1) levels were increased in the group with mild asthma when compared to controls ( $p<0.01$ ) (Table 2). We also studied cytokine receptors contribute to the regulation of cytokine activity by modulating the availability of cytokines in peripheral tissues (23). However, the remaining chemokines and soluble TNF receptors (type 1 and 2) levels did not differ between the studied groups. There was no correlation between the production of chemokines and the soluble TNF receptors measured from PBMCs and *in vitro* GC sensitivity in the subjects studied.

Interestingly, BDNF was found to be a significant marker for disease severity in the present study (Figure 3). BDNF levels from moderate and severe asthmatic patients were significantly higher than mild asthma and control group ( $p<0.001$ ). BDNF levels were negatively correlated with the AUC sensitivity to DEX ( $r=-0.40$ ;  $p<0.05$ ) only in patients with asthma. The remaining inflammatory markers or clinical data were not associated with BDNF.

## 4.5 DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to assess lymphocyte sensitivity to corticosteroids and its relation to a large panel of inflammatory markers in children with persistent asthma. The key main findings of this study are the absence of resistance in severe asthmatic pediatric patients and the indication of BDNF as a marker of disease severity.

In this study, we observed that patients with moderate asthma had reduced T-cell proliferation/viability as compared to controls. This finding could be explained by the use of continuous prophylactic treatment in children with asthma and the potential GC-related immunological effects (24). Children with more severe asthma are expected to be more adherent to treatment than patients with milder disease. Although patients were enrolled in standard treatment with inhaled steroids, and minimal systemic effects are thus expected, recent evidence suggest that peripheral immunological effects can be observed following this therapy. It has been shown that treatment with inhaled GCs can promote differentiation of T regulatory (Treg) cells, with increasing FoxP3 expression in PBMCs of moderate and severe patients with asthma (25). Similar data was reported linking increased level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> to moderate and severe pediatric asthma (26). Future studies should address the role of Treg cells in the pathogenesis of asthma as well as intervenient effects of GC treatment upon these cells.

We have also observed that lymphocytes from pediatric patients with asthma responded differently to GCs *in vitro*. Of particular note, the mild asthmatic patients were less sensitive to GCs than moderate or severe patients. These data are in contrast with previous findings associating GC resistance with severe asthma in adults (11). Discrepancy in

peripheral response to steroids could be associated with differences in pharmacological treatment, taking into consideration the synergistic effects of GCs and  $\beta$ 2-agonists. The GCs are well known to increase the cellular sensitivity to  $\beta$ -agonists. However, recent studies have shown that  $\beta$ 2-agonists are also capable to increase GC-related immunosuppression (27, 28), increasing the GC activity in PBMCs. This may explain why moderate and severe children with asthma show increased sensitivity to GC in our study. Finally, GC sensitivity may vary among different cellular subsets (11, 29) and discrepancies could be expected from studies that assessed this response in different cell populations.

In the authors' opinion, the most important and original finding in the present study is that children with severe asthma did not show *in vitro* insensitivity to GC. A number of previous studies in adults with severe asthma have demonstrated that GC insensitivity was present in a large subset of subjects. In adults with difficult-to-control asthma, nearly 25% of patients were clinically GC-resistant (10). Moreover, in patients with asthma, defined as insensitive to GC, mononuclear cells from peripheral blood were less suppressible to steroids (8, 9). Recently, Hew et al. have also shown that adults with severe asthma have reduced GC sensitivity when compared with subjects with milder disease (11). Our data suggest that GC resistance in asthma is an acquired process, either related to aging or cytokine-induced. It is known that aging is associated with significant changes in peripheral sensitivity to GCs. Indeed, children at the first week of age are highly sensitive to GCs and this sensitivity is gradually decreased reaching adult levels at one year (30). We have previously shown that PBMCs from healthy elders have a reduced sensitivity to GCs when compared to younger subjects (31). These data highlight the importance of our results because the subjects enrolled in this study are in a period of life with less variation in GC sensitivity. Regarding the

cytokine-induced hypothesis, type I GC-resistant asthma (cytokine-induced or acquired) is a complex condition and is poorly understood. This acquired resistance may account for greater than 95% of GC-resistant asthma in adults (32). Our findings support the hypothesis of an acquired GC resistance, showing that children and adolescents with severe asthma are sensitive to GC from PBMC analysis.

We also investigated whether plasma chemokines and soluble TNF receptors were related to cellular sensitivity to GCs and disease severity in pediatric asthma. We did not find any correlation between chemokines and GC sensitivity. However, plasma BDNF was found to be significantly elevated in asthmatic children and negatively correlated to sensitivity to corticosteroids. These data are in agreement with previous studies reporting increased plasma BDNF levels in adult patients (18). Interestingly, when chemokines were controlled by prophylactic treatment, the BDNF was still higher in patients with moderate or severe asthma (33, 34). Recent findings show that GCs may activate neurotrophin receptors and potentially increase BDNF secretion (35). The BDNF has been implicated in the pathogenesis of adult asthma, modulating airway hyper-responsiveness and inflammation as well as being involved with the late allergic reaction in asthma (36). Overall, we and others provide evidence that BDNF could be used as a marker of disease severity in children and adults with asthma.

One limitation of our study was that the inflammatory markers and T-cell sensitivity to steroids analyzed from peripheral blood might not particularly reflect the immune response found in pulmonary tissue. One recent study reported a relative GC resistance of alveolar macrophages in severe adult asthma (29), in accordance with previous findings of GC resistance from PBMC (11). Another study reported similar chemokine levels detected

between sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation (37). On the other hand, we have previously demonstrated that, in infants with viral acute bronchiolitis, the production of cytokines was not significantly correlated between PBMC and upper airway secretions (38). However, the analysis of *in vitro* GC sensitivity and inflammatory markers collected from peripheral blood samples used in our study have been applied by others to assess sensitivity to GCs in asthma (8, 9, 11), showing that this is one of the best methods currently available to address cellular immune response in inflammatory diseases.

In conclusion, our results are of clinical significance suggesting that GC resistance is an acquired process in atopic asthma, probably caused by continuous tissue inflammation and/or GC treatment. Further studies are also needed to clarify the role of neurotrophins in the pathophysiology of persistent asthma and in order to determine whether it might be a potential marker of disease severity in childhood asthma.

## 4.6 REFERENCES

1. Stankovic I, Pejicic T, Milenkovic B, Jovanovic D, Rancic M. Is there any point in a corticosteroid treatment of intermittent asthma? *Scientific World Journal* 2007;7:1082-1089.
2. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 6. Asthma: Factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S456-461.
3. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2003;111:291-297.
4. Kintner EK. Lack of relationship between acceptance and knowledge of asthma in school-age children and early adolescents. *J Spec Pediatr Nurs* 2004;9:5-14.
5. Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 2006;27:413-426.
6. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23-43.
7. Barnes PJ. Corticosteroids: The drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 2006;533:2-14.
8. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood t lymphocyte activation and comparison of the t lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin a. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1026-1032.
9. Spahn JD, Landwehr LP, Nimmagadda S, Surs W, Leung DY, Szeffler SJ. Effects of glucocorticoids on lymphocyte activation in patients with steroid-sensitive and steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1073-1079.
10. Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD. Difficult-to-control asthma: Clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:594-601.
11. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:134-141.

12. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22; quiz 23.
13. Lai ST, Hung CH, Hua YM, Hsu SH, Jong YJ, Suen JL. T-helper 1-related chemokines in the exacerbation of childhood asthma. *Pediatr Int* 2008;50:99-102.
14. Leung TF, Wong GW, Ko FW, Lam CW, Fok TF. Increased macrophage-derived chemokine in exhaled breath condensate and plasma from children with asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34:786-791.
15. Rojas-Ramos E, Avalos AF, Perez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Teran LM. Role of the chemokines rantes, monocyte chemoattractant proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J* 2003;22:310-316.
16. D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1266-1275.
17. Rochlitz S, Nassenstein C, Braun A. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans* 2006;34:594-599.
18. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, Schulte-Herbruggen O, Gill H, Schuff-Werner P, Virchow JC. Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:115-120.
19. Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, Neuhaus-Steinmetz U, Fischer A, Schnoy N, Lewin GR, Renz H. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:537-546.
20. Kerzel S, Path G, Nockher WA, Quarcoo D, Raap U, Groneberg DA, Dinh QT, Fischer A, Braun A, Renz H. Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal



hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:170-178.

21. American Thoracic Society. Proceedings of the ats workshop on refractory asthma: Current understanding, recommendations, and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-2351.

22. Luz C, Collaziol D, Preissler T, da Cruz IM, Glock L, Bauer ME. Healthy aging is associated with unaltered production of immunoreactive growth hormone but impaired neuroimmunomodulation. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:90-99.

23. Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: Basic immunology and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999;36:165-224.

24. Chapman KR. The impact of budesonide and other inhaled corticosteroid therapies in the management of asthma in children and adults. *Clin Ther* 2003;25 Suppl C:C2-C14.

25. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, et al. Glucocorticoids upregulate foxp3 expression and regulatory t cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1425-1433.

26. Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. The levels of cd4+cd25+ regulatory t cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 2007;148:53-63.

27. Johnson M. Interactions between corticosteroids and beta2-agonists in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:200-206.

28. Usmani OS, Ito K, Maneechotesuwan K, Ito M, Johnson M, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:704-712.

29. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Torrego A, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* 2008;63:784-790.
30. Heijnen CJ, Kavelaars A. The importance of being receptive. *J Neuroimmunol* 1999;100:197-202.
31. Luz C, Collaziol D, Preissler T, da Cruz IM, Glock L, Bauer ME. Healthy aging is associated with unaltered production of immunoreactive growth hormone but impaired neuroimmunomodulation. *Neuroimmunomodulation* 2006;13:160-169.
32. Leung DY, Spahn JD, Szeffler SJ. Steroid-unresponsive asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2002;23:387-398.
33. Noga O, Hanf G, Schaper C, O'Connor A, Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1906-1912.
34. Noga O, Hanf G, Gorges D, Dinh QT, Groneberg DA, Suttorp N, Kunkel G. Regulation of ngf and bdnf by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Regul Pept* 2005;132:74-79.
35. Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV. Activation of trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4862-4867.
36. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins and asthma: Novel insight into neuroimmune interaction. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:67-71.
37. Daldegan MB, Teixeira MM, Talvani A. Concentration of ccl11, cxcl8 and tnf-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1359-1365.

38. Pitrez PM, Ponzi D, Machado DC, Bauer ME, Jones MH, Stein RT. Discrepancy between cytokine production from peripheral blood mononuclear cells and nasal secretions among infants with acute bronchiolitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;92:659-662.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Assessment of T-cell proliferation/viability. Lymphocyte proliferation/viability was estimated by colorimetric (MTT) assays. The optical density (OD) was determined at a wavelength of 570 and 630 nm. Proliferation/viability was expressed as OD of stimulated – OD of nonstimulated cultures. Statistical significant differences are indicated: \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  versus controls.

**Figure 2.** Cellular sensitivity to dexamethasone *in vitro*. The cellular sensitivity to glucocorticoids is presented as percentage of basal proliferation (0 = PHA 1% without steroids). Statistical significant differences are indicated: \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  versus patients with mild asthma.

**Figure 3.** Plasma BDNF in patients with asthma and healthy controls. BDNF = Brain-derived Neurotrophic Factor. Data presented as pg / mL. Statistical significant differences are indicated: \*\*  $p < 0.001$  and \*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Table 1***Characteristics of patients with asthma and healthy controls*

	Mild n=19	Moderate n=24	Severe n=14	Controls n=18
Gender (F/M)	8/11	8/16	8/6	13/5
Age, years	10.14 ± 0.44	9.875 ± 0.48	10.79 ± 0.59	9.28 ± 0.63
BMI	18.37 ± 0.76	19.28 ± 0.79	21.48 ± 1.08	-
Prophylactic treatment (%)	12 (63)	24 (100)	14 (100)	-
FEV <sub>1</sub> , L	1.90 ± 0.11	2.01 ± 0.09	1.99 ± 0.16	-
FEV <sub>1</sub> % predicted	98.93 ± 3.10	104.48 ± 2.69	93.23 ± 5.13	-
FEV <sub>1</sub> /FVC	0.83 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.82 ± 0.03	-
Blood leucocytes (mm <sup>3</sup> )	7677.78 ± 423.07	8261.29 ± 558.51	7826.49 ± 1196.91	7222.22 ± 462.42
Blood eosinophils, %	5.76 ± 1.11	7.80 ± 0.96	6.38 ± 1.49	3.83 ± 0.69
Blood lymphocytes, %	31.54 ± 4.44	32.13 ± 2.46	31.00 ± 4.77	43.83 ± 1.82
Serum IgE, IU/mL	1100.19 ± 197.57*	700.13 ± 138.33	798.22 ± 157.04	138.45 ± 53.02

BMI = body mass index. FEV = forced expiratory volume in 1 second. The quantitative variables are expressed as mean ± SD. Statistical significant differences are indicated:

\* Significantly different from controls (p < 0.05).

**Table 2***Plasma chemokines and soluble TNF receptors in patients with asthma and controls*

	Mild	Moderate	Severe	Controls
CCL2	1287.50 ± 253.63 **	873.1 ± 174.10	637.22 ± 154.49	336.46 ± 77.11
CCL3	260.86 ± 114.12	157.42 ± 17.69	147.7 ± 23.58	236.77 ± 50.68
CCL5	10686.42 ± 184.9 **	10641.52 ± 179.17 **	10871.71 ± 201.12 *	11673.32 ± 179.99
CCL11	358.58 ± 30.41	413.4 ± 52.4	341.32 ± 26.69	418.87 ± 48.36
CCL24	965.68 ± 104.81	872.5 ± 71.92	817.31 ± 140.88	1267.11 ± 172.96
CXCL9	196.47 ± 72.98	320.25 ± 112.91	515.65 ± 515.65	556.11 ± 448.18
CXCL10	20.34 ± 14.03	4.68 ± 3.24	5.44 ± 5.44	7.54 ± 4.99
CXCL8	34.1 ± 26.23	30.33 ± 18.03	0 ± 0	18.54 ± 18.54
sTNF-R1	496.48 ± 37.62	496.69 ± 70.2	454.316 ± 31.1	567.19 ± 66.24
sTNF-R2	1725.35 ± 53.75	1734.85 ± 104.63	1825.57 ± 77.09	1697.42 ± 57.59

CCL2 = MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). CCL3 = MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein). CCL5 = RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted). CCL11 = eotaxin. CCL24 = eotaxin-2. CXCL8 = IL-8. CXCL9 = MIG (Monokine Induced by Interferon  $\gamma$ ). CXCL10 = IP10 (Interferon-inducible Protein-10). sTNFR = soluble tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor. Data presented as pg / mL. Statistical significant differences are indicated: \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01 vs. controls.

Figure 1

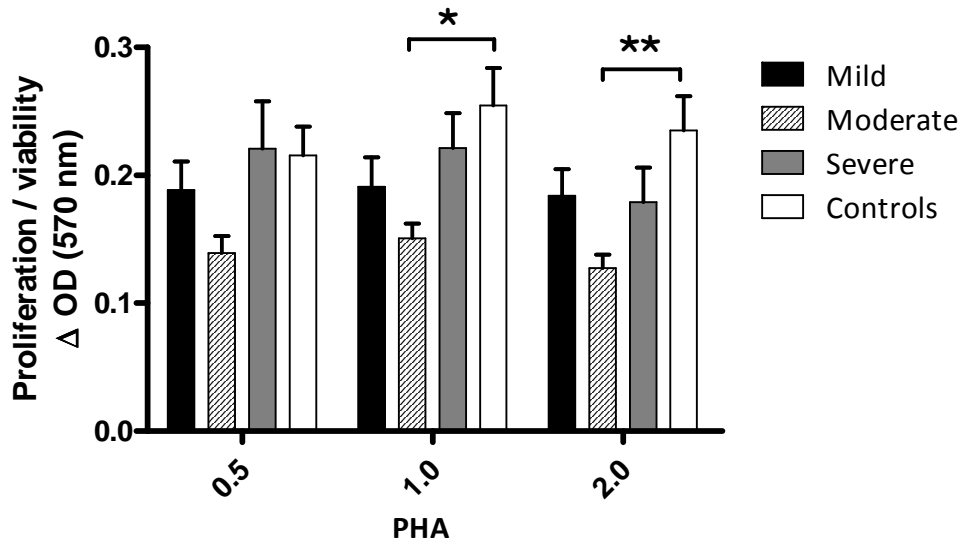


Figure 2

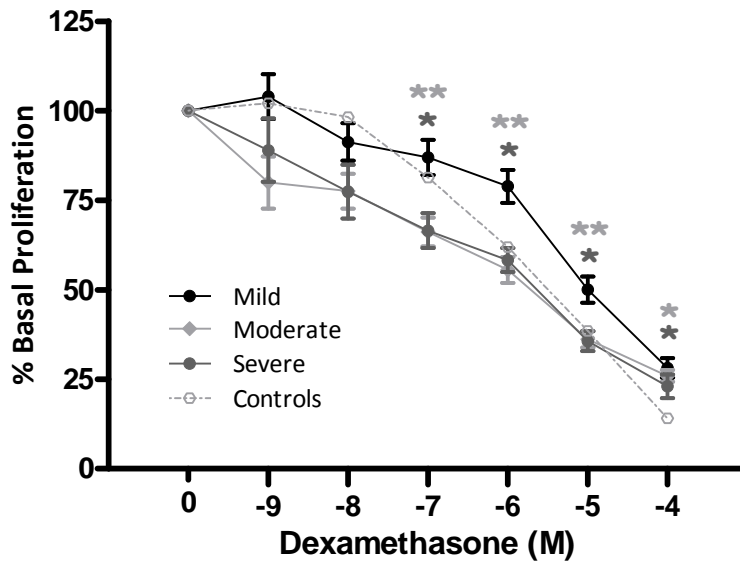
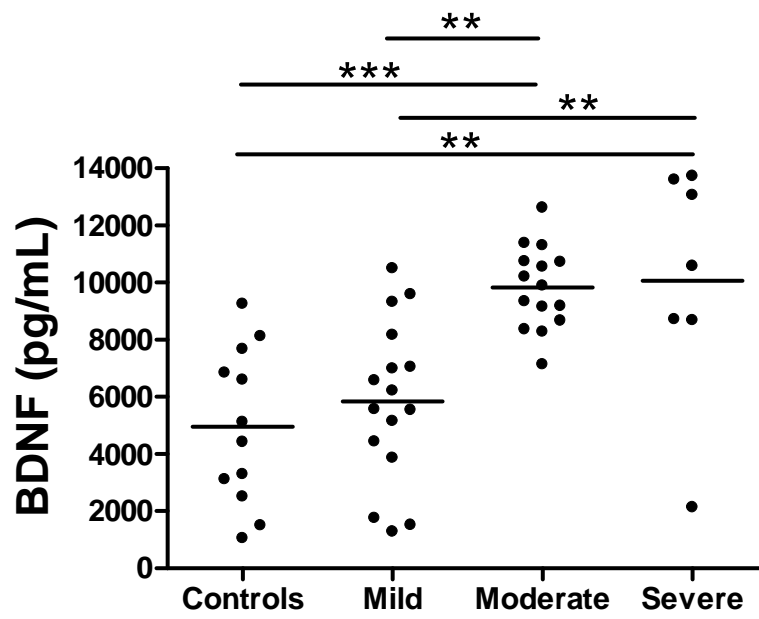


Figure 3





## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo que avaliou a sensibilidade linfocitária a corticosteróides e sua relação com um grande painel de marcadores inflamatórios em crianças com asma persistente. Os principais achados deste estudo foram: ausência de resistência aos glicocorticóides no grupo de pacientes pediátricos com asma grave e a indicação de BDNF como marcador de progressão da doença.

Neste estudo, procuramos estudar diferentes variáveis que podem estar relacionadas com a asma. Como primeiro objetivo neste estudo, nós avaliamos a proliferação das células T como índice da imunidade celular. Considerando que a proliferação de células T *in vitro* sob estímulo de um mitógeno reflete a capacidade dessas células de se multiplicar frente a um potencial antígeno, seria correto afirmar que pacientes com asma deveriam ter uma resposta mais forte frente ao estímulo devido à exacerbada resposta inflamatória que acomete estes pacientes. Este fato é ainda sustentado por outro estudo recente, onde é descrito que crianças com asma têm uma menor expressão de Foxp3 em PBMCs, reduzindo também a frequência de células T reguladoras (Treg) (124). No entanto, em nosso estudo, foi observado que pacientes com asma moderada tiveram uma menor proliferação de células T em comparação aos controles. Isto poderia ser explicado pela boa resposta ao tratamento profilático em crianças com asma (125) e os potenciais efeitos relacionados aos GCs no sistema imune. Entre os efeitos do tratamento com glicocorticóides inalatórios, sabemos que podem promover a diferenciação de células Treg, aumentando a expressão de Foxp3 em PBMCs de pacientes adultos com asma moderada e severa (126). Por fim, em nosso estudo, as PBMCs de pacientes com asma moderada se mostraram menos capazes de proliferar frente a um mitógeno (fitohemaglutinina) do que as PBMCs dos indivíduos controles. Considerando esta capacidade reduzida de responder ao estímulo de um antígeno, podemos supor que estes indivíduos apresentam um baixo índice de imunidade celular, o que indicaria que eles não apenas poderiam ter uma resposta mais

branda frente a alérgenos, como também uma possível susceptibilidade a infecções por conta desta menor capacidade das células T de responderem ao estímulo. É interessante que mais estudos sejam realizados para esclarecer as razões pelas quais os pacientes com asma moderada têm essa capacidade de proliferação reduzida.

O segundo objetivo deste estudo foi de investigar a sensibilidade das células T aos GCs. Sabendo que indivíduos adultos com asma severa apresentam uma relativa resistência aos glicocorticóides (61, 127), procurou-se neste estudo responder uma pergunta que derivou dessa descoberta: esta resistência farmacológica ocorre na infância, ou os pacientes adultos adquiriram essa resistência com o passar do tempo, sob influência do tratamento profilático com GCs? Nós observamos que as PBMCs de crianças asmáticas respondem de forma diferente aos GCs. Em particular, observamos que os pacientes com asma leve apresentavam células mais resistentes aos GCs que os demais grupos de pacientes ou controles saudáveis. Especula-se que isso ocorra devido aos efeitos sinérgicos envolvendo os GCs e os  $\beta$ 2-agonistas. Sabe-se que os GCs são capazes de elevar a sensibilidade celular aos  $\beta$ -agonistas (128) potencializando seus efeitos. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que  $\beta$ 2-agonistas também são capazes de potencializar a imunossupressão relacionada aos GCs (129, 130), aumentando a atividade dos GCs nas PBMCs. Portanto, é possível que os pacientes pediátricos com asma leve, por receberem uma dose profilática menor de GCs e sem a combinação de  $\beta$ 2-agonistas, apresentem uma menor sensibilidade celular que os demais pacientes que necessitam de doses profiláticas mais elevadas. Nossos dados também indicam que a resistência aos GCs encontrada em asmáticos adultos pode ser de fato resultado de um processo de resistência adquirida pelo contínuo uso dos GCs no decorrer da vida do paciente.

Como nosso terceiro objetivo, mensuramos vários marcadores inflamatórios que poderiam influenciar a evolução clínica da asma e a resposta celular aos GCs. Com exceção da CCL5 (RANTES) e da CCL2 (MCP-1), os pacientes e controles apresentaram níveis semelhantes desses marcadores. Mas mesmo nessas duas quimiocinas, a elevação de

suas concentrações não esteve relacionada com a gravidade da doença, uma vez que o grupo com maior concentração de CCL5 foi o grupo controle, e de CCL2 o grupo de asma leve. Holgate et al. (1997) mostrou que células do lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos adultos produziram níveis semelhantes de CCL5, CCL2 e CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) *in vitro* quando comparados com os controles saudáveis (111), assim como Fahy et al. (1997), que analisou CCL5 no lavado broncoalveolar (131). Portanto, considerando os nossos resultados e os encontrados por Holgate et al.(1997) e Fahy et al. (1997), podemos dizer que embora tanto a CCL2 como a CCL5 sejam quimiocinas altamente importantes para processo inflamatório (132), elas tendem a estar elevadas em situações de crise alérgica e ataque de asma (133), quando ocorre um intenso recrutamento de células inflamatórias. De modo que, tanto em nosso estudo, como também nos dois citados, os pacientes estavam com a doença em estado de controle, sem crise, não apresentando então alto recrutamento leucocitário. Novamente, o tratamento profilático com GCs inalatórios, em associação com  $\beta$ 2-agonistas em alguns casos, pode ter estabilizado os níveis de algumas quimiocinas. Somado a isso, um estudo anterior mostrou que o uso de GC, com ou sem  $\beta$ 2 agonistas de longa ação, têm uma boa resposta inibitória em níveis de CCL5 *in vitro* (134). Nossos resultados mostraram haver uma elevação dos níveis de BDNF entre os pacientes em comparação ao grupo controle.

Considerando que a CCL5 é uma quimiocina relacionada com a fase tardia da asma (135), produzida principalmente por eosinófilos, os baixos níveis encontrados nos pacientes sugerem que eles realmente não sofreram uma crise asmática antes da coleta para o estudo. Isso ajuda a comprovar que de fato os critérios de exclusão foram corretamente utilizados, já que crise asmática recente é um dos critérios de exclusão deste estudo. Já a CCL2 é uma quimiocina que age no início da reação asmática sendo liberada pelos mastócitos (135), e na fase tardia sendo secretada pelas células dendríticas. Sabendo que a BDNF pode ter grande importância no desenvolvimento de hiper-reatividade nas vias aéreas segundo modelos experimentais, e que em nossos resultados mostramos que pacientes

com asma moderada e severa, esses níveis elevados de BDNF nesses grupos podem estar relacionados com a hipersensibilidade das vias aéreas.

Nosso quarto objetivo foi de relacionar se existe relação entre a severidade da asma com o perfil de secreção de quimiocinas, receptores solúveis e a sensibilidade das células T aos GCs. Entre as quimiocinas estudadas, apenas a IL-8 esteve correlacionada negativamente com a função pulmonar (FEV<sub>1</sub>). Isso indica que esta quimiocina poderia estar relacionada com a gravidade da doença, provavelmente em exacerbações clínicas, quando o recrutamento celular é mais elevado. Em nosso estudo, nenhuma quimiocina esteve relacionada com a sensibilidade aos glicocorticóides. Não encontramos diferenças entre os grupos analisados em relação aos os receptores solúveis de TNF, contrastando com um estudo anterior que apresenta uma elevação desses receptores solúveis em pacientes com rinite alérgica (136). Mas quando crianças atópicas foram analisadas durante a fase estável da doença, não foram encontradas diferenças entre pacientes e controles (137), o que está de acordo com os nossos resultados, uma vez que em nosso estudo também avaliamos crianças asmáticas sob controle profilático. Com base em nossos achados e nos dados existentes na literatura, podemos dizer que as quimiocinas não são bons marcadores de severidade clínica, uma vez que tendem a estar com níveis relativamente normais em pacientes sob tratamento eficiente. Contudo, elas poderiam ser bons marcadores inflamatórios na fase aguda da asma.

Os níveis de BDNF plasmáticos estiveram de fato relacionados com o quadro clínico. Essa neurotrofina encontrou-se significativamente elevada na asma pediátrica em indivíduos com asma moderada e severa e esteve negativamente correlacionada com a sensibilidade a GCs. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que apresentaram o aumento nos níveis de BDNF no plasma de pacientes adultos com asma (118). A BDNF tem sido relacionada com a patogênese da asma adulta, modulando a hiper-responsividade das vias aéreas e a inflamação, além de estar envolvida nas reações de fase tardia do processo alérgico na asma (114). Portanto, considerando os achados

apresentados neste e em estudos anteriores, acreditamos que existam evidências sugerindo o BDNF como um bom marcador da severidade da doença em crianças e adultos com asma.

Finalizando, os nossos resultados têm relevância clínica porque eles sugerem que a relativa resistência ao glicocorticóides na asma severa encontrada em adultos não se reflete na asma pediátrica. Fato esse que abre a possibilidade para que novas pesquisas sejam realizadas visando avaliar os mecanismos pelos quais essa resistência aos glicocorticóides possa ocorrer nos pacientes adultos, uma vez que nossos dados sugerem que essa resistência não é congênita. A pesquisa de novas drogas profiláticas se mostra ainda mais importante. Mais pesquisas são necessárias para que seja possível esclarecer o papel das neurotrofinas na patofisiologia da asma persistente.

## 6 CONCLUSÕES

- As células mononucleares do sangue periférico de pacientes pediátricos com asma severa não apresentam resistência aos glicocorticóides *in vitro*.
- Os pacientes asmáticos demonstraram poucas alterações nos seus níveis de quimiocinas e receptores solúveis de TNF quando comparados com os controles.
- A IL-8 foi negativamente associada com a função pulmonar.
- BDNF é um marcador em potencial para a severidade da asma pediátrica.

## 7 REFERÊNCIAS

1. American Thoracic Society. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Dec;162(6):2341-51.
2. Stankovic I, Pejdic T, Milenkovic B, Jovanovic D, Rancic M. Is there any point in a corticosteroid treatment of intermittent asthma? *Scientific World Journal.* 2007;7:1082-9.
3. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2006;32(Supl 7):447-S 74.
4. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet.* 1998 Apr 25;351(9111):1225-32.
5. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J.* 2003 Sep;22(3):470-7.
6. Drazen JM, Silverman EK, Lee TH. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma. *Br Med Bull.* 2000;56(4):1054-70.
7. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 6. Asthma: Factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Feb;117(2 Suppl Mini-Primer):S456-61.
8. Gern JE, Lemanske RF, Jr., Busse WW. Early life origins of asthma. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(7):837-43.
9. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest.* 2003 Feb;111(3):291-7.

10. Yunginger JW, Reed CE, O'Connell EJ, Melton LJ, 3rd, O'Fallon WM, Silverstein MD. A community-based study of the epidemiology of asthma. Incidence rates, 1964-1983. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Oct;146(4):888-94.
11. Isaacs D, Joshi P. Respiratory infections and asthma. *Med J Aust*. 2002 Sep 16;177 Suppl:S50-1.
12. Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Morgan WJ, Taussig LM. Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. Group Health Medical Associates. *Bmj*. 1989 Oct 14;299(6705):946-9.
13. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Nov;144(5):1202-18.
14. Siersted HC, Mostgaard G, Hyldebrandt N, Hansen HS, Boldsen J, Oxhøj H. Interrelationships between diagnosed asthma, asthma-like symptoms, and abnormal airway behaviour in adolescence: the Odense Schoolchild Study. *Thorax*. 1996 May;51(5):503-9.
15. Oppenheimer J, Nelson HS. Skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006 Feb;96(2 Suppl 1):S6-12.
16. Barnes PJ. Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):2-14.
17. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):183-92.
18. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, et al. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy*. 1992 Feb;47(1):3-11.
19. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J*. 2005 Dec;26(6):1119-37.



20. Yssel H, Groux H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000 Jan;121(1):10-8.
21. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Jan 11;344(2):109-13.
22. Rochlitzer S, Nassenstein C, Braun A. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans.* 2006 Aug;34(Pt 4):594-9.
23. Liberman AC, Druker J, Perone MJ, Arzt E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Feb-Apr;18(1-2):45-56.
24. Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J.* 2006 Feb;27(2):413-26.
25. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 2002 Oct;96(1):23-43.
26. Wan Y, Nordeen SK. Identification of genes differentially regulated by glucocorticoids and progestins using a Cre/loxP-mediated retroviral promoter-trapping strategy. *J Mol Endocrinol.* 2002 Jun;28(3):177-92.
27. Hearing SD, Norman M, Smyth C, Foy C, Dayan CM. Wide variation in lymphocyte steroid sensitivity among healthy human volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Nov;84(11):4149-54.
28. Hirano T, Tsuboi N, Homma M, Oka K, Takekoshi T, Tahara K, et al. Comparative study of lymphocyte-suppressive potency between prednisolone and methylprednisolone in rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology.* 2000 Sep;49(3):411-7.

29. Gold R, Buttgereit F, Toyka KV. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol.* 2001 Jul 2;117(1-2):1-8.
30. Almawi WY, Tamim H. Posttranscriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: glucocorticoids inhibit IL-6-induced proliferation of B9 hybridoma cells. *Cell Transplant.* 2001 Mar-Apr;10(2):161-4.
31. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* 2004 Nov;50(11):3408-17.
32. Schlaghecke R, Beuscher D, Kornely E, Specker C. Effects of glucocorticoids in rheumatoid arthritis. Diminished glucocorticoid receptors do not result in glucocorticoid resistance. *Arthritis Rheum.* 1994 Aug;37(8):1127-31.
33. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* 1995 Oct 13;270(5234):283-6.
34. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science.* 1995 Oct 13;270(5234):286-90.
35. Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol.* 2001 Jun;169(3):429-35.
36. Wilckens T, De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today.* 1997 Sep;18(9):418-24.
37. Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 2;96(3):1059-64.

38. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Aug;84(8):2834-9.
39. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *Faseb J.* 2002 Jan;16(1):61-71.
40. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;111(1):3-22; quiz 3.
41. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985 Dec 19-1986 Jan 1;318(6047):635-41.
42. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem.* 1996 Apr 19;271(16):9550-9.
43. Oakley RH, Webster JC, Jewell CM, Sar M, Cidlowski JA. Immunocytochemical analysis of the glucocorticoid receptor alpha isoform (GRalpha) using GRalpha-specific antibody. *Steroids.* 1999 Oct;64(10):742-51.
44. de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, et al. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol Med.* 1996 Sep;2(5):597-607.
45. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med.* 1997 Nov 3;186(9):1567-74.

46. Chikanza IC, Grossman AB. Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. *Rheum Dis Clin North Am.* 2000 Nov;26(4):693-711.
47. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsicopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1600-4.
48. Christodoulopoulos P, Leung DY, Elliott MW, Hogg JC, Muro S, Toda M, et al. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Sep;106(3):479-84.
49. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 5;98(12):6865-70.
50. Chikanza LC, Panayi GS. The effects of hydrocortisone on in vitro lymphocyte proliferation and interleukin-2 and -4 production in corticosteroid sensitive and resistant subjects. *Eur J Clin Invest.* 1993 Dec;23(12):845-50.
51. Adcock IM, Lane SJ. Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. *J Endocrinol.* 2003 Sep;178(3):347-55.
52. Norbiato G, Bevilacqua M, Vago T, Baldi G, Chebat E, Bertora P, et al. Cortisol resistance in acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Mar;74(3):608-13.
53. Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ, Spahn JD. Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 May;101(5):594-601.

54. Bauer ME, Papadopoulos A, Poon L, Perks P, Lightman SL, Checkley S, et al. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2003 Jan;28(1):49-65.
55. Travis SP. Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Dig Liver Dis*. 2004 Jul;36(7):448-9.
56. Vingerhoeds AC, Thijssen JH, Schwarz F. Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976 Nov;43(5):1128-33.
57. Chikanza IC, Kozaci DL. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Nov;43(11):1337-45.
58. Szeffler SJ. Measuring the response to glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Jun;85(6):985-7.
59. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Apr;109(4):649-57.
60. Schaaf MJ, Cidowski JA. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol Cell Biol*. 2003 Mar;23(6):1922-34.
61. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jul 15;174(2):134-41.
62. Faffe DS. Asthma: where is it going? *Braz J Med Biol Res*. 2008 Sep;41(9):739-49.

63. Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: basic immunology and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1999 Jun;36(3):165-224.
64. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clin Chim Acta*. 2005 Feb;352(1-2):49-74.
65. Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39320-6.
66. Schuh JM, Blease K, Kunkel SL, Hogaboam CM. Chemokines and cytokines: axis and allies in asthma and allergy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Dec;14(6):503-10.
67. Brown V, Ennis M. T Cell Cytokine Production in Childhood Asthma. *Current Respiratory Medicine Reviews*. 2005;1:1-6.
68. Hartel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Muller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol*. 2005 Dec;142(3):446-53.
69. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
70. Kay AB, Gelfand EW, Smith LJ, Tashkin D. Natural history of asthma from childhood to adulthood. *Clin Exp All Review*. 2002;2:117-27.
71. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl*. 2001 Dec;34:24s-33s.
72. Hirata N, Kohrogi H, Iwagoe H, Goto E, Hamamoto J, Fujii K, et al. Allergen exposure induces the expression of endothelial adhesion molecules in passively sensitized human bronchus: time course and the role of cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Jan;18(1):12-20.

73. Gemou-Engesaeth V, Kay AB, Bush A, Corrigan CJ. Activated peripheral blood CD4 and CD8 T-lymphocytes in child asthma: correlation with eosinophilia and disease severity. *Pediatr Allergy Immunol.* 1994 Aug;5(3):170-7.
74. Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Mar;111(3 Suppl):S799-804.
75. Hertenstein LC. The hygiene hypothesis in the development of atopy and asthma—still a matter of controversy? *Qjm.* 1998 Nov;91(11):767-71.
76. Bodner C, Anderson WJ, Reid TS, Godden DJ. Childhood exposure to infection and risk of adult onset wheeze and atopy. *Thorax.* 2000 May;55(5):383-7.
77. Gern JE. Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Feb;105(2 Pt 2):S497-502.
78. Czeresnia D. Body Interfaces: The integration of alterity into the concept of disease. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2007;10(1):19-29.
79. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(3):264-8.
80. Magnan A, Boniface S, Mely L, Romanet S, Mamessier E, Vervloet D. Cytokines, from atopy to asthma: the Th2 dogma revisited. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001 Jun;47(4):679-87.
81. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A, Olivenstein R, Nakamura Y, Levitt RC, et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Jan;105(1 Pt 1):108-15.
82. Tang ML, Coleman J, Kemp AS. Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy.* 1995 Jun;25(6):515-21.

83. Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC, et al. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Jun;22(6):649-56.
84. Costa ML, Stein RT, Bauer ME, Machado DC, Jones MH, Bertotto C, et al. Levels of Th1 and Th2 cytokines in children with post-infectious bronchiolitis obliterans. *Ann Trop Paediatr.* 2005 Dec;25(4):261-6.
85. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992 Jan 30;326(5):298-304.
86. Matsumoto T, Miike T, Yamaguchi K, Murakami M, Kawabe T, Yodoi J. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-4 and IgE-binding factors in childhood allergic diseases. *Clin Exp Immunol.* 1991 Aug;85(2):288-92.
87. Brown V, Warke TJ, Shields MD, Ennis M. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax.* 2003 Apr;58(4):311-6.
88. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1303-10; quiz 11-2.
89. Liu LY, Bates ME, Jarjour NN, Busse WW, Bertics PJ, Kelly EA. Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF-alpha. *J Immunol.* 2007 Oct 1;179(7):4840-8.
90. Daldegan MB, Teixeira MM, Talvani A. Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Sep;38(9):1359-65.



91. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation*. 1995 Sep 15;92(6):1487-93.
92. Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Brichet A, et al. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Feb;159(2):487-94.
93. Aderka D, Engelmann H, Shemer-Avni Y, Hornik V, Galil A, Sarov B, et al. Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals. *Lymphokine Cytokine Res*. 1992 Jun;11(3):157-9.
94. Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2001 May;22(9):791-7.
95. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia 6ed*. Porto Alegre: Artmed; 2008.
96. Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Lau L, Buckley M, McConnell W, et al. Tumour necrosis factor (TNF $\alpha$ ) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*. 2005 Dec;60(12):1012-8.
97. Morjaria JB, Chauhan AJ, Babu KS, Polosa R, Davies DE, Holgate ST. The role of a soluble TNF $\alpha$  receptor fusion protein (etanercept) in corticosteroid refractory asthma: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *Thorax*. 2008 Jul;63(7):584-91.
98. Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: a double facet cytokine. *Cardiovasc Res*. 1998 Mar;37(3):554-9.

99. Guo Z, Wang S, Jiao Q, Xu M, Xu Z. Soluble TNFR II/IgG1 Fc fusion protein treatment in the LPS-mediated septic shock of rats. *Biomed Pharmacother*. 2008 Sep 16.
100. Matthey DL, Glossop JR, Nixon NB, Dawes PT. Circulating levels of tumor necrosis factor receptors are highly predictive of mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):3940-8.
101. D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Oct 1;164(7):1266-75.
102. Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(8):995-9.
103. Teran LM. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today*. 2000 May;21(5):235-42.
104. Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(9):1331-9.
105. Lai ST, Hung CH, Hua YM, Hsu SH, Jong YJ, Suen JL. T-helper 1-related chemokines in the exacerbation of childhood asthma. *Pediatr Int*. 2008 Feb;50(1):99-102.
106. Leung TF, Wong GW, Ko FW, Lam CW, Fok TF. Increased macrophage-derived chemokine in exhaled breath condensate and plasma from children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004 May;34(5):786-91.
107. Rojas-Ramos E, Avalos AF, Perez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Teran LM. Role of the chemokines RANTES, monocyte chemoattractant protein 1, and macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun;115(6):1303-10.

- proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J*. 2003 Aug;22(2):310-6.
108. Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol*. 1997 Dec;27(12):3507-16.
109. Teran LM, Noso N, Carroll M, Davies DE, Holgate S, Schroder JM. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1806-12.
110. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, 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. *J Immunol*. 1999 Dec 1;163(11):6321-9.
111. Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Nov;156(5):1377-83.
112. McKinley L, Kim J, Bolgos GL, Siddiqui J, Remick DG. CXC chemokines modulate IgE secretion and pulmonary inflammation in a model of allergic asthma. *Cytokine*. 2005 Nov 3;32(3-4):178-85.
113. Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem*. 2008 Apr;105(1):1-17.

114. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan;117(1):67-71.
115. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A, Tirassa P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 25;91(22):10440-4.
116. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Dec;14(6):559-78.
117. Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, et al. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol.* 1998 Oct;28(10):3240-51.
118. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, et al. Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jan 15;171(2):115-20.
119. Path G, Braun A, Meents N, Kerzel S, Quarcoo D, Raap U, et al. Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Sep 15;166(6):818-26.
120. Noga O, Hanf G, Schaper C, O'Connor A, Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy.* 2001 Dec;31(12):1906-12.
121. Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R, Groneberg DA, Kunkel G, et al. Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regul Pept.* 2005 Jan 15;124(1-3):19-25.

122. Edling AE, Nanavati T, Johnson JM, Tuohy VK. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res*. 2004 Sep 1;77(5):709-17.
123. Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Starace G, D'Elia MM, De Carli M, et al. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Sep;100(3):408-14.
124. Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy*. 2008 Jan;63(1):67-74.
125. Chapman KR. The impact of budesonide and other inhaled corticosteroid therapies in the management of asthma in children and adults. *Clin Ther*. 2003;25 Suppl C:C2-C14.
126. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;114(6):1425-33.
127. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Nov;144(5):1026-32.
128. Koto H, Mak JC, Haddad EB, Xu WB, Salmon M, Barnes PJ, et al. Mechanisms of impaired beta-adrenoceptor-induced airway relaxation by interleukin-1beta in vivo in the rat. *J Clin Invest*. 1996 Oct 15;98(8):1780-7.
129. Johnson M. Interactions between corticosteroids and beta2-agonists in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):200-6.

130. Usmani OS, Ito K, Maneechotesuwan K, Ito M, Johnson M, Barnes PJ, et al. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Sep 15;172(6):704-12.
131. Fahy JV, Figueroa DJ, Wong HH, Liu JT, Abrams JS. Similar RANTES levels in healthy and asthmatic airways by immunoassay and in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Mar;155(3):1095-100.
132. Conti P, DiGiacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 2001 May-Jun;22(3):133-7.
133. Castro M, Bloch SR, Jenkerson MV, DeMartino S, Hamilos DL, Cochran RB, et al. Asthma exacerbations after glucocorticoid withdrawal reflects T cell recruitment to the airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Apr 1;169(7):842-9.
134. Soma T, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Uematsu K, et al. Inhibitory effect of budesonide alone and in combination with formoterol on IL-5 and RANTES production from mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008;146 Suppl 1:22-7.
135. Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett.* 2007 Oct 31;113(1):6-18.
136. Kato M, Hattori T, Kato Y, Matsumoto Y, Yamashita T, Nakashima I. Elevated soluble tumor necrosis factor receptor levels in seasonal allergic rhinitis patients. *Allergy.* 1999 Mar;54(3):278-82.
137. Laan MP, Koning H, Baert MR, Oranje AP, Buurman WA, Savelkoul HF, et al. Levels of soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble E-selectin, tumor necrosis factor-alpha, and soluble tumor necrosis factor receptor p55 and p75 in atopic children. *Allergy.* 1998 Jan;53(1):51-8.

## **Anexo 1**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Resistência ao corticóide em cultura de células mononucleares de sangue periférico em pacientes pediátricos com asma grave.**

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

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

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

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

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

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

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

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

Eu, \_\_\_\_\_, responsável pelo paciente \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre os procedimentos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. As minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento, através da Dra. Rejane no telefone (51)9817-8995 ou (51)3320-3000, R:2461 ou Dr. Paulo Márcio no telefone (51)3320-3000 R:2221. Além disto, sei que esta pesquisa possui o aval do Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital, que poderei contactar através do CEP 33203345. Novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa pela equipe de Pneumologia Pediátrica se assim o quiser, sem haver prejuízo no atendimento ao meu filho(a).

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

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



---

Assinatura do responsável

---

Assinatura do investigador principal

## Anexo 2

### Comprovante de Submissão do Artigo

**De:** onbehalf@scholarone.com [mailto:onbehalf@scholarone.com] Em nome de mbendian@thoracic.org

**Enviada em:** terça-feira, 17 de março de 2009 15:44

**Para:** Moises Evandro Bauer

**Assunto:** Blue-200903-0417OC to Corresponding Author

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

**Blue-200903-0417OC:** Absence of peripheral glucocorticoid resistance in children with severe persistent asthma

Dear Dr. Bauer:

Your manuscript has been submitted to the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. As corresponding author, you will receive future communications by e-mail.

Your manuscript ID is: Blue-200903-0417OC. Please make note of your manuscript ID number and refer to it whenever you contact the journal office. You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajrccm> where the status will be displayed in your Author Center.

Please note, it is the policy of the Journal to correspond exclusively with one designated corresponding author. As the corresponding author, it is your responsibility to communicate with your co-authors.

Thank you for your submission to the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

Sincerely,

Marc Bendian

Peer Review Supervisor

American Thoracic Society

Phone: (212)-315-8623

Email: [mbendian@thoracic.org](mailto:mbendian@thoracic.org)