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

PATRÍCIA DIAS DE ARAÚJO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE
TRANSCRIÇÃO CARACTERÍSTICOS DE TH1, TH2,
TH17 E TREG EM CÉLULAS TCD4+ DE CRIANÇAS
ASMÁTICAS**

**PORTO ALEGRE
2015**

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE
TRANSCRIÇÃO CARACTERÍSTICOS DE TH1, TH2,
TH17 E TREG EM CÉLULAS TCD4+ DE CRIANÇAS
ASMÁTICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção
de título de Doutor em Saúde da Criança.

Autora
Patrícia Dias de Araújo

Orientadora
Profa. Dra. Cristina Bonorino

Co-orientadora
Profa. Dra. Ana Paula Souza

Porto Alegre, 2015

A663a Araújo, Patrícia Dias de

Análise da expressão de fatores de transcrição característicos de Th1, Th2, Th17 E TREG em células TCD4+ de crianças asmáticas. / Patrícia Dias de Araújo. Porto Alegre: PUCRS, 2015.

70 f.: il. tab.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Bonorino.

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

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Pediatria e Saúde da Criança.

1. ASMA PEDIÁTRICA. 2. CÉLULAS TCD4. 3. GATA-3. 4. T-BET. 5. RORIT. 6. FOXP3. 7. ALÉRGENOS. 8. D.PTERONYSSINUS. 9. ESTUDO OBSERVACIONAL DO TIPO TRANSVERSAL. I Bonorino, Cristina. II. Souza, Ana Paula. III. Título.

CDD 618.9223
CDU 616.248 (043.2)
NLM WF 553

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

Dedicatória

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

Aos meus irmãos Marcelo, Luciano e Alexandre pelo apoio.

A todas as crianças e adolescentes que participaram da pesquisa e tornaram este estudo possível.

Todos que de alguma forma, colaboraram com meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades, conquistas e experiências obtidas, e por me orientar ao longo dessa trajetória de formação.

À minha família, em especial, meus pais Iris Dias e João Gonçalves de Araújo, que sempre me forneceram total apoio nos momentos difíceis e me deram muito amor durante minha vida. Aos meus irmãos pelas palavras de conforto e carinho, os quais são minha razão de viver. Ao meu namorado Tiago, que sempre me ajudou e de confortou com suas palavras, muito OBRIGADA!

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

A minha co-orientadora e amiga Ana Paula Duarte de Souza pelo apoio, orientação, disponibilidade e cooperação durante a elaboração e desenvolvimento do projeto, e principalmente, durante o desenvolvimento desta tese. Gostaria de agradecer pelo privilégio de poder conviver com uma pessoa tão generosa, dedicada e eficiente. Realmente é um modelo de professora o qual devo me espelhar.

Aos meus amigos que conquistei no laboratório, Giovana dos Santos, Stéfanie Muraro, João Paulo Heinzmann Filho, Deise Nascimento e Krist Antunes, pelo carinho e auxílio de todos durante esses anos aqui. Não há palavras que expresse minha gratidão por vocês. Só tenho que agradecer a Deus todos os dias por colocado amigos como vocês no meu caminho.

À secretária do Instituto de Pesquisas Biomédicas e do Programa de Pós-Graduação em Pediatria/Saúde da Criança, Elizangela Mello e Carla Rothmann, respectivamente.

À todas as escolas, diretoras, professores e alunos que tornaram esta pesquisa possível.

À CAPES, pelo auxílio-pesquisa concedido.

RESUMO

Introdução: A asma é uma doença prevalente em crianças, tendo como principal característica a inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas. Além das células Th2, as células Th17, Th1 e Treg são envolvidas na patologia da doença pela função que elas e as citocinas por elas secretadas exercem. A asma apresenta dois fenótipos principais, os quais dependem da presença de atopia. As células TCD4 apresentam plasticidade, que são influenciadas por fatores ambientais e genéticos.

Objetivos: Avaliar o perfil fenotípico de células TCD4 de crianças em idade escolar asmáticas, com ou sem a presença de atopia e de controles saudáveis. Correlacionar os dados obtidos com a severidade da doença. Além disso, avaliar as células que co-expressam mais de um fator de transcrição no sangue de crianças asmáticas atópicas para *D.pteronyssinus* estimulando as células com a proteína Derp1.

Materiais e métodos: Este foi um estudo transversal caso-controle, onde crianças de 8 a 14 anos foram recrutadas de escolas públicas de Porto Alegre/RS, asmáticas e controles. As células mononucleares foram isoladas por Histopaque do sangue periférico destas crianças e colocadas em cultura com anti-CD3/CD28 ou com proteína Derp1. Após 24hs as células foram marcadas com anticorpos específicos para os fatores de transcrição para análise do perfil Th2, Th17, Th1 e Treg por citometria de fluxo. Além disto, foi analisado no plasma a IgE específica para um painel de alérgenos.

Resultados: Os resultados obtidos mostraram que as comparado com os controles. As células duplo-positivas CD4+GATA-3+ROR γ t+ correlacionaram com o grau de severidade da doença, exceto com asma severa de difícil controle (ADC). Pacientes atópicos apresentaram uma proporção maior de células co-expressando mais de um fator de transcrição comparados com indivíduos não-atópicos. Estimulação de células provenientes de pacientes atópicos com a proteína Derp1 aumenta a frequência de células CD4+Foxp3+ROR γ t+ quando comparados com o controle e estimulação com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28.

Conclusão: De uma maneira geral, os resultados apresentados nesta tese nos permitem concluir que os alérgenos desempenham um papel importante no desenvolvimento das células que expressam mais de um fator de transcrição em pacientes atópicos. Além disso, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que crianças com ADC apresentam um perfil distinto de expressão de fatores de transcrição reguladores de células TCD4 do tipo Th1, Th2, Th17 e Treg quando comparado com crianças com doença menos severa.

Palavras-Chave: asma pediátrica, células TCD4, GATA-3, T-bet, ROR γ t e FoxP3, alérgenos e *D.pteronyssinus*, ADC

ABSTRACT

Introduction: Asthma is a disease that affects most children, characterized by inflammation and airway hyperresponsiveness. Asthma has two main phenotypes depending on the presence of atopy. In addition to Th2 cells, Th17 cells, Th1 and Treg cells are involved in disease pathology by secreting cytokines. CD4 T cells have plasticity, which are influenced by environmental and genetic factors.

Aim: To assess the phenotypic profile of CD4 T cells in asthmatic children of school age, with or without the presence of atopy and healthy controls and correlate the data with disease severity. In addition, analyze cells expressing more than one transcription factor in the blood of atopic asthmatic children to *D. pteronyssinus* stimulating mononuclear cells with DerP1 protein.

Methods: This was a cross-sectional case-control study, where 8-14 years-old asthmatic and healthy children were recruited of public schools in Porto Alegre/RS. Mononuclear cells were isolated by Histopaque peripheral blood of children and cultured with anti-CD3/CD28 or DerP1 protein. After 24 hours the cells were stained with antibodies specific for transcription factors for analysis of Th2, Th17, Th1 and Treg cells by flow cytometry. Moreover, it was analyzed in plasma allergen-specific IgE specific.

Results: The results showed that children with asthma have a higher frequency of CD4+GATA-3+ compared to controls. Frequency of CD4+GATA-3+ROR γ t+ cells correlated with disease severity, except with severe therapy resistant asthma (STRA). Atopic patients showed a higher proportion of co-expressing more than one transcription factor cells compared to non-atopic individuals. Stimulation with DerP1 protein enhances the frequency of CD4 + Foxp3 +ROR γ t+ compared with the control and stimulation with anti-CD3/ CD28.

Conclusion: In general, the results presented in this thesis allowed us to conclude that the allergens play an important role in the development of cells expressing more than one transcription factor in atopic patients. In addition, our study was the first to demonstrate that STRA children have a distinct expression profile of regulatory transcription factors of CD4 T cells Th1, Th2, Th17 and Treg compared to other severity levels of the disease.

Keywords: Pediatric asthma, TCD4 cells, GATA-3, T-bet, ROR γ t e FoxP3, allergens e *D. pteronyssinus*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura.1. A diferenciação de células T naive..	14
--	----

CAPÍTULO II

Figure 1. PBMC were collected from of asthmatic (n = 129) and control (n = 35) children and the expression of master regulator transcriptional factors (MRTF) was analyzed in CD4 T cells.	31
Figure 2. PBMC were collected form atopic (n = 89) and non-atopic (NA) (n = 29) asthmatic children and the expression of MRTF were analysed in CD4 T cells	34
Figure 3. MRTF expression analysis in CD4 T cells from PBMC after 24hs of stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies of children with eosinophilic (n = 19), neutrophilic (n = 21) and mixed (n = 19) induced sputum.	35
Figure 4. MRTF expression analysis in CD4 T cells from PBMC of control healthy children (n = 35) and Intermittent (n = 41), Mild-Persistent (n = 41), Moderated (n = 22) and STRA (n = 11) asthmatic children.	38

CAPÍTULO III

Figure 1. analysis of CD4 T cells expressing MRTF: GATA-3, ROR γ t, T-bet and FoxP3 in peripheral blood of atopic asthmatic children with serum positive IgE to D.pteronyssinus (n=72).....	58
Figure 2. analysis of CD4 T cells expressing MRTF: GATA-3, ROR γ t, T-bet and FoxP3 in peripheral blood of atopic asthmatic children with serum positive IgE to D	60
Figure 3. analysis of CD4 T cells expressing MRTF: GATA-3, ROR γ t, T-bet and FoxP3 in peripheral blood of atopic asthmatic children with serum positive IgE to D.pteronyssinus after 24hs of stimulation with Der p 1, anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or left unstimulated as a control	61
Figure 4. analysis of CD4 T cells expressing MRTF: GATA-3, ROR γ t, T-bet and FoxP3 in peripheral blood of atopic asthmatic children with serum positive IgE to D.pteronyssinus after 24hs of stimulation with Der p 1, anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or left unstimulated as a control.	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1 - Clinical characteristics of asthmatic children and controls.....	30
Table 2 - CD4 T cells master regulator transcriptional factors (MRTF) analysis on PBMC, stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, from asthmatic and control children.	32
Table 3 - Analysis of CD4 T cells co-expressing two master regulator transcriptional factors (MRTF) on PBMC, stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, from asthmatic and control children.	33
Table 4 - Analysis of CD4 T cells co-expressing two master regulator transcriptional factors on PBMC, after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, from asthmatic children with eosinophilic, mixed or neutrophilic induced sputum.	36

CAPÍTULO III

Table 1 - Clinical characteristics of non-atopic and atopic asthmatic children.....	56
Table 2 - Frequency of asthmatic children positive for different allergen specific IgE in serum.	57
Table 3 - Characteristic the cells stimulated co-expressing three of MRTF the of asthmatic children positive for <i>D.peteronissynus</i>	59
Table 4 - Characteristic the cells non-estimated, stimulated with DerP1 and anti CD3/CD28 co-expressing three of MRTF the of asthmatic children positive for <i>D.peteronissynus</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti/CD3, Anti/CD28	Anticorpo monoclonal anti/CD3, anti/CD28
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
DerP1	<i>Dermatophagoides pteronissinus</i> com atividade de protease
DMSO	Dimetilsulfóxido
FoxP3	Forkhead Box P3
HDM	House dust mite
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon Gama
MRTF	<i>Master regulator transcritcion fator</i>
NA	Não-atópico
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RORγt	<i>Orphan Nuclear Receptor T</i>
RPMI	<i>Roswall Park Memorial Intitute</i>
RS	Rio Grande do Sul
SBF	Soro Fetal Bovino
TCD4	Linfócitos T auxiliares
TGF-β	<i>Transforming growth fator beta</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis fator-alpha</i>
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.2.3 Objetivos Específicos	18
1.3 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II.....	22
2 ARTIGO ORIGINAL	24
CAPÍTULO III	49
3 ARTIGO ORIGINAL	50
CAPÍTULO IV.....	68
4 CONCLUSÃO.....	69

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A asma é um problema de saúde pública mundial, especialmente prevalente em crianças (1). Ela é uma doença que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo e vem aumentando nos últimos anos, principalmente no mundo Ocidental em que 10% dos adultos e 30% das crianças são afetadas. No Brasil, a prevalência de asma entre as crianças e adolescentes está próxima de 20% e é alta em todas as regiões do país (2-4).

A asma é uma doença heterogênea das vias aéreas, que envolve interações genéticas e ambientais(5,6). As características fundamentais da asma são: inflamação, hiperresponsividade das vias aéreas, hipersecreção de muco e fibrose subepitelial, que resultam em perda da função pulmonar. Devido a esse desfecho, pacientes asmáticos apresentam dispneia, sibilância, dor no peito, tosse e espirros contínuos, consequência da obstrução das vias aéreas (6-8). A inflamação das vias aéreas é um componente importante na patofisiologia da doença. As citocinas inflamatórias contribuem para uma resposta de reparação alterada, com secreção de muco e de fatores de crescimento que induzem a metaplasia de células, a qual é mais proeminente com a gravidade da doença. Além disso, fatores que podem contribuir com a exacerbação da asma são: alérgenos, vírus, certos medicamentos e produtos químicos (8-10).

Por ser uma doença heterogênea, a asma possui diferentes fenótipos, que interferem na severidade. A apresentação dos diferentes fenótipos da asma depende da história natural da doença, da presença ou não de atopia e da resposta ao tratamento (11). O processo de desenvolvimento da asma inicia pelo contato do alérgeno com a mucosa, a qual instrui as células B a produzir anticorpos IgE, porém esse processo é dependente das células apresentadoras de antígenos (APCs) e da cooperação entre as células B e células T (10). Este processo inicial da asma precoce emerge como a doença mais comum entre as crianças, que pode ou não persistir até adolescência (12).

Na asma a própria natureza da doença influencia na magnitude da resposta imune e consequentemente nos diferentes fenótipos de células TCD4 e respectivas citocinas que por elas são secretadas (1). Podem estar envolvidas na fisiopatologia da asma, as linhagens de células T *helper*, tais como Th1, Th2, Th17 e Treg, que atuam de forma diferente. Além disso, está descrito que a plasticidade destas células, as quais podem mudar de fenótipo dependendo do microambiente (13, 14). Acreditava-se que apenas as células Th1 e células Th2, as quais

foram divididas em meados dos anos de 1980, estivessem envolvidas na asma, porém essa ideia mudou com as novas células efetoras descritas nos últimos anos, como Th17, Treg (15) e recentemente células Th9 (Figura 1).

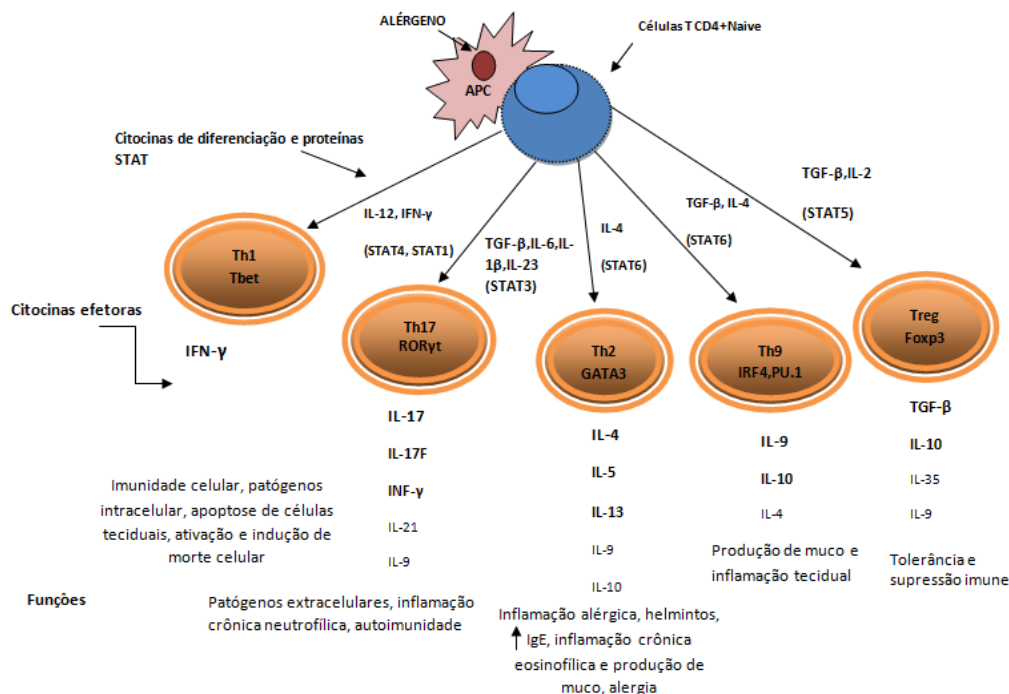


Figura.1. A diferenciação de células T naive. Após estimulação com alérgeno, dependendo do estado de ativação das células e microambiente, as células T naive se diferenciam entre células T helper de diferentes subtipos, sendo eles Th1, Th2, Th17, Treg e Th9. Cada um destes subtipos tem fatores de transcrições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

Na patologia da asma o fenótipo Th2 tem papel chave na doença, bem como as citocinas por ela secretadas: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que estão envolvidas desde a sensibilização alérgica e produção de IgE até a sobrevivência eosinofílica (16). O desenvolvimento de células Th2 ocorre por meio de IL-4 que induz a ativação de STAT6 e a expressão do fator de transcrição GATA-3 (15). Outro fenótipo de células TCD4 também descrito na patologia da asma são as células Th17, uma linhagem que secreta as citocinas IL-17 A a F. O papel principal destas células é o recrutamento e ativação de neutrófilos através da produção de IL-8, além de indiretamente induzir citocinas pró-inflamatórias de epitélio das vias aéreas. As células Th17 são originadas da ativação de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23 que induzem a ativação do fator de transcrição ROR γ t, e conseqüentemente a produção de IL-17 (15-18).

Embora as células Th2 têm sido frequentemente mais estudadas na asma, evidências mostram que as células Th1 possam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Esta

hipótese foi demonstrada em um estudo, onde o aumento dos níveis de INF- γ em pacientes com asma, sugerindo uma resposta Th1. Células Th1 são dirigidas por estimulação do INF- γ e IL-2 que ativam STAT1 e STAT4, resultando na ativação do fator de transcrição Tbet, que por fim estimulam as células a produzirem INF- γ (2, 17). A resposta destas células é importante para a imunidade celular contra patógenos intracelulares (15).

As células TCD4 regulatórias (Treg), que são reguladoras da resposta imune (16), são caracterizadas pelos marcadores CD4 e CD25, e pela expressão do fator de transcrição Foxp3. Também têm sido relatadas durante a patogenia da asma (15, 17).

Cada fenótipo de células Th1, Th2, Th17 e Treg possui um fator de transcrição chave para a sua ativação e para a sua diferenciação. Os fatores de transcrição T-bet, GATA-3 ROR γ t e Foxp3 regulam respectivamente as diferenciações do fenótipo Th1, Th2, Th17 e Treg (11). Acreditava-se que estes fenótipos eram irreversíveis, uma vez diferenciadas a células TCD4 permaneceria com seu fenótipo. Porém, recentemente estudos mostram que as células TCD4 podem co-expressar mais de um fator de transcrição, um exemplo disso, é a expressão de T-bet, a qual pode ser descrita em Treg, Tfh, Th17 e até mesmo em células Th2, apontando para a plasticidade destas células (19-21). Em modelos animais e *in vitro*, estudos têm sugerindo que células TCD4 podem exibir plasticidade, podendo mudar a expressão do fator de transcrição e conseqüentemente sua função efetora de produção de citocinas. Esta plasticidade pode ter um papel importante na modulação de doenças inflamatórias como a asma (22-25).

A plasticidade é ditada por influências ambientais. Como por exemplo, na asma a exposição à alérgenos/atopia, genética, idade, história de infecção, poluição ou até mesmo dieta pode afetar a natureza do desenvolvimento dos fenótipos de células T (26). Recentemente foi descrito um subtipo de células que co-expressa fator de transcrição GATA-3 e ROR γ t que está presente na resposta imune alérgica atuando na patologia pulmonar(23,27). Além disso, foi descrito que células CD4 com fenótipo Th2/Th17 está correlacionada com a severidade da asma (28).

Na asma quando falamos de resposta imune alérgica, mediada por Th2 e IgE, estamos nos referindo a asma atópica, mas a asma pode ser caracterizada como não atópica também. A asma não-atópica (intrínica) é similar à asma atópica em relação a sintomas, porém os pacientes asmáticos assim classificados apresentam testes negativos para atopia, e não apresentam clínica nem história familiar de atopia e tem baixos níveis de IgE (29-31). Além dessas características, os pacientes não-atópicos podem apresentar características celulares

distintas (30,32). Para se confirmar a presença de alergia, o procedimento de diagnóstico mais comum é o teste cutâneo específico (*Skin Prick*) e a avaliação da presença de IgE específica no soro do paciente (33).

O ácaro *Dermatophagoides sp.* é uma das fontes mais comuns de alérgenos em todo o mundo e considera-se que ele atinge mais de 15-20% da população dos países industrializados (34,35). Estudos experimentais sugerem que células Th2 específicas para HDM desempenham um papel central na resposta inflamatória alérgica induzindo a produção de IgE específica, recrutamento de eosinófilos nos tecidos, a produção de muco e a modulação do músculo liso das vias aéreas (36). Entretanto, poucas informações existem sobre o papel do HDM na plasticidade das células T CD4. Pensando no que vem sendo sugerido sobre a plasticidade na diferenciação das células T e no papel na modulação de doenças inflamatórias, nosso objetivo é caracterizar os subtipos e células T, por meio de seus fatores de transcrição em grupos de asmáticos não-atópicos, atópicos e grupo controle, bem como correlacionar com a severidade da asma das crianças.

Esta tese esta organizada em capítulos, sendo que o capítulo II e III é constituído por dois artigos originais. Os artigos originais foram compostos dos resultados obtidos durante todo o mestrado e doutorado da autora.

1.1 JUSTIFICATIVA

Células TCD4 específicas estão envolvidas na patogênese. As células T CD4 podem ter a plasticidade em relação aos seus fenótipos, a qual pode desempenhar um papel modulando as doenças inflamatórias como a asma. Sabe-se que os fatores de transcrição Tbet, GATA-3, ROR γ t e Foxp3, estão envolvidos na ativação de células T naive, em células Th1, Th2, Th17 e Treg, e que essas por sua vez estão envolvidas no processo de desenvolvimento da asma, bem como na sua severidade. Porém atualmente sabe-se que essas células não apresentam apenas um fator de transcrição e sim, dois, três e até quatro fatores.

Além disso, células co-expressando os fatores de transcrição GATA-3 e ROR γ t estão correlacionadas com a severidade da asma, quanto mais severa a doença maior o número destas células. Entretanto, ainda não foi avaliada a presença destes fenótipos na asma pediátrica severa, a asma de difícil controle (ADCs). Os mecanismos moleculares relacionados com o desenvolvimento destas células que expressam mais de um fator de transcrição ainda não foram estudados na asma. Uma hipótese seria que os alérgicos podem estar envolvidos com a estimulação e desenvolvimento destas células.

Deste modo, o estudo destes fatores de transcrição em pacientes com asma pediátrica pode trazer informações importantes quanto à classificação da severidade desta patologia. Além disso, o estudo dos mecanismos de como estas células são geradas na asma pode contribuir na descoberta de novos alvos terapêuticos para a asma pediátrica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os diferentes fenótipos de células TCD4 em uma população de crianças asmáticas atópicas e não-atópicas em idade escolar na cidade de Porto Alegre, bem como correlacionar com a severidade da doença comparando com crianças saudáveis.

1.2.3 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão dos fatores de transcrição (GATA-3, Tbet, ROR γ t e Foxp3) que controlam os fenótipos de células TCD4 no sangue periférico de crianças asmáticas comparando com crianças controles saudáveis;
 - Analisar a expressão dos fatores de transcrição (GATA-3, Tbet, ROR γ t e Foxp3) no sangue periférico de crianças asmáticas de acordo com a severidade da doença, incluindo o espectro mais grave da doença (crianças com asma de difícil controle) e crianças saudáveis, caracterizado as células que co-expressam dois, três ou quatro destes fatores;
 - Avaliar se o estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 ou proteína Derp1 do HDM pode modular a expressão dos fatores de transcrição nestas células.
-

1.3 REFERÊNCIAS

1. Magnus P, Jaakkola JJ. Secular trend in the occurrence of asthma among children and young adults: critical appraisal of repeated cross sectional surveys. *Bmj*. 1997;314(7097):1795-9.
2. Dehzad N, Bopp T, Reuter S, Klein M, Martin H, Ulges A, et al. Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2. *Journal of immunology*. 2011;186(4):2238-44.
3. Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(6):1165-74.
4. Sole D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. *Jornal de pediatria*. 2006;82(5):341-6. Epub 2006/09/05.
5. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(6):872-97.
6. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Current allergy and asthma reports*. 2011;11(5):388-94.
7. Durrant DM, Metzger DW. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. *Immunological investigations*. 2010;39(4-5):526-49. Epub 2010/05/11.
8. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. *Cell*. 2010;140(6):777-83. Epub 2010/03/23.
9. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine*. 2012;18(5):673-83.
10. Machura E, Mazur B, Rusek-Zychma M, Barc-Czarnecka M. Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. *Clinical & developmental immunology*. 2010;2010:606139. Epub 2011/01/05.
11. Malmhall C, Bossios A, Radinger M, Sjostrand M, Lu Y, Lundback B, et al. Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans--possible role in asthma. *PloS one*. 2012;7(6):e40012.
12. Loza MJ, Foster S, Bleeker ER, Peters SP, Penn RB. Asthma and gender impact accumulation of T cell subtypes. *Respiratory research*. 2010;11:103. Epub 2010/07/30.
13. Holt PG, Sly PD. Non-atopic intrinsic asthma and the 'family tree' of chronic respiratory disease syndromes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(6):807-11.
14. Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, de Klerk N, Suriyaarachchi D, et al. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response

- patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. 2005;365(9454):142-9.
15. Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1810(11):1066-79. Epub 2011/02/15.
 16. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):838-48. Epub 2010/11/10.
 17. Vale-Pereira S, Todo-Bom A, Geraldes L, Schmidt-Weber C, Akdis CA, Mota-Pinto A. FoxP3, GATA-3 and T-bet expression in elderly asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2011;41(4):490-6. Epub 2010/12/01.
 18. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011;66(8):989-98. Epub 2011/03/08.
 19. Koch MA, Thomas KR, Perdue NR, Smigiel KS, Srivastava S, Campbell DJ. T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor beta2. *Immunity*. 2012;37(3):501-10.
 20. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity*. 2009;31(5):772-86.
 21. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967-71.
 22. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
 23. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5969):1098-102. Epub 2010/02/27.
 24. Locksley RM. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(8):1643-6. Epub 2009/07/29.
 25. Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature immunology*. 2010;11(8):674-80. Epub 2010/07/21.
 26. Lloyd CM, Saglani S. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(5):1267-74; quiz 75.
 27. Wang YH, Voo KS, Liu B, Chen CY, Uygungil B, Spoeede W, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(11):2479-91.
-

-
28. Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, et al. Increased frequency of dual-positive T2/T17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014. Epub 2014/07/22.
 29. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*. 1999;54(3):268-72.
 30. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunology today*. 1999;20(11):528-33.
 31. Wuthrich B. Atopic dermatitis flare provoked by inhalant allergens. *Dermatologica*. 1989;178(1):51-3.
 32. Bottcher MF, Bjurstrom J, Mai XM, Nilsson L, Jenmalm MC. Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2003;14(5):345-50.
 33. Arshad SH, Tariq SM, Matthews S, Hakim E. Sensitization to common allergens and its association with allergic disorders at age 4 years: a whole population birth cohort study. *Pediatrics*. 2001;108(2):E33.
 34. Zock JP, Heinrich J, Jarvis D, Verlato G, Norback D, Plana E, et al. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: the European Community Respiratory Health Survey II. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(3):682-90.
 35. Arshad SH. Does exposure to indoor allergens contribute to the development of asthma and allergy? *Current allergy and asthma reports*. 2010;10(1):49-55.
 36. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):445-54.
-