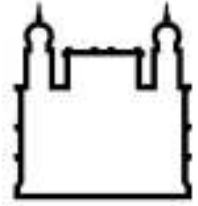




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER (NKT) DE INDIVÍDUOS
ASMÁTICOS DESAFIADAS COM ANTÍGENO SOLÚVEL DO OVO DE
*Schistosoma mansoni***

YURI TABAJARA PEREIRA COSTA DOS SANTOS

Salvador - Bahia

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PERFIL DAS CÉLULAS NKT DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS DESAFIADAS
COM ANTÍGENO SOLÚVEL DO OVO DE *Schistosoma mansoni***

YURI TABAJARA PEREIRA COSTA DOS SANTOS

Orientador: Ricardo Riccio Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237p Santos, Yuri Tabajara Pereira Costa dos.
Perfil das células T Natural Killer (NKT) de indivíduos asmáticos desafiadas com antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni*. / Yuri Tabajara Pereira Costa dos Santos. - 2016.
111 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2016.

1. Células T Natural Killer. 2. Asma. 3. *Schistosoma mansoni*. I.
Título.

CDU 616.248

“PERFIL DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER (NKT) DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS DESAFIADAS COM ANTÍGENO SOLÚVEL DO OVO DE *Schistosoma mansoni*”.

YURI TABAJARA PEREIRA COSTA DOS SANTOS


FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Salvador, 29 de abril de 2016



Dr. Alex José Leite Torres
Professor Assistente
UFBA



Dra. Natalia Machado Tavares
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ

À minha mãe,

Pelo amor e confiança incondicionalmente dedicados.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Amelita, minha maior fonte de inspiração e exemplo de caráter, por sua retidão e resiliência mesmo diante das maiores adversidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Riccio, pelas oportunidades, confiança e amizade depositadas no decorrer de todos esses anos, mostrando o exemplo pessoal e profissional que é, ao trabalhar com empenho e seriedade.

Ao ProAr – Núcleo de excelência em asma da Bahia, em especial ao Dr. Álvaro Cruz, Juliana Viana e Paula Almeida, pelo excelente trabalho prestado à população com asma.

Ao estimado Prof. Eustáquio L. Borges (*in memoriam*), pela grande amizade, por todos conselhos e bem-humorados puxões de orelha, pelo compartilhamento de ideais, de conhecimentos, experiências que levarei durante toda vida.

À Prof. Dra. Vera Vinhas, pelo direcionamento e incentivo iniciais.

Ao estimado amigo Michael Macedo, pelos anos de parceria, pelas enriquecedoras discussões e bons momentos de diversão.

À Laila Fagundes, pelo carinho, atenção e afeto dedicados, que tornam os dias mais agradáveis.

Aos queridos amigos João Pedro Andrade, Lara Muccini, Sayonara Melo, Priscila Guerra, Sânzio Santana, Amanda Catariny, Rômulo Rangel, Ellen Guerra, Lincoln Cardoso, Magnun Borges, Reinaldo Bispo, Luan Félix e Igor Sarmiento.

À Maria de Fátima e Bruno Coqueiro, pela amizade, carinho e agradável convívio diário.

Aos amigos do LACEI/LAPEX, em especial aos queridos Kelvin Edson e Ane Caroline Casaes.

À Robson de Souza, Tiago Landim, Tiago Marconi, Bruna Oliveira pelo auxílio durante a execução do trabalho.

À equipe da plataforma de Citometria de Fluxo, em especial a Liliane Monteiro e Rafaela Alves pelo auxílio durante a execução das aquisições.

À equipe da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ, em especial à Ana Fiscina Vaz.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a execução deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

“O que distingue o autodidata daquele que estudou não é a extensão dos conhecimentos, mas os diferentes graus de vitalidade e de confiança em si. ”

(Milan Kundera)

SANTOS, Yuri Tabajara Pereira Costa dos. Perfil das células T Natural Killer (NKT) de indivíduos asmáticos desafiadas com antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni*. 111 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiper-reatividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável e reversível ao fluxo aéreo. Apresenta manifestações clínicas na forma de sibilância, dispnéia, sensação de aperto no peito e tosse, podendo ser considerada como atópica ou não atópica, de acordo com seus aspectos imunopatogênicos. Células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e as células T *Natural Killer* (NKT), apresentam importante papel no desenvolvimento ou regulação da resposta inflamatória da asma. Desta forma é possível que antígenos com propriedades regulatórias, como no caso dos antígenos de ovo do *Schistosoma mansoni* (SEA), sejam capazes de alterar o perfil destas células e regular a resposta imune da asma. **OBJETIVOS:** Avaliar a frequência de NKT e expressão de moléculas de ativação e coestimulação, além de citocinas nestas células, em indivíduos com asma. **METODOLOGIA:** Trata-se de um estudo de corte transversal realizado com 24 voluntários, sendo 14 indivíduos asmáticos e 10 voluntários não asmáticos. Células mononucleares de sangue periférico (PNMC) foram separadas e incubadas por 14 horas com tetrâmeros de CD1d conjugados com α GalCer ou SEA. A expressão de marcadores de superfície e intracelulares foi analisada por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Não foi observada diferença na frequência de células NKT em culturas de PBMC não estimuladas, estimuladas com α GalCer ou SEA, nos grupos estudados, ou na expressão de CD69, CD28 e CD25 na superfície de células NKT nos diferentes grupos e em todas as condições testadas. Entretanto, a expressão de CD25 foi inferior nas células NKT de indivíduos com asma grave quando comparado com asma intermitente, em todas as condições testadas. A frequência de células NKT expressando CD279 após estímulo com α GalCer foi superior em indivíduos com asma intermitente, na comparação com controles sadios. Não foram observadas diferenças na expressão de IL-4, IL-13 e IL-17 em células NKT nos diferentes estímulos e grupos avaliados. A expressão de IFN- γ após estímulo com α GalCer ou SEA foi inferior em células NKT de indivíduos com asma intermitente quando comparados com controles sadio. Entretanto, a expressão de IFN- γ e IL-10 foi superior em células NKT de indivíduos com asma grave, após estímulo com SEA, quando comparado com asma intermitente. **CONCLUSÃO:** Nossos ensaios sugerem que as células NKT constituem uma população celular de difícil controle, haja vista sua capacidade de produzir tipos de citocina com efeitos teoricamente distintos. Este e outros estudos que contribuem para elucidar a resposta imunológica na asma auxiliam no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, que visem tanto o controle como as manifestações clínicas da doença.

Palavras-chave: NKT; Asma; *Schistosoma mansoni*; CD1d.

SANTOS, Yuri Tabajara Pereira Costa dos. Profile of Natural Killer T cells (NKT) of asthmatic individuals challenged with *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen. f 111 il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by hyperreactivity of lower airways and variable limitation and reversible airflow. The main clinical manifestations are wheezing, breathlessness, chest pain that feel like tightness and coughing, being considered as atopic or non-atopic, according to its immunopathogenic aspect. Immune cells, such as neutrophils, macrophages, dendritic cells and Natural Killer T cells (NKT) play an important role in the regulation or development of inflammatory response of asthma. Thus, it is possible that antigens with regulatory properties, such as *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen (SEA), are able to alter the profile of these cells and regulate the immune response of asthma. **AIM:** To evaluate the frequency of NKT cells, expression of activation and costimulatory markers, as well as cytokine expression in NKT cells from individuals with asthma. **METHODOLOGY:** This is a cross-sectional study of 24 volunteers, of which 14 were asthmatic and 10 non-asthmatic volunteers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated and incubated for 14 hours with CD1d tetramers conjugated with α GalCer or SEA. The expression of surface and intracellular molecules was analyzed by flow cytometry. **RESULTS:** No significant difference was observed in the frequency of NKT cells in unstimulated PBMC cultures or stimulated with α GalCer or SEA, in all groups, as well as in expression of CD69, CD28 and CD25 on surface of NKT cells in the different groups and in all tested conditions. However, CD25 expression was lower in NKT cells from individuals with severe asthma when compared with intermittent asthma in all tested conditions. The frequency of NKT cells expressing CD279 after stimulation with α GalCer was higher in subjects with intermittent asthma, compared to healthy controls. Regarding expression of cytokines, no significant differences were observed in expression of IL-4, IL-13 and IL-17 in NKT cells in different stimuli and groups. However, expression of IFN- γ following stimulation with α GalCer or SEA was lower in NKT cells of individuals with intermittent asthma compared to healthy controls. Moreover, IFN- γ and IL-10 expression was higher in NKT cells of patients with severe asthma, after stimulation with SEA, compared with intermittent asthma. **CONCLUSION:** Our data suggests that NKT cells are a cell population of difficult control, given its capacity to produce cytokines with, in theory, distinct effects. This and other studies that contribute to elucidate the immune response in asthma support the development of new therapeutic strategies targeting both the control and the clinical manifestations of the disease.

Key words: NKT; Asthma; *Schistosoma mansoni*; CD1d.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês, <i>Antigen Presenting Cells</i>)
BSA	Albumina Bovina Sérica (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	Grupamento de Diferenciação (do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i>)
CD1d-Empty	Tetrâmero CD1d com seu sítio de ligação vazio
CD1d-SEA	Tetrâmero CD1d conjugado ao antígeno Solúvel de Ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>
CD1d- α GalCer	Tetrâmero CD1d conjugado com o glicolípídeo α GalCer
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CTLA-4	Proteína-4 associada ao linfócito T citotóxico (do inglês, <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-associated protein 4</i>)
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECRHS	Inquérito de Saúde Respiratória da Comunidade Européia (do inglês, <i>European Community Respiratory Health Survey</i>)
Fc ϵ RII	Receptor de IgE de baixa afinidade
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Foxp3	Fator de transcrição da família <i>forkhead</i> expresso por células T (do inglês, <i>Forkhead box P3</i>)
GINA	Iniciativa Global para a Asma (do inglês, <i>Global Initiative for Asthma</i>)
ICOS	Coestimulador induzível de células T (do inglês, <i>Inducible T-cell Costimulator</i>)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina

ISAAC	Estudo internacional da asma em Crianças (do inglês, <i>International Study of Asthma in Childhood</i>)
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental
MFI	Intensidade Média de Fluorescência (do inglês, <i>Mean Fluorescence Intensity</i>)
MHC	Complexo principal de Histocompatibilidade (do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Célula T <i>Natural Killer</i>
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico (do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Tampão Salina-Fosfato (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
ProAr	Núcleo de Excelência em Asma
SDA	Solução de Diluição de Anticorpo
SEA	Antígeno Solúvel do ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> (do inglês, <i>Soluble Egg Antigen</i>)
ssRNAs	RNA de fita simples (do inglês, <i>single-stranded RNA</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de Células T (do inglês, <i>T cell Receptor</i>)
Th	Linfócito T auxiliador (do inglês, <i>T helper cell</i>)
TLR	Receptor do tipo Toll (do inglês, <i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)
α GalCer	alfa-Galactosilceramida

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estratégia para definição de população de células NKT. 37
- Figura 2.** Frequência de células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA. 40
- Figura 3.** Expressão de CD69 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA. 42
- Figura 4.** Expressão de CD28 em Células NKT em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas, estimuladas com CD1d conjugado com α GalCer ou SEA. 44
- Figura 5.** Expressão de CD279 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺CD279⁺) proveniente de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis após diferentes estímulos in vitro. 46
- Figura 6.** Expressão de CD279 em células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA. 48
- Figura 7.** Expressão de CD25 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺CD25⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA. 50
- Figura 8.** Expressão de CD25 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺CD25⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA. 52
- Figura 9.** Expressão de IFN- γ em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺IFN- γ ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA. 54
- Figura 10.** Expressão de IFN- γ em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺IFN- γ ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não

estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.	56
Figura 11. Expressão de IL-4 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-4 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.	58
Figura 12. Expressão de IL-4 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-4 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.	60
Figura 13. Expressão de IL-13 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-13 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.	62
Figura 14. Expressão de IL-13 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-13 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.	64
Figura 15. Expressão de IL-17 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-17 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.	66
Figura 16. Expressão de IL-17 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-17 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma persistente grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.	68
Figura 17. Expressão de IL-10 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-10 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.	70
Figura 18. Expressão de IL-10 em Células NKT (CD3 ⁺ CD19 ⁻ V α 24J α 18 ⁺ IL-10 ⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	ASMA.....	16
2.2	CLASSIFICAÇÃO DA ASMA.....	17
2.2.1	<i>GINA – Global Initiative for Asthma</i>	17
2.2.2	<i>Diretrizes Brasileiras</i>	18
2.3	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	21
2.4	IMUNOPATOGENESE DA ASMA	22
2.5	CÉLULAS NKT E SUA PARTICIPAÇÃO NA ASMA.....	24
2.6	CONTROLE DA ASMA POR HELMINTOS	27
3	JUSTIFICATIVA	28
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	DESENHO DE ESTUDO	31
5.2	ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	31
5.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	32
5.4	COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO, SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E CULTURA CELULAR	33
5.5	CONJUGAÇÃO DO TETRÂMERO CD1D-EMPTY COM SEA.....	34
5.6	MARCAÇÃO CELULAR E AQUISIÇÃO EM CITÔMETRO DE FLUXO ..	34
5.7	ESTRATÉGIA PARA DEFINIÇÃO DE POPULAÇÃO.....	37
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6	RESULTADOS	38
6.1	CARACTERÍSTICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	38
6.2	FREQUÊNCIA DE CÉLULAS NKT.....	39
6.3	EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS NKT	41
6.4	EXPRESSÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS EM CÉLULAS NKT ..	53
7	DISCUSSÃO	73
8	SUMÁRIO DE RESULTADOS	82
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83

10	REFERÊNCIAS	84
	ANEXOS	102
	Anexo 1. Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos.	102
	Anexo 2. Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.	103
	Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo asmático.	106
	Anexo 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo sadio.	109

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias apresentam-se, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2014), como uma das principais causas de morte na última década, sendo que ainda permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo (SCHLUGER e KOPPAKA, 2014). Estima-se que 200 a 250 mil indivíduos morram todos os anos acometidos pela asma e que estes números aumentem, tendo em vista que a maioria dos casos de morte ocorram em países não desenvolvidos (ANANDAN *et al.*, 2010; PAPADOPOULOS *et al.*, 2012).

A partir da publicação da hipótese da higiene e de suas atualizações (STRACHAN, 1989; YAZDANBAKHSI *et al.*, 2002), novos panoramas puderam ser traçados, mostrando como as interações ambientais e imunológicas do indivíduo podem afetá-lo, permitindo então que estudos que observassem a interação entre parasitos e seres humanos fossem realizados. De acordo com OLIVEIRA *et al.* (2009), a infecção por *Schistosoma mansoni* altera a expressão de moléculas coestimulatórias em células T, bem como sua ativação na asma. Outro estudo do mesmo grupo demonstra que o *S. mansoni* também estimula a produção de citocinas que regulam negativamente a resposta inflamatória na asma (CARDOSO *et al.*, 2006). Estas observações foram possíveis por que a infecção por geohelminthos, mais especificamente o *S. mansoni* induz uma resposta imune regulatória, devido ao constante estímulo induzido pelo parasita.

Apesar destes estudos enfatizarem especialmente a participação da resposta imune adaptativa na associação entre infecção pelo *Schistosoma* e asma, com a participação de células T e B (OLIVEIRA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010), pouca atenção é dada para resposta imune inata e para a sua possível proteção, tendo sido focada principalmente para a ação das células dendríticas, por um grupo da China (LIU *et al.*, 2010; LIU, J. Y. *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014)

Dessa forma, estudos que elucidem os mecanismos celulares e moleculares das respostas imunes associadas às inflamações respiratórias, como a asma, e suas associações com as doenças infecciosas e/ou parasitárias podem ser de grande valia para a manutenção e tratamento da população afetada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ASMA

A asma é uma comum doença respiratória inflamatória crônica, caracterizada por hiper-reatividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável e reversível ao fluxo aéreo. Estima-se que mais de 300 milhões de indivíduos, de diversas idades e etnias, sejam acometidos pela doença e que a asma cause mais de 340 mil mortes por ano, em diversas regiões do mundo (MASOLI *et al.*, 2004; BOUSQUET *et al.*, 2010; LOZANO *et al.*, 2012).

Suas manifestações clínicas apresentam-se por meio de episódios recorrentes de sibilância, dispneia, sensação de aperto no peito e tosse, que ocorrem particularmente à noite e pela manhã, ao despertar (SBP *et al.*, 2006).

A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma e o seu diagnóstico é dado com base na história clínica do paciente e exame físico. Alguns exames complementares, a exemplo da prova de função pulmonar, podem auxiliar o diagnóstico e definir a gravidade da doença (ASBAI/SBPT/SBP, 2006; NIH, 2007; PAPADOPOULOS *et al.*, 2012).

Não obstante a existência de muitos estudos determinando a prevalência de asma em determinadas regiões ou países, a grande maioria não pode ser utilizado para fornecer a real noção da prevalência de asma no mundo, principalmente, devido à falta de padronização na metodologia e nas definições de caso.

Duas iniciativas foram pioneiras ao realizar estudos em diversos países sobre a alergia e asma utilizando-se de protocolos padronizados. O primeiro estudo a apresentar uma metodologia mais adequada para este fim foi o “European Community Respiratory Health Survey” (ECRHS), tendo sua primeira fase iniciada na década de 1980, devido ao aumento da preocupação relativa à elevação da prevalência dos casos de asma no mundo, que avaliou a prevalência de asma e rinite alérgica em adultos jovens, de 20 a 44 anos de idade, provenientes de 48 centros localizados em 22 países, dos quais apenas seis não pertenciam à Europa Ocidental (BURNEY *et al.*, 1994; ECRHS, 1996; BURNEY *et al.*, 1997; ECRHS, 2012; CROISANT, 2014). Apesar da metodologia adequada, os resultados deste estudo ainda não permitiram que informações relativas à prevalência mundial de asma fossem geradas, visto que os dados se referem quase que exclusivamente à Europa. Desta forma, o

“International Study of Asthma and Allergies in Childhood” (ISAAC) elaborou, em seguida, questionários padronizados com o objetivo de permitir comparações da prevalência de asma, rinoconjuntivite alérgica e eczema atópico em populações de diferentes países, além de avaliar a variação da prevalência com o passar do tempo (ASHER *et al.*, 1995; ELLWOOD *et al.*, 2005).

De forma geral e levando-se em consideração importantes exceções, pode-se afirmar que os maiores índices de prevalência de asma são encontrados em países desenvolvidos, como Austrália, Estados Unidos e Canadá, enquanto as menores taxas são encontradas em países ainda em desenvolvimento, como a Índia, China e Indonésia, onde há elevada prevalência de doenças bacterianas e parasitárias (ISAAC, 1998). De acordo com o estudo ISAAC a prevalência média de sintomas de asma no Brasil entre crianças de 6-7 e 13-14 anos de idade foi respectivamente 24,3 e 19,0% (SOLE *et al.*, 2006).

2.2. CLASSIFICAÇÃO DA ASMA

Houveram, no decorrer do tempo, diversas tentativas de classificar a asma, sendo que as principais classificações baseiam-se na gravidade da doença. Não obstante, a severidade não deve ser tomado como uma característica fixa da doença, haja vista que esta não é estática, podendo alterar-se com o passar do tempo. Ainda assim, algumas organizações internacionais tem se organizado, para uma melhor classificação da asma, dentre elas destacam-se a classificação da Iniciativa Global para Asma (GINA) e, em nosso meio, as Diretrizes Brasileira para o manejo da asma.

2.2.1. GINA – *Global Initiative for Asthma*

Estabelecida em 1993, em colaboração com órgãos como o NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute) e WHO (World Health Organization) teve sua primeira publicação em 1995. A GINA (Global Initiative for Asthma) tem objetivado a disseminação de informações relativas ao manejo e ao tratamento da asma, provendo mecanismos que transformem o conhecimento científico em prol da melhora dos cuidados na asma (REDDEL *et al.*, 2015).

Considerando suas características individuais, que a distingue de outras doenças, a GINA descreve a asma como uma doença heterogênea, que se caracteriza pela inflamação crônica das vias aéreas, sendo definida pelo histórico de sintomas respiratórios que vão de chiado a sensação de aperto no peito, falta de ar e tosse, que variam de acordo com o tempo e a intensidade, classificando os subtipos de asma, de acordo com o fenótipo apresentado (ASTHMA, 2014).

Dentre os diversos fenótipos de asma identificados, a GINA utiliza cinco mais comuns para a definição dos quadros de asma. Estes fenótipos incluem: 1) asma atópica, que afeta mais frequentemente crianças, sendo facilmente reconhecível e que responde bem ao tratamento com corticoides inalatórios; 2) asma não alérgica, que como o nome propõe, não se relaciona com alergia, não respondendo bem aos corticoides inalatórios; 3) asma de início tardio, que afeta adultos, particularmente mulheres e que assim como a anterior não apresenta base alérgica e por esse motivo necessita de altas doses de corticoides inalatórios, mostrando-se eventualmente refratária ao tratamento; 4) asma com limitação fixa do fluxo aéreo, onde alguns pacientes com asma de longa duração desenvolvem limitação fixa do fluxo aéreo, causada pelo remodelamento das paredes das vias aéreas; e 5) a asma associada à obesidade, onde os indivíduos obesos e asmáticos apresentam sintomas respiratórios proeminentes, com pouca inflamação eosinofílica (BEL, 2004; MOORE *et al.*, 2010).

Alguns tratamentos direcionados ao fenótipo da asma estão disponíveis, ainda que, até o momento não se tenha encontrado nenhuma relação entre as características e os padrões clínicos específicos de resposta ao tratamento, havendo necessidade de mais estudos a respeito da classificação fenotípica na asma.

2.2.2. Diretrizes Brasileiras

As IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma classificam a asma de acordo com sua gravidade, visando principalmente seu controle. Com a definição da gravidade, pode-se determinar o medicamento que será utilizado, bem como a dose a ser administrada, de forma que o paciente apresente controle da doença no menor espaço de tempo possível. As diretrizes ainda classificam a gravidade da asma como: 1) intermitente; 2) leve; 3) persistente moderada; e 4) grave. Estima-se que a

distribuição da asma sejam de 60% intermitente ou persistente leve, 25 a 30% moderados e 5 a 10% graves (ASBAI/SBPT/SBP, 2006).

Tendo como base a GINA (2006), as Diretrizes Brasileiras determinaram fatores como a análise da frequência, intensidade dos sintomas e função pulmonar utilizados para definir a gravidade da asma. A tolerância ao exercício, o conjunto de medicamentos utilizados para se estabilizar os sintomas, bem como o número de cursos anuais de corticoides sistêmicos e de hospitalizações por asma, além da necessidade de ventilação mecânica, também são fatores para a classificação da gravidade dos casos da doença. Dessa forma, parâmetros que variam das exacerbações da asma, limitações de atividades, necessidade de beta-2 agonistas inalatórios de curta duração e avaliações expiratórias como a do volume expiratório forçado e do pico de fluxo expiratório são avaliados para determinar a gravidade da doença (ASBAI/SBPT/SBP, 2006)

A combinação destes parâmetros, como a gravidade dos sintomas e a limitação ao fluxo de ar, podem ser utilizados como forma de se definir a gravidade da doença. Entretanto, se o indivíduo apresentar boa responsividade a baixas doses do medicamento utilizado, pode ser classificado como menos grave do que inicialmente, desta forma, mostra-se necessária a periódica avaliação do quadro de asma, buscado a melhor estratégia terapêutica possível (Quadro1).

Quadro 1. Classificação da gravidade da asma*.

	Intermitente**	Leve	Persistente moderada	Grave
Sintomas	Raros	Semanais	Diários	Diários ou contínuos
Despertares Noturnos	Raros	Mensais	Semanais	Quase diários
Necessidade da utilização de β-2	Rara	Eventuais	Diária	Diária
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente nas Exacerbações	Presente nas Exacerbações	Contínua
Exacerbações	Raras	Afeta a atividade e o sono	Afeta a atividade e o sono	Frequentes
VEF₁ ou PFE	$\geq 80\%$ Predito	60-80% Predito	60-80% Predito	$\leq 60\%$ Predito
Varição VEF₁ ou PFE	< 20%	< 20-30%	>30%	>30%

*Adaptado de ASBAI/SBPT/SBP (2006)

**Indivíduos com asma intermitente, mas que apresentem exacerbações graves, são classificados com asma persistente moderada

VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE: Pico de Fluxo expiratório.

2.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O tratamento farmacológico na asma busca atenuar suas manifestações, além de evitar as exacerbações da doença. O uso de corticosteroides inalatórios ou orais é indicado para o controle de sintomas, com o intuito de preservar a função pulmonar do indivíduo a longo prazo, além do uso, no caso dos glicocorticoides orais, nas exacerbações e como pré-tratamento do bronco espasmo.

Beta-agonistas de ação prolongada também podem ser utilizados no tratamento da asma, em associação com os corticosteroides inalatórios. Antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos são administrados em substituição aos beta-agonistas de ação prolongada e associados aos corticosteroides inalatórios para alguns indivíduos com asma persistente. Uma outra opção para o tratamento da asma é a imunoterapia, onde alérgenos específicos são administrados fora da crise aguda com o intuito de estimular a tolerância do indivíduo. Recentemente, novas drogas tem sido desenvolvidas, dentre elas o Omalizumab (ASBAI/SBPT/SBP, 2006).

Omalizumab é o mais avançado anticorpo monoclonal anti-IgE humanizado desenvolvido e aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) em 2003 e pela European Medicine Agency (EMA) em 2005, para o tratamento de asma crônica e urticária, como alternativa aos medicamentos esteroides utilizados (HECK *et al.*, 2016). Utilizado no tratamento de doenças respiratórias alérgicas, se liga especificamente à IgE que se encontra livre na circulação, interrompendo a cascata alérgica e prevenindo a ligação da IgE livre com o receptor FcεRI dos mastócitos, células apresentadoras de antígenos (APCs) e outras células inflamatórias, além de reduzir a expressão de FcεRI em basófilos e células dendríticas (CHANEZ *et al.*, 2010). Reduz a níveis basais as exacerbações da asma em indivíduos com asma alérgica indivíduos com asma alérgica, diminuindo a necessidade de utilização de corticoides inalatórios (HUMBERT *et al.*, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2013; LICARI *et al.*, 2015).

2.4. IMUNOPATOGÊNESE DA ASMA

Dentre as diversas classificações da asma, a que a classifica em atópica ou não atópica, leva em consideração aspectos da imunopatogênese da asma. A atopia pode ser definida como a predisposição genética para manifestação de doenças alérgicas, caracterizada pelo aumento dos níveis de IgE específica para alérgenos, bem como de eosinófilos e mastócitos, sendo a base de doenças alérgicas como a asma, rinoconjuntivite e o eczema atópico (YAZDANBAKSHI *et al.*, 2002; NIH, 2007). A asma atópica cursa com resposta inflamatória e hiper-reatividade brônquica, envolvendo diversos tipos celulares, dos quais os mais importantes são as células T CD4⁺ do tipo Th2, mastócitos, basófilos e eosinófilos (YSSEL *et al.*, 2001).

No processo de hipersensibilidade imediata, a sequência típica de eventos consiste na exposição do indivíduo a alérgenos ambientais, interação com o sistema inato por meio das células apresentadoras de antígenos (APCs), seguido da ativação de células Th2 específicas para esse antígeno, com a consequente produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (BLACKBURN *et al.*, 2003).

A IL-4 estimula a produção de IgE, que liga-se à receptores de alta afinidade para porção Fc de IgE (FcεRI) presentes nos mastócitos e basófilos, que em contato subsequente com o alérgeno, promovem a liberação de mediadores da inflamação, como histamina, leucotrienos e prostaglandinas (HAILE *et al.*, 1999).

As citocinas IL-4 e IL-13 estão associadas com a estimulação da produção de IgE, expressão do FcεRII, receptor de IgE de baixa afinidade, e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, regulação de moléculas de adesão vascular nos eosinófilos, mastócitos e basófilos, além da estimulação da produção de quimiocinas.

Além das citocinas citadas acima, a IL-5 também apresenta importante papel no recrutamento, ativação e sobrevivência dos eosinófilos, células com funções pleiotrópicas, que atuam de forma central na resposta imune da asma (MUKHERJEE *et al.*, 2014)

A IL-9 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos, sendo um fator de crescimento de células T e de mastócitos (UYTTENHOVE *et al.*, 1988; RENAULD *et al.*, 1990; HULTNER *et al.*, 2000; KAPLAN *et al.*, 2015; ROJAS-ZULETA e VASQUEZ, 2016). A ação dos mediadores inflamatórios liberados ou ativados pelos mastócitos e basófilos, a exemplo da histamina, prostaglandinas, leucotrienos e fator

de agregação plaquetária são importantes na fisiopatologia das fases imediata e tardia das doenças atópicas (HOLGATE *et al.*, 1985; PLATTS-MILLS e WHEATLEY, 1996). Estes mediadores inflamatórios atuam causando broncoconstrição imediata, no caso da histamina, através dos receptores H1, além de estar correlacionada com a hiperreatividade brônquica e com a gravidade da asma, além de aumentarem a permeabilidade vascular, como ocorre com os leucotrienos e com as prostaglandinas, sinalizando e amplificando a inflamação por meio da ativação de células vizinhas, além de atuarem recrutando eosinófilos e neutrófilos, por exemplo (KRYSTEL-WHITTEMORE *et al.*, 2015; MODENA *et al.*, 2016), além de apresentarem influências para o bronco-espasmo (KRYSTEL-WHITTEMORE *et al.*, 2015)

Além das células T CD4⁺ do tipo Th2, subpopulações de células Th17 ativadas, capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL8, parecem ser importantes para a inflamação neutrofílica presente no processo inflamatório agudo das vias aéreas observado na asma alérgica (HOSHINO *et al.*, 2000; NAKAE *et al.*, 2002; HELLINGS *et al.*, 2003; PRAUSE *et al.*, 2004; HASHIMOTO *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010). A IL-17 atua em sinergia com outras citocinas Th17, como a IL-6 para induzir a produção de muco, ou em conjunto com IL-1 e TNF- α para aumentar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HONORATI *et al.*, 2004).

Estes dados, juntamente com estudos que demonstram que a administração de células Th1 produtoras de IFN- γ , em modelos murinos de inflamação alérgica, causa uma intensa inflamação neutrofílica das vias aéreas; reforça a ideia de que a regulação do sistema imune nas doenças inflamatórias alérgicas não resulta de um simples desequilíbrio entre as presenças de subpopulações de células T (HANSEN *et al.*, 1999; RANDOLPH *et al.*, 1999).

Desta forma, outras células do sistema imune, incluindo o sistema imune inato, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e as células T *Natural Killer* (NKT), devem apresentar papel importante no desenvolvimento ou regulação da resposta inflamatória da asma.

2.5. CÉLULAS NKT E SUA PARTICIPAÇÃO NA ASMA

As células NKT consistem em uma população de linfócitos caracterizada pela expressão de marcadores clássicos de células Natural Killer (NK), como CD56, NK1.1, NKR-P1A (CD161), bem como pela expressão de marcadores de superfície normalmente associados a células T (ativadas/memória) (KRONENBERG e GAPIN, 2002; SCHUMANN *et al.*, 2003), uma cadeia alfa invariante do TCR (TCR α) pareada com uma cadeia beta semi-invariante do TCR (TCR β), com a capacidade de reconhecer antígenos lipídicos apresentados pela molécula CD1d, semelhante ao complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I), presente nas células apresentadoras de antígenos.

Em murinos, a grande maioria das células NKT é composta por um TCR $\alpha\beta$ semi-invariante composto por uma cadeia α invariante V α 14-J α 18 (V α 14i) pareada preferencialmente à uma e uma cadeia V β 8.2, V β 7 ou V β 2. Em humanos as cadeias equivalentes a estas são a V α 24-J α 18 e V β 11 (SCHUMANN *et al.*, 2003)

As células T Natural Killer (NKT) são encontradas em abundância no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos saudáveis, no nascimento, não necessitando de estimulação adicional para o reconhecimento de antígeno específico, para atacar e destruir células alvo, como ocorre com as células T e B (BELLANTI e SETTIPANE, 2013).

Podem ser diferenciadas de acordo com o tipo de receptores que expressam em sua superfície, característica que influencia diretamente na sua função e no tipo de resposta destas células. Os principais tipos de células NKT são:

- a) NKT clássicas (ou invariantes), também chamadas de NKT tipo 1 (dependentes de CD1d);
- b) NKT tipo 2, também dependentes de CD1d;
- c) NKT-like, células T independentes de CD1d, que variam amplamente de função.

Células NKT Tipo I, ou células NKT invariantes (NKT) expressam a cadeia alfa do TCR invariante (V α 14-J α 18 em camundongos e V α 24-J α 18 em humanos), associada a uma cadeia beta com repertório limitado (V β 8, V β 7 e V β 2 em camundongos e V β 11 em humanos) (BELLANTI e SETTIPANE, 2013). Células NKT

respondem a antígenos glicolipídicos apresentados pela molécula não-polimórfica CD1d, semelhante ao MHC classe I. Em mamíferos, as células NKT apresentam grande afinidade e reconhecem α -galactosilceramida (α -GalCer), um glicolípido derivado de uma esponja marinha (KAWANO *et al.*, 1997; SPADA *et al.*, 1998). As células NKT Tipo II também são restritas a antígenos glicolipídicos apresentados pela molécula CD1d, apesar de não reconhecerem o α -GalCer, entretanto, elas expressam TCR não-invariante (GODFREY *et al.*, 2010).

Além dos TCRs conservados, as células NKT expressam ainda outros receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como os Toll Like Receptors (TLR), dentre os quais destaca-se o TLR7, que age como um sensor de RNA de fita simples (ssRNAs) e compostos da família da imidazoquinolina, como o R848 (JURK *et al.*, 2002; HEIL *et al.*, 2004). Em modelo animal, tem sido demonstrado que a estimulação do TLR7 não apresenta apenas resposta antiviral, mas também efeito protetor contra o desenvolvimento da asma, o qual é mediado principalmente via produção de IFN- γ (CAMATEROS *et al.*, 2007; GRELA *et al.*, 2011). Além deste, foi demonstrado recentemente que agonistas dos receptores TLR4, TLR5 e TLR9 também inibem a ativação de células NKT das vias aéreas por meio de um mecanismo dependente da presença de IL-12 (SHIM *et al.*, 2012).

Desta forma, o TCR invariante e conservado das células NKT parece apresentar função de receptor de reconhecimento padrão, sugerindo que as células NKT atuam como componentes da resposta imune inata (SCOTT-BROWNE *et al.*, 2007). A ativação de células NKT requerem ao menos dois sinais distintos das células apresentadoras de antígenos (APC). O primeiro é um sinal de ativação inicial fornecido pela interação do TCR com o complexo CD1d. O segundo sinal é fornecido por moléculas coestimulatórias presentes na superfície de APCs e seus ligantes estimuladores (CD28 e ICOS) e inibidores (CTLA-4 e PD-1) nas células NKT. O receptor PD-1 tem dois ligantes conhecidos: PDL1 e PDL2. A ligação de PD-1 com PDL1 gera um forte sinal inibidor para as células NKT (LARRUBIA *et al.*, 2009; DURGAN *et al.*, 2011; LARRUBIA *et al.*, 2011). Recentemente foi demonstrado que o bloqueio da ligação entre PD-1 e PDL1 permite o restabelecimento da função de células NKT anérgicas, o que indica que a via PD-1/PDL1 é o fundamental para gerar anergia de células NKT (CHANG *et al.*, 2008; AKBARI *et al.*, 2010).

Após sua ativação, as células NKT secretam rapidamente quimiocinas e citocinas tanto do tipo Th1 quanto do tipo Th2, as quais podem então ativar células

dendríticas, macrófagos, células NK, células T, células B, e direcionar a resposta imune adaptativa (BENDELAC *et al.*, 2007). As células NKT apresentam ainda características de células NK, produzindo perforina e granzima B (KAWANO *et al.*, 1999; TANIGUCHI e NAKAYAMA, 2000; METELITSA *et al.*, 2001).

As células NKT podem ainda ser categorizadas em CD4⁺ ou duplo-negativa (CD4⁻CD8⁻; DN), sendo as CD4⁺ maiores produtoras de IL-4 e IL-13 do que as células NKT duplo-negativa. Células NKT duplo-negativa são boas produtoras de IL-17 e IL-22, as quais podem ter importante papel nos pulmões, aumentando a resposta imune inflamatória, por meio do aumento destas citocinas. Adicionalmente, células NKT em contato com TGF- β passam a expressar Foxp3 e produzir IL-10, apresentando perfil regulatório tanto para resposta Th1, quanto para resposta Th2 envolvida na asma (MOREIRA-TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Alguns estudos tem sido realizados na tentativa de identificar o papel das células NKT nas doenças alérgicas. Camundongos deficientes em células NKT apresentam menor inflamação das vias aéreas após desafio com ovalbumina (OVA). Apesar disso, a administração de IL-13 exógena para camundongos deficientes da molécula CD1d é capaz de induzir a hiperresponsividade das vias aéreas, sugerindo que estes animais não apresentam uma inabilidade intrínseca de desenvolvimento de inflamação das vias aéreas (AKBARI *et al.*, 2003; LISBONNE *et al.*, 2003). Adicionalmente, camundongos deficientes em células NKT são capazes de desenvolver normalmente a resposta Th2 (SMILEY *et al.*, 1997), indicando que estas células não são essenciais para o desenvolvimento da resposta Th2 e que as células Th2 apenas não são suficientes para o desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas (AKBARI *et al.*, 2003; LISBONNE *et al.*, 2003).

Ainda em modelo animal, foi demonstrado que as células NKT participam também da colaboração com as células B-1, que têm papel importante no recrutamento de células T efectoras, através da produção rápida de IL-4, em modelo de sensibilização de contato (CAMPOS *et al.*, 2006).

O papel de células NKT na asma humana ainda é controverso. Enquanto alguns autores observaram a presença destas células no pulmão de pacientes com asma (SEN *et al.*, 2005; AKBARI *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008; MATANGKASOMBUT *et al.*, 2009), outros não encontraram associação entre a presença destas células e o desenvolvimento da asma (THOMAS *et al.*, 2006; BRATKE *et al.*, 2007; MUTALITHAS *et al.*, 2007; VIJAYANAND *et al.*, 2007). Entretanto, um estudo recente demonstrou

maior frequência de células NKT em lavado broncoalveolar de pacientes com asma grave ou asma controlada, quando comparado com controles não-asmáticos (MATANGKASOMBUT *et al.*, 2009). Portanto, o controle da ativação ou direcionamento destas e de outras células do sistema imune pode contribuir para a redução das manifestações clínicas da asma.

2.6. CONTROLE DA ASMA POR HELMINTOS

Os mecanismos regulatórios capazes de modular o processo inflamatório na asma vêm sendo estudados e alguns trabalhos sugerem que infecções por helmintos são capazes de prevenir e/ou controlar a exacerbação da resposta do tipo Th2 associada à patogênese das atopias. Embora doenças alérgicas e infecções por helmintos estejam associadas à estimulação da produção de células com perfil do tipo Th2, existem evidências de que nas helmintíases crônicas, principalmente na esquistossomose, a resposta do tipo Th2 é dita “modificada”, sendo um misto de resposta Th2 e regulatória (VAN DEN BIGGELAAR *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2004).

As infecções por helmintos, altamente prevalentes em vários países do mundo, vêm tornando-se objeto de interesse entre os imunologistas, especialmente o *Schistosoma mansoni*, por apresentarem duas características dominantes: primeiro, elas são indutoras eficientes de resposta imune do tipo Th2 (WILLIAMS *et al.*, 1994; ARAUJO *et al.*, 1996; CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1998), representando um modelo de resposta imunológica polarizada deste tipo, e segundo, sendo parasitas bem adaptados ao homem, as infecções são crônicas e de longa duração, causando modulação da resposta imune devido, dentre outros aspectos, à indução de uma resposta reguladora. Na esquistossomose ocorre produção elevada de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas do tipo Th2 e, conseqüentemente, produção de altos níveis de IgE, aumento no número de eosinófilos e mastócitos, além de produção de IL-10, uma citocina regulatória da resposta imune. Em estudos experimentais, a infecção pelo *S. mansoni* previne o desenvolvimento de diabetes tipo I em camundongos geneticamente susceptíveis (DUNNE *et al.*, 1992), de encefalomielite experimental autoimune (LA FLAMME *et al.*, 2003) e de asma (KITAGAKI *et al.*, 2006).

Estudos realizados em populações residentes em áreas endêmicas para esquistossomose, demonstraram que indivíduos infectados pelo *S. mansoni*

apresentam resposta diminuída aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos (ARAUJO *et al.*, 2000) e não desenvolvem asma grave (MEDEIROS *et al.*, 2003). O papel que monócitos e células T CD4 e CD8 exercem na inibição da resposta inflamatória alérgica nesses indivíduos vem sendo estudado pelo grupo de pesquisadores do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, e estes estudos indicam que a IL-10 desempenha um papel importante nesse processo (ARAUJO *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011). Muitos dos antígenos que induzem a produção de IL-10 *in vitro* estão presentes no ovo do *S. mansoni*, sendo que não apenas células T contribuem para a secreção desta citocina, como também células do sistema imune inato, como monócitos, também são importantes fontes produtoras desta citocina (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Desta forma, é possível que antígenos do ovo de *S. mansoni*, sejam também capazes de induzir um perfil regulatório em outras células do sistema imune inato, como as células NKT.

Considerando a elevada frequência de infecção por helmintos, é provável que muitos dos indivíduos infectados, também sejam expostos a outras infecções ou doenças. O questionamento existente é: como a infecção crônica pelo *S. mansoni*, cursa com uma resposta imune altamente polarizada para o tipo Th2, poderia interferir na resposta imune e no curso clínico de outra doença concomitante que também induz uma resposta do tipo Th2?

3. JUSTIFICATIVA

A participação das células NKT, que são ativadas por glicolipídeos, e importantes em direcionar a resposta imune adaptativa, não vem sendo estudada no que diz respeito à possível modulação da resposta inflamatória alérgica que pode ser induzida por antígenos com propriedade imunorregulatórias, com os do ovo do *S. mansoni*.

O *S. mansoni* é capaz de sintetizar uma variedade de glicoconjugados, incluindo glicoproteínas e glicolipídeos, muitos dos quais são também expressos pelo hospedeiro. Estes conjugados exercem importante papel na relação entre parasita e hospedeiro, induzindo tanto a resposta imune humoral quanto celular (HOKKE e

YAZDANBAKHSI, 2005; VAN DIE e CUMMINGS, 2006). A caracterização dos glicolipídeos do ovo do *S. mansoni* demonstrou que uma série de glicoesfingolipídios multifucosilados constituem o seu principal glicolipídeo (KHOO *et al.*, 1997). Apesar dos glicolipídeos extraídos do ovo ou do verme adulto do *S. mansoni* serem capazes de induzir tanto resposta imune pró-inflamatória quanto anti-inflamatória por células mononucleares do sangue periférico (VAN DER KLEIJ *et al.*, 2002), ainda não foi avaliado o papel destes antígenos na ativação das células NKT de indivíduos asmáticos.

As células NKT parecem exercer importante papel durante o curso da infecção pelo *S. mansoni*, visto que foi demonstrado que a molécula CD1d é fundamental na indução da resposta Th2 durante o curso da infecção em modelo murino (FAVEEUW *et al.*, 2002). Além disso, a imunização de camundongos diabéticos não obesos com antígenos do ovo do parasita é capaz de expandir a população de células NKT e induzir uma resposta Th2 que previne o desenvolvimento de diabetes tipo 1 (ZACCONE *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou na esquistossomose murina a presença de células NKT hepáticas ativadas e produtoras de IL-4 e IFN- γ (MALLEVAEY *et al.*, 2006).

Como revisado neste trabalho, a infecção por helmintos, particularmente pelo *S. mansoni*, ou ainda por produtos destes, apresenta a capacidade de modular a resposta imune alérgica. Os mecanismos desta regulação ainda não foram completamente descritos, e, possivelmente, envolve diferentes tipos celulares, incluindo as células NKT.

Portanto, é possível que antígenos de ovo de *S. mansoni*, que apresentam em sua composição glicolipídeos, e que são capazes de induzir resposta regulatória, estimulem as células NKT, para induzir um perfil imunológico de células regulatórias. Como as células NKT fazem parte do sistema imune inato, esta estimulação pode ocorrer inclusive com células de indivíduos que nunca foram infectados ou expostos a antígenos de *S. mansoni*. Estes resultados poderão auxiliar no melhor entendimento sobre a participação das células NKT na asma, além de apresentar, pela primeira vez, como as células NKT comportam-se quando são expostas aos antígenos de *S. mansoni*, já que a maioria dos estudos anteriores faz estimulação apenas com α GalCer. Estes conhecimentos podem contribuir, no futuro, para a descrição de novas alternativas terapêuticas para a asma, uma doença que ainda hoje é de difícil controle.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do uso do antígeno solúvel de ovo do *Schistosoma mansoni* (SEA) ligado ao tetrâmero CD1d na frequência e fenótipo de células NKT de sangue periférico de indivíduos asmáticos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, em indivíduos asmáticos e controle sadios:

- i. A frequência de células NKT em sangue periférico;
- ii. A expressão de molécula de ativação (CD69), coestimulatória (CD28 e CD279) e regulatória (CD25), em células NKT incubadas com tetrâmero CD1d ligado a α GalCer ou ao SEA;
- iii. O perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4 e IL-13), Th17 (IL-17A) e regulatório (IL-10) em células NKT incubadas com tetrâmero CD1d ligado a α GalCer ou ao SEA.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal realizado com 24 voluntários, sendo 14 indivíduos asmáticos (07 acometidos com asma intermitente leve e 07 com asma grave) atendidos pelo Núcleo de Excelência em Asma da Universidade Federal da Bahia (ProAr-UFBA), além de 10 voluntários não asmáticos, sem outras doenças crônicas, chamados neste trabalho de “controles sadios”.

Tomando como base os dados de YAN-MING *et al.* (2012), onde foi demonstrado que a frequência de células NKT em sangue periférico de indivíduos com asma foi de $0,051 \pm 0,041\%$, enquanto controles saudáveis apresentaram frequência superior ($0,135 \pm 0,061\%$), e acrescentando-se 20% ao tamanho amostral obtido, por se tratar de abordagem não paramétrica, um total de 10 indivíduos em cada grupo (asma e controle sadio) foi tido como suficiente para permitir a detecção de uma diferença significativa na frequência de células NKT entre os grupos avaliados, considerando um poder de estudo de 90% e erro alfa de 0,05. Como incluímos um total de 14 indivíduos asmáticos e 10 voluntários não asmáticos, o poder do estudo obtido foi de 98%. O cálculo do tamanho amostral foi feito utilizando o software G*Power 3.1.9.2.

5.2. ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária entre 18 e 59 anos e que apresentaram exame parasitológico de fezes negativo para pesquisa de helmintos. Optou-se por participantes adultos devido à dificuldade de realizar prova de função pulmonar em crianças e para evitar erro de diagnóstico por conta de outras doenças crônicas, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), em idades mais avançadas.

Não foram incluídos neste estudo gestantes, indivíduos em uso de droga imunossupressora por via oral ou sistêmica e indivíduos sabidamente infectados pelo vírus HIV e/ou hepatite.

Os indivíduos incluídos neste estudo eram acompanhados pelo ProAr e faziam parte de uma coorte de estudo dos endofenótipos da asma. Aqueles que se encaixavam nos critérios de inclusão eram convidados para participar do presente estudo. Após o aceite do convite e esclarecimentos de todas as dúvidas sobre o trabalho era obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 3 e 4).

Todos os participantes foram previamente submetidos a exames clínicos para que pudesse ser determinado qual tipo de asma era acometido. Para isso, foram realizados testes de espirometria e exame do escarro. Além dos exames clínicos foram realizados exames laboratoriais: hematológicos, bioquímicos, imunológicos e parasitológico, com o intuito de verificar se os participantes do estudo eram portadores de outras comorbidades como doenças parasitárias, infecciosas e autoimunes.

5.3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido para análise pela Plataforma Brasil (Anexo 1) e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FIOCURZ-BA (CAAE: 22442013.9.0000.0040), em 31 de outubro de 2013 (Anexo 2), sendo realizado no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) - FIOCRUZ/Ba, situado na Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-Ba.

Por se tratar de um estudo que utilizou amostra biológica para sua realização, pequenos riscos associados à coleta de sangue estiveram envolvidos, visto que a retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso acontecesse, os cuidados adequados seriam tomados pelos profissionais preparados, para sanar o trauma.

Todas as informações pessoais e dados médicos foram mantidos em confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo foram armazenadas de acordo com exigências legais e todas as informações do banco de dados apresentam um código ao invés do nome do participante do estudo.

Todos os procedimentos envolvendo os participantes do presente estudo, levaram em consideração as normas regulatórias dispostas na CNS 466/2012.

5.4. COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO, SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E CULTURA CELULAR

Por tratar-se de um trabalho que contou com a colaboração dos participantes de um estudo de maiores duração e proporção, além de contar com a colaboração da equipe do ProAr houve a necessidade de adequação da rotina do ProAr e do estudo que estava sendo realizado.

Quinzenalmente, após a realização dos procedimentos clínicos e convite para participar do estudo, os candidatos aptos eram convocados na sede do ProAr, onde aplicavam-se os TCLE e coletava 20ml de sangue periférico em tubo heparinizado.

As coletas de sangue venoso dos participantes do estudo foram realizadas, em um primeiro momento, na sede do ProAr. Com o término da etapa do estudo que estava sendo realizado e com as demandas internas relativas à finalização do estudo no ProAr, fez-se necessária a transferência do ponto de coleta de amostras dos participantes para as dependências do CPqGM – FIOCRUZ/Ba. Onde, seguindo uma relação de candidatos ao estudo predefinida pelo corpo clínico do ProAr, os mesmos eram convidados e, após a aplicação do TCLE (Anexos 3 e 4) e concordância em participar do estudo, realizava-se a coleta de sangue periférico na sala de coleta deste centro.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por meio do gradiente de sedimentação de Histopaque 1077 (Sigma-Life, St. Louis, MO, USA), através de centrifugação por 30 minutos, a 1450 RPM sem freio, em temperatura ambiente, sendo seguido de duas lavagens, de acordo com protocolos predefinidos e com as especificações do fabricante (CHACKO *et al.*, 2013; EMAD e DROUIN, 2014). Posteriormente o sedimento foi ressuspensionado e ajustado para a concentração de 1×10^7 células/ml em meio de RPMI Medium 1640 (Gibco, Life Technologies Australia Pty Ltd, Mulgrave, VIC, Australia) contendo brefeldina, com 10% de soro fetal bovino (inativado), Gentamicina 1µg/ml, e 0,3µl de Protein Transport Inhibitor Cocktail (500x) (eBioscience, San Diego, CA, USA). Foi acrescentado 50µl desta solução em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo em “U”, perfazendo um total de 5×10^5 células/poço.

As células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 12-16 horas, em três diferentes condições: a) ausência de estímulo; b) presença de tetrâmero de CD1d conjugado com αGalCer (0,3-0,5µl) (CD1d-αGalCer-APC,

PROIMUNE); c) tetrâmero de CD1d conjugado com SEA (0,3-0,5µl) (CD1d-*empty*-APC, PROIMUNE), de acordo com o descrito no esquema de placas para marcação celular (Quadro 2).

5.5. CONJUGAÇÃO DO TETRÂMERO CD1D-EMPTY COM SEA

O tetrâmero CD1d *Empty* (APC *labelled human CD1d tetramer*, PROIMUNE) consiste em uma molécula de CD1d, semelhante ao MHC-1, com seus quatro sítios de ligação disponíveis (*empty*) para conjugação com compostos lipídicos (glicolipídeos, por exemplo) e associada ao fluorocromo alofocianina (APC).

A conjugação dos tetrâmeros CD1d-*empty* com o antígeno SEA foi feita de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (PROIMUNE). Inicialmente foi realizada uma curva dose resposta para definir a melhor concentração de tetrâmero para a quantidade de células que iríamos utilizar. O antígeno SEA utilizado foi mantido na mesma concentração já utilizada em outros estudos prévios do nosso grupo (SOUZA *et al.*, 2012). Utilizou-se o volume de 3,5µl de SEA, na concentração de 10µg/ml em cada poço, acrescido de 0,5 µl de CD1d-*empty*/poço, os quais eram mantidos em temperatura ambiente e protegidos da luz, por 18 horas. Em relação ao tetrâmero CD1d-αGalCer, não foi necessário realizar este procedimento, haja vista que o mesmo é adquirido previamente conjugado.

5.6. MARCAÇÃO CELULAR E AQUISIÇÃO EM CITÔMETRO DE FLUXO

Após a cultura foi iniciada a marcação de superfície e intracelular com anticorpos monoclonais para posterior aquisição em citômetro de fluxo. Foram realizadas até sete marcações simultâneas, em cada condição, com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular ou intracelular, conjugados com fluorocromos específicos. Os anticorpos monoclonais utilizados para marcação da superfície celular foram: CD3 - Alexa Fluor 700 (Invitrogen); CD19 - PE-Texas RED (Invitrogen); CD25 - PE (eBioscience); CD28 - PE-Cy5 (Biolegend); CD69 - PE-Cy5.5 (Invitrogen); CD279 (PD1) – FITC (eBioscience) e Vα24Jα18-TCR - PE-Cyanine7 (clone 6B11) (eBioscience). Os anticorpos monoclonais utilizados para a marcação

intracelular foram: IL-10 – PE (eBioscience); IFN- γ – FITC (eBioscience); IL-4 – PE (eBioscience); IL-13 – FITC (eBioscience) e IL-17A – PE (eBioscience).

Inicialmente as placas foram retiradas da estufa, centrifugadas e o sobrenadante desprezado. As células foram então incubadas por 20 minutos, protegidos da luz e a 4°C, com os anticorpos de superfície diluídos em solução de diluição de anticorpo (SDA: tampão salina fosfato - PBS 1x, azida 1M e fração V de albumina bovina - BSA). Em seguida foi realizada lavagem utilizando solução de lavagem (PBS 1x, azida 1M e fração V de albumina bovina - BSA) para eliminar o excesso de anticorpo monoclonal. As placas contendo as células marcadas seguiam então para o procedimento de permeabilização da membrana, através de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, em solução de permeabilização celular (Permeabilization Buffer: PBS 1x, azida 1M, fração V de albumina bovina - BSA e saponina 10%). Após a permeabilização, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais intracelulares diluídos também em solução de permeabilização, por mais 20 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após a marcação foram realizadas ainda mais duas lavagens (PBS 1x, azida 1M e fração V de albumina bovina - BSA) e então as células foram ressuspensas em 200 μ l de Wash Buffer-Tetrâmero (PBS 1x, azida de sódio 0,1% e BSA 0,1%).

Após realizadas as marcações, as placas eram mantidas a 4°C, protegidas da luz até o momento da aquisição em citômetro de fluxo BD LSRFortessa™, na plataforma de citometria do CPqGM. Todas as aquisições foram realizadas no mesmo dia da realização da marcação celular, sendo este procedimento iniciado até duas horas após o término da marcação e sendo adquiridos em média 174.000 eventos em cada poço avaliado. O esquema de placas utilizado está exposto no Quadro 2.

Quadro 2. Esquema de Placas para marcação celular.

Sem Estímulo	CD1d+αGalCer	CD1d+SEA
ISOTIPOS	ISOTIPOS	ISOTIPOS
CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD25 - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD25 - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD25 - PE
CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD28 - PE-Cy5 CD279 (PD1) - FITC IL-10 - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD28 - PE-Cy5 CD279 (PD1) - FITC IL-10 - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD28 - PE-Cy5 CD279 (PD1) - FITC IL-10 - PE
CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 IFN-γ – FITC IL-4 - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 IFN-γ – FITC IL-4 - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 IFN-γ – FITC IL-4 - PE
CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD69 - PE-Cy5.5 IL-13 - FITC IL-17A - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD69 - PE-Cy5.5 IL-13 - FITC IL-17A - PE	CD3 - Alexa Fluor 700 CD19 - PE-Texas RED Vα24Jα18-TCR - PE- Cyanine7 CD69 - PE-Cy5.5 IL-13 - FITC IL-17A - PE

5.7. ESTRATÉGIA PARA DEFINIÇÃO DE POPULAÇÃO.

A população de células NKT foi definida utilizando o anticorpo anti-V α 24/J α 18 (6B11), combinado com anti-CD3 e anti-CD19. A estratégia de seleção da população de células NKT foi baseada na descrição feita por SHARMA *et al.* (2011). As células NKT foram definidas como CD3⁺CD19⁻V α 24/J α 18⁺ (Figura 1).

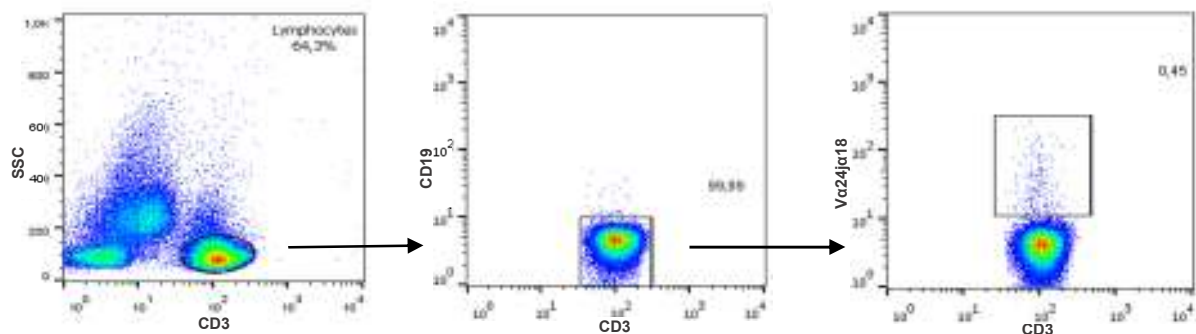


Figura 1. Estratégia para definição de população de células NKT.

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos pelo citômetro de fluxo foram analisados através do software Flow Jo X (Califórnia) e são expressos em frequência percentual de células positivas (%) e pela intensidade média de fluorescência (MFI) de cada anticorpos utilizado. Os dados quantitativos serão expressos em mediana (mínimo –máximo).

As análises estatísticas e os gráficos foram realizadas através do software GraphPad Prism® versão 6.0. O teste de normalidade de D'Agostino e Pearson revelou que os dados gerados não seguem a curva de Gauss, sendo então aplicados testes estatísticos não paramétricos. Para a comparação dos valores medianos de frequência de células positivas ou da intensidade de fluorescência entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, enquanto que para três ou mais grupos foi aplicado o teste de Kruskal Wallis. A comparação de proporções foi realizada através do teste de Qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERÍSTICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A população estudada foi composta por 24 indivíduos, dos quais 14 foram asmáticos, sendo chamados a partir deste momento simplesmente de grupo “Asma”, e 10 foram indivíduos não asmáticos, sendo denominados de “Controle Sadio”. O grupo “Asma” foi composto por 7 indivíduos (50%) com asma intermitente e 7 (50%) com asma grave.

O grupo de controles sadios foi formado por 40% de indivíduos do sexo masculino, enquanto que o grupo de asma intermitente foi composto por 42,9% e o grupo de asma grave apresentou 28,6% de pessoas do sexo masculino ($p > 0,05$; chi-quadrado; Tabela 1).

Também foi avaliada a distribuição etária mediana entre os indivíduos dos diferentes grupos. Foi observado que os indivíduos com asma grave apresentaram idade mediana [38,0 (36,0-51,0)] significativamente superior ao observado para o grupo controle sadio [30,0 (28,5-34,5)]; $p < 0,05$. Entretanto, ao se comparar a idade mediana do grupo controle sadio com o total de asmáticos, esta diferença deixa de existir ($p > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do sexo e idade dos participantes, de acordo com os diferentes grupos.

	Controle Sadio (n=10)	Asma		Total (n=14)	Valor de p
		Asma Intermitente (n=7)	Asma Grave (n=7)		
Sexo (%M)	40,0%	42,9%	28,6%	35,7%	ns
Idade*	30,0 (28,5-34,5)	37,0 (35,0-49,0)	38,0 (36,0-51, 0)	30,0 (28,5-51,1)	<0,05** ns***

ns: não significante; ***Idade representada em mediana (min-max)**; **Teste de Mann Whitney: Controle x Asma Grave; ***Teste de Mann Whitney: Controle x Asma Total

6.2. FREQUÊNCIA DE CÉLULAS NKT.

A frequência de células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺) em cultura de PBMC não estimulada, ou estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugado com α GalCer (CD1d- α GalCer) ou com SEA (CD1d-SEA) foi avaliada nos grupos estudados. Foi observado que a frequência mediana de células NKT, expressa em porcentagem, não diferiu entre os controles sadios e os asmáticos em culturas de PBMC sem estímulo [0,25% (0,13-0,39%) e 0,22% (0,07-0,33%)], estimulada com α GalCer [0,22% (0,18-0,36%) e 0,17% (0,10-0,31%)] ou com tetrâmero conjugado com SEA [0,23% (0,10-0,34%) e 0,18% (0,10-0,30%)], respectivamente; $p > 0,05$; Figura 2A]. Ao se avaliar a média de intensidade de fluorescência (MFI) do receptor de células T (TCR) conservado presente em células NKT, o V α 24J α 18, também foram observados níveis semelhantes entre os grupos avaliados e em cada condição testada (Figura 2B).

Estas mesmas análises foram realizadas dentro do grupo de asmáticos para avaliar se havia alguma diferença na frequência de células NKT, ou mesmo na expressão do receptor V α 24J α 18, entre indivíduos com asma intermitente e asma grave. Entretanto, assim como os resultados anteriores, não foi observada diferenças significativas nestes parâmetros (dado não mostrado).

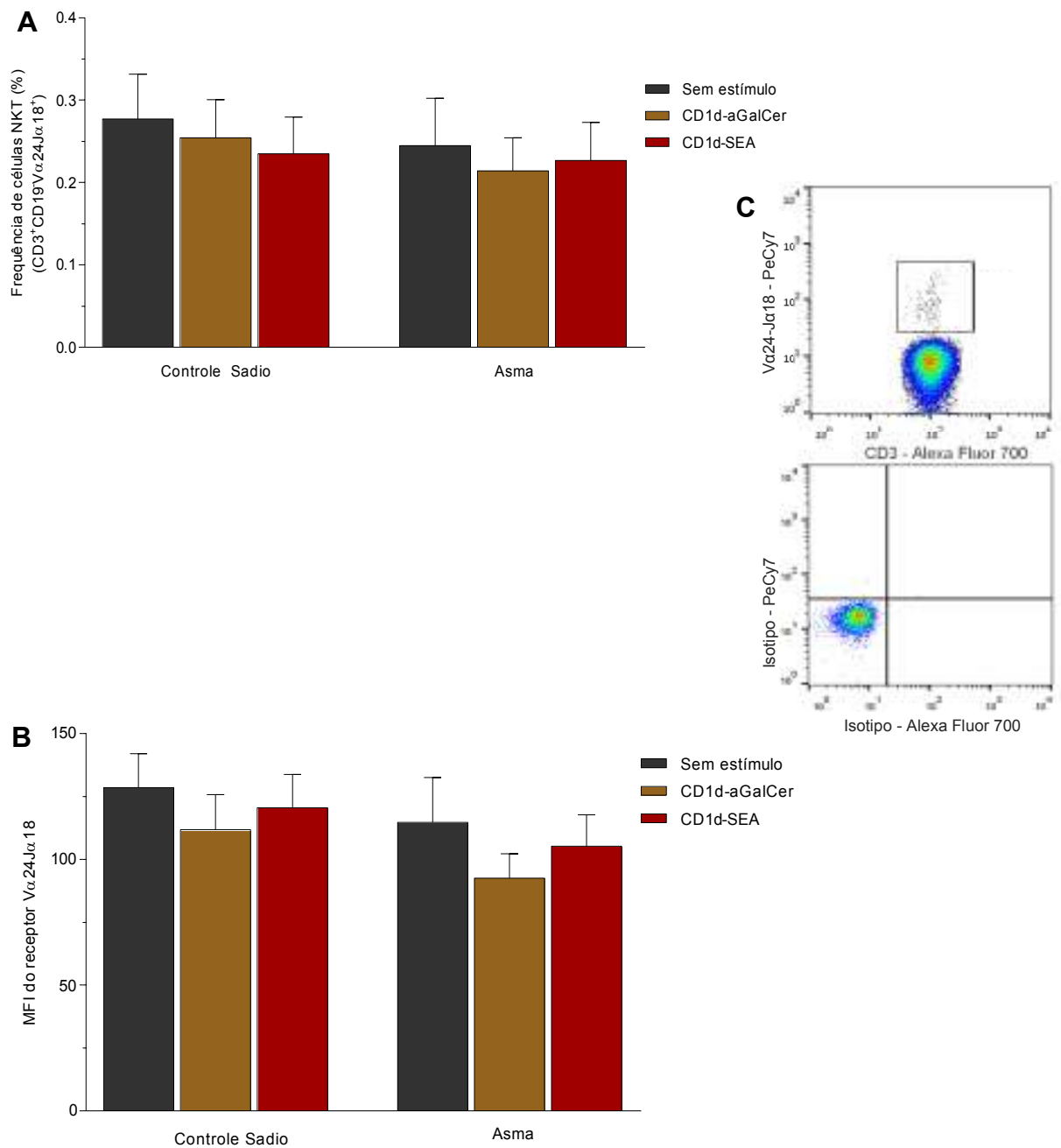


Figura 2. Frequência de células NKT (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com αGalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT expressa em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) do receptor Vα24Jα18 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT e seu respectivo gráfico de isotipos.

6.3. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS NKT

Avaliamos o estado de ativação de células NKT ($CD3^+CD19^-V\alpha24J\alpha18^+$), por meio da expressão da molécula de superfície CD69, em cultura de PBMC não estimulada, estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugado com α GalCer ou SEA. Não foi observada diferença na expressão desta molécula entre os controles saudáveis e os asmáticos em culturas de PBMC sem estímulo [52,60% (43,30-92,36%) e 58,30% (39,70-87,13%) estimulada com CD1d conjugado com α GalCer [71,75% (54,05-85,39%) e 52,60% (57,10-87,96%)] ou com tetrâmero CD1d conjugado com SEA [83,30% (52,05-95,85%) e 47(46-92,16%)], respectivamente; $p > 0,05$; Figura 3A]. Na avaliação da média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD69, valores semelhantes também foram observados nos grupos testados, não havendo diferença entre eles (Figura 3B).

Estas mesmas análises foram realizadas dentro do grupo de asma, comparando os subgrupos de asma intermitente e asma grave, buscando avaliar se havia diferenças na frequência de CD69 nestas células e/ou na expressão dessa molécula por meio da média de intensidade de fluorescência (MFI). Contudo, semelhante aos dados da frequência e expressão de CD69, nos grupos expostos acima, não foi observada diferença nos subgrupos de asma (dado não mostrado).

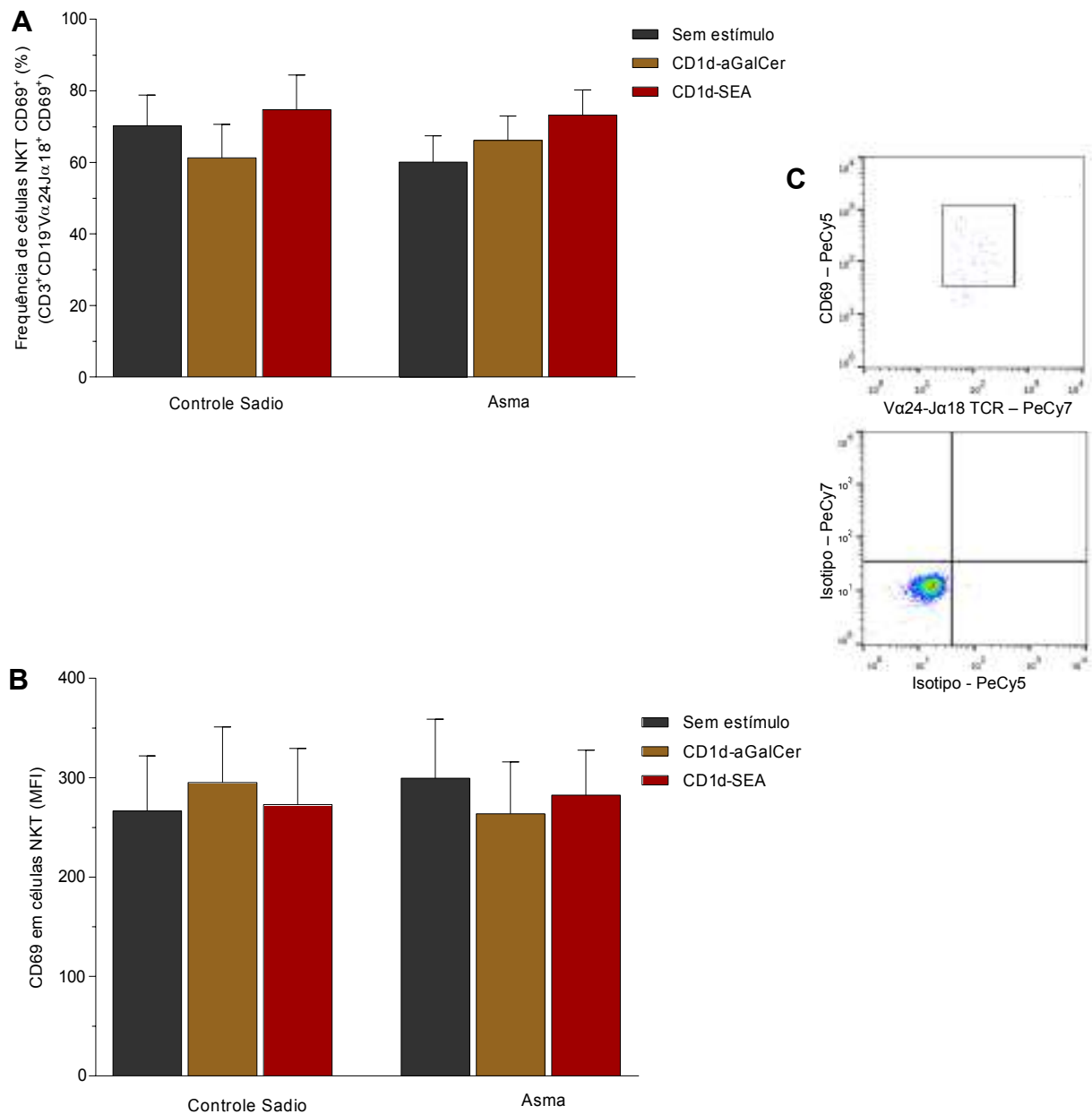


Figura 3. Expressão de CD69 em Células NKT ($CD3^+CD19^+Va24Ja18^+$) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles sadios, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam CD69 em sua superfície ($CD3^+CD19^+Va24Ja18^+CD69^+$), valores expressos em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD69 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT CD69+ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Ainda para determinarmos o estado de ativação das células NKT proveniente de cultura de PBMC de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimulada, estimulada com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA, avaliamos a expressão da molécula coestimulatória CD28 em presentes na superfície destas células NKT. A análise da expressão desta molécula não apresentou diferença nas culturas de PMBC não estimuladas dos controles sadios e dos asmáticos [76,70% (52,38-93,95%) e 64,30% (17,15-87,90%), estimuladas com CD1d Conjugado com α GalCer [78,20% (16,43-91,22%) e 58,50% (11,73-76,20)] ou com o tetrâmero CD1d conjugado com SEA [68,80% (2,94-93,60%) e 68,35% (14,13-78,68), respectivamente; $p > 0,05$, Figura 4A]. Os valores da média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD28 não demonstrou diferença na comparação dos respectivos grupos (Figura 4B).

A avaliação dos subgrupos de asma (asma intermitente e asma grave), também não apresentou diferenças tanto na expressão percentual desta molécula quanto na expressão das mesmas avaliadas por meio da expressão da MFI nestas células.

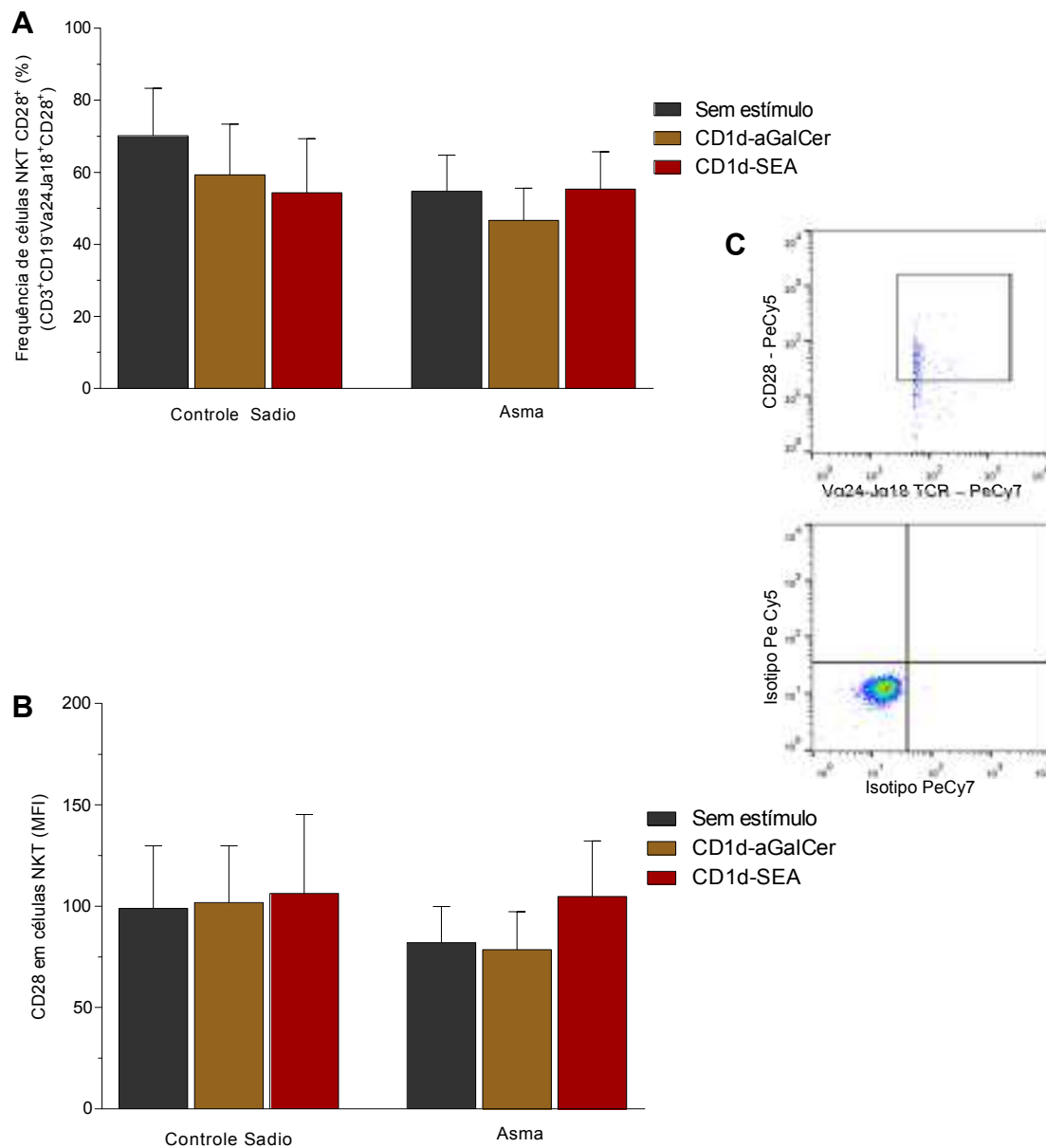


Figura 4. Expressão de CD28 em Células NKT em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles sadios, não estimuladas, estimuladas com CD1d conjugado com αGalCer ou SEA.

A. Frequência de células NKT expressando a molécula CD28 em sua superfície (CD3⁺CD19⁻Vα24Jα18⁺CD28⁺), valores expressos em porcentagem. **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD28 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT CD28⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Ainda em relação a coestimulação, avaliamos também a expressão de CD279, molécula coestimulatória presente na superfície de linfócitos, pertencente à família do CD28, importante na regulação negativa da proliferação e na expressão de citocinas por estes linfócitos. A expressão desta molécula nas células NKT de cultura de PBMC não estimulada, estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugados com α GalCer ou SEA foi semelhante entre os controles sadios e os asmáticos em culturas de PBMC sem estímulo [4,95% (1,84-6,03%) e 4,42 (3,98-13,00%), estimulado com CD1d- α GalCer [4,66% (0,01-9,64%) e 6,45% (2,45-11,35%), ou estimulado com CD1d conjugado ao SEA [4,26% (0,84-5,66%) e 9,00 (3,17-18,15%), respectivamente; $p > 0,05$; Figura 5A).

Contudo, ao avaliarmos a média de intensidade de fluorescência de CD279 nestes mesmos grupos, verificamos que as células NKT de indivíduos asmáticos apresentaram menor intensidade de fluorescência desta molécula em culturas não estimuladas [7,54(6,05-9,82)], quando comparado com o grupo controle [34,00 (12,00-43,55); Figura 5B].

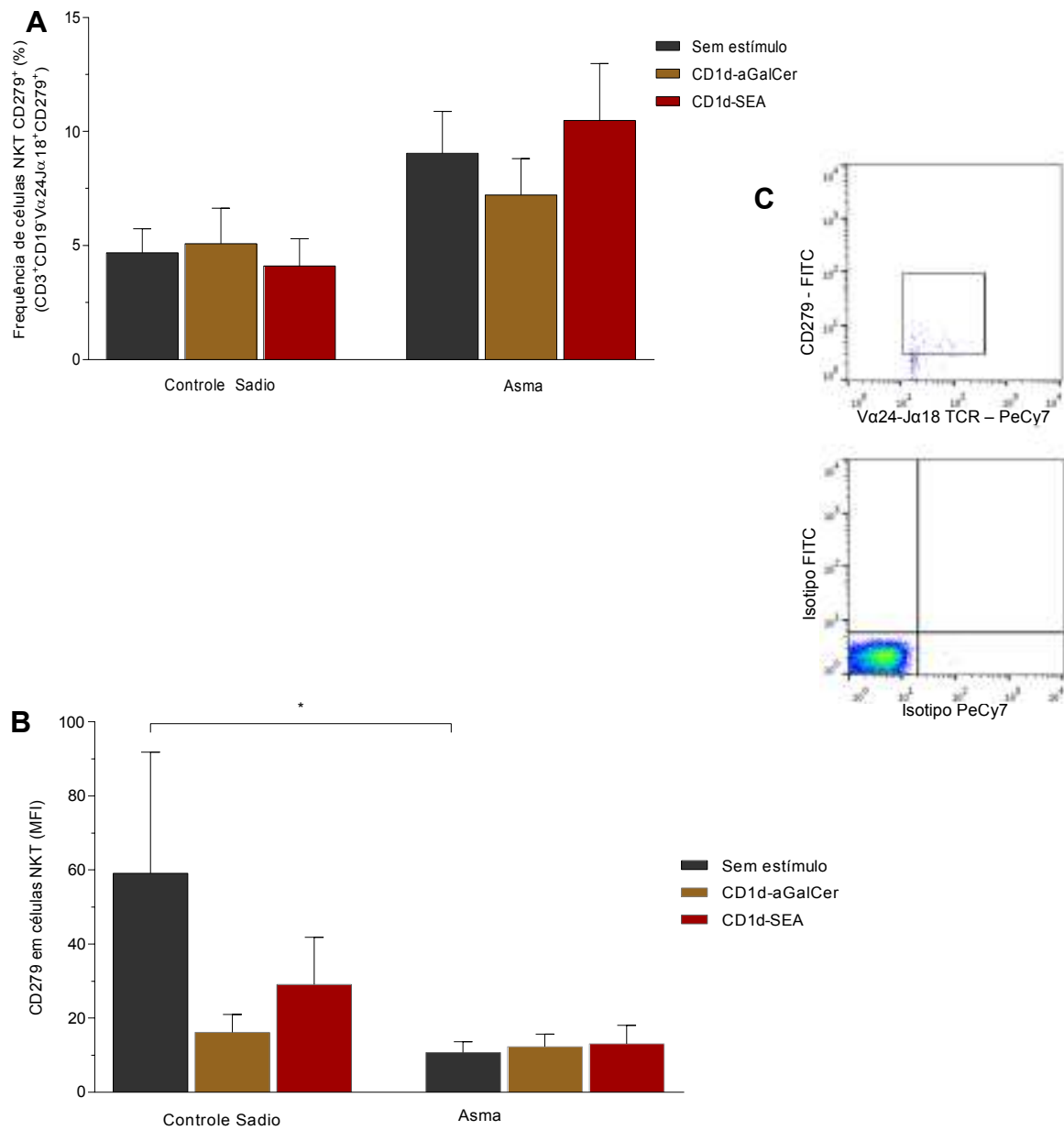


Figura 5. Expressão de CD279 em Células NKT (CD3+CD19-Vα24Jα18+CD279+) proveniente de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles sadios após diferentes estímulos in vitro.

A. Expressão de células NKT que possuem CD279 em sua superfície (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺CD279⁺).

B. Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD279 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT CD279⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Análises semelhantes foram realizadas dentro do grupo de asma, subdividindo-o em asma intermitente e asma grave, com o intuito de avaliar diferenças na frequência ou na média de intensidade de fluorescência de CD279 nas células NKT de cultura de PBMC de sangue periférico. Observamos que a frequência de expressão desta molécula foi superior em células NKT de indivíduos com asma intermitente em culturas não estimuladas [11,10% (9,29-15,40%)], quando comparados com controles sadios [4,95% (1,84-6,03%)] ou com asma grave [3,98% (0,01-7,35%)]. Adicionalmente, quando estimuladas com CD1d- α GalCer, a frequência de CD279 em células NKT de indivíduos com asma intermitente [9,90% (5,24-12,40%)] também foi superior ao observado em células de controles sadios [4,66% (0,01-9,64%); Figura 6A].

A média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD279 em células NKT, de cultura de PBMC, não estimuladas foi menor entre o grupo de asma grave [9,53 (6,91-10,96)] comparado com os controles sadios [34,00% (12,00-43,55%); $p < 0,01$], e entre asma intermitente estímulo [6,18% (6,01-9,01%)] e controles sadios [34,00% (12,00-43,55%), $p < 0,05$]. Por fim, observou-se que quando estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado ao SEA, as células NKT de indivíduos com asma intermitente apresentaram menor expressão de CD279 [6,62% (6,03-7,74%)] quando comparado com controles sadios [11,00% (7,96-9,01%)] ou com células de indivíduos com asma grave [10,50% (8,32-37,45%), figura 6B].

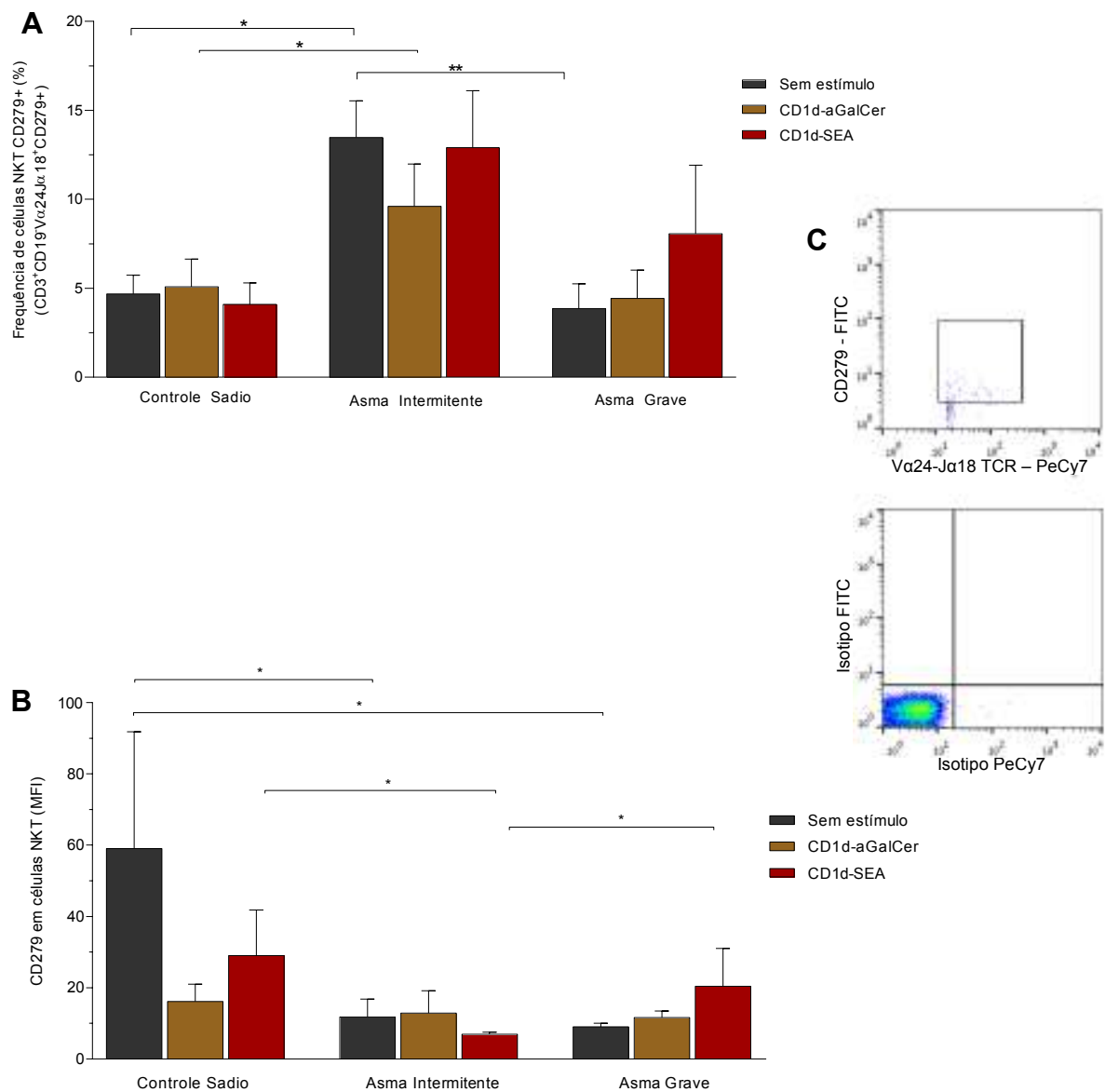


Figura 6. Expressão de CD279 em células NKT (CD3+CD19-Vα24Jα18+) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com αGalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam CD279 em sua superfície, valores apresentados em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD279 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT⁺CD279⁺ e seu respectivo gráfico de isotipos. *p < 0,01; **p < 0,05.

Avaliamos também a expressão da molécula transmembrana CD25 em cultura de PBMC não estimulada, estimulada com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA de controles sadios e indivíduos com asma, com o intuito de verificarmos se as células NKT de cultura de PBMC apresentam perfil regulatório. Observou-se que não houve diferença na expressão desta molécula em células NKT, não estimuladas de asmáticos [14,00% (0,01-24,50%)] quando comparadas com culturas células de semelhantes, dos controle sadios [8,58% (1,42-54,45%)]. Também não foi encontrada diferença na comparação em culturas estimuladas com CD1d- α Galcer de asmáticos e controles sadios [11,80% (0,01-29,20%) e 13,00% (2,20-49,00%)], respectivamente, bem como nas culturas estimuladas com CD1d-SEA, dos mesmos grupos [7,69% (2,90-16,20%) e 9,11% (1,09-43,83%)].

O mesmo foi observado nas culturas de células não estimuladas de indivíduos com asma grave [0,01% (0,01-7,41%)], asma intermitente [6,90% (1,65-16,50)]; nas culturas de células estimuladas com CD1d- α GalCer tanto para o grupo com asma grave [0,01% (0,01-5,08%)], como para grupos de asma intermitente [3,96% (1,40-7,35%)] e controles sadios CD1d- α GalCer [13,00% (2,20-49,00%); $p > 0,05$]. O mesmo foi observado nas culturas estimuladas com CD1d-SEA dos indivíduos com asma grave [2,90% (0,01-5,58%)], asma intermitente [3,57% (1,32-9,15%)] e dos indivíduos saudáveis [9,11% (1,09-43,83%); $p > 0,05$; Figura 7A].

Na avaliação da média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD25, valores semelhantes foram observados nos grupos testados para todos os estímulos (Figura 7B).

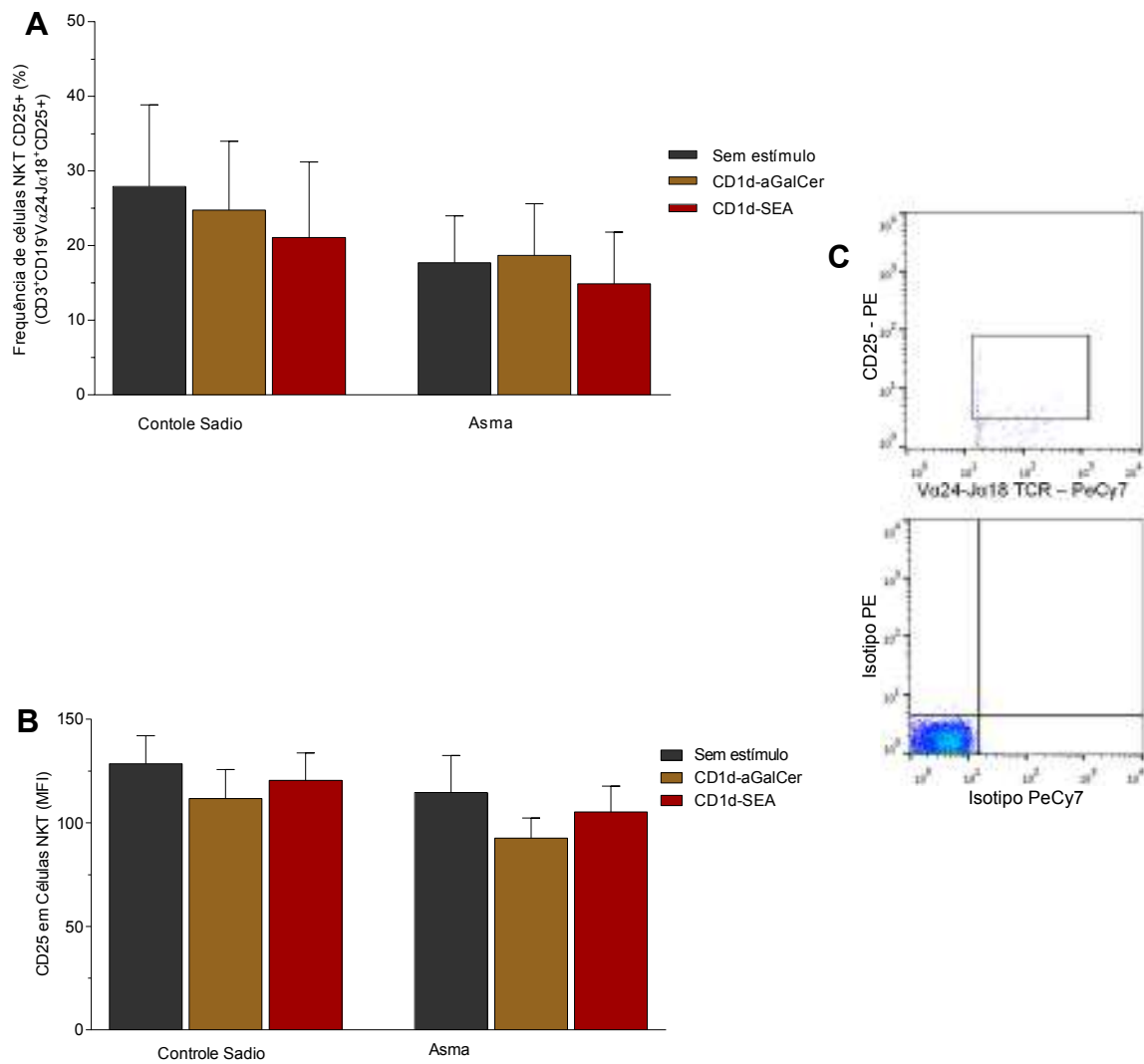


Figura 7. Expressão de CD25 em Células NKT (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺CD25⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com αGalCer ou SEA.

A. Expressão de células NKT que possuem CD25 em sua superfície (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺CD25⁺), valores expressos em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD25 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT CD25⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Por outro lado, foi observado menor frequência de expressão de CD25 em células NKT de cultura de PBMC, não estimuladas, de indivíduos com asma grave [0,01% (0,01-7,41%)] quando comparados com cultura de indivíduos com asma intermitente [6,90% (1,65-16,50)], mantendo-se reduzida quando comparamos as células de culturas estimuladas com CD1d- α GalCer dos indivíduos com asma grave [0,01% (0,01-5,08%)], comparadas com as células de indivíduos com asma intermitente [3,96% (1,40-7,35%)] e na comparação das células dos mesmos grupos, estimuladas com CD1d-SEA [2,90% (0,01-5,58%) e 3,57% (1,32-9,15%); para indivíduos com asma grave e asma intermitente, respectivamente; $p > 0,05$; Figura 8A). Entretanto, ao avaliarmos a média de intensidade de fluorescência deste receptor, não foram encontrados valores semelhantes nos grupos testados, não havendo diferença entre estes (Figura 8B).

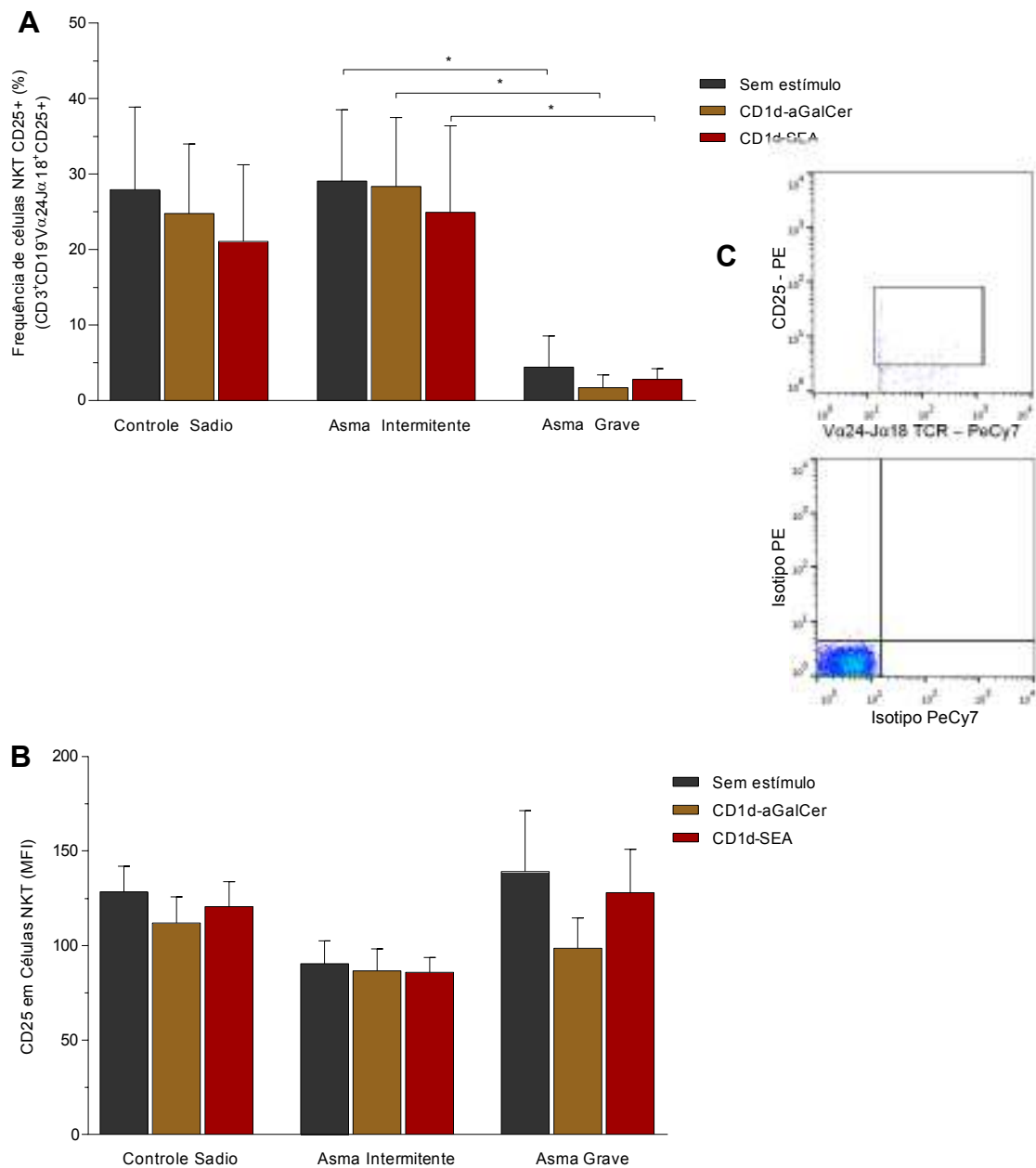


Figura 8. Expressão de CD25 em Células NKT ($CD3^+CD19^+Va24Ja18^+CD25^+$) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam CD25 em sua superfície, valores apresentados em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD25 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT+CD25+ e seu respectivo gráfico de isotipos. * $p < 0,05$.

6.4. EXPRESSÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS EM CÉLULAS NKT

Avaliamos se as células NKT ($CD3^+CD19^-V\alpha24J\alpha18^+$) provenientes de cultura de PBMC apresentam perfil Th1 por meio da expressão intracelular da citocina IFN- γ . Entretanto, foi observado que a expressão desta citocina não apresentou diferença entre os controles sadios e os asmáticos em culturas de PBMC sem estímulo [8,25% (3,06-17,06%) e 10,05% (5,10-25,53%), estimulado com CD1d- α GalCer [5,78% (2,24-17,98%) e 6,17% (3,02-9,49%) ou estimulado com CD1d-SEA [5,26% (0,88-10,00%) e 6,16% (1,27-11,70%), respectivamente; $p > 0,05$; Figura 9A].

Seguindo esta linha, ao avaliarmos a média de intensidade de fluorescência desta citocina intracelular, foi observada expressão inferior no grupo de asma [7,55 (5,66-10.65)] quando comparado com o grupo de controles sadios [7,55 (5,66-10.65); $p < 0,01$], ambos estimulados com CD1d- α GalCer. Para as demais comparações não foram encontradas diferenças (Figura 9B).

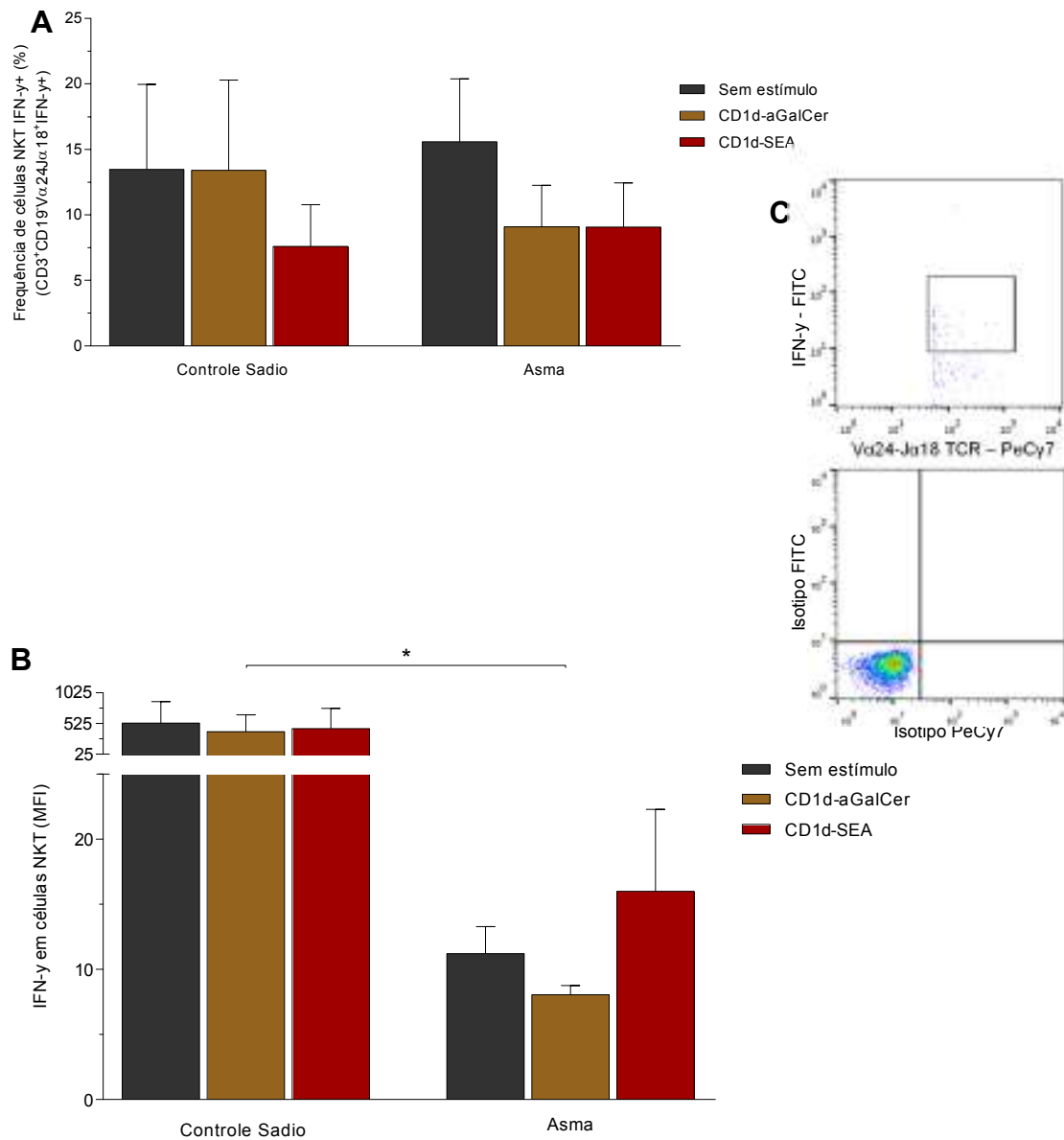


Figura 9. Expressão de IFN- γ em Células NKT ($CD3^+CD19^+V\alpha 24J\alpha 18^+IFN-\gamma^+$) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IFN- γ intracelular ($CD3^+CD19^+V\alpha 24J\alpha 18^+IFN-\gamma^+$), valores apresentados em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de IFN- γ intracelular em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT IFN- γ^+ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Não observamos diferenças ao compararmos a expressão de IFN- γ nas células NKT de cultura de PBMC não estimuladas de indivíduos com asma grave [8,53% (4,05-25,33%)], asma intermitente [13,15% (4,47-28,38%)] e controles sadios [8,25% (3,06-17,06%)]. O mesmo pode ser verificado ao avaliarmos as culturas de PBMC dos grupos de asma grave [5,08% (2,77-26,15%)], asma intermitente [6,60% (2,10-9,10%)] ou controle sadio [5,78% (2,24-17,99%)] estimuladas com CD1d- α GalCer. Por fim ao compararmos os valores das culturas de PBMC dos grupos de asma grave [6,16% (1,75-16,56%)], asma intermitente [4,83% (0,98-14,75%)] e controle sadio [5,26% (0,88-10,00%)] estimuladas com CD1d-SEA, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$; Figura 10^a).

A avaliação da média de intensidade de fluorescência (MFI) do IFN- γ intracelular, demonstrou menor intensidade de fluorescência no grupo de Asma intermitente [6,12 (5,14-7,67)] quando comparado com o grupo de asma grave [9,20 (7,82-49,15)] e com os controles sadios [14,95 (9,64-680,80)] estimulados com CD1d-SEA ($p < 0.05$). Todavia, não houve diferença na comparação das culturas de células NKT dos demais grupos, estimulados com CD1d- α Galcer, CD1d-SEA ou sem estímulo ($p > 0.05$, respectivamente; $p < 0.05$; Figura 10B).

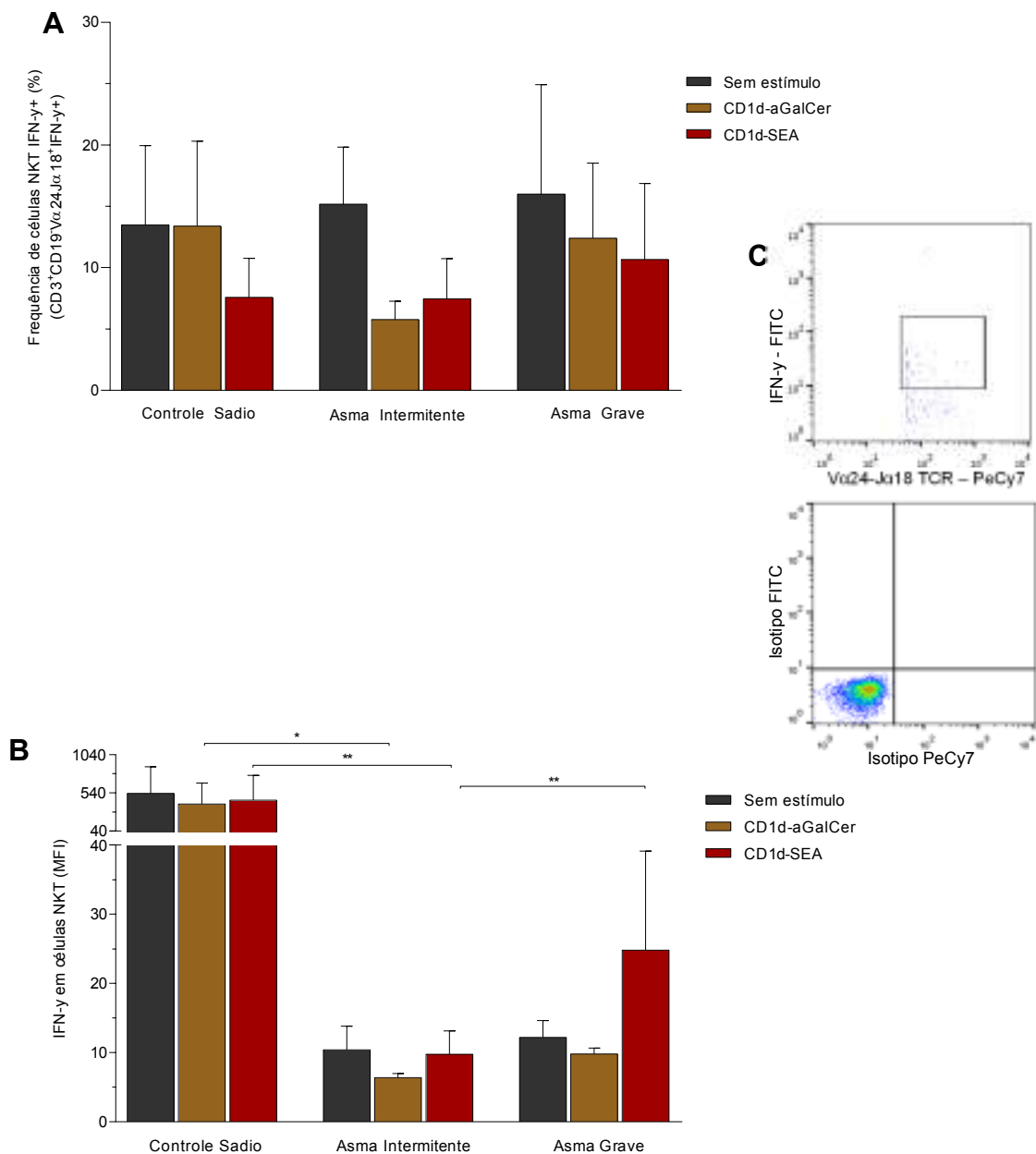


Figura 10. Expressão de IFN- γ em Células NKT (CD3⁺CD19⁻V α 24J α 18⁺IFN- γ +) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com α GalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IFN- γ intracelular, valores em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) de IFN- γ intracelular em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT⁺ IFN- γ + e seu respectivo gráfico de isotipos. *p < 0,01; **p < 0,05.

O perfil Th2 foi avaliado pela expressão da interleucina 4 (IL-4) e IL-13 em cultura de PBMC não estimulada, estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.

Observamos que, a frequência da expressão de IL-4 foi semelhante entre os controles sadios [5,02% (0,45-8,45%)] e os asmáticos [2,40% (0,01-7,69%)] em culturas de PBMC sem estímulo, controles sadios [6,61% (2,49-10,30%)] e asmáticos [2,80% (0,92-8,06%)], estimuladas com CD1d- α GalCer, assim como nos controles sadios [4,17% (0,01-13,20%)] e asmáticos [1,96% (0,01-6,25%)], estimuladas com o tetrâmero CD1d-SEA ($p > 0,05$; Figura 11A). Da mesma forma, na avaliação da média de intensidade de fluorescência (MFI) de IL-4 em células NKT também foram observados nos grupos testados, não havendo diferença entre estes (Figura 11B).

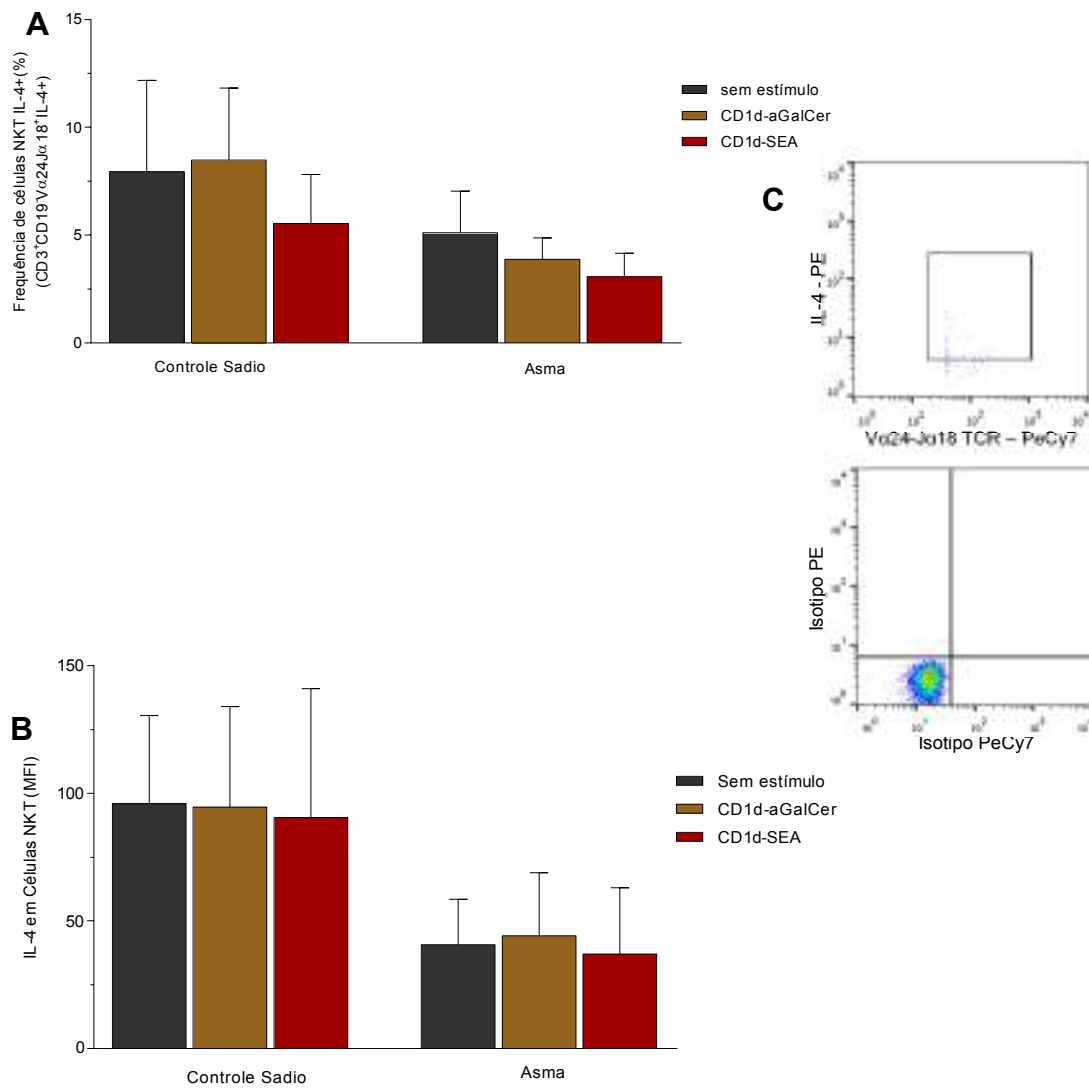


Figura 11. Expressão de IL-4 em Células NKT (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺IL-4⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles sadios, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com αGalCer ou SEA.

A. Frequência de célula NKT que expressam IL-4 intracelular (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺IL-4⁺), valores em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de IL-4 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT IL-4⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Ao compararmos os diferentes grupos de asma intermitente e asma grave, comparados com o controle sadio, observamos que, nas mesmas condições avaliadas acima, não foi possível encontrar diferença entre os grupos, em todas as condições testadas (Figura 12A). Ainda neste contexto, realizamos análises semelhantes dentro do grupo de asma, comparando os subgrupos de asma intermitente e asma grave, buscando avaliar se havia diferenças na intensidade de expressão de IL-4 em células NKT por meio da média de intensidade de fluorescência (MFI). Contudo, exceto a comparação dos valores da média de intensidade de fluorescência do grupo de asma intermitente [7,03 (5,08-97,52)] e controle sadio sem estímulo [53,90 (24,95-169,50); $p < 0,05$], não foi observada diferença nos subgrupos de asma (Figura 12B).

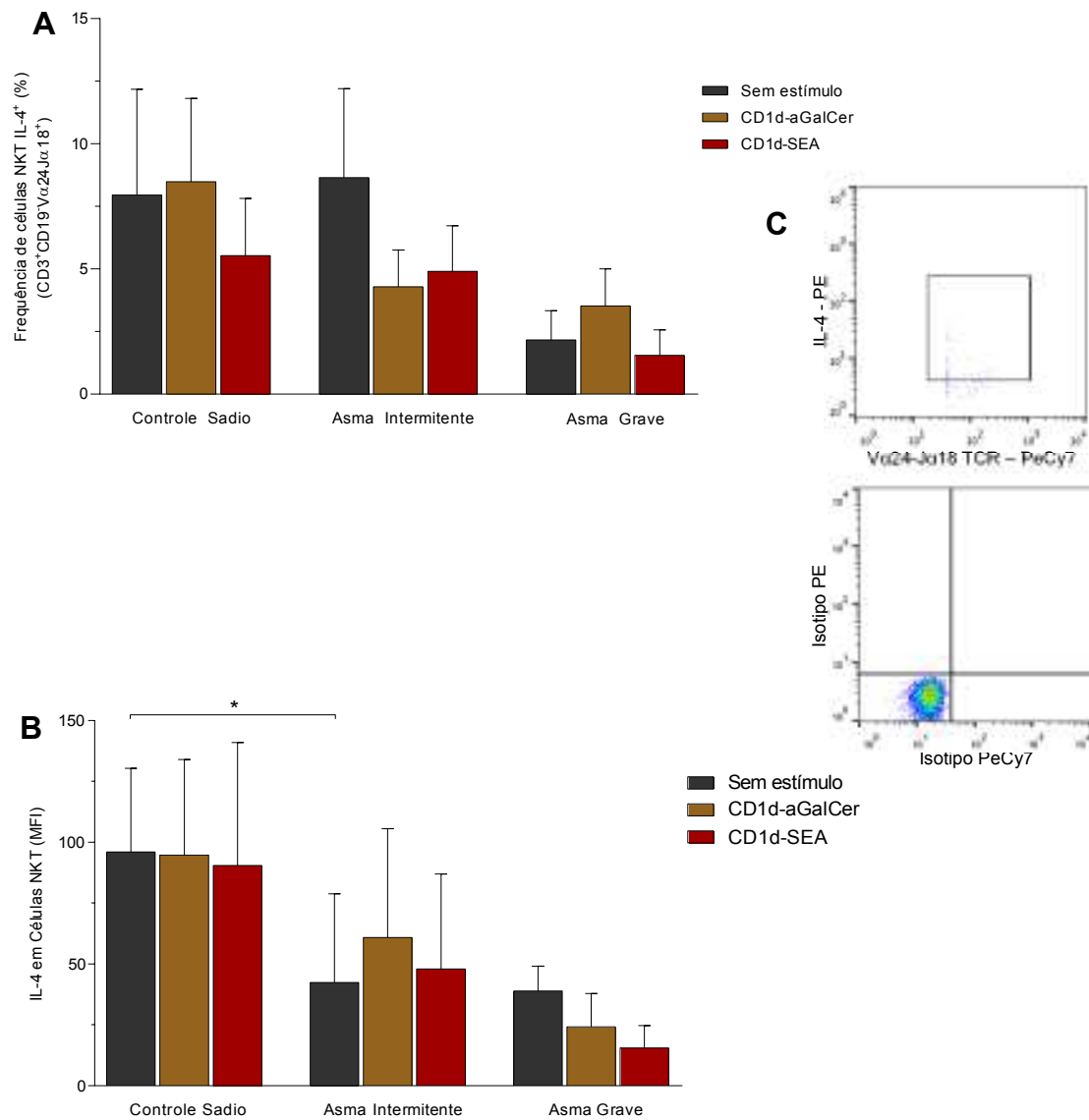


Figura 12. Expressão de IL-4 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻Vα24Jα18⁺IL-4⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles sadios, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com αGalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-4 intracelular, valores em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da citocina IL-4 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT⁺IL-4⁺ e seu respectivo gráfico de isotipos. *p < 0,05.

O perfil de resposta das células NKT também foi verificado por meio da avaliação da expressão da citocina imunorregulatória IL-13, associada ao perfil de resposta do tipo 2, por linfócitos T (Th2).

Avaliamos a expressão intracelular de IL-13 em cultura de PBMC não estimulada, estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugado com α GalCer ou SEA. Observamos que a avaliação da expressão desta citocina não apresentou diferença entre os controles sadios e os asmáticos em culturas de PBMC sem estímulo [3,65% (0,01-24,58%) e 5,70% (2,60-7,89%)], estimulada com CD1d- α GalCer [5,80% (0,01-10,80%) e 7,87% (3,23-14,30%)] ou com CD1d-SEA [4,76% (0,01-15,20%) e 6,00% (3,27-22,20%)], respectivamente; $p > 0,05$; Figura 13A]. Na avaliação da média de intensidade de fluorescência (MFI) da citocina intracelular IL-13, valores semelhantes foram observados nos grupos testados, não havendo diferença entre estes grupos (Figura 13B).

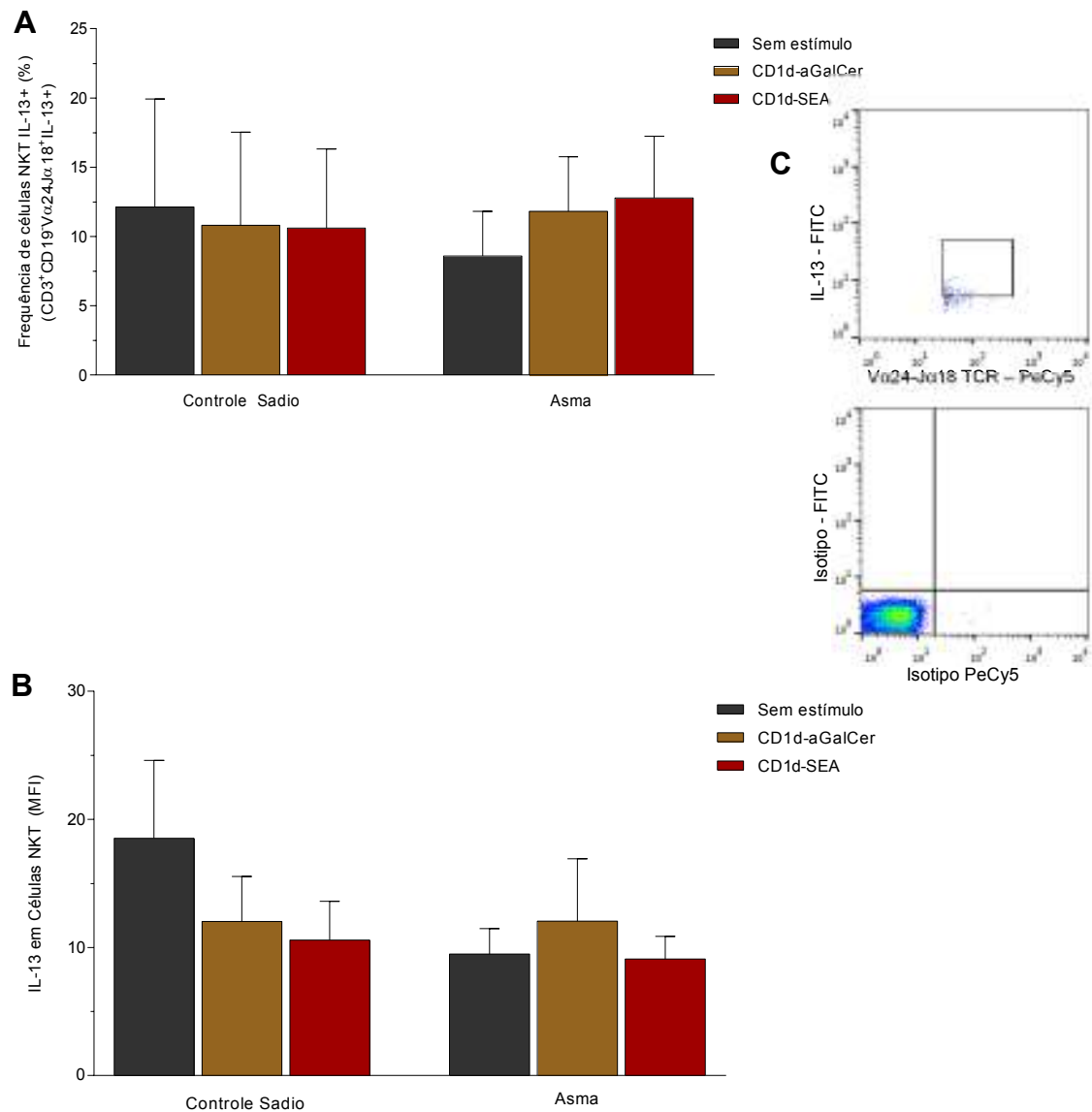


Figura 13. Expressão de IL-13 em Células NKT ($CD3^+CD19^+V\alpha 24J\alpha 18^+IL-13^+$) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles sadios, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-13 intracelular ($CD3^+CD19^+V\alpha 24J\alpha 18^+IL-13^+$), valores em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de IL-13 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT IL-13⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Ao avaliarmos a expressão intracelular de IL-13, em células NKT de culturas de PBMC, não foram observadas diferenças nas células de culturas sem estímulo tanto para asma grave [3,00% (2,60-3,39%)], asma intermitente [7,10% (5,70-37,00%) e controles sadios [3,65% (0,01-24,58%)]. Observou-se o mesmo para as culturas de PBMC estimuladas com CD1d- α GalCer dos grupos de asma grave [4,53% (1,18-7,87%)], controles sadios e [5,80% (0,01-10,80%)] e asma intermitente [28,60% (3,56-43,40%)]. Assim como os dados apresentados acima, não encontramos diferenças na comparação dos grupos de asma grave [1,84% (0,40-3,27%)], asma intermitente [22,20% (6,00-37,40%)] e controles sadios [4,76% (0,01-15,20%)], estimulados com CD1d-SEA ($p > 0.05$; Figura 14A)

Similar a estas avaliações, análises foram realizadas dentro do grupo de asma, comparando os subgrupos de asma intermitente e asma grave, buscando avaliar se havia diferenças na frequência de IL-13 nestas células e/ou na expressão dessa molécula por meio da média de intensidade de fluorescência (MFI). Entretanto, semelhante aos dados da frequência e expressão de IL-13, nos grupos expostos acima, não foi observada diferença nos subgrupos de asma (Figura 14B).

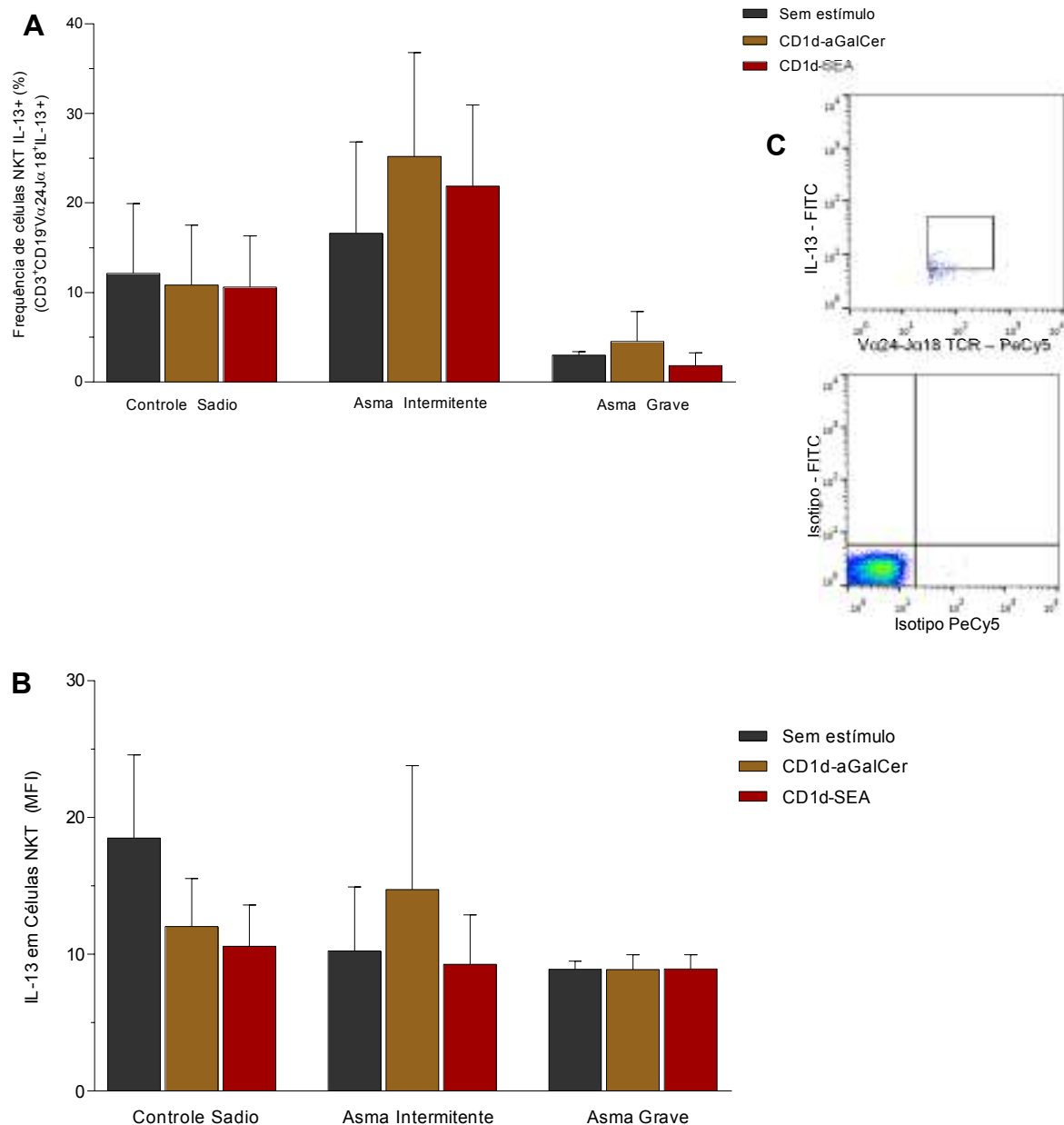


Figura 14. Expressão de IL-13 em Células NKT (CD3⁺CD19⁺Vα24Jα18⁺IL-13⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles saudáveis, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com αGalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-13 intracelular; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da citocina IL-13 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT⁺IL-13⁺ e seu respectivo gráfico de isotipos.

Em seguida, avaliamos se as células NKT estudadas apresentavam perfil TH17, por meio da análise da expressão de IL-17 (IL-17A), nas células NKT, em cultura de PBMC não estimulada, estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.

Na comparação de culturas de PBMC de indivíduos com asma [10,30% (2,60-38,60%)] e controles saudáveis [11,00% (1,89-18,20%)], não estimuladas. Em culturas de PBMC de indivíduos com a asma [4,40% (0,01-22,90%)] comparadas com culturas dos controles saudáveis [16,70% (4,17-30,60%)], estimuladas com CD1d- α GalCer. Bem como com culturas de PBMC estimuladas com CD1d-SEA nos grupos de asma [6,27% (0,01-24,40%)] e controles saudáveis [9,09% (1,60-37,10%)], $p > 0.05$; respectivamente, Figura 15A].

Assim como a frequência de células NKT produtoras de IL-17, sua expressão intracelular foi avaliada por meio da média de intensidade de fluorescência (MFI), onde, similar aos dados apresentados acima, não foi possível determinar diferença na comparação entre os grupos de asma e grupo de controles saudáveis ($p > 0.05$, Figura 15B).

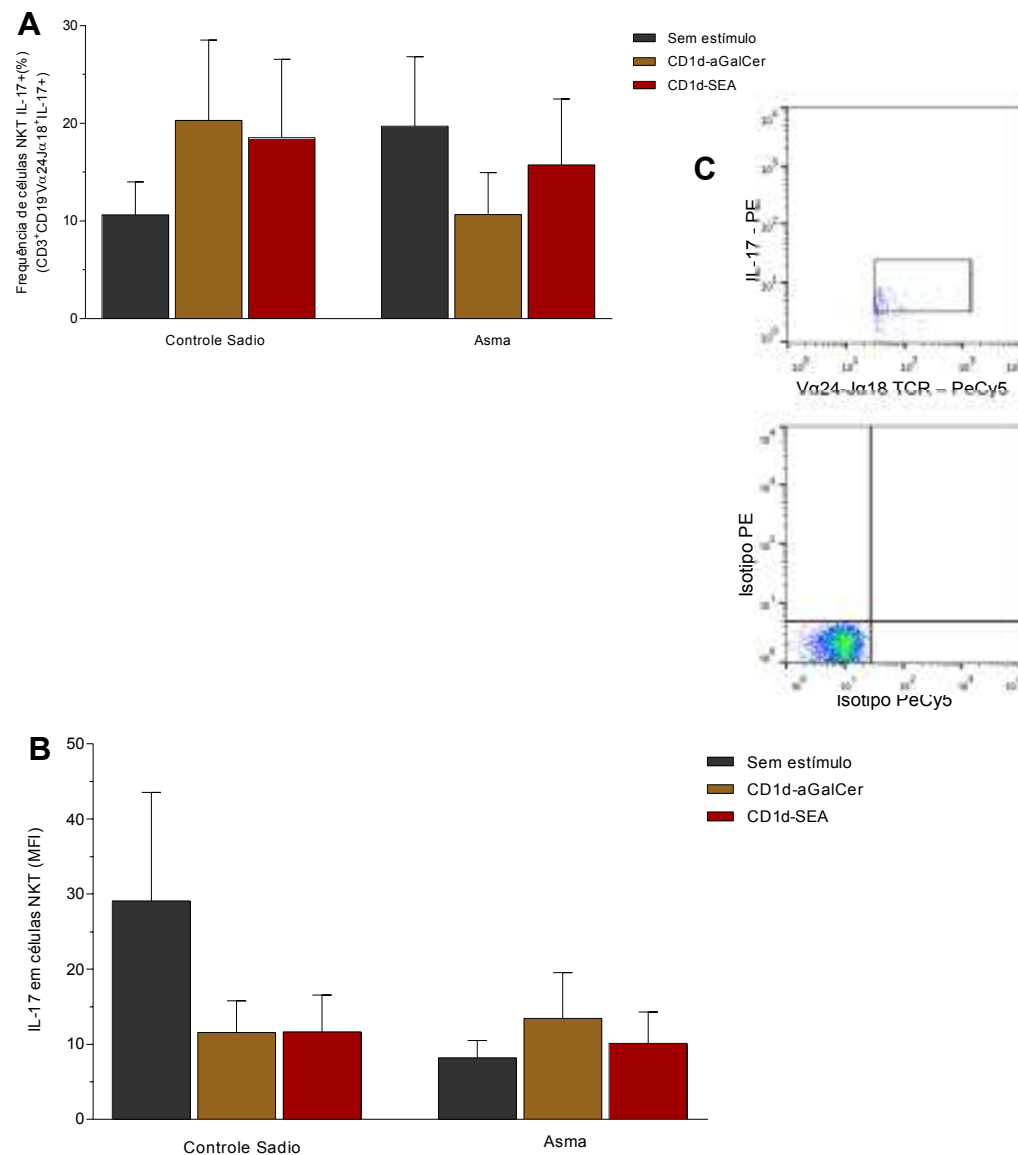


Figura 15. Expressão de IL-17 em Células NKT ($CD3^+CD19^-Va24J\alpha18^+IL-17^+$) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles sadios, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer ou SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-17 intracelular ($CD3^+CD19^-Va24J\alpha18^+IL-17^+$), valores em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de IL-17 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT IL-17⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Também avaliamos a expressão desta citocina nos diferentes subgrupos de asma, entretanto, não foi possível determinar diferenças na comparação deles nem na comparação com os grupos de controles sadios em culturas de células NKT de culturas de PBMC de indivíduos com asma grave [10,40% (2,00-58,00%)], Asma intermitente [9,00% (4,38-26,05%)] ou Controles sadios [11,00% (1,89-18,20%)] sem estímulo. O mesmo pode ser observado na comparação das culturas de indivíduos com Asma grave [11,10% (1,97-35,15%)], asma intermitente [2,20% (0,01-9,17%)] ou controles sadios [16,70% (4,17-30,60%)], estimulados com CD1d- α GalCer, ou de culturas de PBMC de indivíduos com asma grave [6,27% (0,76-39,00%)], asma intermitente [6,23% (0,01-24,23%)] ou controles sadios [9,09% (1,60-37,10%)] estimuladas com CD1d-SEA ($p > 0.05$; respectivamente, Figura 16A).

Ainda neste contexto, e semelhante a avaliação da expressão de IL-17 por meio da média de intensidade de fluorescência observada acima, análises foram realizadas dentro do grupo de asma, comparando os subgrupos de asma intermitente e asma grave, buscando avaliar se havia diferenças na frequência de IL-17 nestas células e/ou na expressão desta citocina. Entretanto, semelhante aos dados da frequência e expressão de IL-17, nos grupos expostos acima, não foi observada diferença nos subgrupos de asma ($p > 0.05$; Figura 16B).

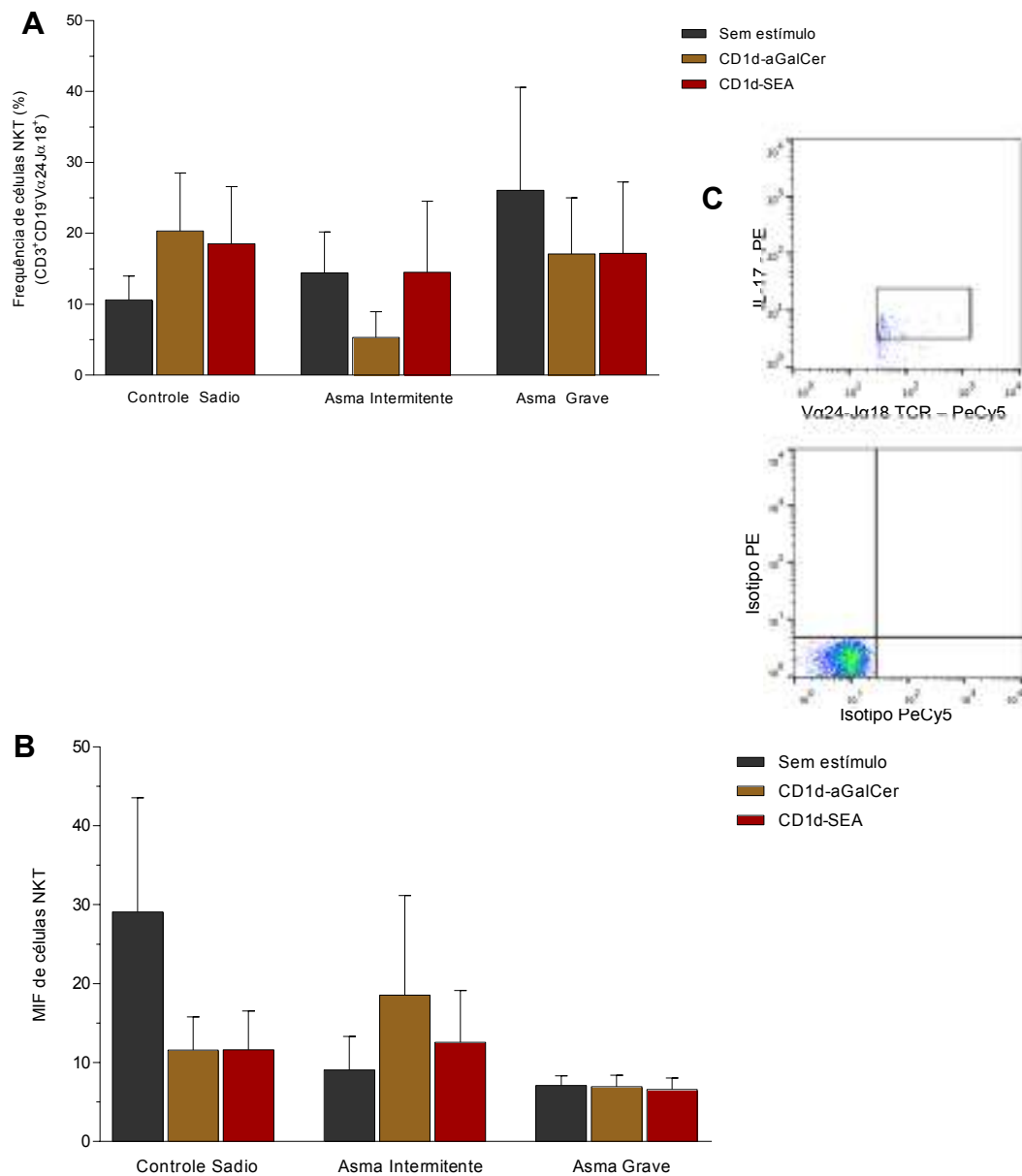


Figura 16. Expressão de IL-17 em Células NKT ($CD3^+CD19^+V\alpha 24J\alpha 18^+IL-17^+$) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles sadios, com asma intermitente ou com asma persistente grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com $\alpha GalCer$ ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-17 intracelular, valores em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da citocina IL-17 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT^+IL-17^+ e seu respectivo gráfico de isotipos.

Por fim, avaliamos a expressão intracelular da citocina regulatória IL-10 em células NKT na cultura de PBMC não estimulada, estimulada com tetrâmeros de CD1d conjugado com α GalCer ou SEA também foi avaliada nos grupos estudados. Observamos que a avaliação da expressão intracelular desta molécula não apresentou diferença na comparação das culturas de PBMC de indivíduos asmáticos [16,35% (6,16-40,30%)] e controles saudáveis [9,21% (2,48-33,30)], sem estímulo, bem como em culturas de PBMC de asmáticos [9,68% (2,94-44,78%)] e controles saudáveis [16,59 (2,44-77,86%)] estimulados com CD1d- α GalCer, assim como em culturas de PBMC de indivíduos asmáticos [6,15% (4,05-38,20%)] e controles saudáveis [8,06% (1,25-30,40%)] estimuladas com CD1d-SEA ($p > 0,05$; Figura 17A). Na avaliação da média de intensidade de fluorescência (MFI) da citocina IL-10, valores semelhantes foram observados nos grupos testados, não havendo diferença entre estes grupos (Figura 17B).

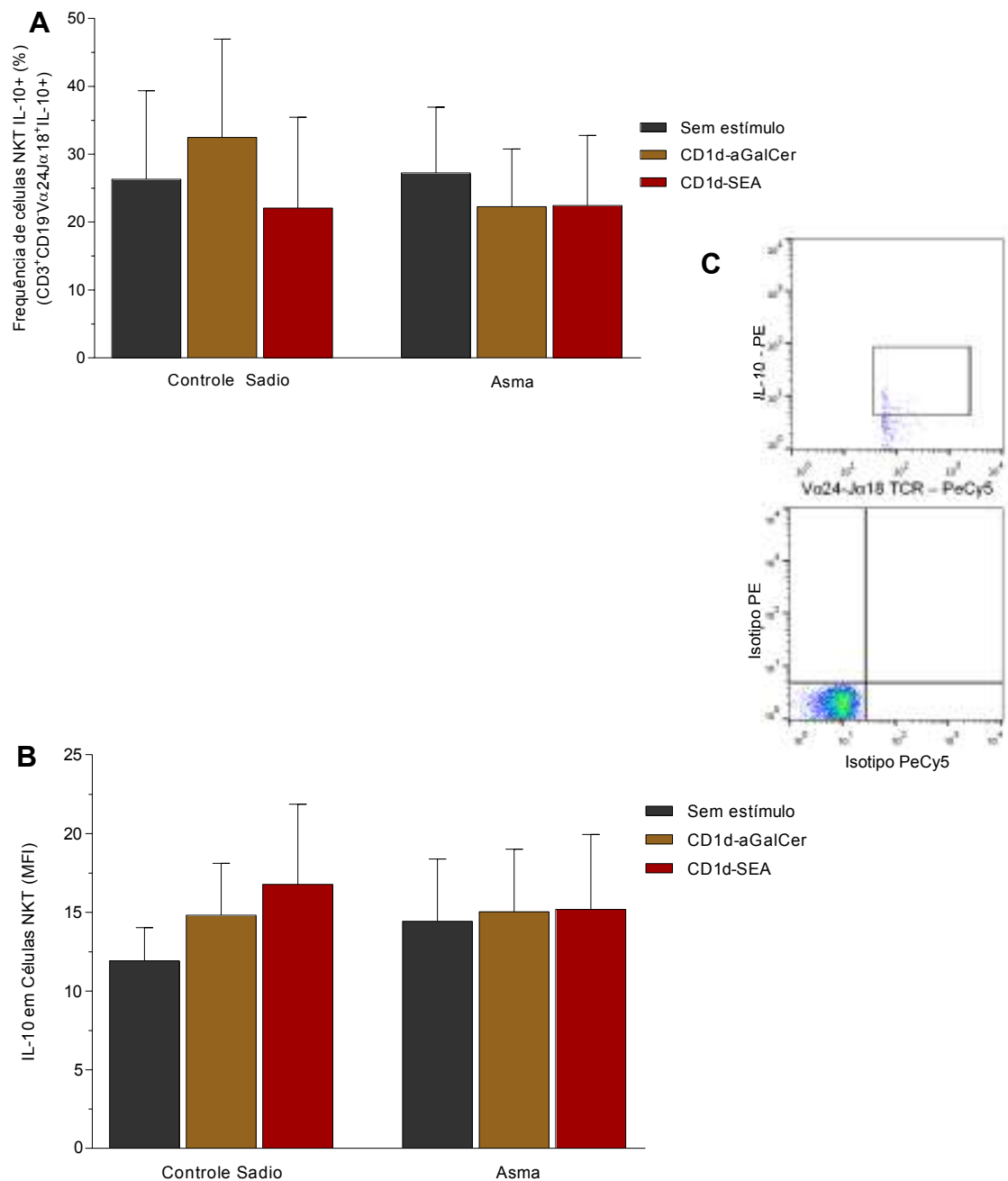


Figura 17. Expressão de IL-10 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻Vα24Jα18⁺IL-10⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis, não estimuladas ou estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com αGalCer ou SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-10 intracelular (CD3⁺CD19⁻Vα24Jα18⁺IL-10⁺), valores em porcentagem. **B.** Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de IL-10 em células NKT. **C.** Representação gráfica da definição de população de células NKT IL-10⁺ e seu respectivo gráfico de isotipo controle.

Realizamos análises semelhantes dentro do grupo de asma, comparando os subgrupos de asma intermitente e asma grave com controles saudáveis, buscando avaliar se havia diferenças na frequência de IL-10 nestas células, entretanto, encontramos diferença na comparação entre os grupos asma grave e asma intermitente, estimulados com o CD1d-SEA [31,80% (6,93-69,80%) e 4,05% (2,91-5,67%), $p < 0.05$]. Contudo, nas comparações das culturas PBMC dos demais grupos, estimuladas com CD1d- α GalCer ou CD1d-SEA, não foram observadas diferenças ($p > 0.05$; Figura 18A).

O mesmo pode ser observado quando avaliamos a expressão desta citocina por meio da média de intensidade de fluorescência na célula, onde não encontramos diferenças entre os subgrupos estudados ($p > 0.05$; Figura 18B).

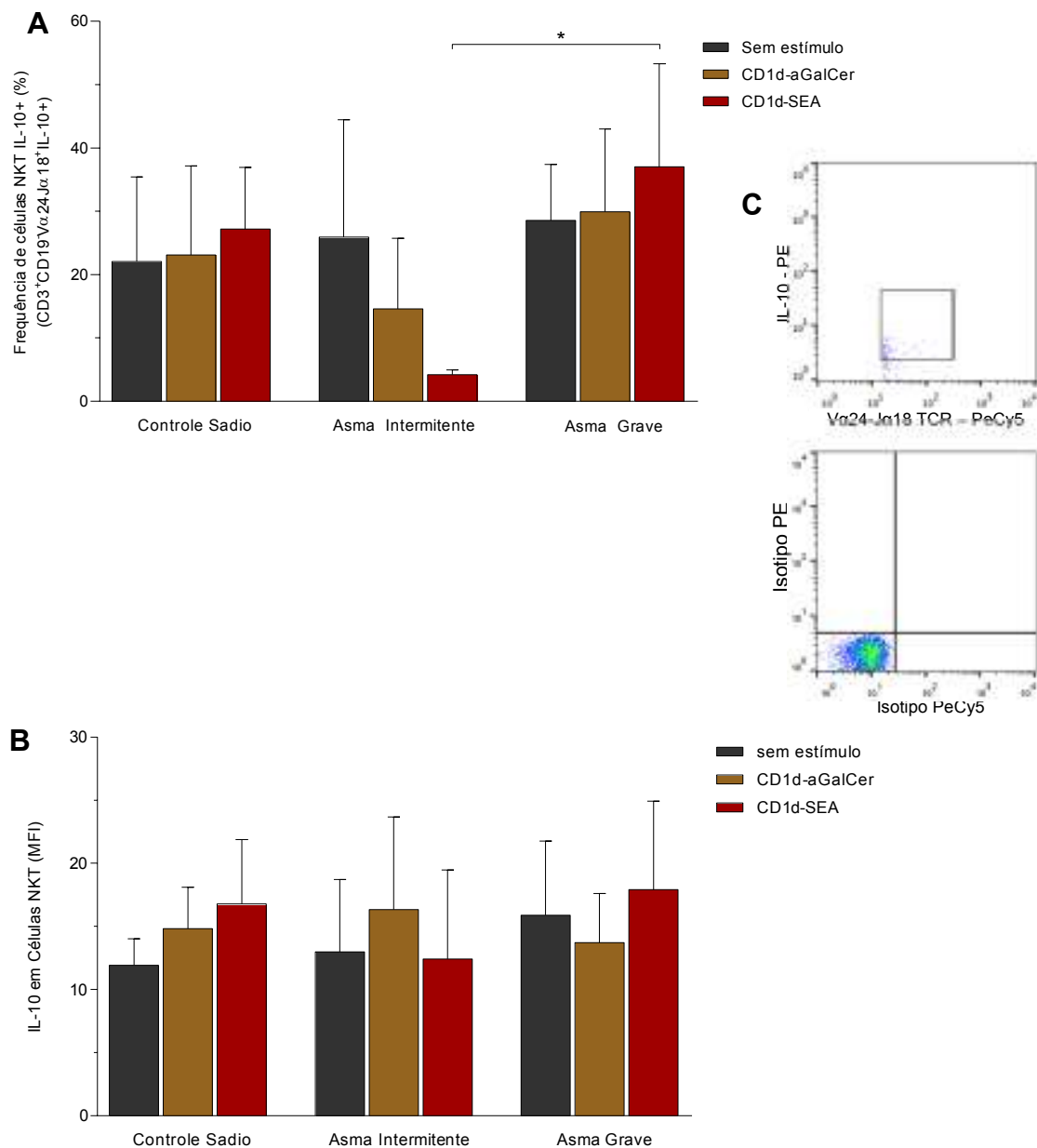


Figura 18. Expressão de IL-10 em Células NKT (CD3⁺CD19⁻Vα24Jα18⁺IL-10⁺) em cultura de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos controles sadios, com asma intermitente ou com asma grave, não estimuladas ou estimuladas com tetrâmero de CD1d conjugados com αGalCer ou com SEA.

A. Frequência de células NKT que expressam IL-10 intracelular, valores em porcentagem; **B.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) da citocina IL-10 em células NKT. **C.** Gráfico representativo da definição de população de células NKT⁺IL-10⁺ e seu respectivo gráfico de isotipos. * < 0,05.

7. DISCUSSÃO

As células NKT desempenham importantes papéis em variados tipos de doenças, por meio da grande produção de citocinas tanto do perfil Th1 quanto Th2, além de sua interação com células dendríticas, linfócitos, neutrófilos e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MICHEL *et al.*, 2007; MESNARD *et al.*, 2009; DE SANTO *et al.*, 2010). Apresentam ainda grande potencial regulatório (LYNCH *et al.*, 2015), associado à expressão de moléculas que são normalmente expressas em células T regulatórias (T_{reg}) e de produção de citocinas após ativação antigênica (SAG *et al.*, 2014).

Dentre algumas doenças importantes, as células NKT destacam-se na progressão do Lupus Eritematoso Sistêmico, a qual está intimamente relacionada com diminuição na frequência de células NKT (OISHI *et al.*, 2001). Na infecção pelo HIV-1 ou pelo *Mycobacterium tuberculosis*, as células NKT apresentam fenótipos relacionados à ativação imune, caracterizada pela expressão de moléculas de superfície como o CD69 (MONTROYA *et al.*, 2008). Em modelo experimental de infecção pelo influenza, as citocinas produzidas por células NKT regulam a produção de IL-5 por células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2), essencial para infiltração gradual, progressiva e para a acumulação de eosinófilos no infiltrado pulmonar (GORSKI *et al.*, 2013). Já nas infecções por helmintos, as células NKT desempenham importante papel principalmente através da produção de citocinas imunorregulatórias (MALLEVAEY *et al.*, 2006), afetando o balanço Th1/Th2 durante a infecção pelo *S. mansoni*, por exemplo (MALLEVAEY *et al.*, 2007). Finalmente, em modelo experimental de inflamação das vias aéreas inferiores, a administração de α GalCer bloqueia de forma efetiva a hiperresponsividade e eosinofilia observada nos pulmões de camundongos previamente sensibilizados (HACHEM *et al.*, 2005; MATSUDA *et al.*, 2005), estando relacionada com a supressão da inflamação alérgica das vias aéreas (KNOTHE *et al.*, 2011).

No presente estudo, avaliamos a frequência de células NKT de indivíduos asmáticos, com asma intermitente e asma grave, expostos ao tetrâmero CD1d ligado ao α GalCer ou ligado ao antígeno solúvel de ovo do *S. mansoni* (SEA). Tanto a frequência de células NKT, quanto a média da intensidade de fluorescência do receptor de células T conservado (V α 24J α 18) das células NKT dos grupos avaliados foram semelhantes entre os diferentes estímulos e quando comparado com indivíduos

saudáveis. Observamos frequência média de 0,25, 0,22 e 0,14% de células NKT em culturas não estimuladas de indivíduos saudáveis, com asma intermitente leve e asma grave, respectivamente, dado que corrobora com alguns autores, que encontraram valores inferiores a 1% (0,01-0,10%) (LEE *et al.*, 2002) de células NKT dentre as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis, 0,02-0,14% em indivíduos transplantados, 0,02% em transplantados livres de rejeição e 0,09% em indivíduos que sofreram rejeição aguda e controles saudáveis (GALANTE *et al.*, 2005).

Estes dados sugerem que, ainda que as células NKT apresentem baixíssima expressão em sangue periférico, o que já está bem descrito na literatura (KITA *et al.*, 2002; KENNA *et al.*, 2003; SLAUENWHITE e JOHNSTON, 2015), os participantes do grupo de asmáticos, apresentam frequência normal ou levemente elevada de células NKT em cultura de sangue periférico. Dados semelhantes foram apresentados por SAG *et al.* (2014), que não encontraram diferenças na frequência total das células NKT de indivíduos com doenças autoimunes, quando comparados com indivíduos saudáveis. Entretanto, não podemos inferir se a frequência destas células está aumentada nos pulmões dos indivíduos com asma e diminuídas nos pulmões dos indivíduos controles saudáveis, como observado por AKBARI *et al.* (2006) ou se estão diminuídas nos indivíduos com asma como foi observado por VIJAYANAND *et al.* (2007).

Diversos autores reportaram que, após sua ativação, as células NKT produzem citocinas de diferentes perfis, inclusive imunoregulatórias, as quais podem direcionar o curso de doenças alérgicas como a asma (COQUET *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2007; 2008). Para verificar a ativação das células NKT expostas a tetrâmeros de CD1d conjugados com α GalCer ou SEA, avaliamos a frequência das células NKT que expressavam a molécula de ativação CD69 e a molécula coestimulatória CD28.

É sabido que CD69 é uma molécula de superfície que serve como um marcador de recente ativação celular (CARNAUD *et al.*, 1999; SHIOW *et al.*, 2006), presente na superfície de linfócitos quando estimulados tanto por citocinas quanto por mitógeno (ALBARRAN *et al.*, 2005). A molécula CD28, por sua vez, desempenha um importante papel não apenas na imunidade adaptativa mediada por células T convencionais, mas também na imunidade inata mediada por células NKT (HAYAKAWA *et al.*, 2001), sendo uma das mais importantes moléculas coestimulatórias em células T. Quando presente em linfócitos T elas são capazes de fornecer sinal de ativação às células apresentadoras de antígenos, através da ligação aos seus receptores B7.1 ou B7.2

(KEIR *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2011), sendo, de acordo com LIU, Y. *et al.* (2011), B7.1 e não B7.2 o receptor crítico para a ativação das células NKT em modelo murino.

Assim como descrito por ALBARRAN *et al.* (2005), que observou frequência de expressão de CD69 acima de 50% em células NKT de indivíduos sadios imunizados contra o vírus da hepatite B, verificamos nos grupos avaliados, frequência superior a 50% das células NKT positivas para CD69, não havendo entretanto diferenças entre os diferentes grupos ou estímulos. O mesmo pode ser observado na avaliação da intensidade de expressão de CD69 na superfície das células NKT. Outros dados ainda demonstram expressão moderada e aumento na média geométrica de CD69 em modelo murino de inibição do receptor de esfingosina-1-fosfato em linfócitos (SHIOW *et al.*, 2006) e em células NKT desafiadas com LPS (SAG *et al.*, 2014), respectivamente. Não obstante estes achados, LEE *et al.* (2002) apontam frequência de CD69 abaixo de 50% em células NKT de doadores saudáveis. Ainda que não tenhamos encontrado diferenças na comparação do número de células NKT nos grupos avaliados, não podemos descartar a possibilidade destas células apresentarem maior expressão de CD69 nos pulmões dos indivíduos com asma, tendo em vista que, como demonstrado por PAGET *et al.* (2011), através de modelo murino de infecção viral do trato respiratório, as células NKT apresentam forte aumento na expressão de CD69, tanto do tecido quanto do lavado broncoalveolar.

Semelhante aumento foi observado por WINGENDER *et al.* (2011) que, em modelo murino de asma desafiados com extrato de poeira doméstica (HDE), observaram o aumento significativo do número total de células NKT bem como na sua expressão de CD69, ainda que não tenha encontrado diferenças no número de células NKT, no seu fenótipo ou aumento da síntese de citocinas nos pulmões ou linfonodos pulmonares dos animais avaliados.

No que diz respeito às células NKT positivas para CD28, não se verificou diferenças entre os grupos estudados. O mesmo foi observado ao avaliarmos sua intensidade de expressão por meio da média de intensidade de fluorescência. Semelhante resultado, porém em células T, foi observado por OLIVEIRA *et al.* (2009), que não encontraram diferenças ao comparar a expressão desta molécula em células T de indivíduos asmáticos infectados e não infectados pelo *S. mansoni*.

Em um estudo realizado por LUCAS *et al.* (2003), foi demonstrado que, apesar das populações de células NKT normalmente estarem altamente ativadas, devido à alta expressão de CD69 em sua superfície, não houve diferença entre os grupos de

indivíduos infectados com o vírus da hepatite C e indivíduos controle, possivelmente devido à compartimentalização destas células em órgãos periféricos. Entretanto, em modelo experimental de sepse, apresentou aumento nas células NKT hepáticas tanto em sua frequência quanto na sua média de intensidade de fluorescência (MFI), apesar da significativa diminuição da quantidade de células NKT hepáticas (SHARMA *et al.*, 2015). Em indivíduos com rinite alérgica, células NKT apresentam maior expressão de CD28 quando comparados com controles não atópicos (MOHAMMADI NEJAD *et al.*, 2013).

Ainda neste contexto, as células NKT, em modelo de metástase pulmonar de melanoma em murino, expressam constitutivamente CD28, sendo que a produção de IL-4 e IFN- γ por meio destas células, em resposta ao α GalCer, necessitam da coestimulação mediada por esta molécula (HAYAKAWA *et al.*, 2001). CHANG *et al.* (2012) demonstraram que o desenvolvimento das células T auxiliares foliculares (T_{FH}), é dependente da coestimulação mediada por CD28, que também responde pela sinalização necessária para a expansão proliferativa de células NKT, havendo possibilidade de também estar associada com a expansão de células NKT foliculares auxiliares (NKT_{FH}; não discutidas neste trabalho) em modelo murino.

Além das funções expostas acima, o CD28 também exerce papel sobre a imunidade contra infecções. Na imunidade contra fungos, tomando como exemplo o estudo realizado por FELONATO *et al.* (2010), que demonstrou a ação do CD28 contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose, através da regulação a expansão de células T_{reg} efectoras e restringindo o crescimento fúngico sem lesar o tecido infectado. No contexto da esquistossomose, o CD28 apresenta, de acordo com OLIVEIRA-PRADO *et al.* (2009), grande importância em processos fisiopatológicos, diminuindo ou elevando a resposta das células T *in vivo* e fornecendo sinais que são essenciais para a ativação de células T auxiliares.

VALLEJO (2005) indica, em sua revisão da literatura, que a perda irreversível da expressão de CD28 é um indicativo do envelhecimento do sistema imune. Entretanto, BOUGUERMOUH *et al.* (2009) apontam em seu artigo evidências de um papel inibitório do CD28 no desenvolvimento de células T CD4⁺ naive em células T auxiliares produtoras de IL-17, sem modulação da expressão de IL-17 em células de memória T CD4⁺.

GUO *et al.* (2008) apontam que o CD28 é essencial para a formação de células T_{reg} periféricas, além de controlar a formação de células T_{reg} a partir de células T CD4⁺.

Estas células T_{regs} são tipicamente categorizadas pela expressão constitutiva de CD25, que é a cadeia alfa do receptor de IL-2 (IL2 α), em sua superfície. Desta forma, as células NKT, por compartilhar receptores com as células T, apresentam algumas características semelhantes às células T_{reg}, como por exemplo a expressão de CD4, CD25 e CTLA-4 em algumas subpopulações (SHEVACH, 2002; HORI *et al.*, 2003; LA CAVA *et al.*, 2006), o que nos levou a avaliar a frequência de CD25 em cultura de células NKT de sangue periférico de indivíduos asmáticos e controles saudáveis.

Ao avaliar o papel de células T_{reg} e NKT no controle da imunidade de alguns tumores, IZHAK *et al.* (2013) encontrou frequência de 0,5% de CD25 em células NKT CD4⁺, em modelo experimental de câncer. Semelhante aos dados de frequência de CD69 em células NKT, ALBARRAN *et al.* (2005) demonstrou que células NKT de indivíduos imunizados contra o vírus da Hepatite B, estimuladas com HBsAg, apresentam maior frequência de CD25 do que as mesmas células de indivíduos não imunizados. Ao avaliarmos a frequência de CD25 em células NKT, observamos maior expressão desta molécula nas culturas de PBMC de asma intermitente quando comparada com asma grave estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer, SEA e nas culturas sem estímulo. Este resultado aparentemente demonstra que a expressão desta molécula pode estar associada a controle da gravidade da doença, bem como sua diminuição, observada nas células de indivíduos com asma grave, pode refletir uma falta de regulação do sistema imune, e conseqüentemente maior gravidade da doença.

Sabe-se que células CD4⁺CD25⁺ foram reportadas em estudos como envolvidas no controle e resolução de dermatite alérgica de contato (BIEDERMANN *et al.*, 2001; FOUSSAT *et al.*, 2003) e que helmintos, como *S. mansoni* e *S. japonicum*, apresentam capacidade de induzir células T_{reg}, por meio de compostos como o SEA, fosfatidilserina e HSP60, que podem induzir células T_{reg} a promover sua sobrevivência (BELKAID e ROUSE, 2005; PEARCE, 2005; SAKAGUCHI *et al.*, 2006; NAUSCH *et al.*, 2011). Deste modo, as subpopulações de células NKT se regulam de forma cruzada, formando um eixo imunorregulador que pode influenciar o equilíbrio de uma série de outras células regulatórias como células T_{reg} (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC), macrófagos M2, células dendríticas reguladoras, dentre outras (TERABE e BERZOFSKY, 2014).

AS células NKT podem ser CD4⁺, CD8⁺ ou CD4⁻CD8⁻ duplo negativo (DN) (GODFREY *et al.*, 2010) além de apresentar um perfil de expressão de citocinas que

dependerá, do tipo de célula NKT estimulada, bem como do tipo de estímulo utilizado, dentre outros fatores (BERNIN *et al.*, 2016)

Para confirmar qual o perfil das células NKT deste estudo, avaliamos a expressão intracelular das citocinas dos perfis Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4 e IL-13), Th17 (IL-17) e regulatório (IL-10) nas culturas de PBMC de indivíduos com asma intermitente e asma grave, comparados com culturas de PBMC de controles sadios estimuladas com o tetrâmero CD1d conjugado com α GalCer, SEA ou sem estímulo.

Já é notório que linfócitos do perfil Th1 mediam a imunidade protetora contra vírus, bactérias intracelulares e protozoários, por meio da ativação de células fagocitárias e citotóxicas, com a subsequente produção de moléculas efetoras e citocinas, como o IFN- γ , por exemplo (KOBAYASHI *et al.*, 2012). Contudo, a ativação exacerbada deste perfil pode induzir, eventualmente, uma resposta imune forte ao ponto de desencadear processos inflamatórios patogênicos e doenças autoimunes. Ainda neste contexto, YANG *et al.* (2009) demonstraram, em modelo animal, que IFN- γ secretada por células Th1 contribuem para a indução da hiper-reatividade das vias aéreas.

Desta forma, levando em consideração que as células NKT são importantes fontes de IFN- γ no início da resposta imune, que ainda podem desempenhar função protetora contra inflamações alérgicas (GRELA *et al.*, 2011), e que esta citocina pode desempenhar um papel importante quando produzidas por células T em resposta a infecções por helmintos do gênero *Schistosoma* (SUN *et al.*, 2012), decidimos avaliar a expressão intracelular de IFN- γ em células NKT de indivíduos com asma intermitente e asma grave. Observamos que o grupo de asmáticos (composto por indivíduos com asma intermitente e asma grave) apresentou expressão reduzida de IFN- γ , com valores aproximadamente cem vezes menores de IFN- γ do que os controles sadios, o que nos levou a comparar os subgrupos de asma. Nesta avaliação pudemos observar considerável diminuição na expressão de intracelular de IFN- γ dos indivíduos asmáticos, principalmente quando comparados ambos grupos estimulados com CD1d conjugado ao α GalCer. Contudo, estudos realizados em modelo murino de asma verificaram que houve aumento de IFN- γ tanto no lavado broncoalveolar quanto nos pulmões dos animais sensibilizados com ovalbumina (OVA), tratados com α GalCer (HACHEM *et al.* (2005); GRELA *et al.*, 2011). Como no nosso estudo avaliamos células de sangue periférico, é possível que as células NKT destes indivíduos,

comprometidas com produção de IFN- γ , estejam nos sítios onde estão ocorrendo as respostas inflamatórias.

Ainda buscando definir o perfil de resposta das células NKT neste estudo, e tendo em vista que células NKT produzem tanto IL-4 quanto IL-13 (AKBARI *et al.*, 2003) e que estas citocinas compartilham funções biológicas (SUN *et al.*, 2012), bem como desempenham importante papel na resistência contra helmintos (BANCROFT *et al.*, 1998), avaliamos a expressão destas citocinas por estas células após estímulos com os antígenos lipídicos α GalCer e SEA conjugado ao tetrâmero CD1d.

HACHEM *et al.* (2005) apontaram em seu estudo que, assim como IFN- γ , foi observado aumento nos valores de IL-4 no lavado broncoalveolar em modelo murino de asma. Por outro lado, SUN *et al.* (2012) observou que não houve aumento significativo nas concentrações de IL-4 em sobrenadante de cultura de esplenócitos de grupos de camundongos naïve, após tratamento com SEA e com OVA.

Ao comparar o grupo de asma e o grupo de controles sadios observamos frequência e intensidade de expressão de IL-4 em células NKT semelhantes entre os grupos. O mesmo foi observado na avaliação das células NKT IL-13⁺, onde foi demonstrado que ambos grupos apresentaram frequência semelhantes tanto para a frequência quanto para a avaliação da expressão de IL-13 por estas células.

Avaliamos ainda a expressão intracelular de IL-17 em células NKT de culturas de PBMC de indivíduos asmáticos e controles sadios. Sabe-se que populações de NKT produzem altos níveis de citocinas logo após sua ativação, e que desta forma IL-17 segue este mesmo padrão nas células NKT, que produzem altas concentrações desta citocina com poucas horas após sua ativação (COQUET *et al.*, 2008). O mesmo foi observado por MBOW *et al.* (2013) ao analisar a expressão desta citocina em células T CD4⁺ de crianças residentes em área endêmica de *Schistosoma haematobium* e em modelo experimental de granuloma de *S. mansoni*. No contexto das inflamações das vias aéreas, MICHEL *et al.* (2007) demonstraram que de as células NKT podem contribuir fortemente secretando IL-17 além de atuar no recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. Adicionalmente, tem sido proposta correlação negativa entre produção de IL-17 e função pulmonar de indivíduos asmáticos, além de menor produção de IL-10 em indivíduos asmáticos, sugerindo importante participação da IL-17 na patogênese da asma, especialmente na ausência de IL-10 (RAEISZADEH JAHROMI *et al.*, 2014).

As células NKT são capazes de produzir grandes quantidades de IL-10 (LOTTER *et al.*, 2009), direcionando o tipo de resposta imune subsequente. Em modelo murino a IL-10 produzida por células NKT estimuladas por LPS apresenta capacidade de regular a quantidade de células NKT e células T que expressam IFN- γ (JUN YAN, 2016). Outro ponto a ser considerado é que células NKT produtoras de IL-10 consistem em uma distinta subpopulação de NKT (NKT10) com potencial regulatório, caracterizada pela expressão de diversos compostos expressos pelas células T_{reg}, além da grande produção de IL-10 após estímulo antigênico (SAG *et al.*, 2014).

Desta forma, buscamos verificar se as células NKT dos grupos estudados apresentavam características regulatórias, por meio da expressão intracelular de IL-10 em cultura de PBMC de indivíduos asmáticos e controles saudáveis. Sabe-se que indivíduos asmáticos apresentam menor capacidade de produzir citocinas e moléculas regulatórias, como a IL-10, e que a quantidade de IL-10 produzida pode estar inversamente relacionada à gravidade da doença (TOSCA *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2014; RAEISZADEH JAHROMI *et al.*, 2014).

Apesar de encontrarmos resultados aparentemente contraditórios, onde maior frequência de células NKT de indivíduos com asma grave expressavam IL-10 quando estimuladas com SEA, em comparação com asma intermitente, observamos que a intensidade de expressão foi semelhante entre eles. Uma possível explicação para este fenômeno poderia ser a maior capacidade responsiva destas células, em virtude do estado de inflamação crônica observada nos indivíduos com asma grave, sendo então capazes de responder melhor aos antígenos expostos. Como o SEA é sabidamente um conjunto de antígenos que induz produção de IL-10 e IFN- γ (VIANA *et al.*, 1994; SILVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2012), ele pode ter sido capaz de promover maior comprometimento na produção de IL-10 por células NKT de indivíduos com asma grave.

Adicionalmente, neste estudo observamos este mesmo padrão de resposta para expressão de IFN- γ , onde células NKT de asmáticos graves expressavam mais IFN- γ do que as células de indivíduos com asma intermitente, quando estimuladas também com SEA, o que também poderia ser explicado por uma possível maior capacidade responsiva das células NKT de indivíduos com asma grave frente a um antígeno que é capaz de induzir produção de IFN- γ . Ademais, verificou-se pela primeira vez a capacidade do antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni*

estimular as células NKT, por meio do complexo CD1d, semelhante ao observado com outros patógenos associados ao α -GalCer, como o *E. Coli* ou *Entamoeba histolytica*.

8. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Não houve diferença na frequência de células NKT em culturas de PBMC não estimuladas, estimuladas com α GalCer ou SEA, nos grupos estudados
- Não houve diferença na expressão de CD69, CD28 e CD25 na superfície de células NKT nos diferentes grupos e em todas as condições testadas.
- A frequência de células NKT expressando CD25 foi inferior em indivíduos com asma grave quando comparado com asma intermitente, em todas as condições testadas.
- A frequência de células NKT expressando CD279 após estímulo com α GalCer foi superior em indivíduos com asma intermitente, quando comparados com controles saudáveis.
- Não foram observadas diferenças na expressão de IL-4, IL-13 e IL-17 em células NKT nos diferentes estímulos e grupos avaliados.
- A expressão de IFN- γ após estímulo com α GalCer ou SEA foi inferior em células NKT de indivíduos com asma intermitente quando comparados com controles saudáveis.
- A expressão de IFN- γ após estímulo com SEA foi superior em células NKT de indivíduos com asma grave, quando comparado com asma intermitente.
- A frequência de células NKT expressando IL-10 após estímulo com SEA foi superior em indivíduos com asma grave, quando comparado com asma intermitente.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células NKT parecem ser uma linhagem celular altamente plástica, adaptando-se ao meio em que ela se encontra. De uma maneira geral estas células estão prontas para exercer sua função. Entretanto, as células NKT demonstraram ser uma população celular de difícil controle, já que elas são capazes de produzir simultaneamente mais de um tipo de citocina com características teoricamente opostas.

Embora promissoras, pode ser difícil utilizar as células NKT em uma intervenção imunológica, tendo esta célula como alvo específico para alterar o perfil de resposta imune do indivíduo com asma. Entretanto, a identificação de algum antígeno que seja capaz de induzir exclusivamente uma citocina, como a IL-10, poderá ser útil em uma possível futura intervenção terapêutica na tentativa de regular a resposta imune da asma.

As células NKT avaliadas mostraram-se capazes de serem ativadas por meio da utilização do SEA conjugado ao tetrâmero CD1d. Podendo, talvez, ser uma das fontes antigênicas capaz de estimular estas células a expressar compostos que, como citado acima, capazes de atuar modulando a resposta imune durante a asma.

Este e outros estudos que contribuem para a melhor compreensão da resposta imunológica, inata ou adaptativa, da asma auxiliam no desenvolvimento de novas e melhores estratégias terapêuticas, que visam não apenas o controle das manifestações clínicas, mas até mesmo a cura.

10. REFERÊNCIAS

AKBARI, O. et al. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. **N Engl. J. Med.**, v. 354, n. 11, p. 1117-1129, mar. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540612> >.

AKBARI, O. et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. **Nat. Med.**, v. 9, n. 5, p. 582-588, may. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669034> >.

AKBARI, O. et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. **Mucosal Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 81-91, jan. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741598> >.

ALBARRAN, B. et al. Profiles of NK, NKT cell activation and cytokine production following vaccination against hepatitis B. **APMIS**, v. 113, n. 7-8, p. 526-535, jul-aug. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086823> >.

ANANDAN, C. et al. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. **Allergy**, v. 65, n. 2, p. 152-167, feb. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912154> >.

ARAUJO, M. I. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 6, p. 1399-1403, 1996.

ARAUJO, M. I. et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 10, p. 1797-1803, nov. 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15499536 >.

ARAUJO, M. I. et al. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 123, n. 2, p. 145-148, oct. 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11060486 >.

ASBAI/SBPT/SBP. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 7, p. 447-474, 2006.

ASHER, M. I. et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. **Eur. Respir. J.**, v. 8, n. 3, p. 483-491, mar. 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7789502 >.

ASTHMA, G. I. F. **Global strategy for asthma management and prevention - revised 2014**. 2014.

BANCROFT, A. J.; MCKENZIE, A. N.; GRENCIS, R. K. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. **J. Immunol.**, v. 160, n. 7, p. 3453-3461, apr. 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531306> >.

BEL, E. H. Clinical phenotypes of asthma. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 10, n. 1, p. 44-50, jan. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749605> >.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 353-360, apr. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785761> >.

BELLANTI, J. A.; SETTIPANE, R. A. Natural killer and invariant natural killer T cells in childhood asthma: Quo vadis? **Allergy Asthma Proc**, v. 34, n. 1, p. 1-2, jan-feb. 2013.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The biology of NKT cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 297-336, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17150027> >.

BERNIN, H. et al. The cytokine profile of human NKT cells and PBMCs is dependent on donor sex and stimulus. **Med. Microbiol. Immunol.**, feb. 20 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895635> >.

BIEDERMANN, T. et al. Reversal of established delayed type hypersensitivity reactions following therapy with IL-4 or antigen-specific Th2 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 5, p. 1582-1591, may. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11465116> >.

BLACKBURN, M. R. et al. Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 3, p. 332-344, aug. 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12897202 >.

BOUGUERMOUTH, S. et al. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e5087, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333372> >.

BOUSQUET, J. et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 126, n. 5, p. 926-938, nov. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926125> >.

BRATKE, K.; JULIUS, P.; VIRCHOW, J. C. Invariant natural killer T cells in obstructive pulmonary diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 2, p. 194-195, jul. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632897> >.

BURNEY, P. et al. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, n. 3, p. 314-322, mar. 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9058686 >.

BURNEY, P. G. et al. The European Community Respiratory Health Survey. **Eur. Respir. J.**, v. 7, n. 5, p. 954-60, may. 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8050554 >.

CAMATEROS, P. et al. Chronic asthma-induced airway remodeling is prevented by toll-like receptor-7/8 ligand S28463. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 175, n. 12, p. 1241-1249, jun. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400732> >.

CAMPOS, R. A. et al. Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity. **J. Immunol.**, v. 177, n. 6, p. 3686-3694, sep. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951328> >.

CARDOSO, L. S.; OLIVEIRA, S. C.; ARAUJO, M. I. Schistosoma mansoni antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. **Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets**, dec. 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22214332 >.

CARDOSO, L. S. et al. Schistosoma mansoni antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 160, n. 2, p. 266-274, may. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132231> >.

CARDOSO, L. S. et al. Schistosoma mansoni antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl 1, p. 339-343, sep. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308794> >.

CARNAUD, C. et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **J. Immunol.**, v. 163, n. 9, p. 4647-4650, nov. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528160> >.

CHACKO, B. K. et al. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. **Lab. Invest.**, v. 93, n. 6, p. 690-700, jun. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23528848> >.

CHANEZ, P. et al. Omalizumab-induced decrease of Fc ϵ RI expression in patients with severe allergic asthma. **Respir. Med.**, v. 104, n. 11, p. 1608-1617, nov. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801010> >.

CHANG, P. P. et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 35-43, jan. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22120117> >.

CHANG, W. S. et al. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. **J. Immunol.**, v. 181, n. 10, p. 6707-6710, nov. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981087> >.

COQUET, J. M. et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 32, p. 11287-11292, aug. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685112> >.

COQUET, J. M. et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. **J. Immunol.**, v. 178, n. 5, p. 2827-5834, mar. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312126> >.

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human Schistosoma mansoni infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 1, p. 171-177, jan. 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9686196 >.

CROISANT, S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 795, p. 17-29, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162900> >.

DE SANTO, C. et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 11, p. 1039-1046, nov. 2010. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890286> >.

DUNNE, D. W. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 1483-1494, jun. 1992. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1601036 >.

DURGAN, K. et al. Targeting NKT cells and PD-L1 pathway results in augmented anti-tumor responses in a melanoma model. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 60, n. 4, p. 547-558, apr. 2011. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240487> >.

ECRHS. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). **Eur. Respir. J.**, v. 9, n. 4, p. 687-695, apr. 1996. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8726932 >.

_____. European Community Respiratory Health Survey. 2012. Disponível em: <
<http://www.ecrhs.org/home.htm> >. Acesso em: 13/10/2015.

ELLWOOD, P. et al. The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 9, n. 1, p. 10-16, jan. 2005. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15675544 >.

EMAD, A.; DROUIN, R. Evaluation of the impact of density gradient centrifugation on fetal cell loss during enrichment from maternal peripheral blood. **Prenat. Diagn.**, v. 34, n. 9, p. 878-885, sep. 2014. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752776> >.

FAVEEUW, C. et al. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice. **J. Immunol.**, v. 169, n. 2, p. 906-912, jul. 2002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097395> >.

FELONATO, M. et al. CD28 exerts protective and detrimental effects in a pulmonary model of paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 11, p. 4922-4935, nov. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713624> >.

FOUSSAT, A. et al. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. **J. Immunol.**, v. 171, n. 10, p. 5018-5026, nov. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607898> >.

GALANTE, N. Z. et al. Frequency of V α 24+V β 11+ NKT cells in peripheral blood of human kidney transplantation recipients. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, n. 1, p. 53-58, jan. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589459> >.

GINA, G. S. F. A. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention** (GINA) 2006.

GODFREY, D. I.; STANKOVIC, S.; BAXTER, A. G. Raising the NKT cell family. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 3, p. 197-206, mar. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139988> >.

GORSKI, S. A.; HAHN, Y. S.; BRACIALE, T. J. Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 9, p. e1003615, sep. 2013.. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068930> >.

GRELA, F. et al. The TLR7 agonist R848 alleviates allergic inflammation by targeting invariant NKT cells to produce IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 186, n. 1, p. 284-290, jan. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131420> >.

GUO, F. et al. CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. **J. Immunol.**, v. 181, n. 4, p. 2285-22891, aug. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684917> >.

GUPTA, A. et al. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. **Thorax**, v. 69, n. 6, p. 508-515, jun. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347461> >.

HACHEM, P. et al. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN- γ . **Eur. J. Immunol.**, v. 35, n. 10, p. 2793-2802, oct. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180255> >.

HAILE, S. et al. Mucous-cell metaplasia and inflammatory-cell recruitment are dissociated in allergic mice after antibody- and drug-dependent cell depletion in a murine model of asthma. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 20, n. 5, p. 891-902, may. 1999. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10226059 >.

HANSEN, G. et al. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 2, p. 175-183, jan. 1999. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9916129 >.

HASHIMOTO, T. et al. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 137 Suppl 1, p. 51-54, 2005. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15947485 >.

HAYAKAWA, Y. et al. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. **J. Immunol.**, v. 166, n. 10, p. 6012-6018, may. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342617> >.

HECK, S. et al. Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 168, n. 4, p. 241-252, feb. 2016.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895179> >.

HEIL, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1526-1529, mar. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976262> >.

HELLINGS, P. W. et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 28, n. 1, p. 42-50, jan. 2003. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12495931 >.

HOKKE, C. H.; YAZDANBAKHS, M. Schistosome glycans and innate immunity. **Parasite Immunol.**, v. 27, n. 7-8, p. 257-264, jul-aug. 2005. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138846> >.

HOLGATE, S. T. et al. Relationship between mediator release from human lung mast cells in vitro and in vivo. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 77, n. 1-2, p. 47-56, 1985. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2409026 >.

HONORATI, M. C.; CATTINI, L.; FACCHINI, A. IL-17, IL-1beta and TNF-alpha stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, n. 9, p. 683-691, sep. 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15325633 >.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, feb. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522256> >.

HOSHINO, H. et al. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, n. 1 Pt 1, p. 143-149, jan. 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10629464 >.

HULTNER, L. et al. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. **J. Immunol.**, v. 164, n. 11, p. 5556-5563, jun. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820229> >.

HUMBERT, M. et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. **Allergy**, v. 60, n. 3, p. 309-316, mar. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15679715> >.

ISAAC. 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**, v. 351, n. 9111, p. 1225-1232, apr. 25 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9643741 >.

IZHAK, L. et al. Delicate balance among three types of T cells in concurrent regulation of tumor immunity. **Cancer Res.**, v. 73, n. 5, p. 1514-1523, mar. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23319803> >.

JUN YAN, A. M. et al. IL-30 (IL27p28) alleviates sepsis via modulation of cytokine profiles produced by NKT cells. **J. Hepatol.**, 2016.

JURK, M. et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 499, jun. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032557> >.

KAPLAN, M. H.; HUFFORD, M. M.; OLSON, M. R. The development and in vivo function of T helper 9 cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 15, n. 5, p. 295-307, may. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848755> >.

KAWANO, T. et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1626-1629, nov. 1997.. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374463> >.

KAWANO, T. et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. **Cancer Res**, v. 59, n. 20, p. 5102-5105, oct. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537282> >.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 677-704, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173375> >.

KENNA, T. et al. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. **J. Immunol.**, v. 171, n. 4, p. 1775-1779, aug. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12902477> >.

KHOO, K. H. et al. Structural characterization of glycosphingolipids from the eggs of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Glycobiology**, v. 7, n. 5, p. 653-661, jul. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254047> >.

KIM, E. Y. et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. **Nat. Med.**, v. 14, n. 6, p. 633-640, jun. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488036> >.

KITA, H. et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1031-1043, oct. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360465> >.

KITAGAKI, K. et al. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. **J. Immunol.**, v. 177, n. 3, p. 1628-1635, aug. 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16849471 >.

KNOTHE, S. et al. The NKT cell ligand alphaGalactosylceramide suppresses allergic airway inflammation by induction of a Th1 response. **Vaccine**, v. 29, n. 25, p. 4249-4255, jun. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463684> >.

KOBAYASHI, M. et al. IFN-gamma elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. **Eur. J. Immunol.**, v. 42, n. 2, p. 393-402, feb. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105467> >.

KRONENBERG, M.; GAPIN, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 557-568, aug. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154375> >.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. **Front. Immunol.**, v. 6, p. 620, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779180> >.

LA CAVA, A.; VAN KAER, L.; FU DONG, S. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 7, p. 322-327, jul. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735139> >.

LA FLAMME, A. C.; RUDDENKLAU, K.; BACKSTROM, B. T. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 9, p. 4996-5004, sep. 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12933842 >.

LARRUBIA, J. R. et al. Bim-mediated apoptosis and PD-1/PD-L1 pathway impair reactivity of PD1(+)/CD127(-) HCV-specific CD8(+) cells targeting the virus in chronic hepatitis C virus infection. **Cell Immunol.**, v. 269, n. 2, p. 104-114, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21481848> >.

LARRUBIA, J. R. et al. Costimulatory molecule programmed death-1 in the cytotoxic response during chronic hepatitis C. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 41, p. 5129-5140, nov. 2009.. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891011> >.

LEE, P. T. et al. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 5, p. 637-641, mar. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877486> >.

LICARI, A. et al. The discovery and development of omalizumab for the treatment of asthma. **Expert Opin. Drug Discov.**, v. 10, n. 9, p. 1033-1042, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979110> >.

LISBONNE, M. et al. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. **J. Immunol.**, v. 171, n. 4, p. 1637-1641, aug.2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525661> >.

LYNCH, L. et al. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. **Nat Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 85-95, jan. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436972> >.

MALLEVAEY, T. et al. Invariant and noninvariant natural killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2171-2180, may. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17353286> >.

MALLEVAEY, T. et al. Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni. **J. Immunol.**, v. 176, n. 4, p. 2476-2485, feb. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456008> >.

MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469-478, may. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15080825> >.

MATANGKASOMBUT, P. et al. Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 123, n. 5, p. 1181-1185, may. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356791> >.

MATSUDA, H. et al. alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 33, n. 1, p. 22-31, jul. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802553> >.

MBOW, M. et al. T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 207, n. 1, p. 186-195, jan. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087431> >.

MEDEIROS, M., JR. et al. Schistosoma mansoni infection is associated with a reduced course of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 5, p. 947-951, may. 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12743556 >.

MESNARD, L. et al. Invariant natural killer T cells and TGF-beta attenuate anti-GBM glomerulonephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, n. 6, p. 1282-1292, jun. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470687> >.

METELITSA, L. S. et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. **J. Immunol.**, v. 167, n. 6, p. 3114-3122, sep. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544296> >.

MEYER, E. H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. iNKT cells in allergic disease. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 314, p. 269-291, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17593665> >.

MICHEL, M. L. et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 5, p. 995-1001, may. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470641> >.

MODENA, B. D.; DAZY, K.; WHITE, A. Emerging concepts: mast cell involvement in allergic diseases. **Transl. Res.**, feb. 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976119> >.

MOHAMMADI NEJAD, M. et al. Increased expression of CD69 antigen on human peripheral blood natural killer cells in patients with allergic rhinitis. **Iran J Allergy Asthma Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 68-74, mar. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454781> >.

MONTOYA, C. J. et al. Invariant NKT cells from HIV-1 or Mycobacterium tuberculosis-infected patients express an activated phenotype. **Clin. Immunol.**, v. 127, n. 1, p. 1-6, apr. 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304877> >.

MOORE, W. C. et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. **Am. J. Respir. Crit Care Med.**, v. 181, n. 4, p. 315-23, feb. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892860> >.

MOREIRA-TEIXEIRA, L. et al. Rapamycin combined with TGF-beta converts human invariant NKT cells into suppressive Foxp3+ regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 188, n. 2, p. 624-631, jan. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156591> >.

MUKHERJEE, M.; SEHMI, R.; NAIR, P. Anti-IL5 therapy for asthma and beyond. **World All. Organ J.**, v. 7, n. 1, p. 32, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709744> >.

MUTALITHAS, K. et al. Bronchoalveolar lavage invariant natural killer T cells are not increased in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 119, n. 5, p. 1274-1276, may. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17399777> >.

NAKAE, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. **Immunity**, v. 17, n. 3, p. 375-387, sep. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354389> >.

NAUSCH, N. et al. Regulatory and activated T cells in human *Schistosoma haematobium* infections. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16860, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347311> >.

NIH. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, S94-138, 2007.

OISHI, Y. et al. Selective reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, v. 28, n. 2, p. 275-283, feb. 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246661> >.

OLIVEIRA-PRADO, R. et al. CD4 and CD8 distribution profile in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. **Scand. J. Immunol.**, v. 69, n. 6, p. 521-528, jun. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439013> >.

OLIVEIRA, R. R. et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 2, p. 296-305, feb. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302866> >.

OLIVEIRA, R. R. et al. *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 2, p. 223-229, feb. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136071> >.

PAGET, C. et al. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. **J. Immunol.**, v. 186, n. 10, p. 5590-5602, may, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490153> >.

PAPADOPOULOS, N. G. et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. **Allergy**, v. 67, n. 8, p. 976-997, aug. 2012.. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702533> >.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunol.**, v. 27, n. 7-8, p. 265-270, jul.-aug. 2005.. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138847> >.

PLATTS-MILLS, T. A.; WHEATLEY, L. M. The role of allergy and atopy in asthma. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 2, n. 1, p. 29-34, jan. 1996. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9363112 >.

PRAUSE, O. et al. Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. **Thorax**, v. 59, n. 4, p. 313-317, apr. 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15047951 >.

RAEISZADEH JAHROMI, S. et al. Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. **J. Asthma**, v. 51, n. 10, p. 1004-1013, dec. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24960440> >.

RANDOLPH, D. A. et al. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. **J. Immunol.**, v. 162, n. 4, p. 2375-2383, feb. 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9973518 >.

REDDEL, H. K. et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. **Eur. Respir. J.**, v. 46, n. 3, p. 622-639, sep. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26206872> >.

RENAULD, J. C. et al. Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, genomic organization, and comparison with the mouse gene. **J. Immunol.**, v. 144, n. 11, p. 4235-4241, jun. 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1971295> >.

ROJAS-ZULETA, W. G.; VASQUEZ, G. Th9 lymphocytes: A recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases. **Autoimmun Rev.**, feb. 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921642> >.

SAG, D. et al. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 9, p. 3725-3740, sep. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25061873> >.

SAKAGUCHI, S. et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 8-27, aug. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903903> >.

SBP; ASBAI; SBPT. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 7, p. 447-474, 2006.

SCHLUGER, N. W.; KOPPAKA, R. Lung disease in a global context. A call for public health action. **Ann. Am. Thorac Soc.**, v. 11, n. 3, p. 407-416, mar. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673697> >.

SCHNEIDER, L. C. et al. A pilot study of omalizumab to facilitate rapid oral desensitization in high-risk peanut-allergic patients. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 132, n. 6, p. 1368-1674, dec. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176117> >.

SCHUMANN, J. et al. Cutting edge: influence of the TCR V beta domain on the avidity of CD1d:alpha-galactosylceramide binding by invariant V alpha 14 NKT cells. **J. Immunol.**, v. 170, n. 12, p. 5815-5819, jun. 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794105> >.

SCOTT-BROWNE, J. P. et al. Germline-encoded recognition of diverse glycolipids by natural killer T cells. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 10, p. 1105-1113, oct. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828267> >.

SEN, Y. et al. V alpha 24-invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement. **J. Immunol.**, v. 175, n. 8, p. 4914-4926, oct. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210593> >.

SHARMA, A. et al. Differential alterations of tissue T-cell subsets after sepsis. **Immunol. Lett.**, v. 168, n. 1, p. 41-50, nov. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362089> >.

SHARMA, A. A. et al. Ex vivo purification and characterization of human invariant Natural Killer T cells. **J. Immunol. Meth.**, v. 373, n. 1-2, p. 1-7, oct. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854781> >.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 389-400, jun. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093005> >.

SHIM, J. U.; RHEE, J. H.; KOH, Y. I. TLR4, 5, and 9 Agonists Inhibit Murine Airway Invariant Natural Killer T Cells in an IL-12-Dependent Manner. **Allergy Asthma Immunol. Res.**, v. 4, n. 5, p. 295-304, sep. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950036> >.

SHIOW, L. R. et al. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 540-544, mar. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525420> >.

SILVEIRA, A. M. et al. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 9, p. 514-519, sep. 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251399> >.

SLAUENWHITE, D.; JOHNSTON, B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. **Front Immunol.**, v. 6, p. 255, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26074921> >.

SMILEY, S. T.; KAPLAN, M. H.; GRUSBY, M. J. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 977-979, feb. 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020080> >.

SOLE, D. et al. 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. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 5, p. 341-346, sep.-oct. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16951799 >.

SOUZA, R. P. et al. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to Schistosoma mansoni Infection. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, p. 394981, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320145> >.

SPADA, F. M.; KOEZUKA, Y.; PORCELLI, S. A. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 8, p. 1529-1534, oct. 1998. ISSN 0022-1007 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9782130> >.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, nov. 1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513902> >.

SUN, X. J. et al. Unique roles of Schistosoma japonicum protein Sj16 to induce IFN-gamma and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo. **Parasite Immunol.**, v. 34, n. 8-9, p. 430-439, aug.-sep. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22712636> >.

TANIGUCHI, M.; NAKAYAMA, T. Recognition and function of Valpha14 NKT cells. **Semin. Immunol.**, v. 12, n. 6, p. 543-550, dec. 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145860> >.

TERABE, M.; BERZOFISKY, J. A. The immunoregulatory role of type I and type II NKT cells in cancer and other diseases. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 63, n. 3, p. 199-213, mar. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384834> >.

THOMAS, S. Y.; LILLY, C. M.; LUSTER, A. D. Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 24, p. 2613-2616, jun. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775244> >.

TOSCA, M. A. et al. Impairment of lung function might be related to IL-10 and IFN-gamma defective production in allergic children. **Immunol. Lett.**, v. 140, n. 1-2, p. 104-106, oct. 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669226> >.

UYTTENHOVE, C.; SIMPSON, R. J.; VAN SNICK, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 18, p. 6934-6938, sep. 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3137580> >.

VALLEJO, A. N. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. **Immunol. Rev.**, v. 205, p. 158-169, jun. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882352> >.

VAN DEN BIGGELAAR, A. H. et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1723-1727, nov. 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11095260 >.

VAN DER KLEIJ, D. et al. Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 4, p. 531-539, feb. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11865406> >.

VAN DIE, I.; CUMMINGS, R. D. Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy. **Chem. Immunol. Allergy**, v. 90, p. 91-112, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210905> >.

VIANA, I. R. et al. Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 4, p. 466-470, jul.-aug 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570847> >.

VIJAYANAND, P. et al. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 14, p. 1410-1422, apr. 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409322> >.

WHO. World Health Organization. The top 10 causes of death. 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> >.

WILLIAMS, M. E. et al. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 4, p. 946-954, oct. 1994.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7930740 >.

WINGENDER, G. et al. Invariant NKT cells are required for airway inflammation induced by environmental antigens. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 6, p. 1151-1162, jun. 2011.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624935> >.

YAN-MING, L. et al. The effect of specific immunotherapy on natural killer T cells in peripheral blood of house dust mite-sensitized children with asthma. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, p. 148262, 2012.

Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23008731> >.

YANG, J. et al. The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. **J. Immunol.**, v. 187, n. 3, p. 1113-1119, aug. 2011.

Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697455> >.

YANG, M.; KUMAR, R. K.; FOSTER, P. S. Pathogenesis of steroid-resistant airway hyperresponsiveness: interaction between IFN-gamma and TLR4/MyD88 pathways. **J. Immunol.**, v. 182, n. 8, p. 5107-5115, apr. 2009.

Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342691> >.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-494, apr. 2002.

Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964470> >.

YSSEL, H.; LECART, S.; PENE, J. Regulatory T cells and allergic asthma. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 11, p. 899-904, sep. 2001.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11564437 >.

ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 5, p. 1439-1449, may. 2003.

Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12731071> >.


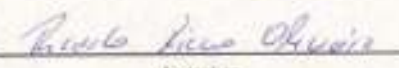
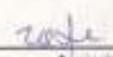
ZHAO, Y. et al. Th17 immunity in patients with allergic asthma. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 151, n. 4, p. 297-307, 2010.

Disponível em: <

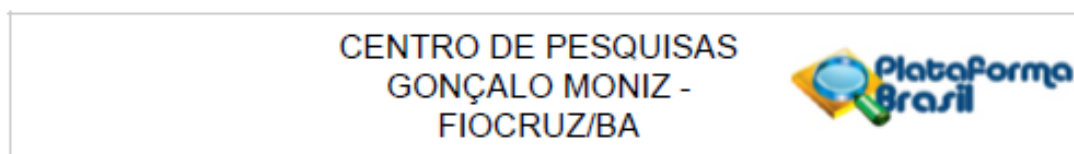
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844129> >.

ANEXOS

Anexo 1. Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos.

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: PERFIL DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER (TNK) DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS FRENTE A ANTÍGENO DE <i>Schistosoma mansoni</i>		2. Número de Sujeitos de Pesquisa: 30	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Ricardo Riccio Oliveira			
6. CPF: 804.709.555-20		7. Endereço (Rua, n.º): SALERNO PITUBA n. 113, ap. 1301 SALVADOR BAHIA 41830500	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (71) 9977-3612	10. Outro Telefone:
11. Email: ricardo.riccio@bahia.fiocruz.br			
12. Cargo: <i>Responsável em SSVL Público</i>			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>18 / 09 / 2013</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Fundação Oswaldo Cruz		14. CNPJ: 33.781.055/0006-40	
15. Telefone: (71) 3176-2327		16. Unidade/Orgão: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA	
17. Outro Telefone:			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>MANOEL BARRAL NETTO</u>		CPF: <u>100.600.145-04</u>	
Cargo/Função: <u>DIRETOR DO CPqGM/FIOCRUZ</u>			
Data: <u>18 / 09 / 13</u>		 Assinatura	
Manoel Barral Netto Diretor do CPqGM/Fiocruz Mat. SIAPE 626424-3			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

Anexo 2. Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: PERFIL DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER (TNK) DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS FRENTE A ANTÍGENO DE *Schistosoma mansoni*

Pesquisador: Ricardo Riccio Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22442013.9.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 453.728

Data da Relatoria: 31/10/2013

Apresentação do Projeto:

A asma é uma doença imunológica crônica. Diferentes componentes da resposta adaptativa e inata parecem ter uma importância neste processo, em particular as células iNKT. Mecanismos regulatórios capazes de modular o processo inflamatório na asma vêm sendo estudados e alguns trabalhos sugerem que infecções por helmintos resultam na modulação da resposta imune nas alergias, sendo esses conhecimentos ainda incipientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a frequência de células iNKT em sangue periférico, bem como seu estado de ativação, expressão de moléculas coestimulatórias, regulatórias e de citocinas em indivíduos com asma persistente leve ou grave estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel do ovo (SEA) do *S. mansoni*.

Objetivo Secundário:

Em indivíduos com asma persistente leve ou grave, avaliar: 1. A frequência de células iNKT em células mononucleares de sangue periférico; 2. A expressão de moléculas coestimulatórias (CD28, PD-1 e CD40L), regulatórias (CD25, FOXP3 e CTLA-4) e de ativação (CD69) em células iNKT na presença de tetrâmero CD1d ligado a α GalCer ou ao SEA; 3. A expressão intracelular de citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-13), Th1 (IFN- γ), Th17 (IL-

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121		
Bairro: Candeal		CEP: 40.296-710
UF: BA	Município: SALVADOR	
Telefone: (71)3176-2327	Fax: (71)3176-2285	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 453.728

17A) e regulatório (IL-10) em células iNKT na presença de tetrâmero CD1d ligado a ζ GalCer ou ao SEA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O estudo propõe coletar sangue periférico para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). A retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso aconteça, é informado no TCLE que todos os cuidados serão tomados pelos profissionais preparados.

Benefícios: Estudos que contribuem para o esclarecimento de como ocorre a resposta imunológica na asma ajudarão para o melhor entendimento da doença e possível desenvolvimento no futuro de um tratamento que cure em definitivo a asma. Os benefícios não serão diretos aos sujeitos que participarem deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ajudar outras pessoas com asma no futuro. Os participantes do estudo que estejam infectados com qualquer verme serão tratados gratuitamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo experimental. Dados sobre a clínica dos casos de asma também devem estar disponíveis para permitir a classificação dos pacientes em casos leves e graves. Basicamente, o projeto propõe a coleta de 30 mL de sangue periférico por punção venosa. PBMCs de indivíduos saudáveis (10), com asma leve (10) e grave (10) serão expostas ao antígeno solúvel do ovo de *S. mansoni* (SEA). A expressão de citocinas, a frequência e imunofenotipagem de células iNKT serão avaliadas. Uma amostra de fezes será solicitada para realizar exame parasitológico de fezes e excluir casos com helmintíase.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os TCLEs para adultos/responsáveis e para os controles saudáveis e um TA foram incluídos. Também foram incluídos o regulamento para biorrepositório e a carta de anuência do PROAR.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121			
Bairro: Candéias			CEP: 40.296-710
UF: BA	Município: SALVADOR		
Telefons: (71)3176-2327	Fax: (71)3176-2285	E-mail: cep@bahia.fiocruz.br	

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 453.728

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar relatórios parciais a cada seis meses e final, em 12/2016.

SALVADOR, 11 de Novembro de 2013

Assinador por:
Adriana Lanfredi Rangel
(Coordenador)

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2265 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo asmático.

**LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTO

Nome do Projeto: PERFIL DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER (TNK) DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS FRENTE A ANTÍGENO DE *Schistosoma mansoni*

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

Comitê de Ética: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

Introdução:

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado “Perfil das Células T Natural Killer (TNK) de Indivíduos Asmáticos Frente a Antígeno de *Schistosoma mansoni*”. Você foi selecionado como um possível participante pois foi informado pelo seu médico que você tem asma. Por favor, leia este documento com calma e tire qualquer dúvida que tenha antes de aceitar participar do estudo. Caso concorde em participar do estudo iremos fazer três exames de fezes e coletar 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Porque o estudo está sendo feito:

A asma é uma doença alérgica que ainda não tem tratamento efetivo capaz de curar a doença. Os remédios utilizados atualmente são apenas para controlar os sintomas da asma e tentar melhorar a qualidade de vida das pessoas com asma. Esta doença é causada pelo nosso próprio organismo, quando respondemos de forma exagerada a alguns elementos que estão presentes no nosso dia a dia, como ácaros da poeira, e que são chamados de alérgenos. A parte do nosso organismo que responde contra estes elementos estranhos ao nosso corpo é chamada de sistema imunológico. Alguns pesquisadores têm mostrado que alguns vermes, como o *Schistosoma*, são capazes de melhorar a asma. O objetivo deste estudo é avaliar a contribuição que uma célula do sistema imunológico exposta a partes deste verme tem na resposta exagerada contra alérgenos em pessoas com asma grave, comparando com o que acontece naquelas pessoas que tem a doença mais leve e outras pessoas que não tem asma.

Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:

Cerca de 10 pessoas com asma grave e 10 com asma leve, que são atendidas no ProAR (Núcleo de Excelência em Asma da UFBA), além de 10 pessoas sem asma, irão participar deste estudo. Essas pessoas farão três exames de fezes e doarão uma amostra de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Procedimentos envolvidos no estudo:

Caso concorde em participar do estudo, você receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos em 3 amostras

colhidas em dias diferentes. Em seguida, você doará 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa), que será coletado por profissional treinado e preparado para fazer coleta de sangue, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. O sangue será coletado para realizar exames que são importantes para o acompanhamento da sua doença.

Duração do Estudo:

Você só vai precisar nos encontrar por duas vezes. Na primeira vez coletaremos 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) e levaremos uma amostra de suas fezes para examinar no laboratório. Na segunda vez faremos exame de fezes em mais duas amostras.

Riscos envolvidos no estudo:

A retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados pelos profissionais preparados.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Estudos que contribuem para o esclarecimento de como ocorre a resposta imunológica na asma ajudarão para o melhor entendimento da doença e possível desenvolvimento no futuro de um tratamento que cure em definitivo a asma. Você não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ajudar outras pessoas com asma no futuro. Os participantes do estudo que estejam infectados com qualquer verme serão tratados gratuitamente.

Confidencialidade:

Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe e com a organização internacional que protege os indivíduos envolvidos em pesquisas (Escritório de Proteção de Pesquisa com Seres Humanos dos Estados Unidos da América). Todas as agências internacionais apropriadas poderão ter acesso aos arquivos da pesquisa. Representantes do Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Para proteger contra violação de informação ou falsificação apenas o seu número de matrícula será obtido. Todas as informações que forem digitadas em banco de dados terão apenas o seu número de matrícula, ao invés do seu nome. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Utilização, armazenamento e descarte dos dados:

Após a realização dos exames imunológicos para este estudo, uma pequena parte do seu sangue será guardada em tubos plásticos em congelador por cinco anos, sem a identificação do seu nome no tubo. Gostaríamos de sua permissão para utilizar seu sangue, ou parte dele, em outros estudos que possam ser realizados no futuro. Como muitas descobertas são realizadas a todo tempo em relação à defesa do corpo contra doenças, gostaríamos de ter seu sangue guardado para fazer novos exames, no futuro, caso descubram algum outro fator importante para proteger contra a asma. Se no futuro for descoberto, no seu sangue, alguma característica importante para sua saúde, nós o informaremos e daremos as devidas orientações a respeito. Mesmo que permita a utilização futura, você poderá voltar atrás nesta decisão a qualquer momento. Marque abaixo a opção desejada sobre esta questão.

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Ricardo Riccio Oliveira, coordenador do projeto, pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Autoriza armazenamento e utilização das amostras coletadas para pesquisas futuras?

- Sim, autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras
 Não autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

Assinatura do Participante	Data	Hora
----------------------------	------	------

Assinatura do Pesquisador	Data	Hora
---------------------------	------	------

Assinatura da Testemunha	Data	Hora
--------------------------	------	------

Anexo 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo sadio.

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA
 Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLE SADIO

Nome do Projeto: PERFIL DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER (TNK) DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS FRENTE A ANTÍGENO DE *Schistosoma mansoni*

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

Comitê de Ética: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

Introdução:

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo chamado “Estudo dos fatores associados a resistência a esquistossomose na Bahia, Brasil”. Você foi selecionado como um possível participante pois você não tem asma e não mora em locais onde tem muitas pessoas com infecção por vermes. Caso concorde em participar do estudo iremos fazer três exames de fezes e coletar 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Porque o estudo está sendo feito:

A asma é uma doença alérgica que ainda não tem tratamento efetivo capaz de curar a doença. Os remédios utilizados atualmente são apenas para controlar os sintomas da asma e tentar melhorar a qualidade de vida das pessoas com asma. Esta doença é causada pelo nosso próprio organismo, quando respondemos de forma exagerada a alguns elementos que estão presentes no nosso dia a dia, como ácaros da poeira, e que são chamados de alérgenos. A parte do nosso organismo que responde contra estes elementos estranhos ao nosso corpo é chamada de sistema imunológico. Alguns pesquisadores têm mostrado que alguns vermes, como o *Schistosoma*, são capazes de melhorar a asma. O objetivo deste estudo é avaliar a contribuição que uma célula do sistema imunológico exposta a partes deste verme tem na resposta exagerada contra alérgenos em pessoas com asma grave, comparando com o que acontece naquelas pessoas que tem a doença mais leve e outras pessoas que não tem asma, como você

Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:

Cerca de 10 pessoas com asma grave e 10 com asma leve, que são atendidas no ProAR (Núcleo de Excelência em Asma da UFBA), além de 10 pessoas sem asma, irão participar deste estudo. Essas pessoas farão três exames de fezes e doarão uma amostra de 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa).

Procedimentos envolvidos no estudo:

Caso concorde em participar do estudo, você receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos em 3 amostras

colhidas em dias diferentes. Em seguida, você doará 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa), que será coletado por profissional treinado e preparado para fazer coleta de sangue, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. O sangue será coletado para realizar exames que são importantes para o acompanhamento da sua doença.

Duração do Estudo:

Você só vai precisar nos encontrar por duas vezes. Na primeira vez coletaremos 30 ml de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) e levaremos uma amostra de suas fezes para examinar no laboratório. Na segunda vez faremos exame de fezes em mais duas amostras.

Riscos envolvidos no estudo:

A retirada de sangue é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve, sangramento após a retirada da agulha ou formação de leve inchaço no local. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados pelos profissionais preparados.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Estudos que contribuem para o esclarecimento de como ocorre a resposta imunológica na asma ajudarão para o melhor entendimento da doença e possível desenvolvimento no futuro de um tratamento que cure em definitivo a asma. Você não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ajudar outras pessoas com asma no futuro. Os participantes do estudo que estejam infectados com qualquer verme serão tratados gratuitamente.

Confidencialidade:

Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe e com a organização internacional que protege os indivíduos envolvidos em pesquisas (Escritório de Proteção de Pesquisa com Seres Humanos dos Estados Unidos da América). Todas as agências internacionais apropriadas poderão ter acesso aos arquivos da pesquisa. Representantes do Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Para proteger contra violação de informação ou falsificação apenas o seu número de matrícula será obtido. Todas as informações que forem digitadas em banco de dados terão apenas o seu número de matrícula, ao invés do seu nome. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Utilização, armazenamento e descarte dos dados:

Após a realização dos exames imunológicos para este estudo, uma pequena parte do seu sangue será guardada em tubos plásticos em congelador por cinco anos, sem a identificação do seu nome no tubo. Gostaríamos de sua permissão para utilizar seu sangue, ou parte dele, em outros estudos que possam ser realizados no futuro. Como muitas descobertas são realizadas a todo tempo em relação à defesa do corpo contra doenças, gostaríamos de ter seu sangue guardado para fazer novos exames, no futuro, caso descubram algum outro fator importante para proteger contra a asma. Se no futuro for descoberto, no seu sangue, alguma característica importante para sua saúde, nós o informaremos e daremos as devidas orientações a respeito. Mesmo que permita a utilização futura, você poderá voltar atrás nesta decisão a qualquer momento. Marque abaixo a opção desejada sobre esta questão.

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Ricardo Riccio Oliveira, coordenador do projeto, pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Autoriza armazenamento e utilização das amostras coletadas para pesquisas futuras?

- Sim, autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras
 Não autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

Assinatura do Participante	Data	Hora
Assinatura do Pesquisador	Data	Hora
Assinatura da Testemunha	Data	Hora