

JULIANA DIAS LOURENÇO

**Estudo da expressão das proteínas STAT e SOCS no
desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva
crônica: comparação entre a resposta imunológica
local e sistêmica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Degobbi
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

SÃO PAULO

2020

JULIANA DIAS LOURENÇO

**Estudo da expressão das proteínas STAT e SOCS no
desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva
crônica: comparação entre a resposta imunológica
local e sistêmica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Degobbi
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

SÃO PAULO

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lourenço, Juliana Dias

Estudo da expressão das proteínas STAT e SOCS no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica : comparação entre a resposta imunológica local e sistêmica / Juliana Dias Lourenço. -- São Paulo, 2020.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica
2.Imunidade adaptativa 3.Fatores de transcrição
4.Linfócitos T 5.Linfócitos T reguladores 6.Tabagismo

USP/FM/DBD-215/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Ricardo e Luci
e minha irmã Rafaela,
por serem meu alicerce
e me amarem incondicionalmente.*

*Ao meu companheiro Calebe,
por sempre me apoiar
e me fazer sorrir diariamente.*

AGRADECIMENTOS

Finalizar este trabalho no ano de 2020 é muito especial e significativo para mim, pois é quando também completo 10 anos integrando o Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM-20). Ingressei no laboratório quando ainda estava cursando minha graduação, e ao longo desses 10 anos, eu amadureci pessoal e profissionalmente, aprendi muito e tive o prazer de encontrar pessoas incríveis ao longo da jornada. Gostaria de aproveitar essa oportunidade para agradecer a todos que cruzaram meu caminho neste período, e, de forma especial, às pessoas que contribuíram para a realização desta tese.

À minha orientada Prof. Dra. Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes, por toda atenção, paciência e ensinamentos ao longo de todos esses anos. Agradeço por ter me acolhido no laboratório, ensinar o valor do nosso trabalho, e mesmo nos momentos de dificuldade, sempre me incentivar a dar o meu melhor. Serei eternamente grata!

Aos meus pais, Ricardo e Luci, pois eu não chegaria até aqui sem o suporte deles. Ao longo de toda a minha vida me ensinaram a ser uma pessoa honesta, justa e a correr atrás dos meus sonhos, e não mediram esforços para prover todo o necessário e educar a mim e minha irmã. Obrigada por toda dedicação, amor incondicional e carinho.

À minha “little sis”, Rafaela, a quem tenho a sorte de também chamar de amiga. Obrigada por sempre me apoiar, incentivar, me ouvir e aconselhar, e por nossas “palhaçadas”. A vida foi muito generosa em me proporcionar uma irmã como você!

Ao meu companheiro, Calebe, agradeço por toda parceria, incentivo, amor e compreensão ao longo desses mais de 3 anos. Sou grata por você me ensinar diariamente a levar a vida com mais leveza e, principalmente, por me fazer rir sempre. Meus dias são melhores desde que você entrou na minha vida!

Às professoras Dra. Walcy Rosolia Teodoro e Dra. Ana Paula Pereira Velosa, pelo suporte e ajuda nas técnicas de Western Blotting e RT-qPCR. Durante o período do doutorado, foram muitos dias (e noites!) na bancada do laboratório delas, onde sempre fui tratada como “de casa”. Agradeço por cederem a estrutura do LIM-17 e pela confiança.

Às alunas e colegas do LIM-17, Lizandre, Zelita, Vitória, Laís e Fabíola, pelas risadas, cafés da tarde e por me auxiliarem em momentos de “aperto” ou correria durante os experimentos. Agradeço também ao aluno Jurandir Tomaz por me ajudar com a pulverização das amostras de tecido.

À Dra. Denise Frediani Barbeiro, pelo auxílio com a técnica de RT-qPCR. Agradeço pelos ensinamentos, pelas dúvidas solucionadas, por ceder espaço e uso de equipamentos para realização de experimentos, e pelas conversas.

À Dra. Solange Carrasco, por me receber diversas vezes em seu laboratório e ceder o uso da centrífuga, para que eu pudesse realizar o processamento das amostras de sangue.

À professora Dra. Elnara Márcia Negri, por tantas ideias, discussões sobre os resultados e, principalmente, por nos apresentar e colocar em contato com o Dr. Jefferson, viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jefferson Luiz Gross e sua instrumentadora cirúrgica Meei, por viabilizar a coleta das amostras dos pacientes incluídos neste trabalho. Agradeço a ajuda com os processos práticos e burocráticos relacionados às coletas, e por vezes até mesmo realizar a separação das amostras por mim, garantindo que eu pudesse ter acesso ao material.

Aos membros da banca de qualificação, professoras Dra. Carla Máximo Prado, Dra. Denise F. Barbeiro e Dra. Elnara M. Negri, pelas sugestões tão valiosas ao trabalho.

À Tiyaki (Dra. Juliana Tiyaki Ito), por toda contribuição ao trabalho, em discussões, revisões e realização de experimentos. Agradeço também pela amizade, parceria, inúmeras conversas e conselhos.

Às queridas Júlia Benini e Alyne Riani, que me ajudaram com a coleta das amostras de tecido e sangue quando eu não pude. Agradeço também por tantas conversas, risadas e por tornarem o dia a dia mais alegre.

À Larissa Emidio, por sua disponibilidade e ajuda nos experimentos e companhia no congresso europeu.

À Isabella Genaro, por me ensinar a técnica de ELISA e me acompanhar nos primeiros experimentos. Agradeço também pelas conversas e ombro amigo.

Ao Dr. Frederico Fernandes e sua aluna Isadora Costa por viabilizarem a coleta das amostras de sangue dos pacientes do HCFMUSP.

Ao Dr. Marcelo Aun, pela contribuição na discussão dos dados.

Aos professores Dr. Rodolfo de Paula, Dra. Maria Sato e sua aluna Anna Júlia pela ajuda com os experimentos parciais de ELISA e RT-qPCR.

À professora Dra. Iolanda Tibério, chefe do LIM-20, por sua disponibilidade, atenção, discussão dos resultados e sugestões.

Aos funcionários do LIM-20, especialmente ao Davi Francisco e Rosana, por ajudarem em questões técnicas e burocráticas.

Às amigas Aline, Débora, Laureen, Ana, Luana e Vanessa. Muito do que sou hoje, foi construído na companhia de vocês. Agradeço por cada palavra de apoio, conselho e risada divididos ao longo de tantos anos. Gostaria de agradecer especialmente à: Aline, pelas conversas quase que diárias e por estar presente na maioria dos momentos mais importantes da minha vida; à Luana, pela amizade e parceria construída, por estar sempre presente e por

*sua lealdade; à Vanessa, por tantas conversas, conselhos e por ser exemplo de
personalidade.*

*Aos demais familiares, avós, tios, sogros e cunhados, agradeço pelo carinho e
cuidado.*

*Aos pacientes incluídos neste trabalho e seus familiares, por consentirem em
participar do trabalho, mesmo se encontrando em um momento de
fragilidade da saúde.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo
apoio financeiro.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste
trabalho, meus sinceros agradecimentos.*

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

*“Learn from yesterday, live for today,
hope for tomorrow. The important thing
is not to stop questioning”*

Albert Einstein

Este trabalho recebeu apoio financeiro de:

FAPESP: Bolsa de Doutorado – Fluxo Contínuo, Processo nº 2016/21408-6

FAPESP: Projeto Regular – Fluxo Contínuo, Processo nº 2016/17817-8

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Quadros e Tabelas

RESUMO

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	1
1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC e Diagnóstico da Doença	2
1.3 Mecanismos para o desenvolvimento da DPOC: papel da imunidade inata e adaptativa para a progressão da doença.....	4
1.3.1 Linfócitos T CD8+ e CD4+	6
1.3.2 Células T reguladoras e a progressão da DPOC	8
1.3.3 Ativadores de Fatores de Transcrição e os Supressores de Sinalização de Citocinas: STAT e SOCS	10
1.3.3.1 O papel das proteínas STAT e SOCS na diferenciação das células TCD 4+ <i>naive</i>	11
1.3.3.2 A ativação e função das STAT e SOCS na progressão da DPOC	12
1.4 Inflamação sistêmica em pacientes com DPOC	14
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. MÉTODOS	21
4.1 Casuística	21
4.2 Coleta e Processamento do Tecido Pulmonar e da Amostra de Sangue	22
4.3 Expressão Gênica	23
4.3.1 Criopreservação de tecidos e Extração de RNA.....	23
4.3.2 Transcrição reversa	24

4.3.3 Real Time PCR	24
4.4 ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>).....	26
4.4.1 Dosagem das citocinas por ELISA.....	26
4.4.2 Quantificação de proteínas totais no tecido pulmonar	26
4.5 Immunoblotting	27
4.5.1 Extração de proteínas	27
4.5.2 Dosagem de proteínas totais	28
4.5.3 Caracterização das proteínas de interesse por eletroforese em gel de poliacrilamida	28
4.5.4 <i>Imunoblotting</i> para quantificação das proteínas de interesse	28
4.6 Análise Estatística	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Caracterização dos pacientes.....	31
5.2 Análise da resposta Th1	33
5.2.1 Análise da resposta Th1 local	33
5.2.2 Análise da resposta Th1 sistêmica.....	36
5.3 Análise da resposta Th17	39
5.3.1 Análise da resposta Th17 local	39
5.3.2 Análise da resposta Th17 sistêmica.....	42
5.4 Análise da resposta Treg	45
5.4.1 Análise da resposta Treg local	45
5.4.2 Análise da resposta Treg sistêmica	48
5.5 Análise da expressão local das proteínas SOCS	51
5.6 Análise da expressão sistêmica das proteínas SOCS.....	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	66
8. ANEXOS	68

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
---	-----------

Lista de Abreviaturas e Siglas

α1-AT	Alfa 1-Antitripsina
BAL	<i>Bronchoalveolar lavage</i> - Lavado broncoalveolar
BCA	Ácido Bicinconínico
BD	Broncodilatador
BSA	Soro de Albumina Bovina
CAT	<i>COPD Assessment Test</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CS	<i>Cigarette Smoke</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CVF	Capacidade Vital Forçada
DAMPS	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FNO	Fumante Não Obstrutivo
Foxp3	<i>Forkhead box p3</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN-γ	<i>Interferon-γ</i>
IL	Interleucina
JAKs	Janus quinases
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo-histocompatibilidade

MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
mMRC	<i>Modified Medical Research Council</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLATINO	Projeto Latino-americano de Investigação em Obstrução pulmonar
RCLB	<i>Red Cells Lysis Buffer</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RORγt	<i>Retinoic-acid-related orphan receptor gamma</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	Método quantitativo de PCR em tempo real
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T-bet	<i>T-box-expressed-in-T-cells</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline (TBS) + Polysorbate 20 (Tween 20)</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	<i>T helper</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis Factor-α</i>
Treg	T regulatória
VEF₁	Volume Expirado Forçado no Primeiro Segundo

Lista de Símbolos

°C	Grau Centígrado
g	Gramas
h	Horas
L	Litros
min	Minuto
mg	Miligramas
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pg	Picograma
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
Δ	Delta
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou Igual
≥	Maior ou Igual
[]	Concentração
%	Percentual
±	Mais-Menos

Lista de Figuras

Figura 1:	Principais células inflamatórias e seus mediadores na fisiopatologia da DPOC.....	5
Figura 2:	Diferenciação das células T CD4+ <i>naive</i>	7
Figura 3:	Estrutura e função das proteínas SOCS.....	11
Figura 4:	Proteínas STAT e SOCS na diferenciação das células T helper....	12
Figura 5:	Fatores de transcrição para resposta Th1 em amostras de tecido pulmonar.....	34
Figura 6:	Citocinas envolvidas na resposta Th1 em amostras de tecido pulmonar.....	35
Figura 7:	Fatores de transcrição para resposta Th1 em amostras de leucócitos do sangue.....	37
Figura 8:	Expressão de IL-12 no plasma sanguíneo.....	38
Figura 9:	Fatores de transcrição para resposta Th17 em amostras de tecido pulmonar.....	40
Figura 10:	Citocinas envolvidas na resposta Th17 em amostras de tecido pulmonar.....	41
Figura 11:	Fatores de transcrição para resposta Th17 em amostras de leucócitos do sangue.....	43

Figura 12: Citocinas envolvidas na resposta Th17 em amostras de leucócitos e plasma sanguíneo.....	44
Figura 13: Fatores de transcrição para resposta Treg em amostras de tecido pulmonar.....	46
Figura 14: Citocinas envolvidas na resposta Treg em amostras de tecido pulmonar.....	47
Figura 15: Fatores de transcrição para resposta Treg em amostras de leucócitos do sangue.....	49
Figura 16: Citocinas envolvidas na resposta Treg em amostras de leucócitos e plasma sanguíneo.....	50
Figura 17: Expressão das proteínas SOCS nas amostras de tecido pulmonar.....	52
Figura 18: Expressão das proteínas SOCS nas amostras de leucócitos do sangue.....	54

Lista de Quadros e Tabelas

Tabela 1:	Classificação da severidade da limitação ao fluxo aéreo na DPOC em pacientes com $VEF_1/CVF < 0,70$	3
Tabela 2:	Classificação da DPOC de acordo com os sintomas apresentados	4
Tabela 3:	Sequência dos primers desenhados para o estudo.....	25
Tabela 4:	Análise das características dos pacientes.....	32

RESUMO

Lourenço JD. *Estudo da expressão das proteínas STAT e SOCS no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica: comparação entre a resposta imunológica local e sistêmica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A diferenciação das células TCD4+ para os diferentes subtipos é mediada pela sinalização das proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STAT) e das proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS). Na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), há o envolvimento dos subtipos T helper (Th)1, Th17 e T reguladora (Tregs). Entretanto, o desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias Th17 e Treg é descrita como um mecanismo fundamental no desenvolvimento e progressão da doença. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão das proteínas STAT e SOCS envolvidas na diferenciação das células TCD4+, principalmente para os subtipos Th17 e Treg, no desenvolvimento da DPOC comparando a resposta local e sistêmica. **Métodos:** Foram coletadas amostras de tecido pulmonar e sangue periférico de 24 pacientes submetidos à ressecção pulmonar, divididos em dois grupos: Grupo Fumantes Não Obstrutivos (FNO) e DPOC estágios I e II. Para as avaliações realizadas no sangue periférico, foi incluído um terceiro grupo composto por 14 pacientes com DPOC estágios III e IV. A expressão gênica para SOCS1 e 3, STAT1, 3 e 5, *Retinoic-acid-related orphan receptor* (ROR γ T), *Forkhead box p3* (Foxp3), *T-box-expressed-in-T-cells* (T-bet), Interleucinas (IL)-6, 17, 10 e Fator de transformação do Crescimento (TGF)- β , foi avaliada em amostras de tecido pulmonar e leucócitos totais do sangue através da técnica de PCR em tempo real. A expressão das proteínas SOCS1 e 3, STAT1, 3 e 5 totais e fosforiladas foi avaliada por Western Blotting nos mesmos compartimentos. Adicionalmente, foram avaliados os níveis de IL-6, 10, 17, 12, Interferon-gama (IFN- γ) e TGF- β no tecido pulmonar e plasma sanguíneo por ELISA. **Resultados e Discussão:** Em amostras de tecido pulmonar, foi observado o aumento da expressão gênica de STAT1 e 3, ROR γ T, Foxp3, IL-6, TGF- β e aumento dos níveis de IL-6, além da diminuição da expressão da proteína pSTAT5 e da razão pSTAT5/STAT5 em pacientes com DPOC I e II. Enquanto na resposta sistêmica foi observado aumento da expressão gênica de

STAT1 e 3 nos grupos DPOC III e IV comparado aos demais e aumento de T-bet, ROR γ t, IL-6, TGF- β e expressão da proteína STAT3 total no grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II. O aumento dos níveis de IL-6 no plasma sanguíneo foi observado no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Além disso, foi demonstrado aumento na expressão gênica de STAT5 no grupo DPOC III e IV, embora tenha havido uma diminuição na expressão de Foxp3 no grupo DPOC I e II, acompanhada de diminuição dos níveis de IL-10 no grupo DPOC III e IV em comparação aos indivíduos com DPOC I e II. Adicionalmente, a análise da expressão das proteínas SOCS demonstrou somente o aumento da expressão gênica de SOCS3 em tecidos de pacientes com DPOC I e II, e leucócitos de pacientes com DPOC III e IV comparado aos demais. **Conclusões:** Observamos diferenciação para resposta Th17 nas amostras de tecido pulmonar desde os estágios iniciais da DPOC, enquanto na resposta sistêmica essas alterações acontecem em estágios mais graves. Entretanto, a sinalização intracelular para a resposta Treg parece variar dependendo do compartimento analisado, com diminuição de IL-10 em estágios avançados da doença, reforçando a ideia de haver uma falha na atividade de Treg no desenvolvimento e progressão da DPOC.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica; Imunidade adaptativa; Fatores de transcrição; Linfócitos T; Linfócitos T reguladores; Tabagismo.

ABSTRACT

Lourenço JD. *Study of STAT and SOCS proteins expression in chronic obstructive pulmonary disease development: comparison between the local and systemic immune responses* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: The differentiation of TCD4+ cells into the different subtypes is mediated by the signalling of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) and the Suppressor of Cytokine Signalling (SOCS) proteins. In Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), the T helper (Th) 1, Th17 and regulatory T (Tregs) subtypes are involved. However, the imbalance between the pro and anti-inflammatory responses mediated by Th17 and Treg cells is described as a fundamental mechanism in the disease development and progression. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression of STAT and SOCS proteins involved in TCD4+ cells differentiation, especially the Th17 and Treg subtypes, in COPD development, comparing both local and systemic responses. **Methods:** Samples of lung tissue and peripheral blood were collected from 24 patients who underwent pulmonary resection and divided into two groups: Non-Obstructive Smokers (NOS) and COPD stages I and II. For the evaluations carried out in the peripheral blood, a third group comprising 14 patients with COPD stages III and IV was included. Gene expression of SOCS1 and 3, STAT1, 3 and 5, Retinoic-acid-related orphan receptor (ROR γ T), Forkhead box p3 (Foxp3), T-box-expressed-in-T-cells (T-bet), Interleukins (IL)-6, 17, 10 and Transforming Growth Factor (TGF)- β , was evaluated in lung tissue samples and total blood leukocytes using the real-time PCR technique. The expression of total and phosphorylated proteins SOCS1 and 3, STAT1, 3 and 5 was evaluated by Western Blotting in the same compartments. Additionally, the levels of IL-6, 10, 17, 12, Interferon-gamma (IFN- γ) and TGF- β in lung tissue and blood plasma were evaluated by ELISA. **Results and Discussion:** The tissue lung sample analyses revealed an increase in gene expression of STAT1 and 3, ROR γ t, Foxp3, IL-6, TGF- β and an increase in IL-6 levels, in addition to decreased expression of pSTAT5 protein and the pSTAT5/STAT5 ratio in patients with COPD I and II. Whereas in systemic response, was observed an increase in gene expression of STAT1 and 3 in COPD III and IV group compared to the others, and an increase in T-bet, ROR γ t,

IL-6, TGF- β and expression of the total STAT3 protein in COPD III and IV group compared to the COPD I and II. Increased levels of IL-6 in blood plasma were observed in COPD I and II group compared to the NOS group. Moreover, an increase in STAT5 gene expression was demonstrated in COPD III and IV group, although there was a decrease in Foxp3 expression in COPD I and II group, accompanied by a decrease in IL-10 levels in COPD III and IV group compared to individuals with COPD I and II. In addition, the analysis of SOCS protein expression demonstrated only an increase in SOCS3 gene expression in lung tissue from patients with COPD I and II, and leukocytes from patients with COPD III and IV compared to the others. **Conclusions:** We observed differentiation for the Th17 response in lung tissue samples since initial stages of COPD, whereas in systemic response these changes occur in more severe stages. However, the intracellular signalling for Treg response seems to vary depending on the compartment analysed, with a decrease in IL-10 levels in advanced stages of disease, reinforcing the idea that there is a failure in Treg activity in the development and progression of COPD.

Descriptors: Pulmonary disease, chronic obstructive; Adaptive immunity; Transcription factors; T-lymphocytes; T-lymphocytes, regulatory; Smoking.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença comum, prevenível e tratável, caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e pela limitação ao fluxo aéreo, geralmente progressiva. É causada como resultado da exposição constante e de longo período a gases ou partículas tóxicas, combinados a fatores intrínsecos ao paciente, como fatores genéticos, hiper-responsividade das vias aéreas e a uma deficiência no desenvolvimento pulmonar durante a infância (1). A DPOC não é considerada uma doença curável, mas o seu tratamento pode ajudar a aliviar os sintomas, melhorar a qualidade de vida e reduzir o risco de morte (2).

A limitação crônica ao fluxo aéreo observada na DPOC acontece devido a uma mistura da obstrução de pequenas vias aéreas (comumente chamada de bronquite crônica) e da destruição do parênquima pulmonar (chamada de enfisema pulmonar). No enfisema pulmonar, se observa o alargamento dos espaços aéreos distais, perda das ligações alveolares às pequenas vias aéreas, perda da elasticidade pulmonar e obstrução de pequenas vias aéreas sem evidência de fibrose (1,3). Essas alterações nem sempre acontecem ao mesmo tempo, variam de indivíduo para indivíduo, e se desenvolvem em proporções diferentes ao longo do tempo (1).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016 a DPOC foi responsável por aproximadamente 3,04 milhões de óbitos, o que representa 5,3% do total de mortes registrados naquele ano. É observado um aumento gradual da porcentagem desta doença em populações com faixa etária mais avançada. No ano 2000, a DPOC era considerada a quarta maior causa de mortes no mundo e, atualmente, já ocupa o terceiro lugar nesta lista (4,5). Estima-se que em 2030, a DPOC cause mais de 4,5 milhões de mortes anualmente no mundo e permaneça em terceiro lugar na lista de doenças que mais causam mortes no mundo (5).

No Brasil, a DPOC foi a quarta principal causa de morte entre os anos de 2000 a 2006, a quinta principal causa de morte de 2007 a 2014 e novamente a quarta principal causa de morte de 2015 a 2016 (6). No ano de 2011, a DPOC gerou um custo de R\$103 milhões ao Sistema Único de Saúde (SUS), referente a mais de 142 mil internações nos hospitais públicos (7), e em 2015, a enfermidade relacionada ao tabagismo foi a que mais gerou gastos nos sistemas públicos e privados de saúde, somando R\$ 16 bilhões (8). De acordo com o projeto latino-americano de investigação em obstrução pulmonar (PLATINO), 15,8% da população no município de São Paulo apresenta a doença, o que representa cerca de 5 a 6 milhões de brasileiros com DPOC (9).

1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC e Diagnóstico da Doença

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o tabagismo ainda é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC (1). Em vários países, a DPOC também está relacionada à inalação de poluentes decorrentes da queima de combustíveis fósseis e de exposições inalatórias ocupacionais a poeiras e gases tóxicos. Entretanto, nem todos os tabagistas desenvolvem DPOC clinicamente significativa, o que sugere que há outros fatores intrínsecos ao indivíduo envolvidos na sua patogênese (1).

Um dos fatores de risco genético é a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina (α 1-AT), uma antiprotease de elastase neutrofílica produzida naturalmente pelo corpo, de caráter recessivo. Os deficientes de α 1-AT apresentam enfisema e piora da função pulmonar de maneira precoce e acelerada, e quando há interação com exposições ambientais, como o tabagismo, a suscetibilidade ao desenvolvimento da doença é significativamente aumentada (10).

Segundo o GOLD (*Global Initiative for Obstructive Lung Disease*) atualizado em 2020, a DPOC pode ser classificada em quatro estágios baseados nos parâmetros espirométricos escolhidos para a avaliação da limitação ao fluxo aéreo (1). Entre estes parâmetros, o mais utilizado é o VEF₁: volume expirado forçado no primeiro segundo, bem como a razão entre esta variável e a CVF

(capacidade vital forçada): VEF_1/CVF . Valores desta razão em espirometria após administração de broncodilatador, menores que 0,70 caracterizam a presença de limitação ao fluxo aéreo, enquanto a classificação do estágio da DPOC é dada pelos valores de VEF_1 em porcentagem do predito pós broncodilatador, conforme a tabela a seguir:

Tabela 1 - Classificação da severidade da limitação ao fluxo aéreo na DPOC em pacientes com $VEF_1/CVF < 0,70$.

VEF_1 (pós broncodilatador)	
GOLD 1 (Leve)	$VEF_1 \geq 80\%$ do predito
GOLD 2 (Moderado)	$50\% \leq VEF_1 < 80\%$ do predito
GOLD 3 (Grave)	$30\% \leq VEF_1 < 50\%$ do predito
GOLD 4 (Muito Grave)	$VEF_1 < 30\%$ do predito

VEF_1 : volume expirado forçado no primeiro segundo; CVF: capacidade vital forçada; %: porcentagem; \geq : maior ou igual; \leq menor ou igual; $<$: menor. FONTE: Adaptados de GOLD (*Global Initiative for Obstructive Lung Disease*) 2020(1).

Ainda segundo o GOLD (1), a espirometria é realizada para determinar a gravidade da limitação ao fluxo aéreo, a fim de fornecer um diagnóstico. No entanto, a determinação do tratamento do paciente se dá através da avaliação dos seus sintomas. As duas principais formas de mensurar os sintomas são através de 2 questionários: o mMRC (*Modified Medical Research Council*), que avalia o nível da dispneia do paciente, gerando uma pontuação de 0 a 4, e o CATtm (*COPD Assessment Test*), que avalia os impactos que os sintomas da DPOC causa no bem estar e dia a dia do paciente, e gera um resultado com pontuação de 0 a 40. No CAT, o escore maior do que 10 é considerado como a pontuação limite, refletindo a presença de impactos significativos. A partir dessas avaliações a DPOC pode ser classificada também em letras (A, B, C ou D), como demonstrado na Tabela 2, possibilitando a escolha da melhor conduta terapêutica. Para essa classificação, são considerados os valores obtidos na espirometria, que determinam a gravidade da limitação ao fluxo aéreo (GOLD 1-4), juntamente com o resultado dos questionários mMRC (0-4) e CAT (0-40), assim como o histórico de exacerbações (com hospitalizações ou não). As

exacerbações são caracterizadas por redução da função pulmonar, diminuição da qualidade de vida e está associada com o aumento de mediadores pró-inflamatórios nos pulmões (11).

Tabela 2 - Classificação da DPOC de acordo com os sintomas apresentados.

Exacerbações	Classificação	
≥ 2 ou ≥ 1 com hospitalização	C	D
0 (zero) ou 1 sem hospitalização	A	B
	mMRC 0-1 CAT < 10	mMRC ≥ 2 CAT ≥ 10
	Sintomas	

mMRC: *Modified Medical Research Council*; CAT: *COPD Assessment Test*; ≥: maior ou igual; <: menor. FONTE: Adaptado de GOLD (Global Initiative for Obstructive Lung Disease) 2020(1)

1.3 Mecanismos para o desenvolvimento da DPOC: papel da imunidade inata e adaptativa para a progressão da doença

A principal característica da DPOC é o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada e crônica à inalação da fumaça de cigarro. Embora a maior parte dos fumantes apresente evidências de algum processo inflamatório pulmonar, somente parte destes apresentará uma resposta inflamatória amplificada, sendo que os mecanismos envolvidos neste processo ainda estão pouco descritos (12). Este processo inflamatório é mediado por células da resposta imune inata (inespecífica) e resposta imune adaptativa (adquirida) (13,14).

A resposta imune inata compreende a primeira linha de defesa pulmonar que atua de maneira rápida e não específica, em resposta aos componentes irritantes da fumaça do cigarro, ao estresse celular e à lesão tecidual. Esta resposta é fornecida pela barreira epitelial, pelo transporte mucociliar, pelos fatores humorais e por células como macrófagos, células dendríticas, monócitos,

neutrófilos, e mastócitos (15) (Figura 1). A exposição à fumaça de cigarro promove lesão de células epiteliais e consequente liberação de produtos derivados desta injúria, como os DAMPs (Padrões moleculares associados ao dano), os quais irão se ligar aos receptores de membrana Toll (*Toll Like Receptors*) no epitélio, induzindo as células epiteliais remanescentes a produzirem mediadores inflamatórios (15). Esta sequência de eventos acarreta a maturação das células dendríticas (apresentadoras de antígenos) e a migração destas células para os órgãos linfoides, onde na presença de condições favoráveis, ocorrerá a ativação de células T (16) (Figura 1).

Cosio e colaboradores (16) propuseram que a resposta imune adaptativa manifesta-se somente quando há uma falha no mecanismo imunoregulador ou uma deficiência na tolerância do sistema imune, que resulta na progressão e perpetuação do processo inflamatório, com consequente agravamento da DPOC. A inflamação pulmonar em pacientes com DPOC grave é caracterizada pelo aumento de linfócitos CD4+ e CD8+, como também de células B, responsáveis pela produção e liberação de anticorpos, as quais continuam aumentadas mesmo após anos de cessação ao hábito de fumar (17).

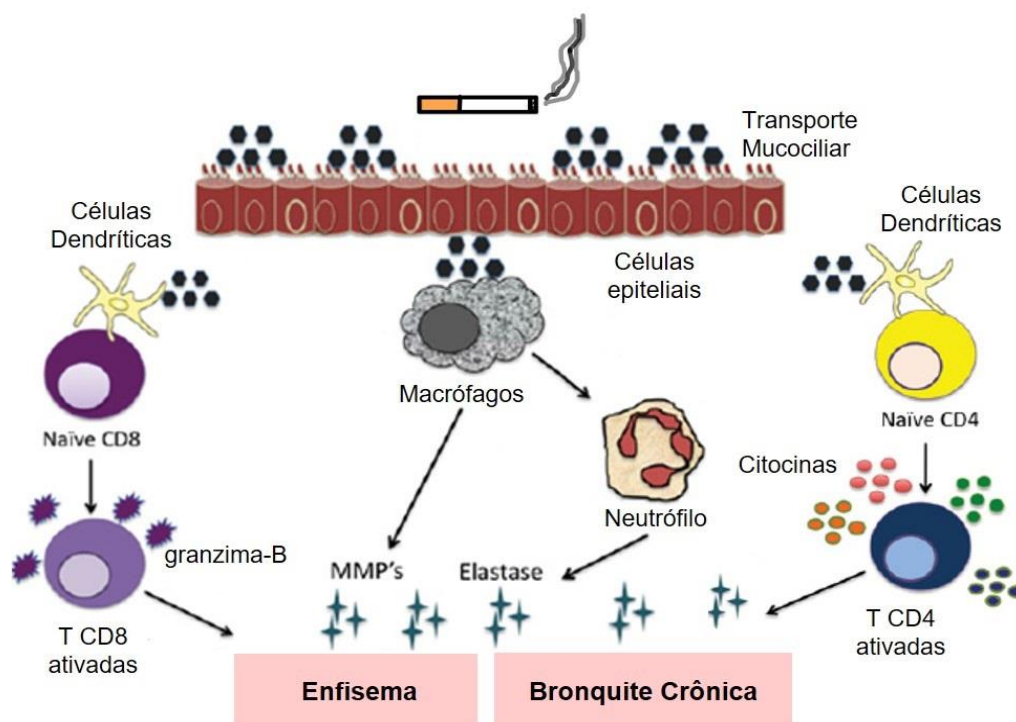


Figura 1. Principais células inflamatórias e seus mediadores na fisiopatologia da DPOC.
Adaptado de Lane N, 2010(18)

1.3.1 Linfócitos T CD8+ e CD4+

Se o processo inflamatório causado pela exposição à fumaça de cigarro não for controlado, as células dendríticas expressam altos níveis de proteínas como as do complexo-histocompatibilidade classe 1 e 2 (MHC-1 e MHC-2) e moléculas como CD80 e CD86 e já na região dos folículos linfoides irão fazer a apresentação dos antígenos às células T, promovendo a ativação, diferenciação e migração de linfócitos T CD4+ e CD8+ para o trato respiratório (15).

Células TCD8+ são o subtipo de linfócito presente em maior quantidade em pacientes com DPOC, e liberam enzimas proteolíticas como as perforinas e a granzima-B. Essas enzimas provocam a morte de células estruturais por apoptose ou necrose levando à degradação de matriz extracelular e remodelamento, resultando na obstrução de pequenas vias aéreas (16,19,20). Em casos de infecções de vias aéreas, as células TCD8+ encontram-se ainda mais aumentadas, sugerindo que essa resposta inflamatória seja causada pela colonização de bactérias no trato respiratório de pacientes com DPOC (21).

As células T CD4+ naïve podem se diferenciar em células Th1, Th2, Th17 ou T reguladoras (Tregs) de acordo com a sinalização de citocinas presentes no microambiente (22). Cada subtipo celular apresenta diferentes fatores de transcrição, receptores de membrana e produzem determinadas citocinas (15)(Figura 2).

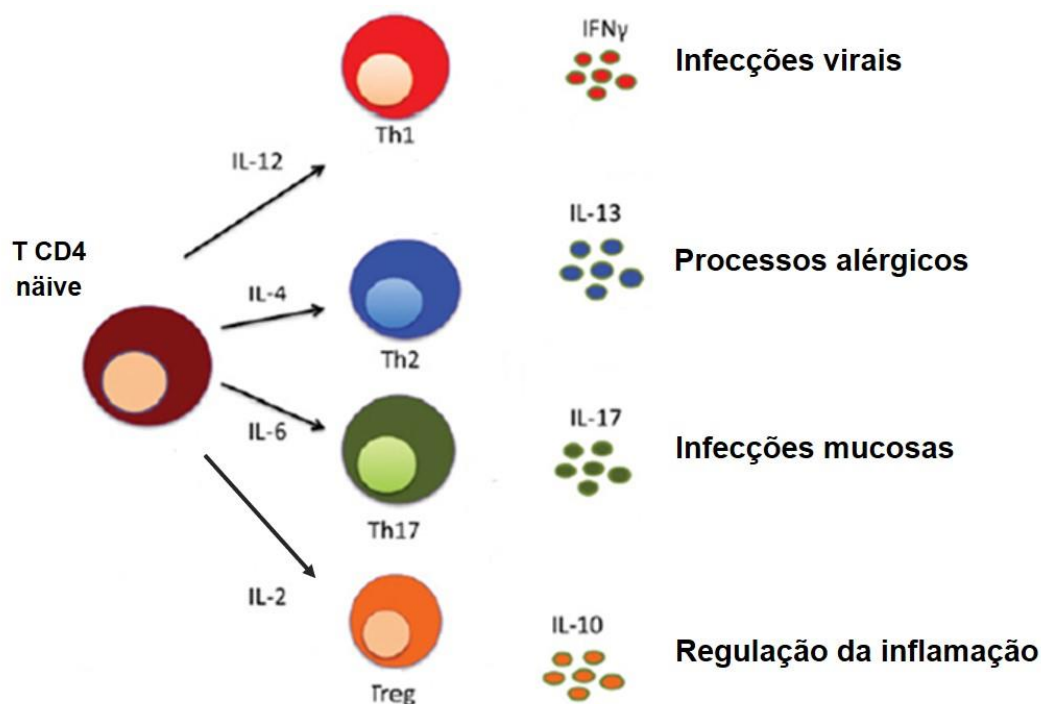


Figura 2. Diferenciação das células T CD4+ naïve. Adaptado de Lane N, 2010(18)

Existem pelo menos dois tipos de linfócitos T CD4+ efetoras em pulmões de pacientes DPOC: as células Th1 e as células Th17 (17,23). Os linfócitos CD4+ Th1 de pacientes enfisematosos secretam maiores quantidades de interferon- γ (IFN- γ) quando comparados aos controles, promovendo o acúmulo de células inflamatórias no pulmão (17,21). Além disso, a alta expressão de citocinas relacionadas à resposta Th1 durante exacerbações, principalmente de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral – α), foi relacionado ao mau prognóstico de pacientes com DPOC, devido ao papel das citocinas Th1 na promoção de respostas inflamatórias, secreção de muco e destruição do tecido (24). A diferenciação para células Th1 e produção de IFN- γ é regulada principalmente pelo fator de transcrição T-box-expresso em células T, conhecido como T-bet (25). Por sua vez, as células Th17 estão envolvidas na manutenção do processo inflamatório e associadas à progressão da DPOC e à exacerbação da destruição alveolar, através da liberação de interleucina (IL) -17A, IL-17F e IL-22 (15,17). As células Th17 são encontradas principalmente na mucosa brônquica e possuem a expressão do fator de transcrição ROR γ t (*Retinoic-acid-related orphan receptor*) como um marcador específico para esse tipo celular (26).

Enquanto as células Th1 e Th17 são responsáveis por perpetuar o processo inflamatório, o controle da proliferação e migração de células T para o trato respiratório é mediado por outro subtipo de linfócitos CD4+: as células Tregs, que apresentam funções imunoreguladoras, inibindo a autoimunidade e suprimindo a inflamação. Esse efeito imunossupressor ocorre devido à produção de citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) (15,27), e é dependente da expressão do fator de transcrição *Forkhead box p3* (Foxp3) (26). A IL-10 é uma interleucina produzida por macrófagos, células dendríticas, células B, células TCD8+ e por várias linhagens de TCD4+, sendo conhecida principalmente por seus efeitos anti-inflamatórios, ao limitar a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , 6, 12, 18, TNF- α , MIP-1, entre outras. Além disso, na falta de IL-10, os níveis de IL-23 podem aumentar, levando a uma diferenciação para Th17 (18,28–30).

1.3.2 Células T reguladoras e a progressão da DPOC

Cosio e colaboradores (16) propõem que a progressão da DPOC e a gravidade desta doença são determinadas tanto pela habilidade das células dendríticas em estimularem as células T, quanto por ações imunoreguladoras dependentes das Tregs. Estes autores sugerem que uma falha grave neste mecanismo resulta em estágios avançados de DPOC.

Lee e colaboradores (14) foram uns dos primeiros autores que propuseram que uma redução na quantidade de células Treg estava associada à progressão da DPOC, causando um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias. Neste estudo, foi observada uma redução de expressão nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) para Foxp3 e da expressão de IL-10 em tecido de pacientes com DPOC, reforçando a teoria de uma menor resposta reguladora em pacientes portadores da doença. Os autores também demonstraram a presença de anticorpos anti-elastina e aumento da resposta Th1, caracterizada pelo aumento da produção de IFN- γ em células TCD4+ isoladas do sangue de pacientes com DPOC, que foram correlacionadas com a gravidade do enfisema nestes indivíduos. A partir dessas observações, foi proposto que a exposição à

fumaça de cigarro induz as células da imunidade inata a secretarem enzimas proteolíticas, liberando fragmentos de elastina que podem ser reconhecidos como auto antígenos e iniciar um processo de auto imunidade mediado por células T e B contra a elastina. Além disso, os autores propuseram que as células Treg são importantes para a regulação desta resposta inflamatória na tentativa de suprimir a resposta aos autoantígenos.

Em estudo anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (31), foi demonstrado o aumento nas células positivas para IL-17 (IL-17⁺) em ambos os grupos de fumantes obstruídos ou não, enquanto o número de células Treg (Foxp3⁺) e IL-10⁺ diminuíram nas pequenas vias aéreas de fumantes obstruídos em comparação a fumantes saudáveis e indivíduos controle, sugerindo a importância das células Tregs no controle do processo inflamatório através da produção de IL-10. Os autores também ressaltam a importância do estudo dos diferentes compartimentos pulmonares, uma vez que encontraram aumento de células Treg nos tecidos linfoides, diferentemente do observado em pequenas e grandes vias aéreas. Em outro estudo desenvolvido por nosso grupo (32), o desequilíbrio entre as respostas Th17 e Treg foi avaliado em modelo experimental induzido por exposição à fumaça de cigarro, de forma temporal ao longo de 1, 3 e 6 meses de exposições. Foi demonstrado o aumento de IL-17⁺ e diminuição de Foxp3⁺ na área peribroncovascular após o sexto mês de exposição, embora a diminuição de IL-10⁺ e TGF-β⁺ tenham acontecido desde o primeiro mês. Esses dados sugerem que apesar da quantidade de células Treg presente no tecido pulmonar, sua atividade imunossupressora encontra-se diminuída.

Estes estudos sugerem o papel importante das Tregs via mediação por IL-10 no controle da resposta imunológica pró inflamatória em pacientes DPOC. A ausência ou falha no mecanismo de ação dessas células, assim como falhas em sua via de sinalização, corrobora com a inflamação persistente e contribui para a perpetuação da doença (15).

1.3.3 Ativadores de Fatores de Transcrição e os Supressores de Sinalização de Citocinas: STAT e SOCS

As citocinas e os fatores de crescimento são mediadores extracelulares responsáveis por transmitir sinais entre as células e desta forma promover a manutenção de alguns processos inflamatórios e progressão de doenças como descrito acima. Estes sinais são recebidos por subunidades de receptores intracelulares associados às proteínas do tipo Janus quinases (JAKs) (33) como descrito na Figura 3. A ativação das JAKs promove a propagação destes sinais por meio intracelular para atingir um perfil de transcrição correto de determinadas proteínas através da ativação das STAT (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*), as quais são transdutores de sinais e ativadores de transcrição (34). Esta complexa cascata de transmissão de sinais intracelulares é responsável pela manutenção da homeostase destas células resultando em sua proliferação, diferenciação e sobrevivência como é o caso da diferenciação das células TCD4+. Muitas doenças resultam das alterações nestes processos de sinalização e transdução de sinais, como na artrite reumatoide, arterosclerose e no processo de tumorigênese (33,35).

Ainda dentro deste processo de homeostase celular existem as proteínas supressoras da sinalização JAK/STAT, do inglês "*Supressor Of Cytokine Signaling*", denominadas SOCS. São pequenas proteínas intracelulares que desempenham um importante controle das respostas celulares às diferentes citocinas e fatores de crescimento (33,34,36). As SOCS promovem a degradação de diversas proteínas fosforiladas e atuam no ajuste fino da resposta imunológica, inflamação, metabolismo e no câncer (36).

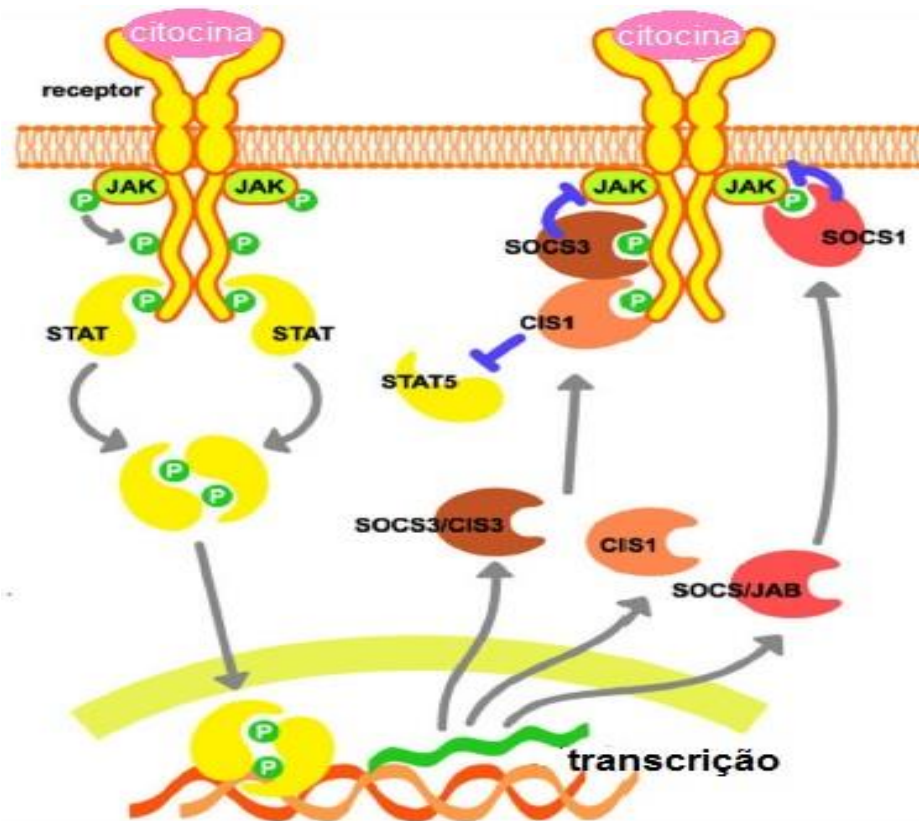


Figura 3. Estrutura e função das proteínas SOCS. Adaptado de Yoshimura e colaboradores (2012) (33).

1.3.3.1 O papel das proteínas STAT e SOCS na diferenciação das células TCD 4+ *naive*

A diferenciação de células TCD4+ *naive* depende da ativação de citocinas específicas como descrito na Figura 4, determinando os diferentes subtipos celulares: Th1, Th2, Th17 e Treg. Até hoje foram descritos oito tipos de proteínas supressoras (SOCS), entretanto as mais descritas são as SOCS 1 e 3, as quais estão envolvidas na diferenciação das células TCD4+ *naive* (36).

Na diferenciação de células TCD4+ *naive* para resposta Th1, se observa diminuição da SOCS1 e aumento de SOCS3, que está envolvida com a inibição da STAT3 e diferenciação para a resposta Th17. Mas também promove inibição de resposta Th1 por suprimir a ativação de STAT4 via IL-12 (37) ou via aumento da produção de IL-10 e TGF- β . Em resposta Th17, observa-se menor expressão

de SOCS3 e aumento da expressão de SOCS1, a qual inibe resposta Th1 via supressão de IFN- γ (33) (Figura 4).

O desvio de resposta para diferenciação em Treg se deve a ativação da STAT5, a qual está envolvida diretamente ao aumento da expressão de Foxp3. Embora a deleção de SOCS1 promova o aumento de células Tregs, estas células apresentam piora em sua função imunoreguladora e na expressão de citocinas (38). Entretanto, em presença de SOCS1 há menos células Tregs, mas com as funções celulares preservadas (39) (Figura 4).

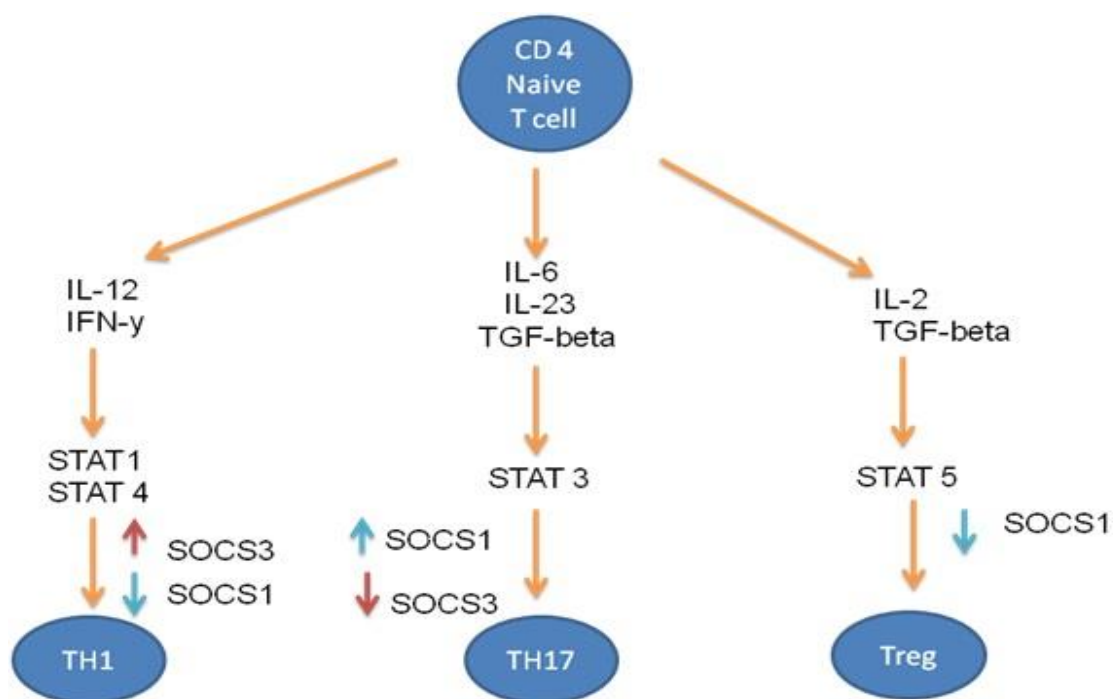


Figura 4. Proteínas STAT e SOCS na diferenciação das células T helper. Adaptado de Yoshimura e colaboradores (2012)(33).

1.3.3.2 A ativação e função das STAT e SOCS na progressão da DPOC

Considerando o importante papel das STAT na persistência dos processos inflamatórios, incluindo os envolvidos na progressão da DPOC, existe um interesse no desenvolvimento de inibidores da cascata de reação JAK-STAT como alternativa terapêutica para o tratamento da DPOC. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre o papel das STAT na progressão dessa doença.

Yew-Booth e colaboradores (40) avaliaram a participação das proteínas fosforiladas STAT 1-6 em tecidos de indivíduos não fumantes, fumantes sem presença de obstrução e fumantes com obstrução (DPOC), obtidos em cirurgias de transplantes. Os resultados demonstraram somente um aumento das proteínas fosforiladas STAT 1 e 3 nos indivíduos fumantes com e sem obstrução comparados aos não fumantes. Apenas outro estudo desenvolvido por Di Stefano e colaboradores (41), avaliaram e demonstraram o aumento de STAT4 no tecido e lavado broncoalveolar (BAL, do inglês *Bronchoalveolar lavage*) de fumantes com e sem obstrução comparados a não fumantes.

Também são poucos os estudos na literatura descrevendo o papel das SOCS na progressão da DPOC, e parte destes apresenta o papel de diferentes tratamentos com medicamentos em cultura de células e em modelos experimentais para o aumento da expressão da SOCS3 (42). Nasreen e colaboradores (42) demonstraram que o tratamento com Propionato de Fluticasona e Salina em cultura de células epiteliais expostas à fumaça de cigarro promoveu aumento de SOCS3 sugerindo um novo mecanismo deste medicamento para induzir um efeito anti-inflamatório. Em outro estudo, este mesmo grupo demonstrou em cultura de células epiteliais de pacientes que apresentavam rinite alérgica e em modelo experimental de inflamação alérgica crônica de vias aéreas, o mesmo efeito no aumento para expressão de SOCS3 com consequente ação anti-inflamatória. Por outro lado, Springer e colaboradores (43) demonstraram diminuição da expressão de SOCS3 em tecidos retirados de biópsias de pulmões de pacientes com DPOC, sugerindo que o desequilíbrio entre os supressores de citocinas (SOCS) e a liberação de citocinas inflamatórias, desempenham importante papel na progressão da DPOC.

Estudos realizados previamente em modelos experimentais por nosso grupo de pesquisa demonstram a importância das proteínas STAT e SOCS na manutenção do processo inflamatório na DPOC. Em um modelo de exacerbação induzida pela instilação de LPS (lipopolissacarídeo) em camundongos expostos à fumaça de cigarro (CS), foi observado que os animais do grupo CS/LPS apresentaram aumento tanto dos mediadores inflamatórios STAT3⁺, pSTAT3⁺ e IL-17⁺, quanto dos mediadores anti-inflamatórios STAT5⁺, pSTAT5⁺ e Treg

(Foxp3⁺) (44). Os autores acreditam que apesar do aumento de células Treg, os níveis iguais de IL-10 e a diminuição na densidade de células IL10⁺ observada no grupo CS/LPS sugere que a falha na liberação desta citocina desempenha um papel fundamental na resposta inflamatória exacerbada no modelo proposto. Em outro estudo, o papel das STAT e SOCS no desequilíbrio entre as respostas Th17/Treg foi avaliado em camundongos expostos à fumaça de cigarro, durante 3 e 6 meses (45). Os animais expostos à fumaça de cigarro apresentaram diminuição de células STAT5⁺ e pSTAT5⁺ e diminuição dos níveis de TGF- β e IL-10 a partir do terceiro mês de exposição, enquanto o aumento no número de células STAT3⁺ e pSTAT3⁺ e da expressão de IL-17 ocorreu somente no 6^o mês. Os autores também demonstraram aumento na densidade de SOCS1⁺ desde o 3^o mês, concomitantemente à diminuição de SOCS3⁺, evidenciando uma regulação negativa da resposta anti-inflamatória mediada pelas proteínas SOCS e STAT desde o início do desenvolvimento da doença.

1.4 Inflamação sistêmica em pacientes com DPOC

Pacientes com DPOC, principalmente quando possuem a doença em estágios graves e durante as exacerbações, apresentam também inflamação sistêmica, que parece estar relacionada à diminuição acelerada da função pulmonar. Essa inflamação é avaliada através do aumento de citocinas e quimiocinas circulantes, dos níveis de proteína de fase aguda ou através de anormalidades em células circulantes (46). O tabagismo pode causar inflamação sistêmica (por exemplo, aumento na contagem total de leucócitos), porém em pacientes com DPOC o grau desta inflamação é maior. Quando a inflamação sistêmica é persistente, ela é associada a piores resultados clínicos dos pacientes, podendo agravar suas comorbidades, aumentar a frequência de exacerbações e o risco de morte (21).

O desequilíbrio entre as resposta Th17 e Treg já foi demonstrado em amostras de sangue de pacientes com DPOC (22,47–50), embora algumas divergências sejam observadas. A maioria destes estudos avalia pacientes com DPOC de diversos estágios reunidos em um único grupo, ou somente um estágio

específico da doença, enquanto apenas alguns estudos avaliaram amostras de pacientes incluindo e comparando os 4 diferentes estágios GOLD (47,50).

Foi observado que pacientes com DPOC em estágio III apresentam menos IL-10 circulante e mais IL-6 comparado aos indivíduos com a doença em estágio I e II (50). Wang e colaboradores (22) avaliaram amostras de sangue periférico de indivíduos que nunca fumaram (controle), fumantes sem obstrução e indivíduos com DPOC moderada (estágios II e III) e grave (estágio IV). Os pacientes com DPOC moderada e grave apresentaram maior frequência de células Th17, níveis elevados de RNAm para ROR γ t e aumento dos níveis séricos de IL-17A, IL-6, IL-21, IL-22 e IL-23, além de menor frequência de células Treg e níveis séricos de Foxp3 e IL-10 diminuídos. Adicionalmente, os autores demonstraram que o aumento da razão Th17/Treg foi negativamente correlacionado com a piora da função pulmonar nesses pacientes. No entanto, Zhang e colaboradores (47) demonstrou que a IL-17A sérica aumentou com os estágios da DPOC, mas não observou diferença nos níveis de IL-10 sérica entre os pacientes com DPOC e fumantes saudáveis.

Ao avaliar pacientes com DPOC estágio III estável e exacerbada, Li e colaboradores (49) observaram que a proporção de células Treg no sangue periférico de indivíduos com DPOC exacerbada é menor quando comparada aos indivíduos com a doença estável, e maior comparada aos fumantes saudáveis. No entanto, foi observada uma correlação negativa entre as respostas Th17 e Treg tanto na exacerbação aguda quanto na DPOC estável. Enquanto Jin e colaboradores (48) demonstraram um aumento de citocinas inflamatórias (IL-17 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) nos pacientes com DPOC exacerbada, além do aumento de células Treg. Embora a relação Treg/IL-17 tenha apresentado valores normais, as células Treg foram insuficientes para suprimir o aumento dos mediadores associados à inflamação. Estes estudos reforçam a importância do desequilíbrio entre as respostas Th17 e Treg na progressão da DPOC, assim como a importância de se avaliar diferentes estágios da doença.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Estudos recentes demonstram o importante papel da sinalização das proteínas STAT e SOCS na ativação e controle das respostas imunológicas, além de atuar na persistência dos processos inflamatórios, incluindo os envolvidos na progressão da DPOC.

Desta forma, pretendemos avançar no entendimento acerca da expressão das proteínas STAT e SOCS, envolvidas na diferenciação das células TCD4+ *naïve* para os diferentes subtipos presentes na DPOC, em indivíduos fumantes ou ex-fumantes com e sem obstrução, comparando a resposta imunológica local e a sistêmica. Daremos ênfase nos subtipos Th17 e Treg, uma vez que o desequilíbrio entre estas respostas possui papel fundamental no desenvolvimento e progressão da DPOC.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Avaliar por meio de técnicas específicas, a expressão das proteínas STAT e SOCS envolvidas no processo de diferenciação das células TCD4+ *naive*, com ênfase nos subtipos Th17 e Treg, em pacientes fumantes ou ex-fumantes obstrutivos (DPOC) e não obstrutivos, comparando a resposta local e sistêmica.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP) juntamente com a Plataforma Brasil, sob o protocolo de número 15101 (parecer 1.754.895), bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos das instituições coparticipantes: Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Câncer Center, sob protocolo de número 2306/16 (parecer 1.881.938), e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP) (parecer 3.120.979) (Anexos). Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento livre esclarecido.

4.1 Casuística

Foram estudados 24 indivíduos submetidos à ressecção pulmonar por tumor metastático ou primário, no período de fevereiro de 2017 a dezembro de 2019, provenientes do hospital A.C. Camargo Cancer Center, instituição coparticipante deste estudo. Destes indivíduos, foram coletadas amostras de tecido pulmonar e de sangue periférico. Também foram estudados outros 14 pacientes submetidos à coleta de sangue, durante suas consultas de rotina com pneumologistas, sem diagnóstico de neoplasia, no período de agosto de 2018 a junho de 2019, provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Dados demográficos, história médica, hábito tabágico, medicações e prova de função pulmonar foram obtidas a partir da análise de prontuários.

Os pacientes do estudo foram divididos em grupos, considerando o hábito tabágico e prova de função pulmonar, de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

Grupo Fumantes Não Obstrutivos (FNO) (n=14): indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com cessação de fumo > 1 mês, sem doença pulmonar prévia e prova de função pulmonar normal ($VEF_1/CVF > 70\%$ e $VEF_1 > 80\%$), submetidos à ressecção pulmonar por tumor primário ou metastático. Foram coletadas amostras de tecido pulmonar (n=14) e de sangue periférico (plasma

sanguíneo n=8, leucócitos totais do sangue n=6).

Grupo DPOC I e II (n=10): indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com histórico de cessação de fumo > 1 mês, com prova de função pulmonar positiva para a obstrução de fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 70\%$, $VEF_1 \geq 50\%$), submetidos à ressecção pulmonar por tumor primário ou metastático. Foram coletadas amostras de tecido pulmonar (n= 9) e de sangue periférico (plasma sanguíneo n= 8, leucócitos totais do sangue n=7).

Para comparar marcadores da resposta sistêmica, incluímos um terceiro grupo de pacientes com diagnóstico de DPOC III e IV e sem neoplasia.

Grupo DPOC III e IV (n=14): indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com histórico de cessação de fumo > 1 mês, com prova de função pulmonar positiva para a obstrução de fluxo aéreo ($VEF_1/CVF < 70\%$, $VEF_1 < 50\%$), sem diagnóstico de neoplasia. Amostras de sangue periférico foram coletadas (plasma sanguíneo n=13, leucócitos totais do sangue n=10).

Pacientes com diagnóstico clínico de asma, bronquiectasia, doença pulmonar infecciosa, deficiência de $\alpha 1$ -antitripsina, doença pulmonar intersticial ou que tenham realizado radioterapia prévia não foram incluídos.

4.2 Coleta e Processamento do Tecido Pulmonar e da Amostra de Sangue

Foram coletados fragmentos de tecido pulmonar de região distante do tumor pelo qual o indivíduo foi diagnosticado e submetido à ressecção pulmonar cirúrgica, e/ou amostras de sangue periférico dos pacientes. Também foram coletadas amostras de sangue dos pacientes provenientes do ambulatório de pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, no momento de suas consultas de rotina.

O tecido retirado foi congelado em nitrogênio líquido e transportado até as dependências da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), onde foi então transferido para o freezer -70°C e permaneceram até o momento das análises. As amostras de sangue foram coletadas em tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) no momento da cirurgia e mantidas em gelo até o momento em que chegaram à FMUSP e foram processadas.

Para a retirada do plasma, parte do sangue foi centrifugado por 10 minutos, a 4°C e 1500 rpm. Após a centrifugação, o plasma foi transferido para outro tubo e armazenado em freezer -70°C até o momento das análises. Para a separação de leucócitos totais do sangue, utilizamos o tampão de lise de células vermelhas (RCLB) (0,158 g Carbonato de Amônio, 12,2 g Cloreto de Amônio em 2 L de água destilada), em uma sequência de incubação no gelo por 10 minutos e de posterior centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, repetida por duas vezes. Depois desse processo, o sobrenadante foi descartado, restando somente os leucócitos totais. Parte dos leucócitos foi armazenado em Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) no freezer -70°C para posterior extração de RNA, e em outra parte realizamos a extração de proteínas como descrito posteriormente.

4.3 Expressão Gênica

A expressão gênica das proteínas SOCS 1 e 3, STAT 1, 3 e 5, ROR γ t, Foxp3, T-bet, IL-6, -10, -17 e TGF- β , foi avaliada pela PCR em tempo real (RT-qPCR) por se tratar de um método de alta sensibilidade.

4.3.1 Criopreservação de tecidos e Extração de RNA

Para estudos moleculares, o tecido pulmonar coletado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em tubos de criopreservação até o momento da extração do RNA, em freezer -70°C. O tecido pulmonar foi homogeneizado em temperatura negativa, seguido do procedimento para isolamento e purificação do RNA com Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) através do método modificado de isotiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio em etapa única, além do tratamento das amostras com DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA). A quantidade e a qualidade dos RNAs foram verificadas por espectrofotometria (NanoVue Plus® Spectrophotometer; GE). O mesmo procedimento de extração foi realizado para os leucócitos totais do sangue.

4.3.2 Transcrição reversa

Depois de extraído o RNA das amostras, realizamos a transcrição reversa (RT), para a síntese de cDNA, com a utilização de 1 µg de massa de RNA total. O volume de cada amostra necessário para a reação foi calculado pela fórmula:

$$V_{amostra} = 1 / [] \text{ ng/}\mu\text{l amostra} \times 1000$$

Para isso, utilizamos o kit Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). O volume final de cada reação foi de 21 µl, sendo 12 µl do Super Mix, 8 µl a soma do volume de RNA já calculado anteriormente com a água DEPC, e 1 µl de RNase *E. coli* que é adicionada durante o procedimento do termociclador. Os ciclos de RT foram programados no termociclador da seguinte forma:

1º passo: incubação a 25°C por 10min.

2º passo: incubação a 50°C por 30min.

3º passos: incubação a 85°C por 5min.

4º passo: adicionar 1 µl de RNase *E. coli*.

5º passo: incubar a 37°C por 20min.

O cDNA obtido foi mantido na temperatura de -20°C.

4.3.3 Real Time PCR

A expressão das STAT 1, 3 e 5, SOCS 1 e 3, RORγt, T-bet, Foxp3, IL-6, IL-17, IL-10 e TGF-β foi avaliada pelo método quantitativo de PCR em tempo real (Real Time RT-qPCR). O sistema SYBER Green® foi escolhido para quantificar a expressão dos alvos de interesse, o qual possui um fluorocromo que quando ligado à dupla fita de DNA do produto de interesse, emite a fluorescência que será detectada e quantificada pelo leitor. A adoção de uma mesma plataforma para todos os alvos tem a vantagem de permitir que todos sejam amplificados com o mesmo perfil de variação térmica o que otimiza o uso de reagentes e de montagem das reações.

As RT-qPCRs foram executadas em placas de 96 poços com a utilização de 1 µl de produto de transcrição reversa, 10 µl de Platinum SYBR Green qPCR

SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA) (2X), 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse, 0,2 µl de enzima Rox (presente no kit) e 6,8 µl de água DEPC, em volume final de 20 µl. O perfil térmico das reações consistiu em 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. As amplificações foram executadas em um termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para normalização das amplificações utilizamos o gene endógeno GAPDH. A expressão dos genes de interesse foi calculada utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e expresso como unidades arbitrárias.

As sequências dos genes de interesse foram obtidas do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> e estão descritas na Tabela 3. O tamanho dos fragmentos gerados por RT-qPCR foram validados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para confirmar o tamanho do fragmento e a especificidade da amplificação.

Tabela 3 - Sequência dos primers desenhados para o estudo.

Primer	Sequência <i>Forward</i> 5' – 3'	Sequência <i>Reverse</i> 3' – 5'
SOCS1	CGATTACCGGCGCATCACGC	TGTCGCGCACCCAGGAAGGTG
SOCS3	ACGGTCTTCCGACAGAGATG	GCCACCTACTGAACCCTCCT
STAT1	TGAATATTCCCCGACTGAGC	CCGTTTTTCATGACCTCCTGT
STAT3	CGGACTGGATCTGGGTCTTA	CCTTTGGAACGAAGGGTACA
STAT5	GTGGACGATGACAACCACAG	CTGAACAACCTGCTGCGTGAT
T-BET	ACTTTCCAAGAAACCCAGTTCA	GGAACAGGATACTGGTTGGGTA
RORYT	TGAGAAGGACAGGGAGCCAA	CCACAGATTTTGCAAGGGATCA
FOXP3	CAGCACATTCCCAGAGTTCCTC	GCGTGTGAACCAGTGGTAGATC
IL-6	CCTGAGAAAGGAGACATGTAA	GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC
IL-17A	CTTGTCCTCAGAATTTGGGCATCC	GACTCCTGGGAAGACCTCATTGG
IL-10	AAGCCTGACCACGCTTTCTA	ATGAAGTGGTTGGGGAATGA
TGF-β1	GGAAATTGAGGGCTTTTCGCC	AGTGAACCCGTTGATGTCCA
GAPDH	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG

SOCS: *Suppressor Of Cytokine Signaling*; STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*; T-bet: *T-box-expressed-in-T-cells*; RORYt: *Retinoic-acid-related orphan receptor gamma*; Foxp3: *Forkhead box p3*; IL: Interleucina; TGF-β: *Transforming Growth Factor-β*; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

4.4 ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Os níveis de IL-10, IL-17, IL-6, IL-12, IFN- γ e TGF- β nas amostras de tecido pulmonar e plasma foram determinados por ELISA, seguindo as informações do fabricante de cada um dos kits.

4.4.1 Dosagem das citocinas por ELISA

Para todos os ensaios, microplacas (Costar, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos. Após bloqueio, lavagem e distribuição das amostras, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, adicionamos uma solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes, e corrigidas pelos valores de proteína total correspondentes.

Foram utilizados os kits específicos para humanos da marca R&D Systems (Boston, EUA), para detecção de IL-10 (R&D Systems, CA, USA; DY217B-05 limite de detecção 31–2000 pg/mL) e TGF- β (R&D Systems, CA, USA; DY240-05 limite de detecção 31–2000 pg/mL), e kits da marca Bio Legend (San Diego, CA) para detecção de IL-6 (Biolegend, CA, USA; DUO 430504-BL; limite de detecção 7.8–500 pg/mL), IL-17 (Biolegend, CA, USA; DUO 433914; limite de detecção 3.9-250 pg/mL), IL-12 (Biolegend, CA, USA; DUO 430704; limite de detecção 62.5-4,000 pg/mL) e IFN- γ (R&D Systems, CA, USA; DY285B limite de detecção 9.4 - 600 pg/mL).

4.4.2 Quantificação de proteínas totais no tecido pulmonar

Para a quantificação das proteínas totais e da posterior dosagem de citocinas, fragmentos de tecido pulmonar foram descongelados e individualmente homogeneizados em um homogeneizador de amostras Power

Lyzer 24 (MO Bio Laboratories, CA, EUA) por 15 segundos, em 500 µl de tampão PBS.

Foi utilizado o método de Bradford (Protein Assay, Bio-rad, California, USA) na diluição de 1:5 e uma curva de proteína conhecida, albumina de soro bovino (BSA, SigmaAldrich, St. Louis, MO), nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 (mg/ml). As amostras foram diluídas na titulação de 1:10, sendo 6 µl da amostra diluída de pulmão adicionados aos 300 µl de reagente de Bradford em uma placa com 96 poços. Após a distribuição das amostras, as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos, e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Moleculas Devices) sob a absorvância de 570 nm.

Os valores obtidos em absorvância e corrigidos pelo seu valor de branco (BradFord) foram convertidos e expressos em mg/ml por meio da equação da reta obtida pela curva estabelecida de BSA (soro de albumina bovina).

4.5 Imunoblotting

A expressão das proteínas SOCS 1 e 3, STAT 1, 3 e 5, pSTAT1, 3 e 5 no tecido pulmonar e nos leucócitos do sangue foi avaliada por Imunoblotting.

4.5.1 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, tanto o tecido pulmonar quanto os leucócitos do sangue foram homogeneizados em 200 µl de tampão de lise de células NP40 (Invitrogen, Carlsbad, CA) com inibidor de proteases PMSF (SigmaAldrich, St. Louis, MO), e centrifugadas por 15 minutos, a 4°C em 13000 rpm. O sobrenadante foi armazenado em alíquotas no freezer -70°C até o momento das análises.

4.5.2 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método baseado no ácido bicinchonínico (BCA, Kit Pierce), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente foi realizada uma curva padrão utilizando soro de albumina bovina (BSA), em uma concentração de 20-2000 µg/ml (25 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1500 µg e 2000 µg). Posteriormente, 50 µl de cada uma das soluções da curva padrão da amostra e do branco foram transferidos separadamente para tubos de 1,5 ml. Logo após, acrescentamos 1 ml de solução de reação do kit, preparada a partir dos Reagentes A e B, na proporção de 50:1. A reação foi incubada em banho maria a 37°C, durante 30 minutos. Em seguida foi feita a leitura das amostras em espectrofotômetro (Evolution 60) a 562 nm. Uma curva de calibração com a densidade óptica correspondente a cada uma das concentrações da curva padrão foi feita, e a concentração da amostra foi calculada a partir desta curva.

4.5.3 Caracterização das proteínas de interesse por eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas extraídas foram preparadas em tampão com β-mercaptoetanol e incubadas por 5 min a 96°C. Cerca de 10 µg da amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 10% e separada por eletroforese em tampão 10x Tris/Glycine/SDS (Bio Rad, CA, USA), sob corrente elétrica constante de 300 volts por 20 minutos. Para identificação do peso molecular das proteínas de interesse (SOCS 1 e 3, STAT e pSTAT 1, 3 e 5), foi utilizado padrão de peso molecular comercial (Bio Rad, CA, USA).

4.5.4 Immunoblotting para quantificação das proteínas de interesse

Depois de separadas por eletroforese, as amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio Rad). A transferência aconteceu em tampão tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10%,

por 30 min a 100 volts. A eficiência da transferência foi confirmada pela coloração com solução de Ponceau S 0,5% (Sigma Chem Co).

Posteriormente, as membranas de nitrocelulose foram incubadas por 2h em temperatura ambiente, em solução de leite em pó desnatado 5% ou em solução de BSA 5% em TBST, para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas de 16 a 18h em 4°C com o anticorpo primário de interesse (SOCS1, SOCS3, STAT1, pSTAT1, STAT3, pSTAT3, STAT5, pSTAT5 e β -actina como controle endógeno), diluído em solução de leite desnatado 5% ou BSA 5% em TBST. Após este período, as membranas foram lavadas três vezes com TBST e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP, correspondente ao primário, diluído em leite desnatado 3% em TBST. No caso das proteínas fosforiladas e totais, a marcação da proteína fosforilada foi realizada antes da marcação da proteína total, utilizando-se a mesma membrana. Utilizamos o *Stripping buffer* (15g glicina, 1g de SDS, 10mL de Tween-20, 1L de água destilada, pH 2.2) para retirar a marcação da proteína fosforilada, e então reiniciar a marcação da proteína total. A revelação das reações foi realizada com o Kit Clarity (Bio Rad, CA, USA). As imagens de quimioluminescência foram obtidas pelo fotodocumentador ChemiDoc (Bio Rad, CA, USA) e analisadas no software ImageLab (Bio Rad, CA, USA).

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism® v.5. A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Dependendo da normalidade na distribuição dos dados, o teste T de Student não pareado ou o teste de Mann-Whitney foram usados ao analisar dois grupos, e a análise de variância One-Way ANOVA seguida do pós teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns foi usada para as comparações entre três grupos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e interquartis a depender da normalidade dos dados. Consideramos o valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos pacientes

Ao analisar o perfil dos pacientes incluídos no estudo, observamos que não há diferença estatística entre os grupos quando comparamos carga tabágica e idade, demonstrando que estes não são fatores relacionados à obstrução e gravidade da doença em nossa amostra. Com relação aos parâmetros referentes à função pulmonar, observamos valores menores de VEF₁ e VEF₁/CVF pré e pós broncodilatador (BD) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO, e no grupo DPOC III e IV comparado aos demais grupos (Tabela 4).

Entre os 10 indivíduos do grupo DPOC I e II, 2 possuem a doença em estágio GOLD I – leve, com valor de VEF₁ ≥ 80% do predito, e 8 possuem a doença em estágio GOLD II – moderado, com valor de VEF₁ pós broncodilatador entre 80% e 50% do predito. No grupo DPOC III e IV, 9 pacientes possuem a doença em estágio GOLD III – Grave, com valor de VEF₁ pós BD entre 30% e 49% do predito, e 5 pacientes em estágio GOLD IV - Muito grave, com valores de VEF₁ menor do que 30% do predito.

Tabela 4 - Análise das características dos pacientes.

	FNO	DPOC I e II	DPOC III e IV
Instituição (n°. de pacientes)			
AC Camargo Cancer Center	14	10	0
HCFMUSP	0	0	14
Idade (anos)	61,29 ± 9,47	68,44 ± 4,44	61 ± 7,78
Gênero (Masculino/Feminino)	5/9	7/3	6/8
Fumantes/Ex-fumantes	4/10	4/6	2/12
Carga Tabágica	30,01 ± 22,35	37,40 ± 24,71	47,53 ± 35,39
VEF₁% do predito	95,36 ± 13,33	71,10 ± 14,65 #	29,21 ± 8 *
VEF₁/CVF %	77,21 ± 5,67	64,4 ± 4,69 #	45,57 ± 10,99 *
VEF₁% do predito (Pós-BD)	97,25 ± 12,8	76 ± 15,22 #	31,36 ± 9,07 *
VEF₁/CVF % (Pós-BD)	77,93 ± 4,89	65,5 ± 4,32 #	44,43 ± 11,63 *

Dados apresentados em médias ± desvio padrão. FNO: Fumantes sem obstrução; DPOC I e II: indivíduos com diagnóstico de DPOC estágios I e II; DPOC III e IV: indivíduos com diagnóstico de DPOC estágios III e IV. HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. BD: broncodilatador; VEF₁: volume expirado forçado no primeiro segundo; CVF: capacidade vital forçada. * p < 0.0001, DPOC III e IV comparado aos demais grupos; # p < 0.001, DPOC I e II comparado ao grupo FNO.

5.2 Análise da resposta Th1

5.2.1 Análise da resposta Th1 local

A avaliação da expressão dos fatores de transcrição para resposta Th1 nas amostras de tecido pulmonar revelou somente o aumento da expressão gênica de STAT1 nos pacientes com DPOC I e II comparados ao grupo FNO (Figura 5A). Não foram observadas diferença na expressão gênica de T-bet (Figura 5B), na expressão das proteínas STAT1 e pSTAT1 (Figura 5C e 5D) e na relação entre expressão de STAT1 fosforilada e total (pSTAT1/STAT1) (Figura 5E). Também não foram observadas diferenças na expressão de IFN- γ e IL-12 (Figura 6A e 6B) entre os grupos estudados.

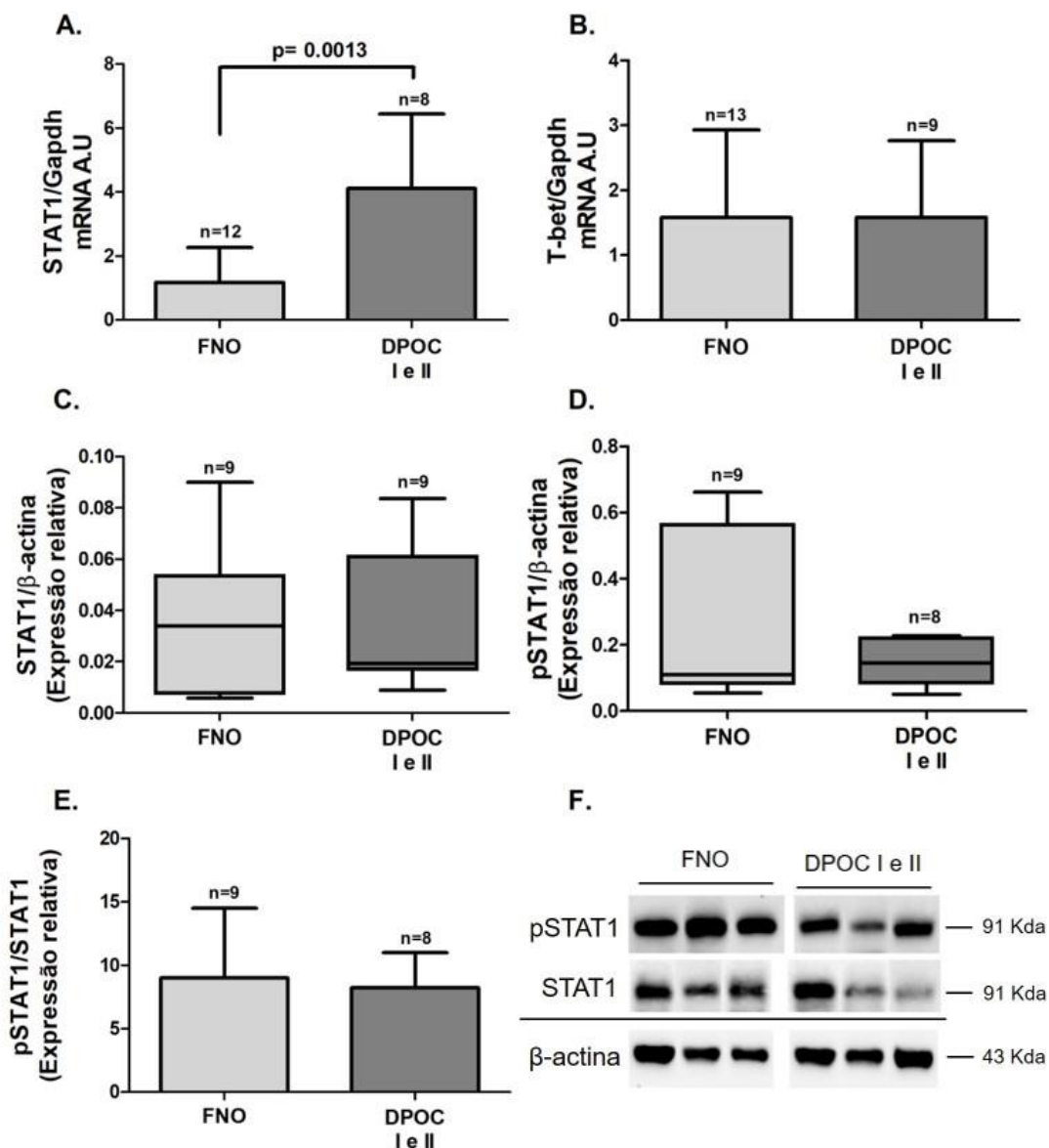


Figura 5 - Fatores de transcrição para resposta Th1 em amostras de tecido pulmonar. (A) Houve aumento da expressão gênica de STAT1 (p=0,0013) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença estatística entre os grupos em (B), (C), (D) e (E). (F) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de pSTAT1 e STAT1 normalizadas com β -actina. Dados expressos como média \pm DP em (A), (B) e (E), e como mediana e interquartis em (C) e (D).

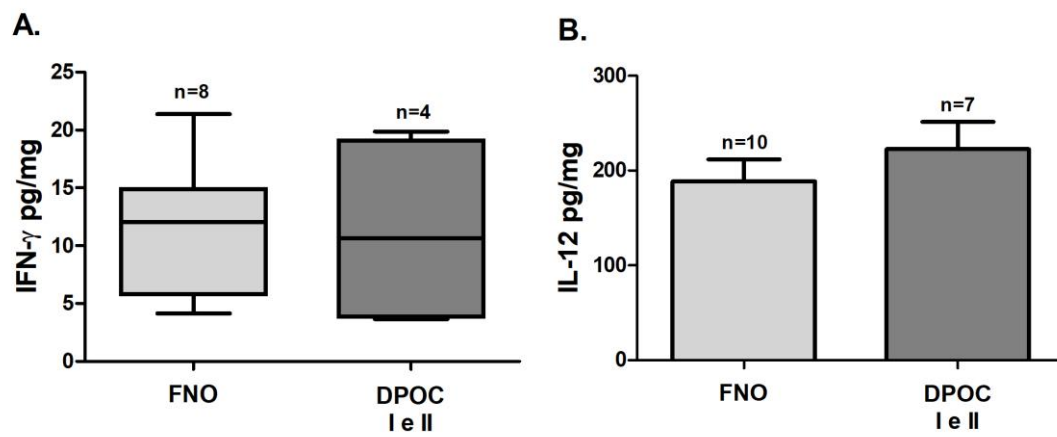


Figura 6 – Citocinas envolvidas na resposta Th1 em amostras de tecido pulmonar. Não houve diferença estatística entre os grupos para as citocinas avaliadas. Dados expressos como média \pm DP em (B), e como mediana e interquartis em (A).

5.2.2 Análise da resposta Th1 sistêmica

A expressão dos fatores de transcrição da resposta Th1 sistêmica foi avaliada nos leucócitos totais do sangue. Foi encontrado o aumento da expressão gênica de STAT1 no grupo DPOC III e IV comparado aos demais grupos (Figura 7A), juntamente ao aumento da expressão gênica de T-bet no grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II (Figura 7B). A análise da expressão da proteína STAT1 através da técnica de *Imunoblotting* apresentou marcação positiva somente em três amostras nos grupos FNO e DPOC III e IV (Figura 7C). Dessa forma, não houve diferença entre os grupos ao avaliar a expressão das proteínas STAT1 total e fosforilada (Figura 7C e 7D), e entre a relação pSTAT1/STAT1 (Figura 7E). Também não foi observada diferença entre os grupos na expressão de IL-12 no plasma sanguíneo (Figura 8).

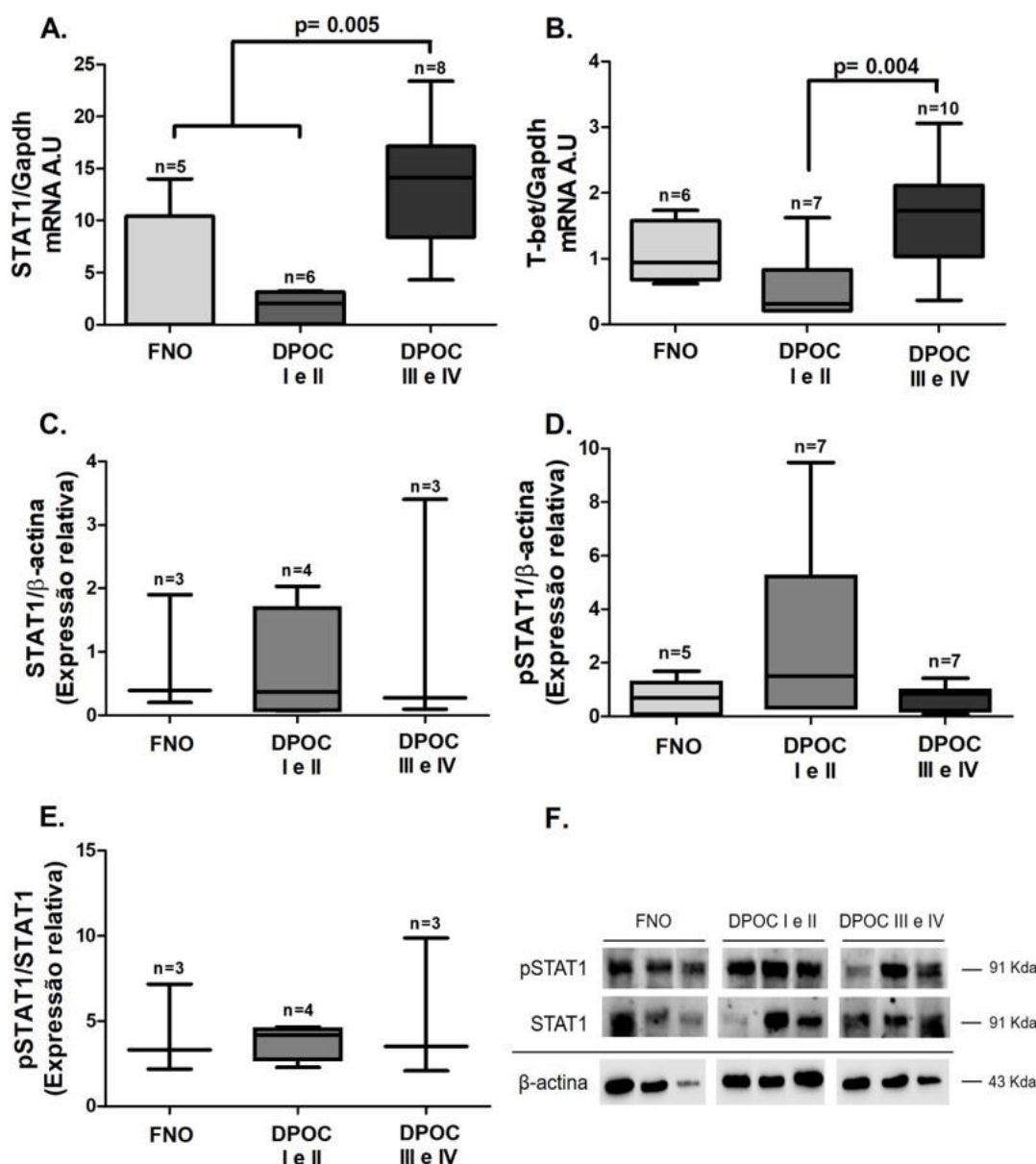


Figura 7 - Fatores de transcrição para resposta Th1 em amostras de leucócitos do sangue. (A) Aumento da expressão gênica de STAT1 ($p=0,005$) no grupo DPOC III e IV comparado aos demais grupos. (B) Aumento da expressão gênica de T-bet no grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II. Não houve diferença entre os grupos em (C), (D) e (E). (F) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de pSTAT1 e STAT1 normalizadas com β -actina. Dados expressos como mediana e interquartil em todas as análises.

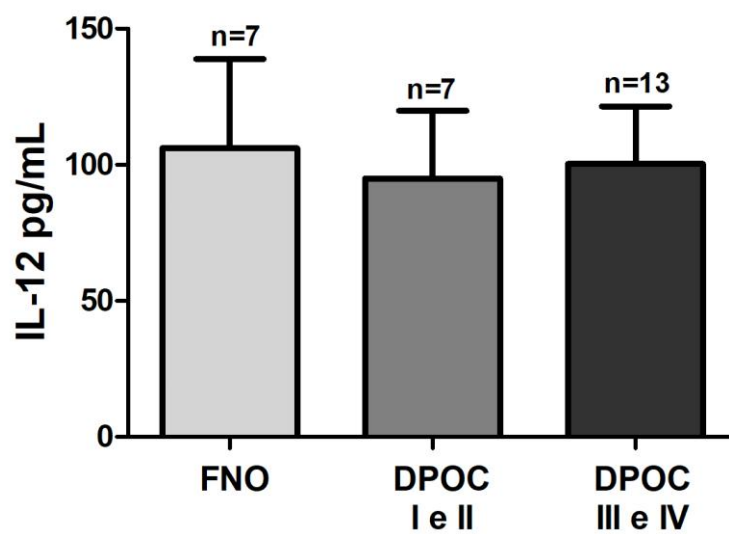


Figura 8 - Expressão de IL-12 no plasma sanguíneo. Não houve diferença estatística entre os grupos para a expressão de IL-12 no plasma sanguíneo. Dados expressos como média \pm DP.

5.3 Análise da resposta Th17

5.3.1 Análise da resposta Th17 local

A avaliação dos fatores de transcrição para resposta Th17 nas amostras de tecido pulmonar demonstrou aumento da expressão gênica de STAT3 e de ROR γ t (Figura 9A e 9B) nos pacientes com DPOC I e II comparados aos fumantes não obstrutivos (FNO). Entretanto não observamos diferença entre os grupos ao quantificar a expressão das proteínas STAT3 e pSTAT3, bem como a relação entre elas (Figura 9C, 9D e 9E, respectivamente).

Ao avaliar as citocinas envolvidas na resposta Th17, observamos aumento tanto da expressão gênica quanto para os níveis de IL-6 no tecido pulmonar (Figura 10A e 10C) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO, porém não observamos diferença para a expressão e níveis de IL-17 nas amostras avaliadas (Figura 10B e 10D).

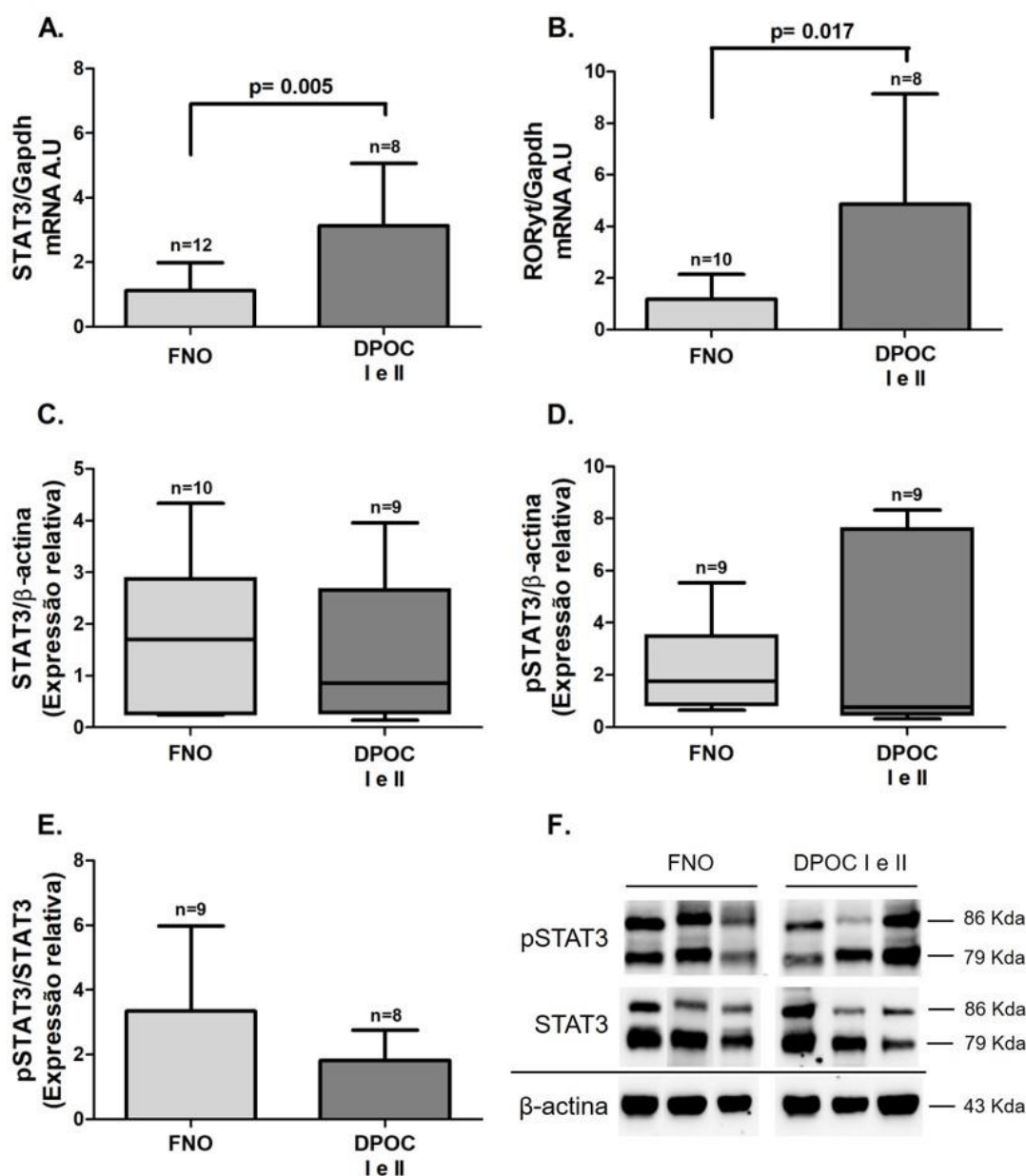


Figura 9 - Fatores de transcrição para resposta Th17 em amostras de tecido pulmonar. (A) Aumento da expressão gênica de STAT3 ($p=0,005$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. (B) Aumento da expressão gênica de ROR γ t ($p=0,017$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos em (C), (D) e (E). (F) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de pSTAT3 e STAT3 normalizadas com β -actina. Dados expressos como média \pm DP em (A), (B) e (E), e como mediana e interquartis em (C) e (D).

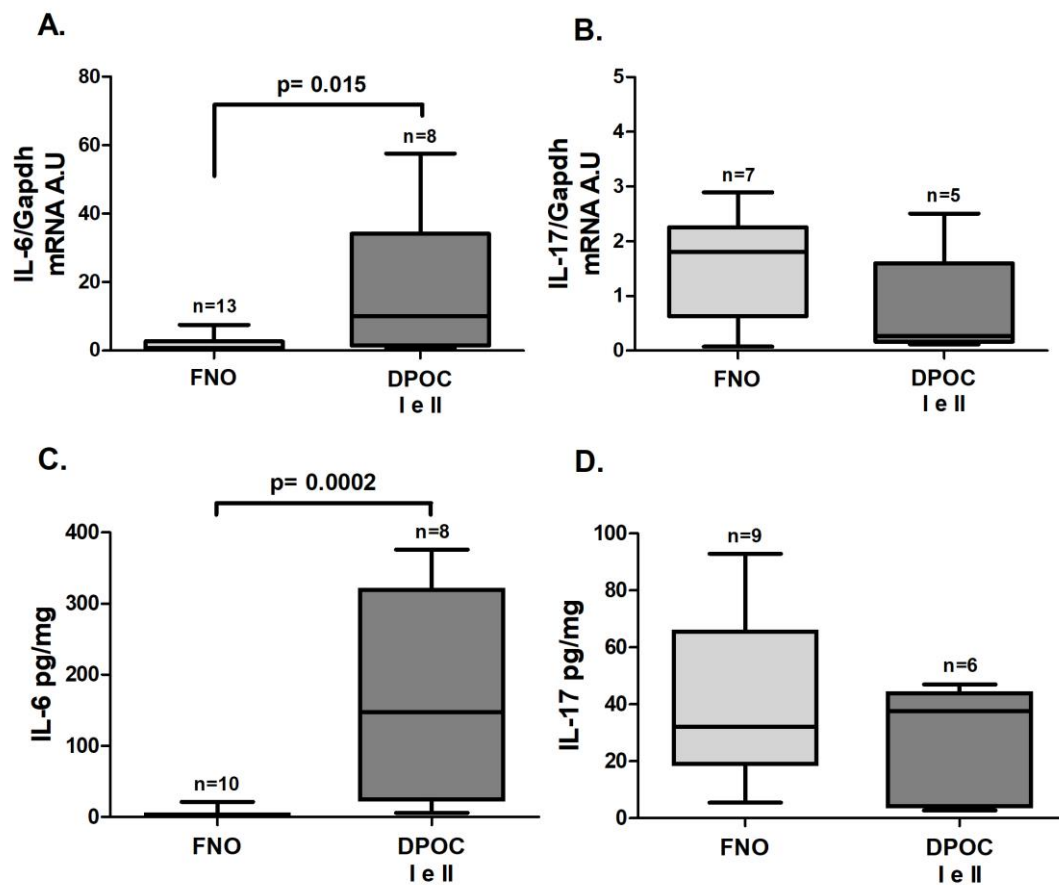


Figura 10 - Citocinas envolvidas na resposta Th17 em amostras de tecido pulmonar. (A) Aumento da expressão gênica ($p=0,015$) e (C) nos níveis de IL-6 ($p=0,0002$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos em (B) e (D). Dados apresentados como mediana e interquartis.

5.3.2 Análise da resposta Th17 sistêmica

A expressão dos fatores de transcrição da resposta Th17 foi avaliada nos leucócitos do sangue. Foi observado o aumento da expressão gênica para STAT3 somente nas amostras de pacientes com DPOC em estágios mais avançados (grupo DPOC III e IV) comparado aos demais grupos (Figura 11A). Também foi observado o aumento da expressão gênica de ROR γ t (Figura 11B) e da proteína STAT3 total (Figura 11C) nos pacientes com DPOC III e IV somente quando comparado aos com DPOC I e II. No entanto, não foram observadas diferenças quanto à expressão da proteína fosforilada pSTAT3, e da relação pSTAT3/STAT3 (Figura 11D e 11E, respectivamente).

A avaliação das citocinas presentes na resposta Th17 revelou o aumento da expressão gênica de IL-6 nos leucócitos sanguíneos somente no grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II (Figura 12A). Entretanto, foi observado o aumento dos níveis de IL-6 no plasma sanguíneo nos pacientes com DPOC I e II comparado aos fumantes sem obstrução (Figura 12C). Não foi observada diferença entre os grupos para a avaliação da expressão de IL-17 no plasma sanguíneo (Figura 12D), e devido a níveis baixos de expressão, foi possível detectar a expressão gênica de IL-17 somente em poucas amostras de leucócitos do sangue (Figura 12C).

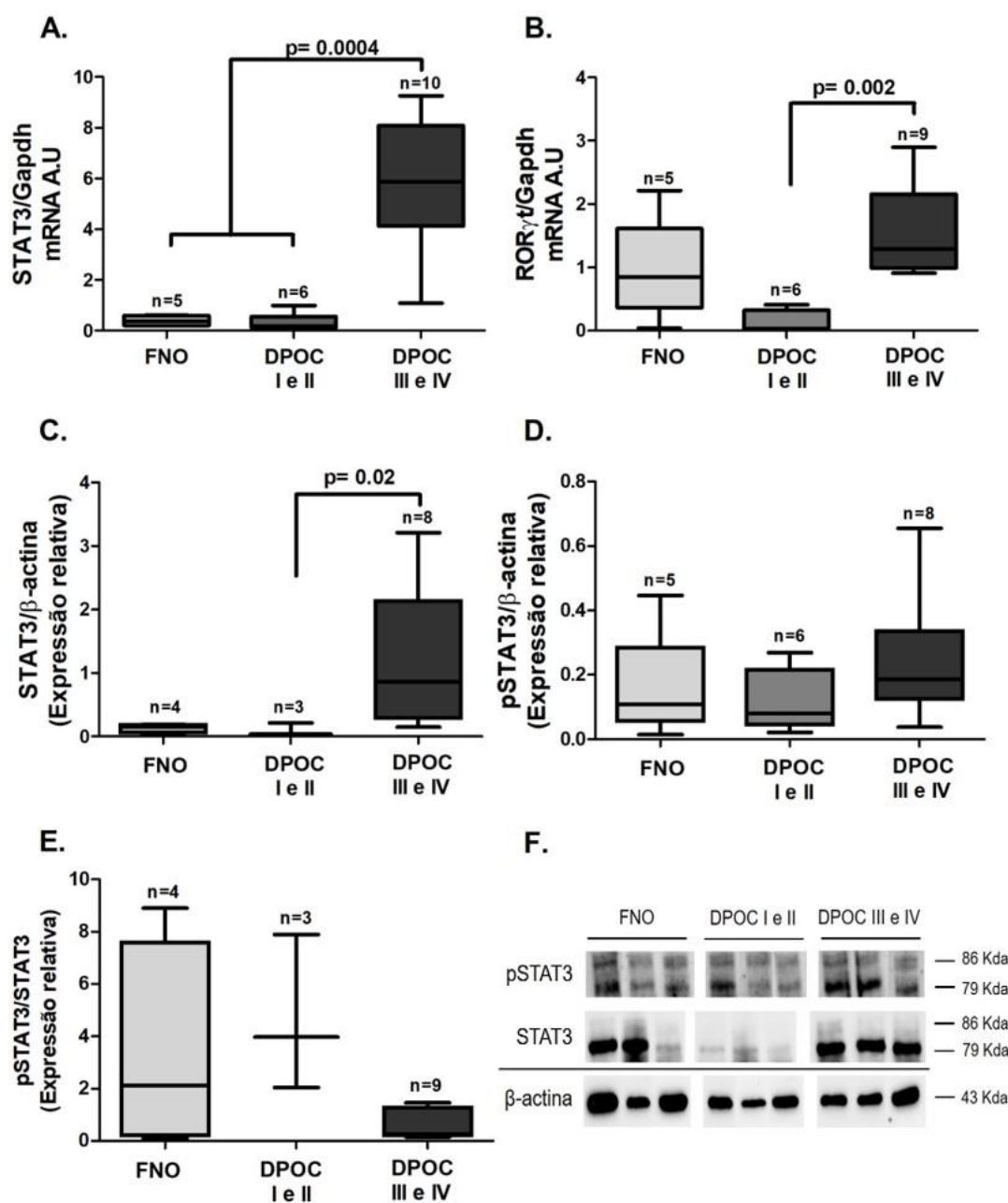


Figura 11 - Fatores de transcrição para resposta Th17 em amostras de leucócitos do sangue. (A) Aumento da expressão gênica de STAT3 ($p=0,0004$) no grupo DPOC III e IV comparado aos demais grupos; (B) Aumento da expressão gênica de ROR γ t ($p=0,002$) e (C) da expressão de proteína STAT3 ($p=0,02$) no grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II. Não houve diferença entre os grupos em (D) e (E). (F) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de pSTAT3 e STAT3 normalizadas com β -actina. Dados expressos como mediana e interquartil em todas as análises.

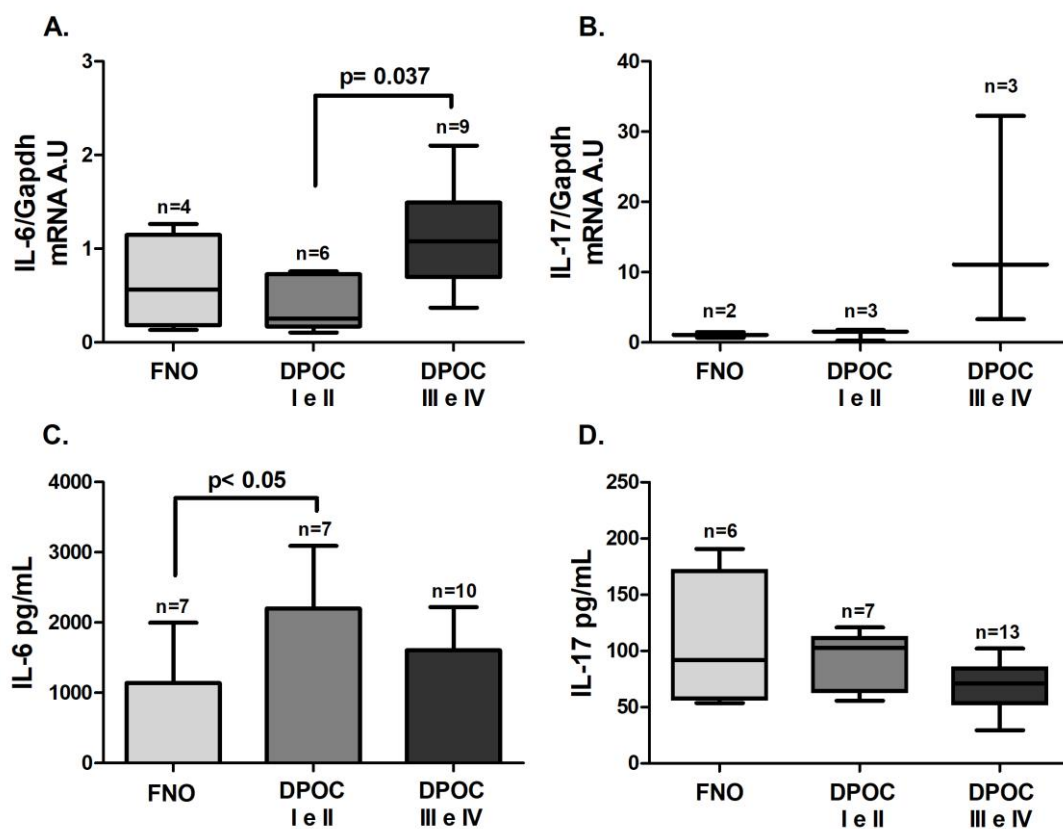


Figura 12 - Citocinas envolvidas na resposta Th17 em amostras de leucócitos e plasma sanguíneo. (A) Aumento da expressão gênica de IL-6 ($p = 0,037$) nos leucócitos sanguíneos do grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II; (C) Aumento dos níveis de IL-6 no plasma sanguíneo do grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos em (B) e (D). Dados expressos como média \pm DP em (C) e como mediana e interquartis em (A), (B) e (D).

5.4 Análise da resposta Treg

5.4.1 Análise da resposta Treg local

A avaliação dos fatores de transcrição da resposta Treg em amostras de tecido pulmonar demonstrou que embora haja o aumento da expressão gênica de Foxp3 no grupo DPOC I e II (Figura 13B), houve diminuição da expressão da proteína fosforilada pSTAT5 (Figura 13D), assim como da razão pSTAT5/STAT5 (Figura 13E) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não foi observada diferença entre os grupos para as avaliações de expressão gênica e de proteína total de STAT5 (Figura 13A e 13C, respectivamente).

Ao avaliar as citocinas envolvidas na resposta Treg nas amostras de tecido pulmonar, observamos apenas o aumento da expressão gênica de TGF- β (Figura 14A) em pacientes com DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos ao avaliar a expressão gênica de IL-10 (Figura 14B) e os níveis de TGF- β e IL-10 (Figura 14C e 14D, respectivamente).

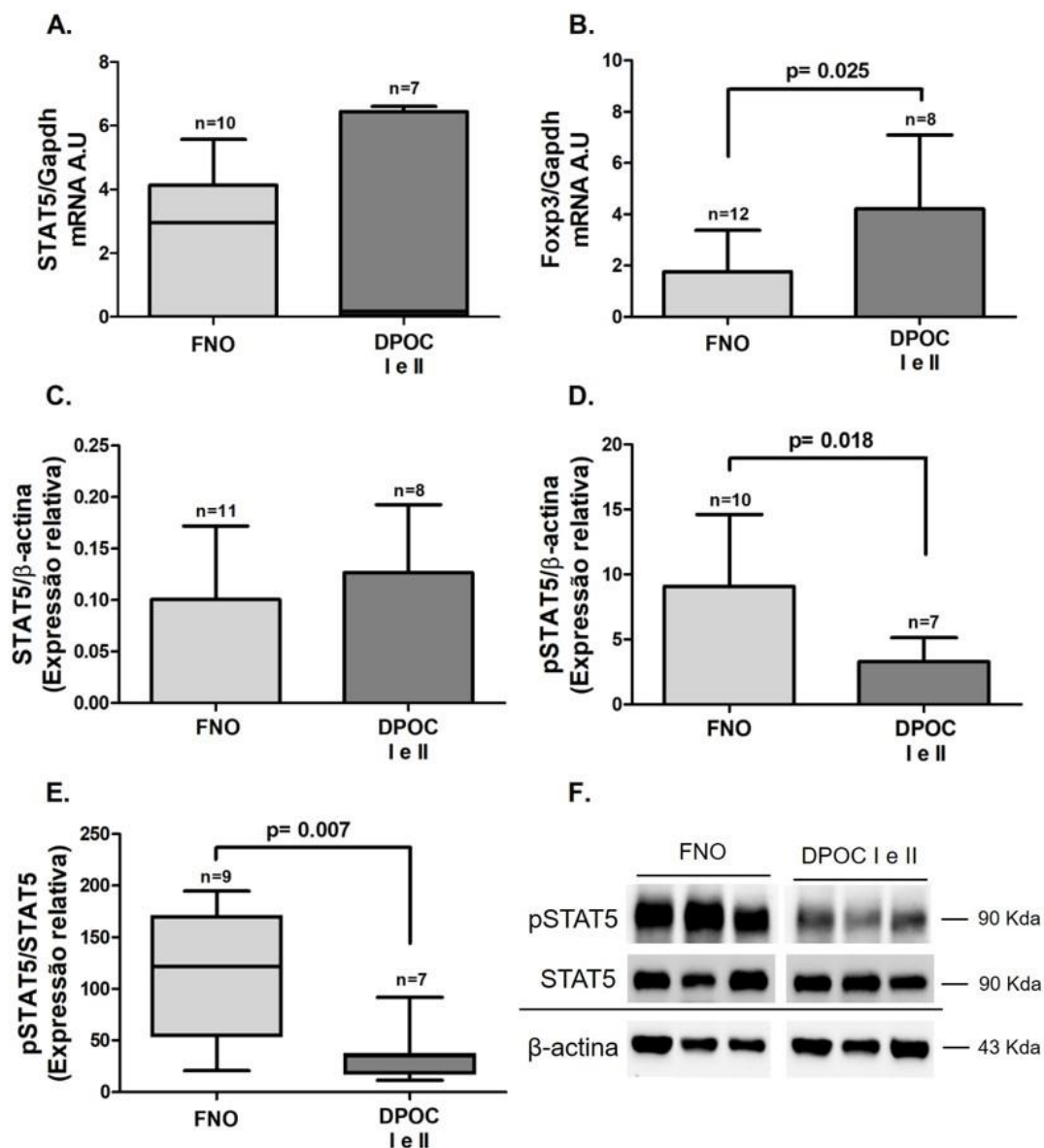


Figura 13 - Fatores de transcrição para resposta Treg em amostras de tecido pulmonar. (B) Aumento da expressão gênica de Foxp3 ($p= 0,025$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO; (D) Diminuição da expressão da proteína pSTAT5 ($p= 0,018$) e (E) da relação entre a expressão de pSTAT5/STAT5 ($p= 0,007$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos em (A) e (C). (F) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de pSTAT5 e STAT5 normalizadas com β -actina. Dados expressos como média \pm DP em (B), (C) e (D), e mediana e interquartis em (A) e (E).

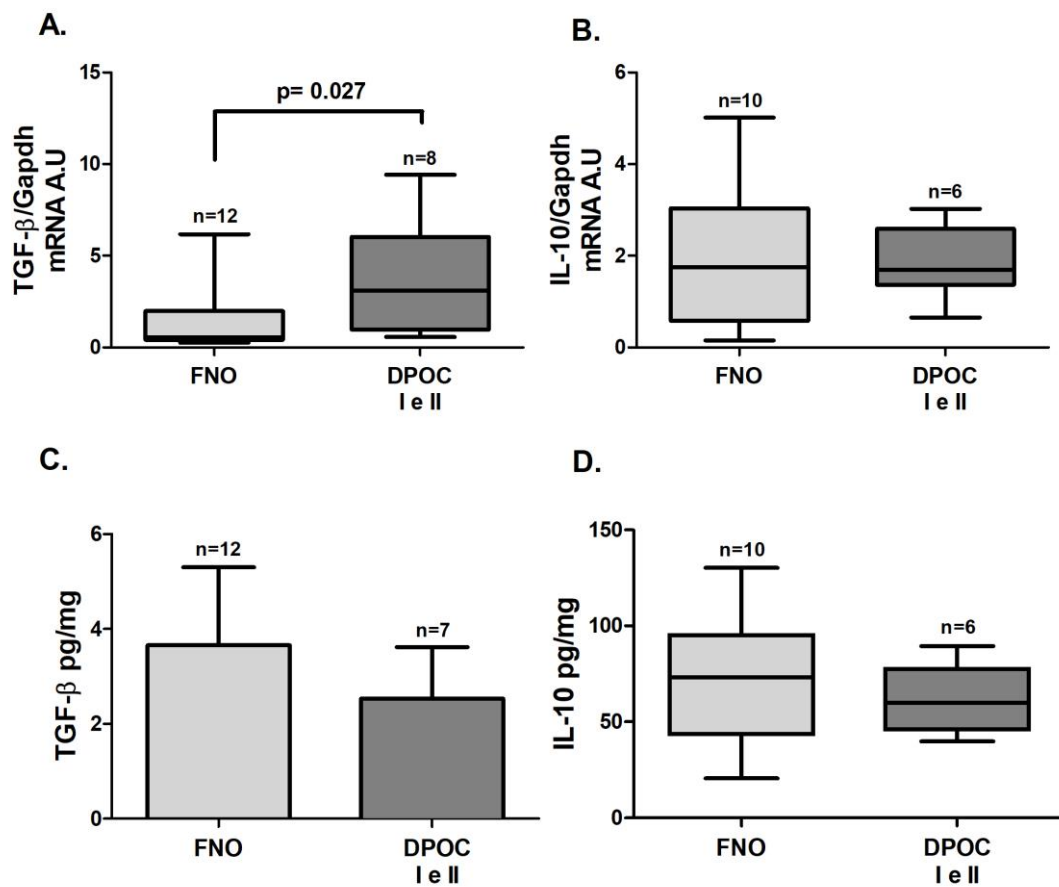


Figura 14 - Citocinas envolvidas na resposta Treg em amostras de tecido pulmonar. (A) Aumento da expressão gênica de TGF- β ($p=0,027$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos em (B), (C) e (D). Dados expressos como média \pm DP em (C) e como mediana e interquartis em (A), (B) e (D).

5.4.2 Análise da resposta Treg sistêmica

A expressão dos fatores de transcrição da resposta Treg foi avaliada nos leucócitos totais do sangue. Foi observado aumento da expressão gênica de STAT5 (Figura 15A) nas amostras de pacientes com DPOC III e IV comparado aos demais, embora haja diminuição da expressão de Foxp3 (Figura 15B) nas amostras de pacientes com DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não foi observada diferença entre os grupos ao avaliar a expressão das proteínas STAT5 e pSTAT5, assim como a relação entre elas (Figuras 15C, 15D e 15E, respectivamente).

Apesar de observarmos aumento da expressão gênica de TGF- β nos leucócitos do sangue, além do aumento dessa mesma citocina no plasma sanguíneo de pacientes com DPOC III e IV comparado aos com DPOC I e II (Figura 16A e 16C, respectivamente), houve uma diminuição dos níveis de IL-10 no plasma sanguíneo do grupo DPOC III e IV comparado ao DPOC I e II (Figura 16D). Não houve diferença entre os grupos para a avaliação da expressão gênica de IL-10 (Figura 16B).

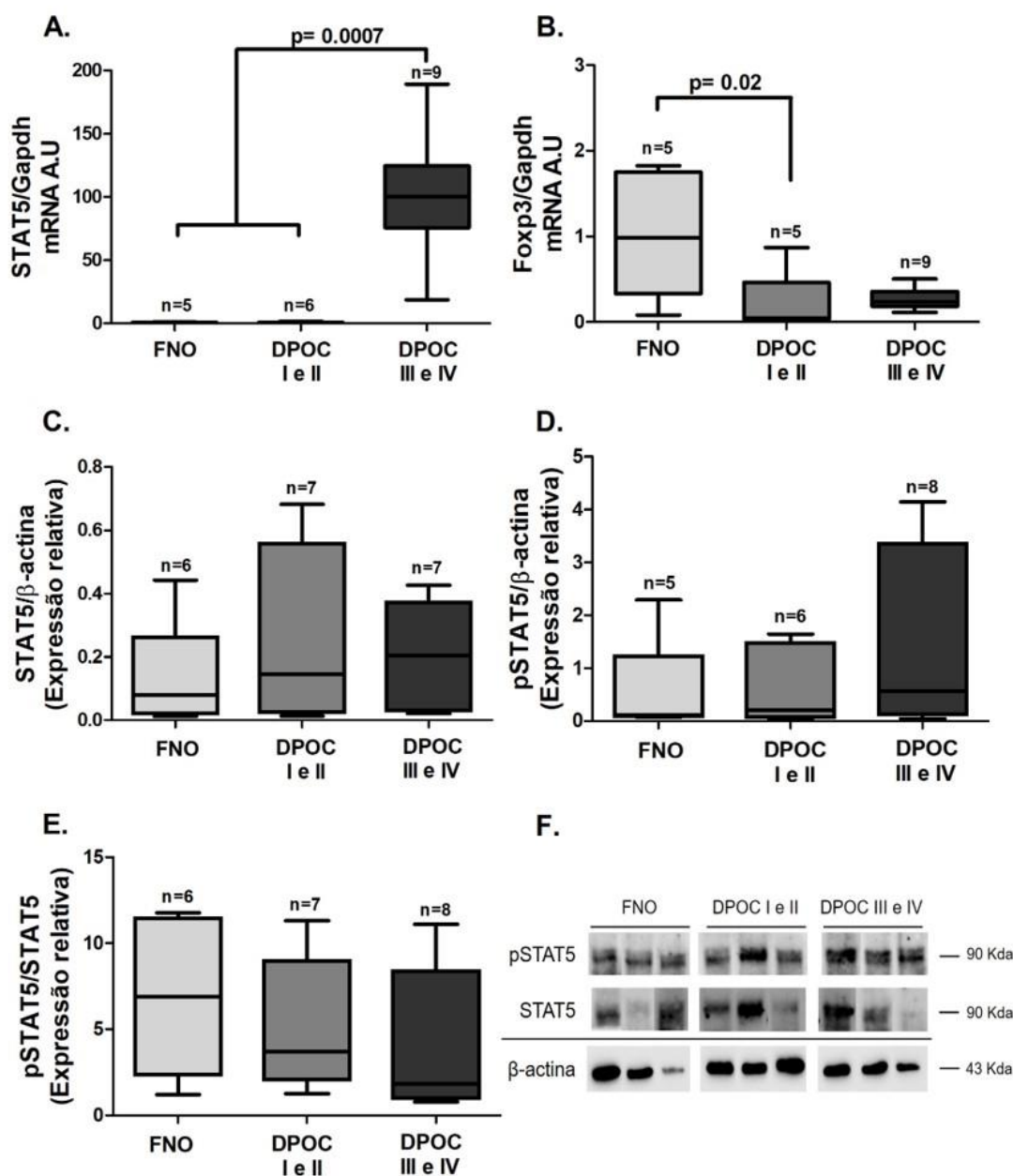


Figura 15 - Fatores de transcrição para resposta Treg em amostras de leucócitos do sangue. (A) Aumento da expressão gênica de STAT5 ($p=0,0007$) no grupo DPOC III e IV comparado aos demais; (B) Diminuição da expressão gênica de Foxp3 ($p=0,02$) no grupo DPOC I e II comparado ao grupo FNO. Não houve diferença entre os grupos em (C), (D) e (E). (F) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de pSTAT5 e STAT5 normalizadas com β -actina. Dados expressos como mediana e interquartis em todas as análises.

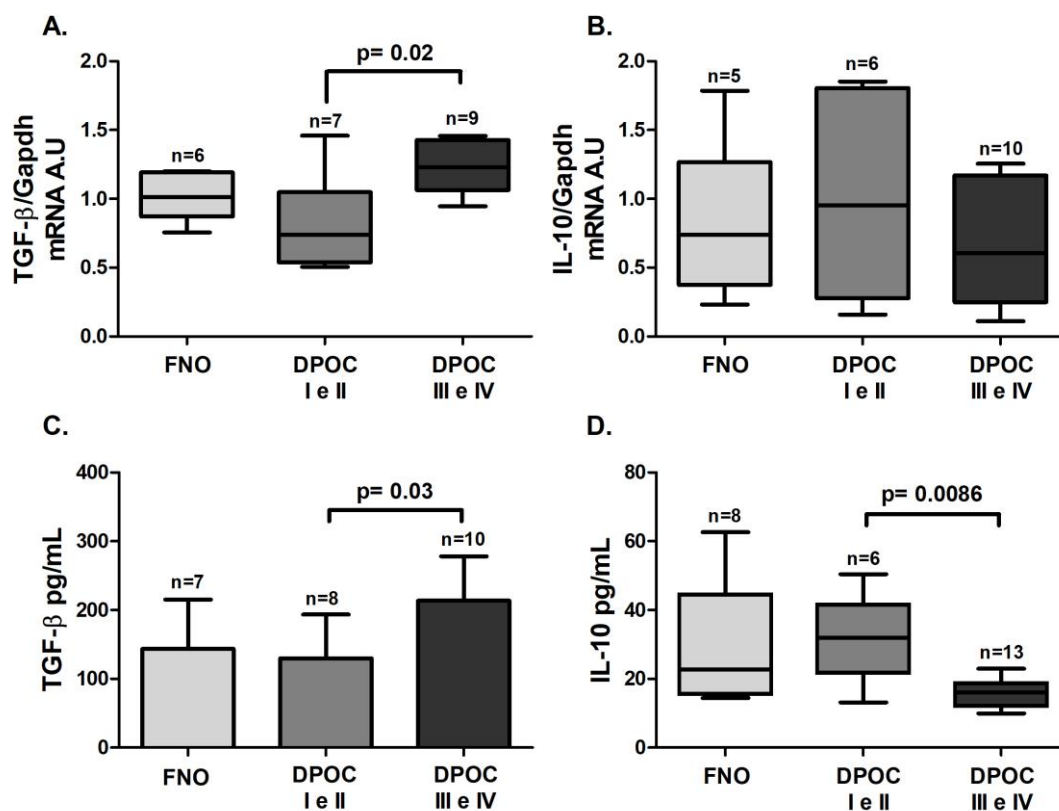


Figura 16 - Citocinas envolvidas na resposta Treg em amostras de leucócitos e plasma sanguíneo. (A) aumento da expressão gênica de TGF- β ($p= 0,02$) nos leucócitos do sangue e (C) dos níveis de TGF- β no plasma sanguíneo ($p= 0,03$) no grupo DPOC III e IV comparado ao DPOC I e II; (D) Diminuição dos níveis de IL-10 ($p= 0,0086$) no plasma sanguíneo do grupo DPOC III e IV comparado ao grupo DPOC I e II. Não houve diferença entre os grupos em (B). Dados expressos como média \pm DP em (C) e como mediana e interquartis em (A), (B) e (D).

5.5 Análise da expressão local das proteínas SOCS

Ao avaliar a expressão das proteínas SOCS nas amostras de tecido pulmonar, observamos somente o aumento da expressão gênica de SOCS3 (Figura 17B) nos pacientes com DPOC I e II comparado aos fumantes não obstrutivos. Não foi observada diferença na expressão gênica e de proteínas SOCS1 (Figuras 17A e 17C, respectivamente), e na expressão de proteínas SOCS3 (Figura 17D).

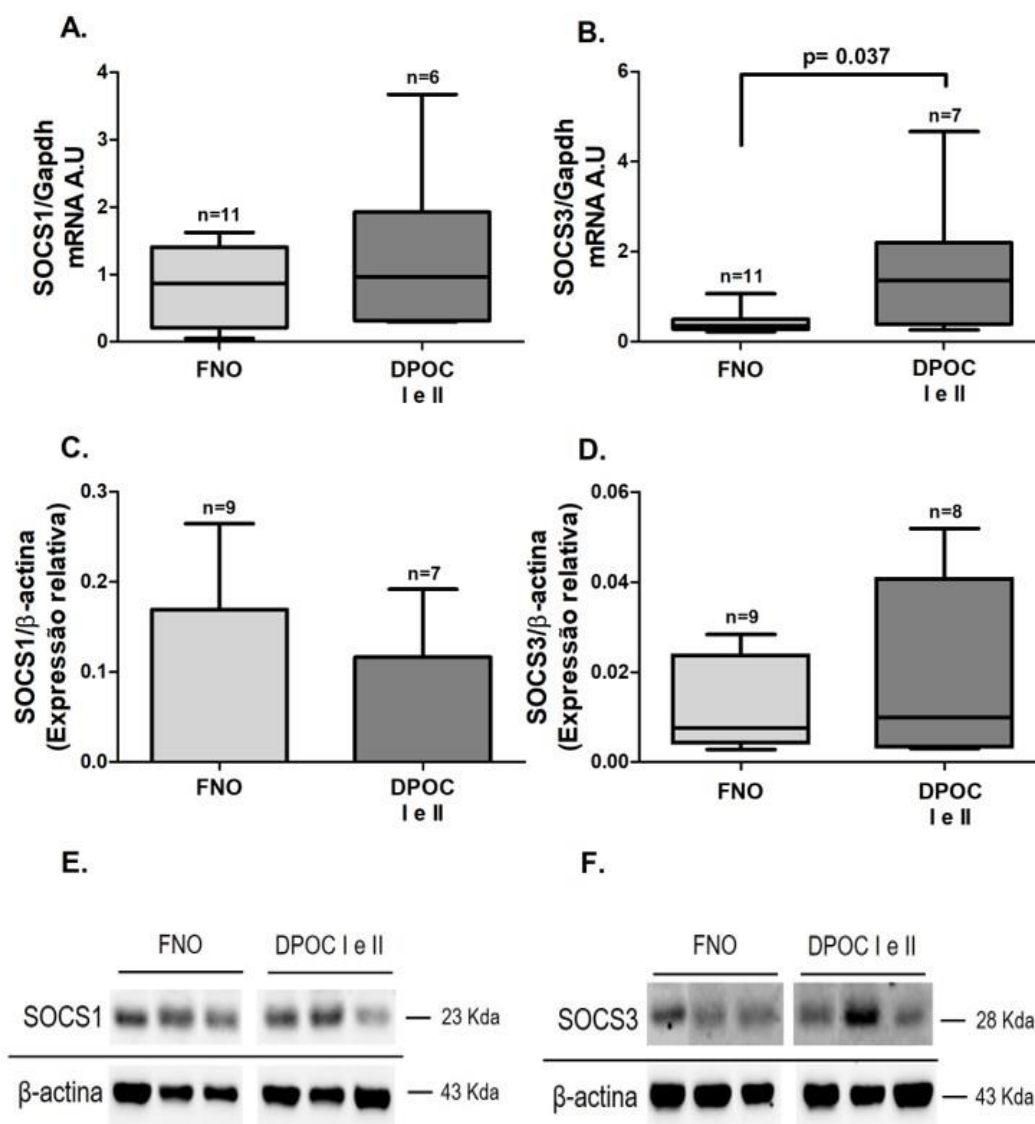


Figura 17 – Expressão das proteínas SOCS nas amostras de tecido pulmonar. (B) Aumento d expressão gênica de SOCS3 ($p= 0,037$) no grupo DPOC I e II comparado ao FNO. Não houve diferença entre os grupos em (A), (C) e (D). (E) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de SOCS1 e (F) SOCS3 normalizadas com β -actina. Dados expressos como média \pm DP em (C) e como mediana e interquartis em (A), (B) e (D).

5.6 Análise da expressão sistêmica das proteínas SOCS

A avaliação da expressão das proteínas SOCS nas amostras de leucócitos totais do sangue demonstrou somente o aumento da expressão gênica de SOCS3 (Figura 18B) nos pacientes com DPOC III e IV comparado aos demais grupos. Além de não ser observada diferença na expressão gênica de SOCS1 (Figura 18A), a análise da expressão dessa proteína através da técnica de *Imunoblotting* apresentou marcação positiva somente em duas amostras (Figura 18C). Não foi observada diferença entre os grupos para a expressão de proteína SOCS3, e dentro do grupo FNO, somente duas amostras apresentaram marcação positiva para essa proteína (Figura 18D).

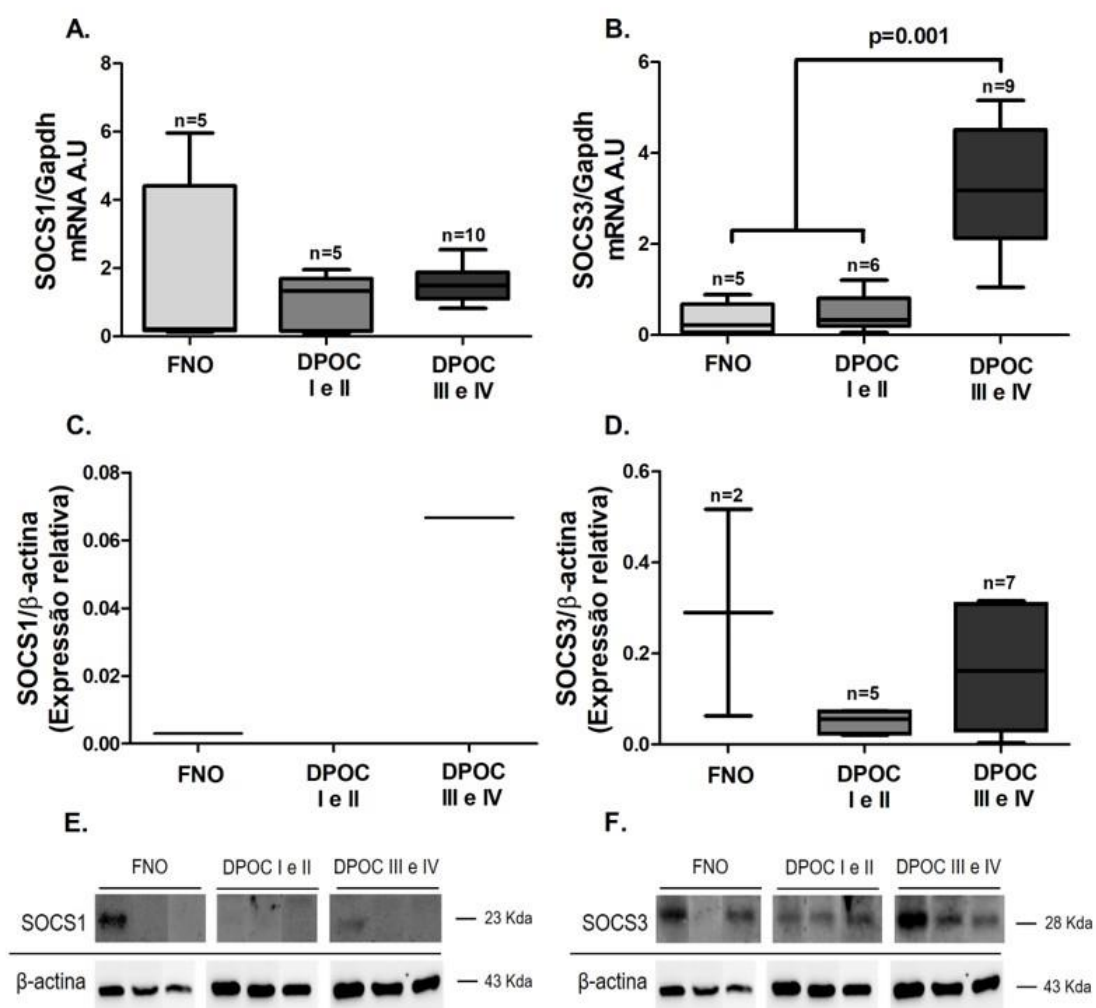


Figura 18 - Expressão das proteínas SOCS nas amostras de leucócitos do sangue. (B) Aumento da expressão gênica de SOCS3 ($p= 0,001$) no grupo DPOC III e IV comparado aos demais grupos. Não houve diferença entre os grupos em (A), (C) e (D). (E) Imagem ilustrativa da análise densitométrica dos níveis de SOCS1 e (F) SOCS3 normalizadas com β -actina. Dados expressos como mediana e interquartis em todas as análises.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos diferenças na expressão das proteínas STAT e SOCS entre as respostas local e sistêmica. Enquanto em amostras de tecido pulmonar foi observado aumento na sinalização intracelular para Th1 e Th17 desde os estágios iniciais da DPOC, na resposta sistêmica essas alterações foram observadas nos estágios mais graves. Por outro lado, a sinalização intracelular para a resposta Treg parece variar dependendo do compartimento analisado.

Ao avaliarmos o perfil dos pacientes incluídos no estudo, observamos que os indivíduos com DPOC estágios I e II e os com DPOC estágios III e IV, possuem valores menores de VEF₁ e VEF₁/CVF, tanto antes quanto após a administração de broncodilatador quando comparados ao grupo FNO. Observamos também que não há diferença entre os grupos com relação à carga tabágica e idade, demonstrando que estes não são fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença nesta amostra estudada.

Para facilitar o entendimento dos dados, a discussão será subdividida em tópicos, de forma que a comparação entre a resposta local e sistêmica para as respostas Th1, Th17 e Treg seja melhor explorada.

Sinalização para resposta Th1

Antes dos estudos que demonstraram a importância das células Th17 na perpetuação do processo inflamatório na DPOC, o papel das células do tipo Th1 foi extensamente descrito como fundamental para a perpetuação da inflamação na doença (41,51). As análises referentes à resposta do tipo Th1 no tecido pulmonar demonstraram somente um aumento da expressão gênica de STAT1 no grupo DPOC I e II comparado ao FNO. Enquanto nos leucócitos totais do sangue, foi observado o aumento da expressão gênica de STAT1 no grupo DPOC III e IV comparado aos demais, e de T-bet no grupo DPOC III e IV quando comparados aos pacientes com DPOC I e II. No entanto, não foram observadas

alterações na expressão das proteínas STAT1 total e fosforilada nas amostras de tecido pulmonar e nas de leucócitos do sangue.

Divergências quanto a expressão de STAT1 em diferentes compartimentos e mediante o uso de diferentes técnicas já foram demonstradas. O aumento da proteína fosforilada de STAT1 foi observado em tecido de pacientes com DPOC em estágios III e IV comparado a pacientes não fumantes, somente quando avaliado por western blotting e não por imuno-histoquímica (40). Em contrapartida, Di Stefano e colaboradores (52) demonstraram o aumento de células positivas para STAT1 no epitélio brônquico de pacientes com DPOC III e IV, enquanto na submucosa brônquica esse aumento foi detectado desde os estágios I e II da DPOC, acompanhado do aumento de pSTAT1 no grupo com DPOC III e IV. Em estudo anterior do mesmo grupo de pesquisadores, o fator de transcrição T-bet foi avaliado na submucosa brônquica e em linfócitos do lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC leve e moderada, e em ambos os casos não foram observadas diferenças ao comparar com os pacientes controles (41). Nossos dados reforçam as diferenças observadas na expressão de STAT1 avaliada por diferentes técnicas, além da diferença de expressão entre compartimentos e estágios da doença. Adicionalmente, demonstramos pela primeira vez o aumento da expressão de STAT1 e T-bet nos leucócitos do sangue de pacientes com DPOC grave e muito grave.

Apesar do aumento da expressão gênica para os fatores de transcrição da resposta Th1, não observamos alteração nos níveis de IL-12 e IFN- γ , tanto na resposta local quanto sistêmica. Em amostras de tecido pulmonar, já foi observado o aumento IFN- γ na submucosa brônquica de pacientes com DPOC leve e moderada comparado aos indivíduos não fumantes (41). Enquanto Vinterberga e colaboradores (53) analisaram citocinas pró e anti-inflamatórias em fragmentos de pulmão de pacientes com DPOC e não observaram diferença na densidade de células positivas para IL-12 nos compartimentos avaliados, corroborando com os nossos achados. Estudos avaliando citocinas de resposta Th1 em sangue de pacientes com DPOC demonstraram aumento de IFN- γ em indivíduos com DPOC exacerbada comparado aos pacientes com a doença estável (54), e aumento da frequência de células Th1 que expressam IFN- γ ,

acompanhado do aumento de IL-12 em pacientes com DPOC estável comparado aos fumantes saudáveis e nunca fumantes (51). As diferenças observadas entre esses estudos e os nossos dados em relação à expressão de citocinas no tecido e sangue de pacientes com DPOC, podem acontecer devido à diferentes técnicas utilizadas e ao número de amostras analisadas.

Sinalização para resposta Th17

O aumento na sinalização intracelular para diferenciação em Th17, mediado por fatores de transcrição como STAT3 e ROR γ t, foi observado tanto em amostras de tecido pulmonar quanto em leucócitos de pacientes com DPOC, quando avaliamos a expressão gênica para esses fatores. Nas amostras de tecido pulmonar, essas alterações puderam ser observadas em estágios leve e moderado (DPOC I e II) em comparação aos pacientes fumantes sem obstrução (FNO), enquanto a avaliação dos leucócitos do sangue demonstrou essas alterações apenas em pacientes com estágios mais graves da DPOC (DPOC III e IV). Adicionalmente, foi observado o aumento da expressão da proteína STAT3 total nos leucócitos do grupo DPOC III e IV quando comparados aos pacientes com DPOC I e II.

O aumento da expressão gênica e proteica de ROR γ t foi observado em estudo conduzido em amostras de tecido de pacientes com DPOC moderada e grave (estágios II e III), submetidos à ressecção pulmonar por carcinoma periférico (55), e corroboram com nossos achados. Yew-Booth e colaboradores (40) avaliaram amostras de tecido obtidas em cirurgia de transplante e demonstraram um aumento na proteína STAT3 fosforilada no grupo DPOC em comparação com fumantes não obstruídos e nunca fumantes. Neste estudo, os pacientes com DPOC encontravam-se nos estágios III e IV, enquanto em nosso estudo as amostras de tecido são de estágios I e II da DPOC, demonstrando que mesmo nos estágios leve e moderado da doença, há um aumento da expressão de STAT3 no tecido pulmonar. Segundo estes autores, o aumento de STAT3 juntamente com os níveis elevados de IL-6 demonstrados tanto em amostras de escarro quanto em amostras de tecidos de pacientes com DPOC em trabalhos

prévios (56,57), reforça a ideia do papel da IL-6 na ativação da STAT3 e corrobora com os nossos achados.

Em nosso estudo foi observado o aumento tanto da expressão gênica quanto dos níveis de IL-6 em amostras de pulmão em estágios leve e moderado da DPOC. No entanto, detectamos aumento da expressão gênica nos leucócitos somente no grupo de pacientes em estágios grave e muito grave, enquanto os níveis de IL-6 avaliados pela técnica de ELISA se apresentam aumentados nos pacientes com DPOC I e II.

A IL-6 se apresenta constantemente aumentada na circulação sanguínea de pacientes com DPOC, principalmente durante exacerbações, porém sem correlação com os níveis da doença (58,59). Os seus efeitos ainda não são claros, porém, podem estar relacionados com o enfraquecimento do músculo esquelético (17). Silva e colaboradores (50) demonstraram o aumento nos níveis de IL-6 no plasma sanguíneo de pacientes com DPOC estágio III quando comparado aos pacientes em estágio I e II, enquanto Wang e colaboradores (22) demonstraram o aumento de IL-6, IL-17A e da expressão de ROR γ t no sangue de pacientes com DPOC moderada e grave.

Em relação à IL-17A, não observamos aumento da expressão gênica e dos níveis desta interleucina em nossas amostras. No entanto, o aumento da expressão gênica para ROR γ t foi compatível com o aumento dos níveis de IL-6, confirmando a diferenciação para resposta Th17. Di Stefano e colaboradores (23) avaliaram as citocinas relacionadas a resposta Th17 (IL-17A, IL-22 e IL-23) em biópsias brônquicas de pacientes com DPOC estável, utilizando imunohistoquímica e/ou RT-qPCR. Embora a IL-17A seja considerada a principal citocina efetora das células Th17, o aumento de células positivas para IL-17 foi detectado somente na submucosa brônquica dos indivíduos com DPOC e dos fumantes saudáveis. Os autores não demonstraram diferença significativa de células positivas para IL-17A no epitélio brônquico e na expressão gênica dessa interleucina entre fumantes com ou sem DPOC ou entre DPOC de diferentes estágios (23). Considerando que a produção de IL-17A está ligada a células estruturais, como as células endoteliais (15), acreditamos que seja mais fácil detectar esse aumento da expressão de IL-17 por meio de técnicas que avaliam

compartimentos pulmonares específicos, e não em homogenato de tecido pulmonar.

Sinalização para resposta Treg

A avaliação dos marcadores para diferenciação em Treg demonstrou que embora tenha havido um aumento na expressão gênica de STAT5 em leucócitos de pacientes com DPOC III e IV, a expressão de Foxp3 foi reduzida nos grupos DPOC I e II. Essas alterações corroboraram com a diminuição dos níveis de IL-10 no grupo DPOC III e IV. Entretanto, em amostras de tecido pulmonar, embora tenha havido diminuição da expressão de pSTAT5 e da razão pSTAT5/STAT5, observamos um aumento na expressão gênica de Foxp3 nos grupos DPOC I e II, sem diferenças nos níveis de IL-10. Diferentemente do observado em nossas amostras, um estudo conduzido em amostras de tecido de pacientes com DPOC grave e muito grave, não encontrou diferença na expressão de pSTAT5 comparado aos grupos controles, tanto pela técnica de western blotting quanto de imuno-histoquímica (40). No entanto, a diferença na expressão de Foxp3 entre os diferentes compartimentos já foi abordada em estudo anterior realizado em nosso grupo de pesquisa (31), onde foi demonstrada a diminuição nas células Foxp3⁺ nas pequenas vias aéreas de pacientes com DPOC em comparação ao grupo controle, enquanto a avaliação no tecido linfóide demonstrou um aumento nas células Foxp3⁺ em fumantes não obstrutivos e no grupo com DPOC. Apesar do aumento de células Foxp3⁺ nos tecidos linfóides, os autores não observaram diferença na densidade de células IL-10⁺, o que só pôde ser observado em pequenas e grandes vias aéreas de pacientes com DPOC em comparação aos fumantes não obstrutivos.

Novamente demonstramos diferenças entre as respostas local e sistêmica, considerando que verificamos a diminuição dos níveis de IL-10 apenas no plasma de pacientes em estágios graves, sugerindo uma falha na atividade de Treg. Estudos demonstraram níveis diminuídos de IL-10 no plasma sanguíneo de pacientes com DPOC estágio III em comparação aos com DPOC estágios I e II (50) e em pacientes com DPOC estágios II e III, que também

apresentaram menor quantidade de RNAm para Foxp3, comparados aos fumantes não obstruídos (22). Um estudo recente avaliou a expressão de células Treg em biópsias de tecido brônquico e no sangue de pacientes com DPOC. Os autores demonstraram diminuição das células Treg no epitélio brônquico de pacientes com DPOC grave e muito grave, em comparação aos com DPOC leve e moderada e fumantes saudáveis, sugerindo que a DPOC grave é diagnosticada em pacientes com níveis menores de células Treg no sangue e trato respiratório, corroborando com nossos achados (60).

Ademais, o TGF- β é considerado como uma citocina chave na diferenciação de células TCD4+ em Th17 ou Treg. Foi demonstrado que o TGF- β induz a expressão de Foxp3 em células TCD4+ *naive*, convertendo-as em células Treg (61) e também que a IL-6 juntamente com TGF- β induz a diferenciação para Th17 e inibe a diferenciação de Treg induzida por TGF- β (62). Além da função imunomoduladora, o TGF- β tem atividade fibrogênica e seu aumento pode resultar em fibrose das vias aéreas e contribuir para a limitação do fluxo aéreo em doenças das pequenas vias aéreas, como a DPOC (63). O TGF- β 1 pode aumentar a produção de matriz extracelular e a diferenciação de miofibroblastos em fibroblastos pulmonares de indivíduos com DPOC (64), enquanto a inibição da sinalização de TGF- β , tanto em estudos *in vitro* quanto em estudos *in vivo*, pode proteger os pulmões de alterações em sua morfologia, lesões e diminuição da função pulmonar (65,66). Em nosso estudo, o aumento do TGF- β foi observado no tecido pulmonar dos estágios I e II da DPOC e em leucócitos e plasma sanguíneo nos estágios III e IV da DPOC. Esse aumento pode estar relacionado aos níveis aumentados de IL-6 observados, levando à diferenciação de Th17, e ao comprometimento da função pulmonar dos grupos com DPOC, devido à sua atividade fibrogênica.

Expressão das proteínas SOCS

As proteínas SOCS são responsáveis por impedir a ativação das STAT, bloqueando seu recrutamento para o receptor de citocina ou inibindo sua fosforilação pelas JAKs (67). Dessa forma, as SOCS desempenham um papel

essencial na regulação da polarização de células TCD4+ para os seus subtipos, e nas respostas imunológicas por elas mediadas. Em nosso estudo foi observado somente o aumento da expressão gênica de SOCS3 em tecido de pacientes com DPOC I e II, e nos leucócitos de pacientes com DPOC III e IV, sem diferenças para a expressão de SOCS1 em ambos os compartimentos. Estudos demonstram que a SOCS1 pode promover a diferenciação para Th17, regulando a SOCS3 e inibindo a liberação de IFN- γ (67), além de estar relacionada com a integridade e função das células Treg, mantendo a expressão de Foxp3 (68). Em pacientes com DPOC estágio II, foi observado a diminuição da expressão de SOCS1 tanto na mucosa brônquica quanto em macrófagos alveolares do lavado broncoalveolar (69). No entanto, não observamos diferenças quanto à expressão de SOCS1 em nossas amostras. Novamente, essas diferenças podem acontecer devido às técnicas utilizadas, ao número de amostras utilizadas ou ao compartimento avaliado.

O papel da SOCS3 como inibidor de STAT3 e, portanto, das células Th17 é bem estabelecido. No entanto o papel da SOCS3 nas células Treg ainda precisa ser melhor esclarecido (36). Springer e colaboradores (43) demonstraram diminuição da expressão de SOCS3 em biópsias de pacientes com DPOC estágio II comparado a indivíduos controle, diferentemente do nossos achados. No entanto, estudo realizado em tecido nasal de pacientes com rinosinusite crônica, demonstrou uma correlação negativa entre SOCS3 e Foxp3, uma vez que a deleção de SOCS3 aumentou a expressão de Foxp3 nessas amostras, assim como o aumento da expressão de SOCS3 diminuiu os níveis de Foxp3 (70). De forma semelhante, o aumento de SOCS3 observado nas amostras de leucócitos do nosso estudo, pode estar relacionado à diminuição de Foxp3 e consequente falha da resposta Treg. No entanto, Linossi e colaboradores (71) apontam que deve haver precaução ao avaliar e atribuir função a uma proteína SOCS baseado somente em sua indução de RNAm, uma vez que a correlação entre a expressão de RNAm e os níveis de proteína, frequentemente não são claros. Dessa forma, nossos dados reforçam a necessidade de aprofundar os estudos em relação a expressão e participação

das proteínas SOCS na DPOC, principalmente a relação entre a SOCS3 e resposta Treg.

Considerações finais

Nossos resultados demonstram diferenças entre as respostas locais e sistêmicas. O aumento dos marcadores de sinalização intracelular para diferenciação em resposta Th17 nos pacientes em estágios iniciais foi observado somente em amostras de tecido pulmonar, sugerindo que essa diferenciação na resposta sistêmica ocorreu posteriormente. Ainda é incerto se a inflamação sistêmica ocorre como resultado da liberação de mediadores inflamatórios ("*spill over*") dos pulmões onde a inflamação começaria ou se é o resultado de alguma comorbidade que então afeta os pulmões (46,72,73). Embora existam evidências indicando que a doença das vias aéreas está associada a alterações inflamatórias sistêmicas e aumento da inflamação, ainda faltam estudos que confirmem ou refutem a hipótese (74).

É importante pontuar que nosso estudo possui algumas limitações para a comparação entre as respostas locais e sistêmica, como a falta de amostras de tecido pulmonar de indivíduos com DPOC III e IV, e o fato de que os pacientes deste grupo não apresentavam doença neoplásica. Por outro lado, os pacientes também portadores de neoplasia (grupos FNO e DPOC I e II) não foram submetidos a nenhum tratamento sistêmico antes da cirurgia. Além disso, a maioria das citocinas atua nas células próximas à célula de origem (ação parácrina) e, em alguns casos, uma quantidade suficiente das citocinas pode ser produzida para que quantidades significativas entrem na circulação e atuem à distância (ação endócrina) (75). Dessa forma, a avaliação de citocinas circulantes pode ser difícil de correlacionar com as amostras de tecido.

Nossos resultados demonstram um aumento na sinalização intracelular para Th1 e Th17 em amostras de tecido pulmonar desde os estágios iniciais da DPOC, embora somente a diferenciação para Th17 seja confirmada devido ao aumento concomitante de STAT3, ROR γ t e IL-6. Já a sinalização intracelular para a resposta Treg parece variar dependendo do compartimento analisado,

sendo que a falha em sua função, evidenciada pela diminuição de IL-10, é mais evidente em estágios avançados da doença. Adicionalmente, nossos dados sugerem o envolvimento da SOCS3 na falha resposta Treg, porém mais investigações são necessárias.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram diferenças entre as respostas local e sistêmica quanto à expressão das proteínas STAT e SOCS na DPOC. Embora observemos o aumento da sinalização intracelular para as respostas Th1 e Th17 nas amostras de tecido pulmonar, somente a diferenciação para Th17 é confirmada desde os estágios iniciais da DPOC, enquanto na resposta sistêmica essas alterações acontecem nos estágios mais graves. Entretanto, a sinalização intracelular para a resposta Treg parece variar dependendo do compartimento analisado, sendo que a falha em sua função, evidenciada pela diminuição de IL-10, é mais evidente em estágios avançados da doença. Esses dados reforçam a ideia de haver uma falha na produção desta interleucina anti-inflamatória no desenvolvimento e progressão da DPOC. Adicionalmente, nossos dados sugerem o envolvimento da SOCS3 na falha da resposta Treg, porém mais investigações são necessárias.

8. ANEXOS

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DAS PROTEÍNAS SOCS E STATS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ NAIVE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA: COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E SISTÊMICA.

Pesquisador: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57797516.9.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.754.895

Apresentação do Projeto:

De acordo com parecer Número 1.731.09.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar os mecanismos envolvidos na diferenciação das células TCD4+ naive para os diferentes subtipos, em especial as células Th17 e Tregs considerando o papel das SOCS e das STATS nestes eventos em pacientes com DPOC comparando a resposta imune local e sistêmica de indivíduos fumantes portadores da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e fumantes não portadores da DPOC submetidos à cirurgia de retirada de tumor no pulmão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com parecer Número 1.731.09.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com parecer Número 1.731.09.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE apresentado com a inclusão de informações referentes ao período que o material parafinado

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.754.895

será guardado para pesquisas futuras referentes a avaliação de mecanismos envolvidos na resposta imune em pacientes com DPOC, e ainda, da autorização do CEP das Instituições envolvidas na Pesquisa em caso de prorrogação do tempo de armazenamento do material, com a devida justificativa do pesquisador responsável.

Recomendações:

Uma vez que foram sanadas todas as pendências apontadas no TCLE recomendo a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências e com recomendação de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_754791.pdf	19/09/2016 11:04:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/09/2016 11:02:43	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Anexo_CEP_JulianaLourenco_agostode2016.pdf	29/08/2016 15:49:23	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_SOCS_STATS.docx	06/07/2016 17:01:51	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Plataforma_Brasil_LourencoJD.pdf	06/07/2016 16:57:17	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **06/12/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2306/16** intitulado: **“O PAPEL DAS PROTEÍNAS SOCS E STATS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ NAIVE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA: COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E SISTÊMICA”**.

Pesquisador responsável: Fernanda **Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes**
Aluna: **Juliana Dias Lourenço (Doutorado – externo)**

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 26 de dezembro de 2016.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Cairés Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DAS PROTEÍNAS SOCS E STATS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ NAIVE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA: COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E SISTÊMICA.

Pesquisador: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57797516.9.3001.5432

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.881.938

Apresentação do Projeto:

O PAPEL DAS PROTEÍNAS SOCS E STATS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ NAIVE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA: COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E SISTÊMICA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os mecanismos envolvidos na diferenciação das células TCD4+ naive para os diferentes subtipos, em especial as células Th17 e Tregs considerando o papel das SOCS e das STATS nestes eventos em pacientes com DPOC comparando a resposta imune local e sistêmica.

Objetivo Secundário:

Teremos como objetivos específicos avaliar em amostras de tecido pulmonar e de coleta de sangue de pacientes: - Expressão gênica para SOCS 1 e 3, STAT 3 e 5 através de RT-qPCR;- Quantificar as proteínas SOCS 1 e 3; STAT 3 e 5 através de Western Blot;- Quantificar as Interleucinas-10, -

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo
Cancer Center

HOSPITAL A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 1.881.938

17, -6 e TGF- através de ELISA;- Quantificar e localizar as proteínas SOCS1 e 3, STATS 3 e 5 através da marcação dupla de imunohistoquímica (somente no tecido).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A retirada destes pequenos pedaços de tecido pulmonar e da amostra de sangue não irá causar ampliação da cirurgia ou qualquer prejuízo na análise da peça que será feita pelo médico patologista para o diagnóstico da sua doença. Da mesma forma, que isto não irá trazer risco ou desconforto adicional ao paciente.

Benefícios:

Não há benefícios diretos ou imediatos aos participantes do estudo. Entretanto, a pesquisa visa um melhor entendimento dos males causados pelo cigarro às pessoas, eventualmente trazendo novos conhecimentos para a comunidade científica e, conseqüentemente, contribuindo para a melhoria do tratamento desses pacientes que apresentam bronquite crônica ou enfisema pulmonar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em riscos e benefícios - sugiro colocar em riscos as possíveis complicações inerentes a coleta de sangue (formação de hematoma, dor local, infecção, etc). Além disso, foi sugerido a colocação de pelo menos um paciente como controle sem câncer (ressecção por doença pulmonar benigna), já que alterações em proteínas inflamatórias podem estar presente no sangue de pacientes com câncer. Como sugestão também, discriminar se há teste estatístico para cálculo de tamanho da amostra. Outra sugestão seria utilizar mais marcadores para realizar a caracterização do infiltrado inflamatório.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em conformidade

Recomendações:

Sem pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2169-5020

Fax: (11)2109-5020

E-mail: cep_ficancer@accamargo.org.br



HOSPITAL A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 1.881.938

dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_754791.pdf	19/09/2016 11:04:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/09/2016 11:02:43	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_754791.pdf	29/08/2016 15:51:15		Aceito
Outros	Anexo_CEP_JulianaLourenco_agostode2016.pdf	29/08/2016 15:49:23	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	29/08/2016 15:48:17	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_754791.pdf	06/07/2016 17:04:53		Aceito
Outros	Anexo_CEP_Juliana_Lourenco_junho_2016.pdf	06/07/2016 17:02:28	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_SOCS_STATS.docx	06/07/2016 17:01:51	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/07/2016 16:58:25	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Plataforma_Brasil_LourencoJD.pdf	06/07/2016 16:57:17	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DAS PROTEÍNAS SOCS E STATS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ NAIVE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA: COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E SISTÊMICA.

Pesquisador: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57797516.9.3002.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.120.979

Apresentação do Projeto:

Trata-se do segundo relato da solicitação de uma emenda ao projeto "PAPEL DAS PROTEÍNAS SOCS E STATS NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ NAIVE NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA: COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA LOCAL E SISTÊMICA". Os pesquisadores realizaram adequadamente as alterações solicitadas no TCLE e incluíram nova carta de anuência da Instituição Co-participante. A emenda solicitada é pertinente ao andamento do presente projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores vão avaliar os mecanismos envolvidos na diferenciação das células TCD4+ naive para os diferentes subtipos em especial as células Th17 e Tregs considerando o papel das SOCS e das STATS nestes eventos em pacientes com DPOC comparando a resposta imune local e sistêmica. Foi solicitado uma emenda para a inclusão de Instituição co-participante que não altera os objetivos do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A emenda solicitada não trará riscos para o sujeito da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicitação da emenda para aumento da casuística.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.120.979

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O novo TCLE apresentado está adequado.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugerimos sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1196550.pdf	21/12/2018 18:33:58		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	21/12/2018 18:31:35	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	045_18_A_DECLARACAO_revisada_A_NUENCIA_SDC_COP_089_18_021.pdf	21/12/2018 18:30:42	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_modificado_LourencoJD_INCOR.docx	21/12/2018 18:24:42	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Declaracao_de_Anuencia.pdf	08/06/2018 20:05:33	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Carta_emenda_HC.pdf	08/06/2018 20:03:41	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_SOCS_STATS_InclusaoHC.docx	08/06/2018 20:02:49	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Inclusao_HC.docx	08/06/2018 20:02:02	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Carta_emenda_PlataformaBrasil.pdf	27/07/2017 15:08:45	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito
Outros	Anexo_CEP_JulianaLourenco_agostode2016.pdf	29/08/2016 15:49:23	Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. GOLD Report 2020. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2020.
2. World Health Organization. WHO | Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) Fact Sheet. WHO. 2017.
3. Janssen R, Piscoer I, Franssen FME, Wouters EFM. Emphysema: looking beyond alpha-1 antitrypsin deficiency. Expert Review of Respiratory Medicine. 2019.
4. World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016. Geneva. World Health Organization. 2018.
5. WHO WHO. Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060. WHO. 2018;
6. Gonçalves-Macedo L, Lacerda EM, Markman-Filho B, Lundgren FLC, Luna CF. Trends in morbidity and mortality from COPD in Brazil, 2000 to 2016. J Bras Pneumol. 2019;45(6):1–8.
7. Ministério da Saúde do Brasil. Brasília. Available from: <http://www.2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>.
8. Pinto M, Bardach A, Palacios A, Biz A, Alcaraz A, Rodriguez B, et al. Burden of smoking in Brazil and potential benefit of increasing taxes on cigarettes for the economy and for reducing morbidity and mortality. Cad Saude Publica. 2019;35(8):1–17.
9. Menezes AMB, Jardim JR, Pérez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. Cad saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Esc Nac Saúde Pública. 2005;
10. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. Am J Respir Crit Care Med. 2001;

11. Pavord ID, Jones PW, Burgel PR, Rabe KF. Exacerbations of COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2016.
12. Baraldo S, Saetta M. To reg or not to reg: That is the question in COPD. *European Respiratory Journal*. 2008.
13. Cosio MG, Majo J. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: Role of T cells. *Chest*. 2002;
14. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med*. 2007;
15. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378(9795):1015–26.
16. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*. 2009.
17. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med [Internet]*. 2014;35(1):71–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2013.10.004>
18. Lane N, Robins RA, Corne J, Fairclough L. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: The role of regulatory T-cells and Th17 cells. *Clin Sci*. 2010;119(2):75–86.
19. Duan MC, Huang Y, Zhong XN, Tang HJ. Th17 Cell enhances CD8 T-cell cytotoxicity via IL-21 production in emphysema mice. *Mediators Inflamm*. 2012;
20. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res*. 2010;
21. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 2016;138(1):16–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>
22. Wang H, Ying H, Wang S, Gu X, Weng Y, Peng W, et al. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J*. 2015;9(3):330–41.
23. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial

- mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(2):316–24.
24. Yu Y, Zhao L, Xie Y, Xu Y, Jiao W, Wu J, et al. Th1/th17 cytokine profiles are associated with disease severity and exacerbation frequency in copd patients. *Int J COPD.* 2020;
 25. Zhang Y, Zhang Y, Gu W, Sun B. Th1/Th2 cell differentiation and molecular signals. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2014.
 26. Ren J, Li B. The Functional Stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and Their Therapeutic Applications. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 2017.
 27. Singh R, Alape D, De Lima A, Ascanio J, Majid A, Gangadharan SP. Regulatory T Cells in Respiratory Health and Diseases. *Pulm Med.* 2019;2019.
 28. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity [Internet].* 2019;50(4):871–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
 29. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, et al. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity.* 2011;34(4):566–78.
 30. Saraiva M, Saraiva M, Vieira P, Vieira P, Vieira P, O'Garra A, et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 2020;217(1):1–19.
 31. Sales DS, Ito JT, Zanchetta IA, Annoni R, Aun M V., Ferraz LFS, et al. Regulatory T-Cell Distribution within Lung Compartments in COPD. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis.* 2017;14(5):533–42.
 32. Ito JT, De Brito Cervilha DA, Lourenço JD, Gonçalves NG, Volpini RA, Caldini EG, et al. Th17/Treg imbalance in COPD progression: A temporal analysis using a CS-induced model. *PLoS One.* 2019;
 33. Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. SOCS, inflammation, and autoimmunity. *Front Immunol.* 2012;3(MAR):1–9.
 34. Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal.* 2017;15(1):1–13.

35. Linossi EM, Nicholson SE. Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: Resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunol Rev.* 2015;266(1):123–33.
36. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative regulation of cytokine signaling in immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(7).
37. Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, Miura O. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor β 2 subunit. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;
38. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-Dependent MicroRNA155 Confers Competitive Fitness to Regulatory T Cells by Targeting SOCS1 Protein. *Immunity.* 2009;
39. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell.* 2010;
40. Yew-Booth L, Birrell MA, Lau MS, Baker K, Jones V, Kilty I, et al. JAK-STAT pathway activation in COPD. *Eur Respir J.* 2015;46(3):843–5.
41. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T, et al. STAT2 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2004;24(1):78–85.
42. Nasreen N, Gonzalves L, Peruvemba S, Mohammed KA. Fluticasone furoate is more effective than mometasone furoate in restoring tobacco smoke inhibited SOCS-3 expression in airway epithelial cells. *Int Immunopharmacol [Internet].* 2014;19(1):153–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.12.029>
43. Springer J, Scholz FR, Peiser C, Dinh QT, Fischer A, Quarcoo D, et al. Transcriptional down-regulation of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Med Toxicol [Internet].* 2013;8(1):1. Available from: *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*
44. Cervilha DAB, Ito JT, Lourenço JD, Olivo CR, Saraiva-Romanholo BM,

- Volpini RA, et al. The Th17/Treg Cytokine Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation in an Animal Model of Cigarette Smoke Exposure and Lipopolysaccharide Challenge Association. *Sci Rep*. 2019;
45. Silva LEF, Lourenço JD, Silva KR, Santana FPR, Kohler JB, Moreira AR, et al. Th17/Treg imbalance in COPD development: suppressors of cytokine signaling and signal transducers and activators of transcription proteins. *Sci Rep*. 2020;
 46. Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in copd: A novel phenotype. *PLoS One*. 2012;7(5).
 47. Zhang L, Cheng Z, Liu W, Wu K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013;10(4):459–65.
 48. Jin Y, Wan Y, Chen G, Chen L, Zhang MQ, Deng L, et al. Treg/IL-17 ratio and Treg differentiation in patients with COPD. *PLoS One*. 2014;9(10).
 49. Li XN, Pan X, Qiu D. Imbalances of Th17 and Treg cells and their respective cytokines in COPD patients by disease stage. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(12):5324–9.
 50. Silva BSA, Lira FS, Ramos D, Uzeloto JS, Rossi FE, Freire APCF, et al. Severity of COPD and its relationship with IL-10. *Cytokine* [Internet]. 2018;106(October):95–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.018>
 51. Xu W, Li R, Sun Y. Increased IFN- γ -producing Th17/Th1 cells and their association with lung function and current smoking status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med*. 2019;19(1):1–9.
 52. Di Stefano A, Caramori G, Barczyk A, Vicari C, Brun P, Zanini A, et al. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax*. 2014;
 53. Vitenberga Z, Pilmane M, Babjoniševa A. The evaluation of inflammatory, anti-inflammatory and regulatory factors contributing to the pathogenesis of COPD in airways. *Pathol Res Pract*. 2019;
 54. Wei B, Sheng Li C. Changes in Th1/Th2-producing cytokines during acute exacerbation chronic obstructive pulmonary disease. *J Int Med Res*.

- 2018;46(9):3890–902.
55. Chu S, Zhong X, Zhang J, Lao Q, He Z, Bai J. The expression of Foxp3 and ROR gamma t in lung tissues from normal smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011;11(11):1780–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.010>
 56. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* [Internet]. 2010;50(2):152–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.004>
 57. Ruwanpura SM, McLeod L, Miller A, Jones J, Vlahos R, Ramm G, et al. Deregulated Stat3 signaling dissociates pulmonary inflammation from emphysema in gp130 mutant mice. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(7):627–39.
 58. Wei J, Xiong XF, Lin YH, Zheng BX, Cheng DY. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. *PeerJ*. 2015;2015(8).
 59. de Moraes MR, da Costa AC, Corrêa K de S, Junqueira-Kipnis AP, Rabahi MF. Interleukin-6 and interleukin-8 blood levels' poor association with the severity and clinical profile of ex-smokers with COPD. *Int J COPD*. 2014;9:735–43.
 60. Sileikiene V, Laurinaviciene A, Lesciute-Krilaviciene D, Jurgauskiene L, Malickaite R, Laurinavicius A. Levels of CD4+ CD25+ T regulatory cells in bronchial mucosa and peripheral blood of chronic obstructive pulmonary disease indicate involvement of autoimmunity mechanisms. *Adv Respir Med*. 2019;87(3):159–66.
 61. Chen W, Konkel JE. TGF- β and 'adaptive 'Foxp3+ regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2010;2(1):30–6.
 62. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1830–5.
 63. Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C. Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: A key for

- understanding inflammation and remodeling. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2012;
64. Baarsma HA, Spanjer AIR, Haitzma G, Engelbertink LHJM, Meurs H, Jonker MR, et al. Activation of WNT/ β -catenin signaling in pulmonary fibroblasts by TGF- β 1 is increased in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2011;
 65. Podowski M, Calvi C, Metzger S, Misono K, Poonyagariyagorn H, Lopez-Mercado A, et al. Angiotensin receptor blockade attenuates cigarette smoke - Induced lung injury and rescues lung architecture in mice. *J Clin Invest.* 2012;
 66. Wang Z, Fang K, Wang G, Guan X, Pang Z, Guo Y, et al. Protective effect of amygdalin on epithelial–mesenchymal transformation in experimental chronic obstructive pulmonary disease mice. *Phyther Res.* 2019;
 67. Knosp CA, Johnston JA. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology.* 2012.
 68. Takahashi R, Nishimoto S, Muto G, Sekiya T, Tamiya T, Kimura A, et al. SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *J Exp Med.* 2011;208(10):2055–67.
 69. Dong R, Xie L, Zhao K, Zhou M, He P. Cigarette smoke-induced lung inflammation in COPD mediated via LTB4/BLT1/SOCS1 pathway. *Int J COPD.* 2015;
 70. Lan F, Zhang N, Zhang J, Krysko O, Zhang Q, Xian J, et al. Forkhead box protein 3 in human nasal polyp regulatory T cells is regulated by the protein suppressor of cytokine signaling 3. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;
 71. Linossi EM, Calleja DJ, Nicholson SE. Understanding SOCS protein specificity. *Growth Factors [Internet].* 2018;36(3–4):104–17. Available from: <https://doi.org/10.1080/08977194.2018.1518324>
 72. Agustí A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: What we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(7):522–5.
 73. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2009;33(5):1165–85.

74. Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: A result of “overspill” of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax*. 2010;65(10):930–6.
75. Abbas, AK, Lichtman A PS. No Title. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. 2018. p. 57–95.