



ARTIGO ORIGINAL

## Peripheral Th17/Treg cell-mediated immunity imbalance in allergic rhinitis patients<sup>☆,☆☆</sup>

Xuekun Huang<sup>a</sup>, Yulian Chen<sup>a</sup>, Fucheng Zhang<sup>b</sup>, Qintai Yang<sup>a,\*</sup>, Gehua Zhang<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Otorrinolaringologia, Third Hospital, Sun Yat-sen University, Guangdong, China

<sup>b</sup> Laboratório Central, Third Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong, China

Recebido em 8 de julho de 2013; aceito em 10 de novembro de 2013

### KEYWORDS

Rhinitis allergic,  
seasonal;  
Th17 cells;  
T-lymphocytes,  
regulatory

### PALAVRAS-CHAVE

Rinite alérgica,  
sazonal;  
Células Th17;  
Linfócitos T reguladores

### Abstract

**Introduction:** Allergic rhinitis (AR) is an IgE-mediated non-infectious disease of the nasal mucosa following contact with allergens.

**Objective:** To investigate the peripheral Th17 cells and CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T (Treg) cells and the expression of cytokines in the serum of AR patients.

**Methods:** The peripheral blood of 14 patients with AR (AR group) and six healthy subjects (control group) was collected from March to May of 2012. Flow cytometry was performed to detect the Th17 cells and Treg cells, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure the serum levels of IL-17 and TGF- $\beta$ 1.

**Results:** The proportion of Th17 cells in the AR group was markedly higher than that in the control group ( $p < 0.01$ ). The proportion of Treg cells in the AR group was also dramatically reduced when compared with the control group ( $p < 0.01$ ). In the AR group, serum IL-17 levels were markedly higher than those in the control group ( $p < 0.01$ ). In the AR group, serum TGF- $\beta$ 1 levels were significantly lower than those in the control group ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** The imbalance of peripheral Th17/Treg cells plays an important role in the pathogenesis of AR.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

### Desequilíbrio imunológico periférico mediado por células Th17/Treg em pacientes com rinite alérgica

### Resumo

**Introdução:** A rinite alérgica (RA) é uma doença não infecciosa da mucosa nasal mediada por IgE após o contato com alérgenos.

**Objetivo:** Investigar as células Th17 periféricas e CD4 + CD25 + Foxp3 + células T reguladoras (Treg) e a expressão sérica de citocinas em pacientes com RA.

**Métodos:** De março a maio de 2012, foi coletado o sangue periférico de 14 pacientes com RA (grupo RA) e seis indivíduos saudáveis (grupo controle). A detecção das células Th17 e células Treg foi realizada através da citometria de fluxo e os níveis séricos de IL-17 e TGF- $\beta$ 1. Foram medidos por ELISA.

DOI se refere ao artigo: 10.5935/1808-8694.20140031

<sup>☆</sup>Como citar este artigo: Huang X, Chen Y, Zhang F, Yang Q, Zhang G. Peripheral Th17/Treg cell-mediated immunity imbalance in allergic rhinitis patients. Braz J Otorhinolaryngol. 2014;80:152-5.

<sup>☆☆</sup>Trabalho realizado no Third Hospital, Sun Yat-sen University, Guangdong, China.

\* Autor para correspondência.

E-mail: yang32432423@sohu.com (Q. Yang).

**Resultados:** A percentagem de células Th17 no grupo RA foi bem maior do que no grupo controle ( $p < 0,01$ ). A proporção de células Treg no grupo RA também foi drasticamente menor quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). No grupo RA, o nível sérico de IL-17 foi significativamente maior do que no grupo controle ( $p < 0,01$ ).

**Conclusão:** O desequilíbrio de células Th17/Treg periféricas desempenha um papel importante na patogênese da RA.

© 2014 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

## Introdução

A rinite alérgica (RA) é uma doença não infecciosa da mucosa nasal, mediada por IgE após contato com alérgenos.<sup>1</sup> Estudos anteriores demonstraram que o desequilíbrio da imunidade mediada por células Th1/Th2 é importante na patogênese da RA, caracterizada pela inflamação mediada por células Th2.<sup>2</sup> Nos últimos anos, há evidências demonstrando que as células T reguladoras (Tregs) são um outro subgrupo de linfócitos T envolvido nas doenças alérgicas e podem regular a resposta imune patológica e fisiológica, que poderá atingir uma tolerância autoimune e manutenção do equilíbrio imunológico.<sup>3</sup> As células Tregs CD4+CD25 são o principal tipo de células Tregs e podem secretar algumas citocinas, inclusive TGF- $\beta$ 1 e IL-10. O gene Forkhead box p3 (Foxp3) é um regulador fundamental no desenvolvimento e manutenção funcional das células Tregs CD4+CD25+.<sup>4</sup>

As células Th17 são um subgrupo de linfócitos T e desempenham papéis cruciais na inflamação pró-inflamatória e em doenças autoimunes. O ROR $\gamma$ t é o principal fator de transcrição nuclear das células Th17, e a interleucina IL-17 é uma importante citocina efetora secretada pelas células Th17. A IL-17 pode exercer um efeito pró-inflamatório, promover a produção de quimiocinas (como IL-8, proteína quimiotática de monócitos-1 etc.) nos tecidos locais, facilitar a proliferação de monócitos e neutrófilos e estimular a geração de IL-6 e prostaglandina E2, resultando em inflamação local.<sup>5,6</sup> Alguns pesquisadores descobriram que a expressão de ROR $\gamma$ t e IL-17 aumentou, e a expressão de Foxp3 (fator de transcrição das células Tregs) e TGF- $\beta$ 1 (citocina associada) apresentou redução durante a detecção de fatores de transcrição associados e citocinas de Th17 e células Tregs no sangue periférico de pacientes com RA utilizando a reação RT-PCR e ensaio imunoenzimático (ELISA).<sup>7</sup> No presente estudo, foram utilizados a citometria de fluxo (CMF) e o ELISA para detectar as células Th17/Tregs e os níveis séricos de IL-17 e TGF- $\beta$ 1, respectivamente, visando explorar o papel das células Th17/Tregs na patogênese da RA.

## Método

### Indivíduos

De março a maio de 2012 foram recrutados 14 pacientes com RA em nosso departamento, incluindo cinco homens e nove mulheres com idade média de 29,76 anos. O diagnósti-

co de RA foi feito de acordo com os critérios de diagnóstico de RA.<sup>1</sup> Os resultados dos testes cutâneos foram positivos para ácaro de poeira e a gravidade da rinite alérgica foi moderada a grave em todos os 14 pacientes. Esses pacientes não tinham sido tratados com glicocorticoides no último mês e nem recebido terapia anti-histamínica e imunoterapia específica para alérgenos. Foram excluídos os pacientes com sinusite, asma e intolerância à aspirina. Além disso, seis voluntários saudáveis sem sintomas de RA foram recrutados e serviram como controle. Foram incluídos dois homens e quatro mulheres com idade média de 30,83 anos. Obtivemos o consentimento informado de todos os indivíduos antes do início do estudo.

### Principais reagentes e equipamentos laboratoriais

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACSCalibur; BD, EUA) para detecção e o software Cellquest (BD, EUA) para aquisição de dados e análise posterior. Foram utilizados, no presente estudo, leitor de microplacas (ELX-800; Bio-Tek, EUA), acetato fenilmercúrico (PMA), cálcio ionomicina, BFA (MultiSciences), kit de coloração de células T reguladoras humanas (eBioscience), *APC-conjugated human CD8 mAb* (BD, EUA), *PerCP-Cy5.5 conjugated human CD3 mAb*, *PE conjugated human IL-17 mAb* e controle isotipo correspondente (eBioscience, EUA), solução de fixação e solução para ruptura de membranas (Invitrogen, EUA), kit ELISA de IL-17 anti-humano (eBioscience, EUA) e kit ELISA TGF- $\beta$ 1 (RayBio, EUA).

### Coleta de amostras

Pela manhã, foi coletado sangue venoso (4 ml) da veia ulnar e feita a anticoagulação com heparina. A seguir, 2 mL de sangue foram centrifugados a 3.000 r/min, por 15 minutos, e o soro foi coletado e armazenado a -20° C para detecção de IL-17 e TGF- $\beta$ 1. Além disso, os 2 ml de sangue restantes foram utilizados para citometria de fluxo, para detecção de células Th17 e células Tregs.

### Detecção de células Th17 por CMF

Resumidamente, 250  $\mu$ L de sangue periférico foram misturados com 50  $\mu$ g/L de PMA, 2,0  $\mu$ mol/L de monensina e 750  $\mu$ mol/L de cálcio ionomicina após incubação a 37° C em um ambiente com 50 mL/L de CO<sub>2</sub> por quatro horas. A suspensão de células foi transferida para um tubo equalizador de pressão de 1,5 mL após centrifugação a 2.500 r/min, por 6

minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram lavadas duas vezes pela CFM, com solução salina tamponada com fosfato. As células foram tratadas com 10 µL de PECy-5-CD3Ab e 10 µL de FITC-CD8Ab em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Após dupla lavagem com solução salina tamponada com fosfato, as células foram fixadas em 300 µL de solução de fixação em ambiente escuro a 4°C por 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido. Após adição da solução para ruptura de membranas, foi feita centrifugação a 3.000 r/min e o sobrenadante foi removido. Após dupla lavagem em solução salina tamponada com fosfato, as células foram transferidas para dois tubos e tratadas com 20 µL de PE-IL-17Ab e 10 µL de controle isotipo PE-IgG1, respectivamente, no escuro e em temperatura ambiente por 30 minutos. Após dupla lavagem com solução salina tamponada com fosfato, as células foram novamente suspensas em 0,3 mL de solução salina tamponada com fosfato e submetidas a CFM. O software CellQuest foi utilizado para análise de dados.

### Detecção de células Tregs por CMF

As células foram transferidas para um tubo amostral e um tubo controle. As células no tubo amostral foram tratadas com CD4/CD25/FoxP3, porém, as no tubo controle foram tratadas com controle isotipo FoxP3. Então, 100 µL de sangue anticoagulado foram adicionados após incubação no escuro e em temperatura ambiente, por 20 minutos. Após adição de 1 mL de agente hemolítico, a incubação foi feita em temperatura ambiente e no escuro, por 10 minutos após centrifugação a 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram novamente suspensas em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato após centrifugação e 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e 0,5 mL de solução de fixação Foxp3 foi adicionado após incubação, no escuro e em temperatura ambiente, por 20 minutos. As células foram novamente suspensas em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato e a centrifugação feita a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e 0,5 mL de solução para ruptura de membranas Foxp3 foi adicionado em cada tubo após centrifugação a 1.000 rpm, por 5 minutos. Essas células foram novamente suspensas em 0,5 mL de solução para ruptura de membranas Foxp3 após incubação, no escuro e em temperatura ambiente, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Então, 10 µL de Foxp3Ab PE foram adicionados no tubo de amostra e 10 µL de controle isotipo no tubo controle, após incubação, em temperatura ambiente no escuro, por 30 minutos. As células foram novamente suspensas em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato e a centrifugação feita a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram novamente suspensas em 0,4 mL de solução salina tamponada com fosfato. Foi feita a CMF e foi utilizado o software CellQuest para análise de dados.

### Detecção sérica de IL-17 e TGF-β1 por ELISA

A detecção sérica de IL-17 e TGF-β1 foi feita de acordo com as instruções do fabricante. O limite mínimo de detecção foi de 0,5 pg/mL para IL-17 e 9 pg/mL para TGF-β1.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 16.0. Os dados com distribuição normal foram expressos em média ± desvio-padrão ( $c \pm s$ ). O teste t independente foi utilizado para comparações entre dois grupos. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Resultados

Proporção de células Th17 no grupo RA e grupo controle.

A CMF mostrou que a proporção das células Th17 no grupo RA foi nitidamente superior em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ; tabela 1).

Proporção de células Tregs no grupo RA e grupo controle.

No grupo RA, a proporção de células Tregs foi nitidamente superior quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,01$ ; tabela 1).

Níveis séricos de IL-17 e TGFβ1 no grupo RA e grupo controle.

O ELISA foi realizado para detectar os níveis séricos de IL-17 e TGF-β1 no grupo RA e grupo controle. Os resultados são mostrados na tabela 2. Os resultados mostraram que o nível de IL-17 no grupo RA foi nitidamente superior em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ; tabela 1). No grupo RA, o nível de TGF-β1 foi drasticamente menor quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 1** Proporção de células Th17 e Tregs no grupo RA e grupo de controle ( $c \pm s$ )

| Grupo            | Th17 (%)                 | Treg (%)                 |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| RA (n = 14)      | 1,69 ± 0,64 <sup>a</sup> | 1,82 ± 0,76 <sup>b</sup> |
| Controle (n = 6) | 0,59 ± 0,19              | 5,19 ± 2,10              |

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle.

<sup>b</sup>  $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle.

**Tabela 2** Níveis séricos de IL-17 e TGF-β1 no grupo RA e grupo de controle ( $c \pm s$ ; pg/mL)

|                  | IL-17                       | TGF-β1                   |
|------------------|-----------------------------|--------------------------|
| RA (n = 14)      | 668,68 ± 62,59 <sup>a</sup> | 0,37 ± 0,05 <sup>b</sup> |
| Controle (n = 6) | 668,68 ± 28,00              | 0,50 ± 0,07              |

<sup>a</sup>  $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle.

<sup>b</sup>  $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle.

### Discussão

Um estudo anterior mostrou que o nível sérico de IL-17 nos pacientes com RA se encontrava significativamente aumentado quando comparado ao grupo controle,<sup>8</sup> e a proporção de células IL-17 positivas na mucosa nasal em pacientes com RA também era nitidamente superior em comparação aos indivíduos saudáveis.<sup>9</sup> Ciprandi et al.<sup>10,11</sup> observaram que o

nível sérico de IL-17 estava positivamente associado à gravidade dos sintomas de RA e positivamente associados ao número de eosinófilos periféricos. Os monócitos periféricos dos pacientes com RA foram tratados com alérgeno de pólen, e a CMF mostrou que a proporção de células de Th17 foi nitidamente superior no grupo controle. No presente estudo, nossos resultados mostraram que a proporção de células periféricas Th17 nos pacientes com RA foi significativamente superior em comparação ao grupo controle, acompanhada do nível sérico de IL-17 aumentado. Esses achados sugerem que as células Th17 podem secretar um grande número de IL-17 e estejam envolvidas na patogênese da RA.

Além disso, a proporção de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> no sangue periférico dos pacientes com RA foi significativamente inferior em comparação ao grupo controle, acompanhada pela redução do nível sérico de TGF- $\beta$ 1. Isso sugere que a redução na contagem de células periféricas Tregs leva ao comprometimento da função dessas células. Nos indivíduos saudáveis, a proporção das células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> foi 5-10% no sangue periférico. As células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> podem exercer um efeito inibidor sobre a resposta imune por meio da interação intercelular ou secreção de algumas citocinas inibidoras (como IL-10 e TGF- $\beta$ ).<sup>4</sup> Nossos resultados revelaram que a proporção de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> periféricas e o nível sérico de TGF- $\beta$ 1 estão reduzidos. Xu et al.<sup>12</sup> confirmaram que Foxp3<sup>+</sup> linfócitos positivos e a expressão Foxp3 mRNA na mucosa nasal e nos monócitos periféricos dos pacientes com RA apresentavam nítida redução quando comparados ao grupo controle, e Foxp3 e as células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nos pacientes alérgicos eram nitidamente reduzidas.<sup>13</sup> Isso sugere que o efeito inibidor comprometido das células Tregs leva à ocorrência de doenças alérgicas.

As células Th17 e as células Tregs derivam das células T virgens (naïve). As células Th17 mediam a reação inflamatória e as células Tregs mediam a tolerância autoimune. Há antagonismo na função e diferenciação nas células Th17 e nas células Tregs. Assim, o equilíbrio das células Tregs e das células Th17 é fundamental para a manutenção do estado imunitário. No presente estudo, os resultados mostraram que a proporção das células Th17 no sangue periférico dos pacientes com RA está nitidamente aumentado; porém, as células Tregs encontraram-se drasticamente reduzidas. Isso sugere que o desequilíbrio das células Th17/Tregs desempenha um papel importante na patogênese da RA. Assim, pesquisas adicionais sobre o equilíbrio das células Th17/Tregs poderão fornecer uma nova estratégia para o tratamento da RA.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 Update (in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63(Suppl 86):8-160.
2. Agrawal DK, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10:39-48.
3. Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T regulatory cells and their counterparts-masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:626-39.
4. Pai SY, Truitt ML, Ting CN, Leiden JM, Glimcher LH, Ho IC. Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. *Immunity*. 2003;19:863-75.
5. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-32.
6. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006;126:1121-33.
7. Zhang C, Hong S, Hu G. The expression of Treg/Th17 cells related transcription factors and cytokines in PBMCs and plasma in patients with allergic rhinitis. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2012; 26:209-11.
8. Huang X, Yang Q, Chen Y, Zhang GH, Li Y. Expressions of IL-17, IL-21 and IL-23 in the serum of allergic rhinitis patients. *J Med Biochem*. 2011;30:323-7.
9. Ba L, Du J, Liu Y, Shang T, Yang F, Bian P. The expression and significance of interleukin-17 and the infiltrating eosinophils in nasal polyps. *J Clin Otorhino Laryngol Head Neck Surg*. 2010;24:53-6.
10. Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, Fenoglio D, Ricciardolo F, Marseglia G, et al. Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy*. 2009;64:1375-8.
11. Ciprandi G, Filaci G, Battaglia F, Fenoglio D. Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: New evidence. *Int Immuno Pharmacol*. 2010;10:226-9.
12. Xu G, Mou Z, Jiang H, Cheng L, Shi J, Xu R, et al. A possible role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells as well as transcription factor Foxp3 in the dysregulation of allergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2007;117:876-80.
13. Larché M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest*. 2007;132:1007-14.