TATIANA LANÇAS

**Responsividade do tecido pulmonar
periférico de pacientes com Doença Pulmonar
Obstrutiva Crônica**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff

**SÃO PAULO
2009**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1. 1 DPOC.....	02
1.1.1 DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E MORTALIDADE.....	02
1.1.2 ETIOLOGIA, QUADRO CLÍNICO E CLASSIFICAÇÃO.....	04
1.1.3 FISIOPATOLOGIA.....	08
1.2 HIPER-RESPONSIVIDADE.....	15
1.3 TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MÉTODOS.....	22
3. 1 CASUÍSTICA.....	23
3. 2 OBTENÇÃO DO TECIDO.....	24
3. 3 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO.....	24
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	28
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS.....	33

4. 1 DADOS DEMOGRÁFICOS E DE FUNÇÃO PULMONAR.....	34
4.2 MECÂNICA DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO.....	35
4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	38
4.4 CORRELAÇÕES.....	39
 5. DISCUSSÃO.....	 43
 6. CONCLUSÕES.....	 51
 7. ANEXOS.....	 53
 8. REFERÊNCIAS.....	 65

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Δ	delta
%R	porcentagem de aumento de resistência
%E	porcentagem de aumento de elastância
ACh	acetilcolina
AML	actina de músculo liso

CaCl ₂	cloreto de cálcio
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CO ₂	gás carbônico
CVF	capacidade vital forçada
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
E	elastância
Ebasal	elastância basal
EACH	elastância pós-acetilcolina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
	Universidade de São Paulo
HR	hiper-responsividade
Hz	hertz
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio
MEC	matriz extracelular
MgSO ₄	sulfato de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
O ₂	oxigênio
R	resistência
Rbasal	resistência basal
RACH	resistência pós-acetilcolina
T	tensão
VEF ₁	volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da mecânica do tecido pulmonar periférico.....	27
Figura 2. Fotografia do equipamento de análise da mecânica do tecido pulmonar periférico.....	27
Figura 3. Demonstração do método de morfometria convencional.....	30
Figura 4. Demonstração do método de análise de imagem.....	31
Figura 5. Gráficos dos valores de resistência basais e pós-ACh.....	36
Figura 6. Gráfico dos valores de elastância basais e pós-ACh.....	36
Figura 7. Gráfico das porcentagens de aumento de resistência.....	37
Figura 8. Gráfico das porcentagens de aumento de elastância.....	37
Figura 9. Gráfico das correlações entre a proporção de volume de fibras elásticas e a densidade alveolar de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação espirométrica de gravidade da DPOC.....08

TABELA 2. Anticorpos e métodos utilizados nas colorações de imuno-histoquímica.....30

TABELA 3. Dados demográficos e de prova de função pulmonar.....35

TABELA 4. Densidade alveolar de células inflamatórias.....38

TABELA 5. Proporção de volume de células positivas para α -actina de músculo liso e de fibras colágenas e elásticas.....39

TABELA 6. Correlações entre os valores de mecânica e os parâmetros morfológicos.....40

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).....	54
Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo.....	55
Anexo C. Tabela de dados dos pacientes do estudo.....	56
Anexo D. Tabelas de dados utilizados na análise estatística do estudo.....	57

RESUMO

Lanças T. *Responsividade do tecido pulmonar periférico de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Mais de 60% dos pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) podem apresentar hiper-responsividade brônquica. Entretanto, não se sabe se, além das vias aéreas, o tecido pulmonar periférico também apresenta uma resposta exagerada a um agonista na DPOC. No presente estudo foi investigado o comportamento mecânico *in vitro* e as alterações estruturais e inflamatórias do tecido pulmonar periférico de 10 pacientes com DPOC comparados com 10 controles não fumantes. Foram realizadas medidas de resistência (R) e elastância (E) de fatias pulmonares em situação basal e após desafio com Acetilcolina. Também foram analisados no tecido alveolar as densidades de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos CD8+ e CD4+, além do conteúdo de células positivas para α -actina de músculo liso, fibras elásticas e colágenas. Os valores de R após o tratamento com Acetilcolina (RACH) e a porcentagem de aumento de resistência (%R) foram significativamente maiores no grupo DPOC comparado ao grupo controle ($p \leq 0,03$). O grupo DPOC também apresentou densidade de macrófagos ($p=0,04$) e linfócitos CD8+ ($p=0,017$) significativamente maior e conteúdo de fibras elásticas significativamente menor ($p=0,003$) comparado ao grupo controle. Foi observada uma correlação positiva significativa entre a %R e a densidade de eosinófilos e

linfócitos CD8+ ($r=0,608$, $p=0,002$; e $r=0,581$, $p=0,001$, respectivamente), e também uma correlação negativa significativa entre a %R e a relação VEF_1/CVF ($r=-0,451$, $p<0,05$). Concluimos que a resposta colinérgica de fatias de parênquima pulmonar está aumentada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e parece estar relacionada tanto à densidade de eosinófilos e de linfócitos CD8+ no tecido alveolar quanto ao grau de obstrução determinado pela prova de função pulmonar.

Descritores: doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquite crônica, enfisema pulmonar, pulmão/fisiopatologia, hiper-reatividade brônquica, mecânica, alvéolos pulmonares.

SUMMARY

Lanças T. *Hyperresponsiveness of peripheral lung parenchyma in Chronic Obstructive Pulmonary Disease* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.

Up to 60% of COPD patients can present airway hyperresponsiveness. However, it is not known whether the peripheral lung tissue also presents an exaggerated response to agonists in COPD. In this study we investigated the in vitro mechanical behavior and structural and inflammatory changes of peripheral lung tissue of 10 COPD patients and compared to 10 non-smoking controls. We measured resistance (R) and elastance (E) of lung strips at baseline and after acetylcholine (ACh) challenge. We further assessed the alveolar tissue density of neutrophils, eosinophils, macrophages, mast cells and CD8+ and CD4+ cells, and the content of α -smooth muscle actin+ cells, elastic fibers and collagen fibers. Values of R after ACh treatment (R_{ACh}) and percent increase of tissue resistance (%R) were significantly higher in COPD group compared to controls ($p \leq 0.03$). There was a significantly higher density of macrophages ($p = 0.04$) and CD8+ cells ($p = 0.017$) and a lower elastic fiber content ($p = 0.003$) in COPD group compared to controls. We observed a significant positive correlation between %R and eosinophil and CD8+ cells density ($r = 0.608$, $p = 0.002$; and $r = 0.581$, $p = 0.001$, respectively), and also a negative correlation between %R and FEV1/FVC ($r = -0.451$, $p < 0.05$). We conclude that the cholinergic responsiveness of parenchymal lung strips is increased in COPD patients and seems to be related to alveolar tissue eosinophilic and CD8 lymphocytic inflammation and also to the degree of airway obstruction at pulmonary function test.

Key Words: chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchitis, pulmonary emphysema, lung/physiopathology, bronchial hyperreactivity, mechanics, pulmonary alveoli.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 DPOC

1.1.1 DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E MORTALIDADE

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é definida como “*uma doença evitável e tratável com alguns efeitos extrapulmonares significativos que podem contribuir para a gravidade em alguns pacientes. O componente pulmonar é caracterizado por limitação ao fluxo aéreo que não é totalmente reversível. A limitação ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal do pulmão a partículas ou gases nocivos*” (Rabe et al., 2007).

A DPOC é uma das principais causas mundiais de morbidade e mortalidade e resulta em um impacto social e econômico substancial e crescente. A prevalência, a morbidade e a mortalidade da doença variam entre os países e entre grupos diferentes de um mesmo país, mas, em geral, estão relacionadas diretamente à prevalência do tabagismo. Em muitos países, a poluição do ar resultante da queima de biomassa (lenha, carvão e outros combustíveis) tem também sido identificada como importante fator de risco (Rabe et al., 2007).

A prevalência da DPOC pode variar muito em razão de diferenças nos métodos de levantamento, nos critérios de diagnóstico e nas abordagens analíticas (Halbert et al., 2006). As menores estimativas de prevalência são geralmente as baseadas em relatos pessoais de um diagnóstico médico de DPOC ou condição equivalente. A maioria dos dados mundiais mostra que

menos de 6% da população afirma ter a doença, o que reflete o sub-reconhecimento e subdiagnóstico da DPOC (van den Boom et al., 1998). Por outro lado, estudos realizados em diversos países com métodos padronizados e incluindo parâmetros espirométricos fornecem evidências de que, em indivíduos com mais de 40 anos, a prevalência de DPOC pode chegar a cerca de 25% (Rabe et al., 2007). Os dados de prevalência no Brasil, obtidos de questionários de sintomas, permitem estimar a DPOC em adultos maiores de 40 anos em 12% da população, ou seja, 5.500.000 indivíduos (II Consenso Brasileiro sobre DPOC, 2004). Na cidade de São Paulo a prevalência da DPOC varia de 6 a 15,8% em indivíduos maiores de 40 anos (Menezes et al., 2005).

O fato da DPOC não ser devidamente reconhecida e tratada e de muitas vezes ser considerada uma causa de morte contribuinte ou omitida do atestado de óbito, influencia na precisão dos dados de mortalidade. Mas, apesar desse fato, a DPOC é uma das causas mais importantes de morte na maioria dos países. Em 1990, a doença ocupava o sexto lugar como causa de morte no mundo e deverá ficar em terceiro lugar em 2020 (Lopez et al., 2006). Essa mortalidade elevada é devido à “epidemia” do tabagismo e às mudanças demográficas na maioria dos países, com a maioria da população vivendo mais. Em 2000, o número de mortes por DPOC nos Estados Unidos foi maior entre as mulheres do que entre os homens (59.936 contra 59.118), no entanto o índice de mortalidade entre as mulheres permanece ligeiramente abaixo do observado em homens (Rabe et al., 2007). No Brasil, vem ocorrendo um aumento do número de óbitos por DPOC nos últimos 20 anos, em ambos os sexos, tendo a taxa de mortalidade passado de 7,88

para 19,04 em cada 100.000 habitantes nas décadas de 1980 e 1990, respectivamente e ocupando da 4^a à 7^a posição entre as principais causas de morte (II Consenso Brasileiro sobre DPOC, 2004).

1.1. 2 ETIOLOGIA, QUADRO CLÍNICO E CLASSIFICAÇÃO

A principal causa da doença pulmonar obstrutiva crônica é o tabagismo. Entretanto, evidências consistentes de estudos epidemiológicos mostram que não fumantes também podem desenvolver obstrução crônica ao fluxo aéreo (Behrendt et al., 2005).

A DPOC é uma doença poligênica e um exemplo clássico de interação entre genética e meio ambiente. O fator de risco genético mais evidente é a deficiência hereditária grave de alfa-1 antitripsina que provoca um desenvolvimento prematuro e acelerado de enfisema panlobular associado à diminuição da função pulmonar e que ocorre tanto em fumantes quanto em não fumantes com deficiência grave. O caráter familiar de obstrução ao fluxo aéreo tem sido observado em irmãos de pacientes com DPOC grave, sugerindo a influência de fatores genéticos nesta suscetibilidade. Os resultados de estudos genéticos, entretanto, têm sido bastante inconsistentes e as variantes genéticas que influenciam o desenvolvimento da DPOC (além da deficiência de alfa-1 antitripsina) não têm sido definitivamente identificadas (Rabe et al., 2007).

Dentre os tipos de exposições inalatórias que predis põem ao desenvolvimento da DPOC estão a fumaça de tabaco, a poeira e os agentes químicos ocupacionais, e a poluição do ar.

Os indivíduos que fumam cigarro têm maior prevalência de sintomas respiratórios e anormalidades na função pulmonar, maior taxa de declínio anual no VEF₁ e maior taxa de mortalidade quando comparados a não fumantes. Outros tipos de tabagismo, populares em vários países, também representam fatores de risco para DPOC. Além disso, a exposição passiva à fumaça de cigarro, que aumenta o impacto total sobre os pulmões de partículas e gases inalados, pode contribuir para a ocorrência de sintomas respiratórios e DPOC. A observação de que apenas parte dos fumantes [estimada em 15 a 20% na maioria dos estudos, ou até 41% em tabagistas acompanhados por mais de 20 anos (Lokke et al., 2006)] desenvolve DPOC clinicamente significativa contribui para a hipótese de interferência de fatores genéticos (Rabe et al., 2007).

As exposições ocupacionais incluem poeiras orgânicas e inorgânicas e agentes químicos. Estas exposições contribuem para 10-20% tanto dos sintomas quanto do comprometimento funcional da DPOC (Balmes et al., 2003).

A poluição doméstica do ar resultante da queima de biomassa em habitações pouco ventiladas também representa um fator de risco importante para a DPOC, principalmente entre mulheres em países em desenvolvimento (Salvi e Barnes, 2009). Os altos níveis de poluição do ar nos grandes centros urbanos também são prejudiciais para os indivíduos com doenças pulmonares e/ou cardíacas pré-existentes, mas a real importância da poluição atmosférica no desenvolvimento da DPOC não está totalmente estabelecida. Outros fatores relevantes para a predisposição à doença são o sexo, as infecções respiratórias, o crescimento e o

desenvolvimento pulmonares, o nível socioeconômico, o estado nutricional e as comorbidades (Rabe et al., 2007).

Pelo fato da DPOC frequentemente se desenvolver em tabagistas de longa data, os pacientes muitas vezes têm uma variedade de doenças relacionadas ao tabagismo e ao envelhecimento (Soriano et al., 2005). Porém, a própria DPOC também tem efeitos extrapulmonares significativos (como perda de massa muscular, anemia, osteoporose, depressão), que levam à presença de comorbidades (Agusti, 2005).

O componente pulmonar manifesta-se inicialmente nos pacientes fumantes com tosse produtiva que ocorre em aproximadamente 50% dos fumantes, pode ser diária ou intermitente e pode preceder a dispnéia ou aparecer simultaneamente a ela. A dispnéia é o principal sintoma associado à incapacidade, redução da qualidade de vida e pior prognóstico. É geralmente progressiva com a evolução da doença e muitos pacientes só a referem numa fase mais avançada da doença (II Consenso Brasileiro sobre DPOC, 2004).

O diagnóstico de DPOC é realizado com base na apresentação clínica dos sintomas e nos exames de espirometria, radiológicos e de gasometria e pH. A espirometria é obrigatória na suspeita clínica da DPOC e deve ser realizada antes e após a administração de broncodilatador e de preferência em uma fase estável da doença. Os parâmetros mais importantes a serem avaliados neste exame são a capacidade vital forçada (CVF), o volume expiratório no primeiro segundo (VEF_1) e a relação VEF_1/CVF . A existência de limitação ao fluxo aéreo é definida pela presença da relação VEF_1/CVF

abaixo de 0,70 pós-broncodilatador (II Consenso Brasileiro sobre DPOC, 2004).

Uma classificação espirométrica simples de gravidade da doença em quatro estágios é proposta por razões educacionais (Tabela 1). As medidas da relação VEF_1/CVF e VEF_1 pós-broncodilatador são recomendadas para o diagnóstico e avaliação da gravidade da DPOC, mas, o grau de reversibilidade da obstrução pulmonar não é mais recomendado para diagnóstico, diagnóstico diferencial com asma, ou prognóstico da resposta ao tratamento de longo prazo com broncodilatadores ou corticóides (Rabe et al., 2007).

Tabela 1. Classificação espirométrica de gravidade da DPOC*	
Estágio I: Leve	$VEF_1/CVF < 0,70$ $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto
Estágio II: Moderado	$VEF_1/CVF < 0,70$ $50 \leq VEF_1 < 80\%$ do previsto
Estágio III: Grave	$VEF_1/CVF < 0,70$ $30 \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto
Estágio IV: Muito grave	$VEF_1/CVF < 0,70$ $VEF_1 < 30\%$ do previsto $VEF_1 < 50\%$ do previsto mais

* baseada no VEF₁ pós-broncodilatador.

VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF: capacidade vital forçada; Insuficiência respiratória: pressão parcial arterial de oxigênio (PaO₂) menor que 8,0 kPa (60mmHg) com ou sem pressão parcial arterial de gás carbônico (PaCO₂) maior que 6,7 kPa (50mmHg) respirando ar ao nível do mar.

1.1. 3 FISIOPATOLOGIA

As alterações características da DPOC são encontradas nas vias aéreas proximais, nas vias aéreas periféricas, no parênquima pulmonar e na vasculatura pulmonar (Hogg, 2004). O processo inflamatório crônico causa alterações dos brônquios (bronquite crônica), alteração dos bronquíolos (bronqueolite obstrutiva) e destruição do parênquima pulmonar (enfisema pulmonar) (II Consenso Brasileiro sobre DPOC, 2004).

A inflamação crônica cursa com aumento da densidade de células inflamatórias específicas em diferentes regiões do pulmão e alterações estruturais resultantes do processo repetido de lesão e reparo. Em geral, estas alterações inflamatórias e estruturais das vias aéreas aumentam com a gravidade da doença e persistem mesmo após o abandono do hábito de fumar (Rabe et al., 2007).

A inflamação nos pacientes com DPOC parece ser uma amplificação da resposta inflamatória normal do sistema respiratório a irritantes crônicos como a fumaça de cigarro. Os mecanismos responsáveis por esta amplificação não são totalmente conhecidos, mas podem ser geneticamente determinados. O estresse oxidativo e o excesso de proteinases no pulmão

também estão envolvidos no mecanismo de lesão inflamatória (Rabe et al., 2007). A inflamação na DPOC envolve diferentes tipos celulares, mas, principalmente neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Barnes et al., 2003).

Os neutrófilos são as células efetoras primárias na DPOC e as proteinases liberadas por estas células, principalmente a elastase, são responsáveis pelas principais alterações estruturais. Alguns estudos têm demonstrado que fumantes apresentam um aumento do número de neutrófilos no tecido pulmonar (Saetta et al., 1997), no escarro (Rutgers et al., 2000) e no lavado broncoalveolar (Martin et al., 1985). Um aumento ainda maior na densidade destas células ocorre com o desenvolvimento da DPOC e está associado à gravidade da doença (Stockley, 2002). O índice de troca gasosa (medida fisiológica mais direta do enfisema) é inversamente proporcional aos níveis de marcadores associados aos neutrófilos em pacientes com DPOC (Ekberg-Jansson et al., 2001). Os neutrófilos destes pacientes também têm resposta quimiotática e atividade proteolítica aumentadas (Burnett et al., 1987) e expressam mais moléculas de adesão (Noguera et al., 2001) em comparação com as células de indivíduos não-fumantes sem DPOC. Além disso, as enzimas neutrofílicas são capazes de causar todas as alterações patológicas características da DPOC incluindo o enfisema, a hipersecreção de muco e a diminuição do batimento ciliar (Sapey e Stockley, 2005).

Um grande aumento na densidade de macrófagos é encontrado nas vias aéreas, no parênquima pulmonar, no lavado broncoalveolar e no escarro de pacientes com DPOC (Barnes, 2005). Estas células estão localizadas nas regiões de destruição das paredes alveolares nos pacientes

com enfisema. Além disso, existe uma correlação entre o número de macrófagos nas vias aéreas e a gravidade da DPOC (Di Stefano et al., 1998). Os macrófagos alveolares possuem a capacidade de secretar um grande número de mediadores inflamatórios incluindo mediadores lipídicos, quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estas células podem ser ativadas por diversos estímulos, incluindo fumaça de cigarro, citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas e estímulos imunes. Os macrófagos de pacientes com DPOC apresentam liberação aumentada de mediadores inflamatórios quando comparados a células de fumantes normais, que, por sua vez, secretam mais mediadores do que macrófagos de indivíduos não fumantes (Barnes, 2005).

Diversos estudos têm identificado as células T CD8+ como o linfócito predominante nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de fumantes com DPOC, embora as células T CD4+ também estejam aumentadas nestes pacientes (Cosio, 2005). O'Shaughnessy e colaboradores (1997) e Saetta e colaboradores (1998) estudando as grandes e as pequenas vias aéreas, respectivamente, mostraram que a única diferença significativa no infiltrado celular inflamatório de fumantes assintomáticos e fumantes com DPOC é que estes últimos apresentavam um aumento de linfócitos CD8+. Além disso, nestes dois estudos houve uma correlação negativa entre a densidade destas células e o grau de obstrução ao fluxo aéreo medido pelo VEF₁. Majo e colaboradores (2001) demonstraram que, em fumantes com DPOC, ambos os linfócitos CD8+ e CD4+ aumentavam de acordo com o aumento da carga tabágica dos mesmos, o que não acontecia com fumantes

normais sugerindo, desta forma, que as células T CD4+ também estão envolvidas no processo inflamatório da DPOC. Estes autores também encontraram um aumento do número de células apoptóticas nos pulmões de fumantes com DPOC e este aumento apresentou uma correlação positiva com o número de linfócitos CD8+ citolíticos nas paredes alveolares. Este e outros estudos que demonstram apoptose aumentada de células pulmonares estruturais em pulmões enfisematosos sugerem que as células T CD8+ induzem apoptose de células epiteliais e endoteliais no enfisema (Cosio, 2005).

Os linfócitos B estão aumentados nas vias aéreas periféricas e no interior de folículos linfóides possivelmente como uma resposta à colonização crônica e infecção das vias aéreas (Hogg et al., 2004).

Na doença estável, os eosinófilos são ocasionalmente descritos, mas não são as células geralmente encontradas na mucosa brônquica de pacientes com DPOC como ocorre na asma leve/moderada. Porém, os eosinófilos podem ser encontrados em maior número na mucosa brônquica de pacientes com DPOC leve ou moderada durante as exacerbações da doença quando comparados com pacientes com DPOC estáveis (Saetta et al., 1994; Zhu et al., 2001). Entretanto, esse aumento de eosinófilos é diferente do aumento descrito na asma. A presença de eosinófilos nas exacerbações da DPOC é transitória e geralmente restrita aos capilares sanguíneos (Di Stefano et al., 2004).

Alguns estudos também demonstraram um aumento de mastócitos em pacientes com DPOC quando comparados com controles sem limitação ao fluxo aéreo (Grashoff et al., 1997; Pesci et al., 1994). Os mastócitos

podem desempenhar um papel na patogênese da DPOC por meio da indução da produção de colágeno, da proliferação de fibroblastos e da liberação de vários mediadores incluindo proteases potentes com a triptase e a quimase (Gosman et al., 2008).

A bronquite crônica está associada à hiperplasia de ambas as células caliciformes epiteliais e as glândulas submucosas das vias aéreas. As mucinas, glicoproteínas complexas que fornecem as propriedades viscoelásticas do muco, são um mecanismo de defesa essencial nas vias aéreas superiores. A regulação destas mucinas está alterada nos pulmões de pacientes com DPOC. As vias aéreas de fumantes contêm mais células caliciformes do que as de não fumantes e a ativação destas células resulta em hipersecreção de muco levando à obstrução das vias aéreas (Rahman, 2005).

Um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio também é encontrado em pacientes com DPOC. Essas espécies reativas podem ser cruciais na amplificação da resposta inflamatória normal dos pulmões à fumaça de cigarro e oxidantes do meio ambiente (agentes nocivos), mas também estão envolvidas no mecanismo protetor contra os efeitos do cigarro por meio da indução de genes antioxidantes. A presença do estresse oxidativo tem consequências importantes em diversos eventos da patogênese da DPOC, como a lesão do epitélio dos espaços alveolares, o sequestro e a migração de neutrófilos para o pulmão, o desequilíbrio entre proteinases e antiproteinases, a hipersecreção de muco, a apoptose e o remodelamento da matriz extracelular (MEC) (Rahman, 2005).

Outro aspecto importante da patogênese da DPOC é o processo de remodelamento pulmonar, que afeta principalmente as pequenas vias aéreas (espessamento, fibrose, perda dos acoplamentos bronquíolo-alveolares) e o parênquima pulmonar (enfisema) (Jeffery, 2004). O enfisema contribui para a limitação ao fluxo aéreo por meio da redução do recolhimento elástico, enquanto as alterações das pequenas vias aéreas aumentam a resistência ao fluxo. Estes dois componentes geralmente coexistem em proporções variadas e interagem para contribuir para a limitação total ao fluxo aéreo (Sturton et al., 2008).

Todos os componentes da MEC (colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos) parecem estar envolvidos no processo de remodelamento pulmonar na DPOC. A parede das pequenas vias aéreas apresenta espessamento causado principalmente por fibrose (Jeffery, 2001). Este espessamento envolve a lâmina própria, o músculo liso e a adventícia (Hogg et al., 2007). Os mecanismos de sinalização para o processo fibrótico começaram a ser elucidados nas vias aéreas grandes e pequenas de animais expostos à fumaça de cigarro (Wang et al., 2003; Wang et al., 2005; Kenyon et al., 2003). Estudos em humanos também demonstraram que a sinalização para o processo fibrótico está aumentada nas células epiteliais das pequenas vias aéreas de fumantes (De Boer et al., 1998; Takizawa et al., 2001). Tanto em animais quanto em humanos, o início desta resposta parece ocorrer via ativação direta do TGF- β 1 pelos constituintes do cigarro, mesmo na ausência de infiltração de células inflamatórias (Churg et al., 2006). Entretanto, oxidantes derivados destas células provavelmente amplificam esta resposta (Wang et al., 2003). Não se sabe, porém, se a

inibição desta sinalização pró-fibrótica resultaria na resolução do espessamento da via aérea e na restauração da função pulmonar.

O processo de remodelamento no enfisema pulmonar é causado principalmente pelo desequilíbrio entre as proteinases e antiproteinases. O enfisema associado à fumaça de cigarro pode ser descrito pelos seguintes eventos: 1) recrutamento de células inflamatórias para o interior dos espaços aéreos terminais do pulmão; 2) liberação, por estas células inflamatórias, de proteinases elastolíticas em maior quantidade do que os inibidores em locais específicos causando lesão da MEC; 3) células estruturais do pulmão são destruídas tanto em resposta à perda da MEC quanto por um evento primário e 4) reparo ineficaz de alvéolos e de fibras elásticas e, provavelmente, de outros componentes da MEC resultando em alargamento dos espaços alveolares (Shapiro, 2005).

Os estudos que avaliaram o conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de indivíduos com DPOC mostraram um aumento bioquímico e histológico de colágeno no parênquima alveolar de indivíduos com enfisema centrilobular (Cardoso et al., 1993; Vlahovic et al., 1999). As fibras elásticas do septo alveolar também estão alteradas nos indivíduos com enfisema, apresentando fragmentação (Finlay et al., 1996). Os estudos, porém, que quantificaram essas fibras mostraram resultados conflitantes. Vlahovic e colaboradores (1999) demonstraram um aumento no volume de septos alveolares com um aumento paralelo de fibras elásticas no tecido pulmonar de pacientes enfisematosos. Outro estudo, porém, mostrou preservação da espessura do septo alveolar e diminuição no conteúdo de fibras elásticas no

tecido pulmonar de pacientes com DPOC quando comparados com indivíduos fumantes sem obstrução (Black et al., 2008).

1. 2 HIPER-RESPONSIVIDADE

A hiper-responsividade das vias aéreas (HRVA), definida como uma resposta constritora exagerada das vias aéreas a diferentes estímulos, é um fenômeno característico da asma (Grootendorst e Rabe, 2004). Entretanto, a prevalência de HR também é alta em pacientes com DPOC, variando de 25% a 87%, dependendo da população estudada (Yan et al., 1985; Kanner et al., 1994; Tashkin et al., 1992).

Enquanto na asma a HRVA é considerada um marcador da inflamação e está relacionada à gravidade da doença, sabe-se muito menos sobre os mecanismos envolvidos na HRVA em pacientes com DPOC (Grootendorst e Rabe, 2004). A HR das vias aéreas na DPOC está associada a uma redução da função pulmonar (Sparrow et al., 1987), a um pior prognóstico (Postma et al., 1991; Tashkin, 1996) e a maior mortalidade (Hospers et al., 2000). Os mecanismos propostos para a HRVA na DPOC incluem inflamação e hipertrofia de músculo liso das vias aéreas, aumento da espessura da parede da via aérea por remodelamento e alterações estruturais no parênquima alveolar (enfisema) (Postma e Kerstjens, 1998). A presença de HRVA em indivíduos com DPOC está associada, portanto, à limitação basal ao fluxo aéreo. Entretanto, estudos que mostram que a HRVA na DPOC está associada ao perfil inflamatório das vias aéreas (Rutgers et al., 2000, Finkelstein et al., 1995), que indivíduos com HRVA têm

um risco aumentado de desenvolver DPOC (Brutsche et al., 2006), e que pacientes com DPOC leve ou precoce apresentam HRVA (Tashkin et al., 1996), sugerem que a HR pode ser uma característica fisiopatológica da DPOC e não um marcador indireto da obstrução das vias aéreas (Postma e Kerstjens, 1998, Grootendorst e Rabe, 2004).

Estudos *in vitro* têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar o papel do músculo liso da via aérea na HR em pacientes com DPOC. De Jongste e colaboradores demonstraram que a resposta de bronquíolos à histamina é significativamente maior em pacientes com DPOC comparada a indivíduos sem a doença (De Jongste et al., 1987). Outros autores também mostraram que bronquíolos isolados de pacientes obstruídos geram uma força isométrica máxima maior em resposta à acetilcolina (ACh) do que bronquíolos de pacientes não obstruídos, sugerindo que uma função alterada do músculo liso periférico pode ser um importante determinante na função anormal das vias aéreas em pacientes com doenças pulmonares obstrutivas (Opazo Saez et al., 2000).

1. 3 TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO

Estudos experimentais têm demonstrado que, não só as vias aéreas, mas também o parênquima alveolar pode responder a agonistas constritores (Fredberg et al., 1993).

A obstrução ao fluxo de ar, característica na DPOC, provoca um aumento da resistência pulmonar que é um fator determinante para o gasto de energia que ocorre durante a respiração. Grande parte dessa resistência

é determinada pelas vias aéreas; porém, tem sido proposto que o pulmão distal pode ter um papel fundamental na resistência pulmonar total. Considera-se pulmão distal as vias aéreas com calibre ≤ 2 mm de diâmetro e o parênquima pulmonar adjacente (Tulic e Hamid, 2002). Tem sido observado que o parênquima pulmonar pode também apresentar aumento de resistência durante uma constrição induzida por agonistas em diferentes modelos animais de asma (Homma et al, 2005; Nagase et al, 1995; Tomioka et al, 2002; Xisto et al, 2005).

Embora a heterogeneidade de constrição da via aérea possa ser responsável pelas alterações observadas na resistência do tecido em resposta a agonistas (Lutchen et al, 1996), um aumento nessa resistência tecidual pode também refletir um papel direto do parênquima na resposta pulmonar total. O local da resposta contrátil do parênquima alveolado ainda não está totalmente estabelecido. Os mecanismos que podem estar potencialmente envolvidos nesta resposta são: a contração de miofibroblastos ou células intersticiais contráteis (Kapanci et al, 1974, Fukui et al, 1996), alterações mecânicas da matriz extracelular, contração de células musculares lisas ao nível de ductos alveolares, de pequenas vias aéreas ou de vasos presentes no tecido pulmonar periférico (Lai et al, 1994; Ludwig, 1997).

Fatias de parênquima pulmonar submetidas a oscilações sinusoidais *in vitro* podem ser usadas com o objetivo de determinar o comportamento mecânico do tecido, uma vez que representam exclusivamente as unidades distais do tecido pulmonar e permitem uma melhor avaliação das propriedades puras do tecido (Fust et al, 2004; Leite-Junior et al, 2003).

Foi demonstrado anteriormente que o tecido pulmonar periférico humano é capaz de apresentar uma resposta contrátil à ACh *in vitro* com aumento de resistência e elastância. Nesse estudo, não houve diferença na resposta contrátil entre as fatias de tecido pulmonar com ou sem vias aéreas. Esses resultados sugerem que a resposta à acetilcolina ocorre em nível de parênquima pulmonar e independe da presença de vias aéreas no tecido analisado (Dolhnikoff et al, 1998). Entretanto, não se sabe se esta contratilidade do parênquima está alterada na DPOC. Embora seja bem conhecido que o grau de limitação ao fluxo aéreo em pacientes com DPOC é amplamente determinado por alterações inflamatórias e estruturais das pequenas vias aéreas e do parênquima pulmonar, não se sabe se uma contratilidade alterada em um nível distal pode ser parte do mecanismo de HR e obstrução na DPOC.

Com o objetivo de investigar se a resposta contrátil do pulmão distal poderia contribuir para a patogênese da HR na DPOC, foi analisado o comportamento mecânico dinâmico de fatias de parênquima pulmonar periférico de pacientes com DPOC antes e durante uma constrição induzida por ACh, e este comportamento foi comparado ao de controles não fumantes. Também foi investigado se essas alterações mecânicas do parênquima *in vitro* se correlacionam com parâmetros estruturais e inflamatórios do tecido pulmonar e com a função pulmonar *in vivo*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a mecânica do tecido pulmonar periférico de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e compará-la à de indivíduos controles em situação basal e em resposta a um agonista constritor.
- Analisar as possíveis correlações entre a mecânica do tecido pulmonar e os parâmetros morfológicos (inflamatórios e estruturais) das fatias de tecido pulmonar.

- Analisar as possíveis correlações entre a mecânica do tecido pulmonar e parâmetros clínicos (idade e tempo de fumo) e dados da prova de função pulmonar.

Métodos

3. MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HCFMUSP), sob o protocolo número 086/03 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo (Anexo B).

Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

3.1 CASUÍSTICA

Os indivíduos incluídos neste estudo foram separados em dois grupos, de acordo com os seguintes critérios:

Grupo DPOC: pacientes tabagistas ou ex-tabagistas com diagnóstico clínico de doença pulmonar obstrutiva crônica e obstrução na prova de função pulmonar (Rabe et al., 2007).

Grupo controle: indivíduos não-tabagistas sem doença pulmonar prévia e sem obstrução à prova de função pulmonar ($VEF_1/CVF > 0,70$).

No período entre 2003 e 2006, foi coletado tecido pulmonar periférico de 63 pacientes submetidos à cirurgia de ressecção pulmonar para retirada de tumor primário ou metastático. Destes pacientes, 17 foram excluídos por não apresentarem dados de prova de função pulmonar.

Dos 46 pacientes restantes, 26 indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas foram excluídos por não preencherem os critérios clínico-funcionais de DPOC. O grupo DPOC foi então constituído por 10 pacientes fumantes ou ex-fumantes com diagnóstico de DPOC, submetidos à ressecção pulmonar para retirada de neoplasia. O grupo controle foi constituído por 10 indivíduos não-fumantes, sem doença pulmonar prévia, submetidos à ressecção pulmonar para retirada de nódulos metastáticos ou para retirada de lesões pulmonares isoladas, benignas, diagnosticadas aos exames de imagem.

Os dados demográficos e de função pulmonar foram obtidos por meio de revisão dos prontuários.

3.2 OBTENÇÃO DO TECIDO

Fragments de tecido pulmonar foram obtidos no centro cirúrgico imediatamente após a ressecção pulmonar. O tecido foi coletado nas áreas livres de tumor, correspondendo às regiões mais periféricas do segmento pulmonar retirado na cirurgia. O tecido foi transportado do centro cirúrgico

em solução de Krebs (mM: NaCl, 118; KCl, 4,5; NaHCO₃, 25,5; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; glicose 10; Sigma Chemical, St. Louis, MO).

3.2 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO

Dos fragmentos coletados de tecido pulmonar foram então obtidas uma ou duas fatias subpleurais (10 x 2 x 2 mm), dependendo da quantidade de material disponível. O comprimento de repouso (L_r) e o peso úmido (W_0) de cada fatia foram medidos. Clipes de metal foram colados com cianocrilato em cada extremidade da fatia e, por meio de hastes de aço (0,5 mm de diâmetro) acopladas aos clipes de metal, uma extremidade da fatia pulmonar foi conectada a um transdutor de força (modelo 404A; Aurora Scientific Inc., Ontário, Canadá) e a outra extremidade foi conectada a um braço oscilatório servo-controlado (modelo 300B; Aurora Scientific Inc., Ontário, Canadá). O braço oscilatório é capaz de realizar excursões de 8 mm e resoluções de comprimento de 1 μ m e foi, por sua vez, conectado a um gerador (modelo 3030; BK Precision, Califórnia, USA) que controla a frequência, a amplitude e a forma de onda das oscilações. A tensão de repouso (T) foi obtida pela movimentação de um parafuso de microscópio adaptado ao equipamento que realizava lentos deslocamentos verticais do transdutor de força. Os sinais de força e comprimento foram convertidos de analógico para digital com auxílio de um conversor e gravados em um computador compatível. As fatias foram pré-condicionadas por ciclos lentos de tensão de 1 a 2 g por três vezes e, após o terceiro ciclo, foram fixadas em 1g e mantidas no banho orgânico contendo solução de Krebs aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

por 50 minutos para permitir um *stress relaxation*. Durante este tempo, a solução de Krebs foi trocada a cada 15 minutos. A frequência de oscilação foi 0,25 Hz e a amplitude foi de 2,5% de L_r . Após estes 50 minutos, a tensão final de repouso era aproximadamente 0,8g (Figuras 1 e 2).

Após o período de *stress relaxation*, medidas basais de resistência (R) e elastância (E) foram obtidas por 5 minutos e após a adição de acetilcolina (ACh) 10^{-3} M (Sigma Chemical, St. Louis, MO) por mais 15 minutos. A concentração final de ACh no banho orgânico foi de 0,17mg/ml.

A resistência e a elastância foram estimadas pela equação (Lauzon, 1991):

$$(1) \quad T = E\Delta l + R (\Delta l/\Delta t) + K$$

Onde T = tensão, l = comprimento, $\Delta l/\Delta t$ = é a alteração de comprimento por unidade de tempo, e K é uma constante que reflete a tensão de repouso. Os resultados foram padronizados para o tamanho de cada fatia. A área de secção transversal (A_0) da fatia de tecido pulmonar foi obtida pela fórmula:

$$(2) \quad A_0 (\text{cm}^2) = W_0 / (\rho \times L_r)$$

Onde ρ é a densidade de massa do tecido adotada como $1,06 \text{ g cm}^{-3}$, W_0 é o peso úmido em gramas e L_r é a tensão em repouso em cm. Os valores de R e E foram multiplicados por L_r/A_0 . Após a oscilação mecânica, as fatias foram fixadas em formalina 10% por 48 horas e emblocadas em parafina para análise histológica.

FIGURA 1. Esquema da mecânica do tecido pulmonar periférico. As fatias de tecido pulmonar periférico foram conectadas a um transdutor de força e a um braço oscilatório e foram suspensas em um banho orgânico (solução de Krebs).

FIGURA 2. Fotografia do equipamento de análise da mecânica do tecido pulmonar periférico.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Cortes de 5 μm de espessura das fatias de parênquima pulmonar foram coradas pelo método de histoquímica com hematoxilina e eosina para análise histológica de rotina, com coloração de Luna para identificação de eosinófilos (Luna, 1986; Watanabe, 2004) e com Picro-Sirius e Resorcina-Fucsina para avaliação do conteúdo de fibras colágenas e de fibras elásticas, respectivamente (Dolhnikoff et al., 1999; Lanças et al., 2006). As fatias pulmonares foram também submetidas à reação imuno-histoquímica para quantificação de células positivas para α -actina de músculo liso (AML), neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos CD8+ e CD4+. A Tabela 1 apresenta os respectivos anticorpos utilizados em cada coloração.

Para a análise imuno-histoquímica, os blocos foram desparafinizados e uma solução de peróxido de hidrogênio foi aplicada por 35 minutos para inibir a atividade de peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada com solução citrato por 45 minutos, exceto no caso da coloração para neutrófilos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário overnight a 4°C. O kit LSAB® Plus-HRP (K-0690 DAKO Corporation, Carpinteria, USA) foi usado como anticorpo secundário e, como cromógeno, foi usado o 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris.

Com o método de morfometria convencional (Weibel e Cruz-Orive, 1997) foi avaliada a densidade de células inflamatórias no parênquima e proporção de volume de células positivas para α -AML das fatias pulmonares. Utilizando-se um retículo de 100 pontos (com área de 43,312 μm^2 no

aumento de 400x) acoplado à ocular do microscópio foi quantificado o número de pontos que incidiam no tecido alveolar e o número de células inflamatórias em cada campo (Figura 3). A densidade de células inflamatórias foi determinada pelo número de células positivas dividido pela área de tecido. A contagem foi realizada em 15 campos em um aumento de 400x e os resultados foram expressos por células/mm². A proporção de volume de células α -AML+ foi determinada pela divisão entre o número de pontos que incidiam nas células α -AML+ e o número total de pontos que incidiam no tecido das fatias pulmonares. As medidas foram realizadas em 10 campos em um aumento de 400x.

A proporção de vias aéreas, vasos sanguíneos e parênquima nas fatias pulmonares também foi avaliada por morfometria e determinada pelo número de pontos que incidiam respectivamente nas paredes das vias aéreas, nas paredes dos vasos sanguíneos e nos septos alveolares divididos pelo número total de pontos incidiam no tecido das fatias pulmonares. As medidas foram realizadas em um aumento de 200x em todo o comprimento da fatia.

O conteúdo de fibras colágenas e de fibras elásticas das fatias de tecido pulmonar periférico foi obtido por análise de imagem utilizando-se o software Image-Pro® Plus 4.1 for Windows® (Media Cybernetics—Silver Spring, MD, USA) em um computador compatível conectado a uma câmera digital acoplada a um microscópio ótico (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany). A área de fibras colágenas e elásticas do tecido alveolar foi medida em toda extensão de cada fatia. A proporção de volume

de fibras colágenas e elásticas no tecido alveolar foi obtida pela divisão entre a área positiva e a área total de parênquima (Figura 4).

TABELA 2. Anticorpos e métodos utilizados nas colorações de imuno-histoquímica.

Anticorpos	Pré-tratamento	Espécie	Clone	Diluição	Origem
α -smooth muscle actin	Citrato	Mouse	1A4	1:500	Dako, DNK
Neutrophil elastase	-	Mouse	NP57	1:300	Dako, DNK
Mast Cell	Citrato	Mouse	AA1	1:1200	Dako, DNK
Macrophage	Citrato	Mouse	KP1	1:3200	Dako, DNK
CD4	Citrato	Mouse	OPD4	1:400	Dako, DNK
CD8	Citrato	Mouse	C8/144B	1:50	Dako, DNK

FIGURA 3. Demonstração do método de morfometria convencional. A: fotomicrografia de uma fatia de tecido pulmonar periférico com coloração imuno-histoquímica para linfócitos CD8+ (aumento de 400x) e B: retículo utilizado sobre o mesmo campo da figura A. A densidade celular foi determinada pelo número de células dividido pela área de tecido.

FIGURA 4. Demonstração do método de análise de imagem. A: fotomicrografia (aumento de 200x) de uma fatia de tecido pulmonar periférico corado com Picro-Sirius (análise de fibras colágenas); B: marcação da luz alveolar (azul) que subtraída da área total da figura resulta na área total de tecido e C: marcação da área de fibras colágenas (azul). Determina-se a densidade de fibras colágenas neste campo de análise dividindo-se a área corada da figura 4C pela área total de tecido.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS 15.0® (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Após aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov, as variáveis foram submetidas ao teste T de *Student* ou ao teste de *Mann-Whitney* para comparação dos diferentes parâmetros entre os dois grupos. As correlações entre os parâmetros mecânicos, morfológicos e funcionais foram realizadas pelos testes de Pearson ou Spearman. Os resultados foram expressos por média±DP. O nível de

significância foi estabelecido como $p < 0.05$ para todas as análises (Zar, 1984).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E DE FUNÇÃO PULMONAR

A tabela 3 mostra os dados demográficos e de prova de função pulmonar dos pacientes dos dois grupos. A média de idade foi significativamente maior no grupo DPOC quando comparado ao grupo controle ($p=0,039$). Houve uma diferença de gênero entre os grupos com uma predominância de pacientes do sexo masculino no grupo DPOC e de pacientes do sexo feminino no grupo controle. Todos os pacientes do grupo controle eram não fumantes e no grupo DPOC 5 pacientes eram tabagistas e 5 ex-tabagistas com uma média de consumo de cigarro de $70,8 \pm 10,3$ anos/maço.

As médias dos valores de VEF_1 , $\%VEF_1$ e VEF_1/CVF foram, respectivamente, 34,3% ($p=0,024$), 43,4% ($p=0,001$) e 35,6% ($p<0.001$) menores no grupo DPOC quando comparados ao grupo controle. Dentre os pacientes do grupo DPOC, 2 foram classificados como DPOC leve e 5 como DPOC moderado de acordo com a classificação proposta pela *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) (Rabe et al., 2007).

TABELA 3. Dados demográficos e de prova de função pulmonar dos grupos controle e DPOC.

	Controle	DPOC
Idade (anos)	54±6	67±4*
Gênero	2M:8F	8M:2F
Tabagismo (anos/maço)	--	70,8±10,3
Fumantes/Ex-fumantes	--	5/5
VEF ₁ (L)	2,33±0,59	1,75±0,44*
VEF ₁ , (%pred.)	100,11±16,08	69,82±15,43*
VEF ₁ /CVF	0,80±0,05	0,59±0,07*

Valores expressos em média±DP.

M: masculino; F: feminino; *p≤0,04 comparado ao grupo controle.

VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo;

%pred: porcentagem do VEF₁ predito; CVF: capacidade vital forçada.

4.2 MECÂNICA DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO

As figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, os valores de resistência e elastância (basais e após adição de acetilcolina) nos dois grupos estudados. Foi observado um aumento significativo nos valores de R e E ($p \leq 0,003$ e $p \leq 0,023$, respectivamente) após adição de ACh quando comparados aos respectivos valores basais em ambos os grupos. Além disso, os valores de R pós-ACh foram significativamente maiores no grupo DPOC quando comparado ao grupo controle ($p = 0,032$). A intensidade de resposta foi calculada como a porcentagem de aumento de R e E após desafio com acetilcolina em relação aos valores basais (Figuras 7 e 8). A porcentagem de aumento de R foi significativamente maior no grupo DPOC quando comparado ao grupo controle ($p = 0,024$). Porém, nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de aumento de E entre os dois grupos.

FIGURA 5. Gráfico dos valores de resistência basais e pós-ACh nos grupos controle e DPOC (* $p \leq 0,003$ comparado aos valores basais; # $p = 0,032$ comparado ao grupo controle).

FIGURA 6. Gráfico dos valores de elastância basais e pós-ACh nos grupos controle e DPOC (* $p \leq 0,023$ comparado aos valores basais).

FIGURA 7. Gráfico das porcentagens de aumento de resistência (%Resistência) dos grupos controle e DPOC (* $p=0,024$ quando comparado ao grupo controle).

FIGURA 8. Gráfico das porcentagens de aumento de elastância (%Elastância) dos grupos controle e DPOC.

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As densidades de células inflamatórias no tecido alveolar dos pacientes dos dois grupos são apresentadas na Tabela 4. Foi observado um aumento significativo na densidade macrófagos e linfócitos CD8+ no grupo DPOC quando comparado ao grupo controle ($p=0,04$ e $p=0,017$, respectivamente). Não houve diferença significativa nas densidades de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos CD4+.

TABELA 4. Densidade alveolar de células inflamatórias das fatias de tecido pulmonar.

	Controle	DPOC
Macrófagos	278,79±151,29	528,65±322,91*
Neutrófilos	124,74±127,51	303,47±262,42
Eosinófilos	25,44±19,36	62,26±69,03
Mastócitos	277,46±131,06	302,96±92,16
Linfócitos CD4+	68,15±68,59	65,84±37,32
Linfócitos CD8+	87,20±48,83	157,95±60,35*

Valores expressos em média±DP.

* $p \leq 0,04$ comparado ao grupo controle.

A análise dos componentes estruturais na totalidade das fatias de parênquima pulmonar mostrou uma média de 3,6±5,5% de vias aéreas, 16,7±8,3% de vasos sanguíneos e 79,6±9,7% de tecido alveolar. Em seis fatias do grupo DPOC e nove fatias do grupo controle, nenhuma via aérea foi identificada.

A tabela 5 mostra os valores de proporção de volume de células positivas para α -actina de músculo liso e de fibras colágenas e elásticas das fatias de tecido pulmonar. O grupo DPOC apresentou uma diminuição

significativa no conteúdo de fibras elásticas quando comparado ao grupo controle ($p=0,004$). Não houve diferença no conteúdo de células α -actina+ e de fibras colágenas entre os dois grupos estudados.

TABELA 5. Proporção de volume de células positivas para α -actina de músculo liso e de fibras colágenas e elásticas das fatias de tecido pulmonar.

	Controle	DPOC
Células α -actina+	0,15 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,04
Fibras colágenas	0,23 $\pm$ 0,10	0,18 $\pm$ 0,12
Fibras elásticas	0,18 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,04*

Valores expressos em média $\pm$ DP.

* $p=0,004$ em relação ao grupo controle.

4.4 CORRELAÇÕES

A tabela 6 mostra as correlações entre os valores de mecânica do tecido pulmonar periférico e os parâmetros morfológicos de densidade alveolar de células inflamatórias e de proporção de volume de células positivas para α -actina de músculo liso, fibras colágenas e fibras elásticas das fatias pulmonares dos grupos controle e DPOC. Foram observadas correlações significativas positivas entre a densidade alveolar de eosinófilos e os valores de RACH, EACH, %R e %E; entre a densidade alveolar de macrófagos e os valores de RACH e entre a densidade alveolar de linfócitos CD8+ e %R. Foram observadas também correlações significativas negativas entre a proporção de volume de fibras elásticas e os valores de Rbasal, Ebasal, RACH e EACH.

TABELA 6. Correlações entre os valores de mecânica e os parâmetros morfológicos dos grupos controle e DPOC (valores de r)*.

	Rbasal	RACH	%R	Ebasal	EACH	%E
Neutrófilos	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Eosinófilos	NS	0,39 (0,043)	0,58 (0,001)	NS	0,39 (0,039)	0,42 (0,026)
Macrófagos	NS	0,58 (0,001)	NS	NS	NS	NS
Mastócitos	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Linfócitos CD4+	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Linfócitos CD8+	NS	NS	0,44 (0,031)	NS	NS	NS
Células α -actina+	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Fibras colágenas	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Fibras elásticas	-0,49 (0,004)	-0,41 (0,017)	NS	-0,39 (0,025)	-0,42 (0,015)	NS

Rbasal=resistência basal; RACH=resistência pós-ACh; %R=porcentagem de aumento de resistência pós-ACh;
Ebasal=elastância basal; EACH=elastância pós-ACh; %E= porcentagem de aumento de elastância pós-ACh

Os dados são apresentados como: valores de r (p).

NS=não significantes.

Em relação às correlações entre os parâmetros morfológicos entre si, houve uma correlação negativa significativa entre o conteúdo de fibras elásticas das fatias pulmonares e a densidade alveolar de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ (Figura 9).

FIGURA 9. Gráficos das correlações entre a proporção de volume de fibras elásticas e a densidade alveolar de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ dos grupos controle e DPOC.

As correlações entre os dados da prova de função pulmonar e os parâmetros: idade, valores de mecânica do tecido pulmonar periférico e parâmetros morfológicos dos grupos controle e DPOC mostraram uma correlação positiva significativa entre a idade e os valores de VEF_1 e da relação VEF_1/CVF ($r = -0,620$; $p = 0,003$ e $r = -0,450$; $p = 0,045$, respectivamente). Foi observada, também, uma correlação negativa significativa entre a %R e os valores da relação VEF_1/CVF ($r = -0,450$; $p = 0,046$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a resposta contrátil do tecido pulmonar periférico está aumentada em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e que esta resposta está associada tanto à densidade de eosinófilos e de linfócitos CD8+ no tecido alveolar quanto ao grau de obstrução determinado pela prova de função pulmonar.

Tem sido proposto que a hiper-responsividade de vias aéreas em pacientes com DPOC é amplamente dependente da limitação basal ao fluxo aéreo e pode representar um epifenômeno da redução do calibre das vias aéreas (Grootendorst e Rabe, 2004). Entretanto, o fato de pacientes com

DPOC leve ou precoce (que possuem, portanto, uma obstrução leve ao fluxo aéreo) apresentarem hiper-responsividade brônquica sugere que esta resposta exagerada pode ser uma característica fisiopatológica da DPOC e não uma consequência da obstrução das vias aéreas (Tashkin, 1996; Postma e Kerstjens, 1998; Grootendorst e Rabe, 2004). Poucos estudos em humanos têm investigado esta questão com uma análise de pequenas vias aéreas isoladas *in vitro*. De Jongste e colaboradores (1987) demonstraram que pacientes com DPOC apresentam uma resposta bronquiolar aumentada em resposta à histamina quando comparados a pacientes sem a doença. Opazo Saez e colaboradores (2000) também demonstraram que as pequenas vias aéreas de pacientes asmáticos ou com DPOC apresentam uma resposta à acetilcolina aumentada quando comparados a pacientes controles não obstruídos. No presente estudo, a oscilação mecânica de fatias de tecido pulmonar humano permitiu que o comportamento do parênquima pulmonar periférico de pacientes com DPOC fosse avaliado pela primeira vez, observando-se uma maior responsividade do tecido desses indivíduos quando comparado a controles. Os estudos experimentais citados acima, analisados em conjunto, reforçam a hipótese de que a hiper-responsividade seja uma característica fisiopatológica da DPOC.

Uma vez que as alterações do parênquima pulmonar são importantes determinantes da obstrução de vias aéreas na DPOC, torna-se relevante avaliar se uma resposta contrátil aumentada também ocorre neste nível. Além disso, o estudo funcional do pulmão distal nas doenças obstrutivas pode contribuir para uma melhor abordagem terapêutica dos pacientes. Um dos obstáculos para uma possível resolução da lesão nas pequenas vias

aéreas está no acesso de novas drogas a este compartimento relativamente inacessível. As terapias atuais são administradas por via inalatória e estudos anteriores têm demonstrado que as partículas normalmente utilizadas, em torno de 3 a 5 μM , são excelentes para alcançar as vias aéreas de condução, mas que para atingir as pequenas vias aéreas é necessário a utilização de partículas menores, em torno de 1 μM (Tashkin, 1999; Dolovich et al., 2005).

A fatia de tecido pulmonar periférico é composta principalmente por parênquima pulmonar com uma pequena porção de pequenas vias aéreas e vasos e tem sido usada como um modelo para avaliação do comportamento mecânico do parênquima pulmonar (Ludwig et al., 1994). Foi demonstrado anteriormente que fatias de tecido pulmonar humano podem responder a um desafio com ACh mesmo na ausência de pequenas vias aéreas (Dolhnikoff et al., 1998). No presente estudo observamos que 6 de 16 fatias pulmonares do grupo DPOC não apresentavam vias aéreas na análise morfológica. De maneira interessante, as fatias sem vias aéreas mostraram uma resposta semelhante àquelas que continham pequenas vias aéreas sugerindo, desta forma, que, tanto as pequenas vias aéreas quanto o tecido alveolar contribuíram para a resposta contrátil aumentada nos pacientes com DPOC.

Em pulmões normais, o efeito de ancoramento do parênquima pulmonar é crucial para a manutenção da patência das vias aéreas e tem sido sugerido que a contratilidade do parênquima poderia representar um fator protetor ao estreitamento das vias aéreas (Hoppin, 1995). Entretanto, se os acoplamentos alveolares estão rompidos, como no enfisema centrilobular, por exemplo, a ligação entre a via aérea e o parênquima

adjacente se altera favorecendo o estreitamento da luz bronquiolar. Nesta situação, a contratilidade alveolar poderia aumentar o efeito de ruptura dos septos e a perda da interdependência via aérea-parênquima.

Uma limitação deste estudo foi a ausência de testes de broncoprovocação *in vivo* e, portanto, a impossibilidade de analisar uma relação entre as respostas a agonistas *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, observou-se uma correlação fraca, mas significativa, entre a intensidade de resposta tecidual à ACh (%R) e o grau de obstrução determinado pela prova de função pulmonar (VEF₁/CVF), o que reforça a idéia de que a hiper-responsividade na DPOC está associada à perda de função pulmonar e à gravidade da doença (Postma e Kerstjens, 1998; Tashkin et al., 1992).

Embora neste estudo os pacientes do grupo controle sejam significativamente mais jovem que os do grupo DPOC, é improvável que a idade tenha influenciado os resultados, pois, estudos anteriores demonstraram que uma idade maior não representa um risco aumentado para hiper-responsividade e que, em qualquer idade, a atopia e o calibre das vias aéreas são considerados os maiores determinantes da hiper-reatividade na população geral (Britton et al., 1994).

Houve uma diferença na proporção de gênero entre os dois grupos com predominância de pacientes do sexo masculino no grupo DPOC e de pacientes do sexo feminino no grupo controle. Está bem estabelecido na literatura o fato de que mulheres apresentam uma maior prevalência de HR de vias aéreas quando comparadas aos homens (Kanner et al., 1994; Manfreda et al., 2004; Langdeau et al., 2009). Portanto, é possível que os resultados deste estudo estejam subestimados.

Os mecanismos envolvidos na resposta alveolar a um agonista não são totalmente compreendidos e podem envolver a contração de células musculares lisas dos ductos alveolares ou miofibroblastos alveolares. Esta resposta contrátil também pode ser dependente do grau e do tipo de inflamação alveolar e da composição da matriz extracelular (Lanças et al., 2006). Não foram observadas diferenças no conteúdo de actina entre o grupo DPOC e o grupo controle e não houve correlação entre o conteúdo de actina e a resposta tecidual. Estes resultados sugerem que a responsividade aumentada no grupo DPOC pode estar associada a uma alteração na função contrátil do tecido e não a uma alteração na massa muscular.

Assim como em outros estudos anteriores (Jeffery, 2004; Di Stefano et al., 2004; Saetta et al., 1999), observamos um aumento na densidade alveolar de linfócitos CD8+ e macrófagos nos pacientes com DPOC. Poucos estudos investigaram a relação entre a inflamação e a hiper-responsividade na DPOC. Rutgers e colaboradores (2000) demonstraram que a hiper-responsividade à AMP na DPOC está associada a um aumento na densidade de células CD8+ nas paredes das vias aéreas e a um número maior de eosinófilos no escarro. No presente estudo também foi observada uma associação entre a magnitude da resposta tecidual e a densidade alveolar de células CD8+ e, embora a densidade de eosinófilos no parênquima não tenha sido significativamente diferente entre os dois grupos, foi observada uma correlação positiva significativa entre a quantidade de eosinófilos e a %R. Um possível mecanismo envolvido na resposta tecidual contrátil poderia ser a liberação de mediadores broncoconstritores pelos eosinófilos como os leucotrienos e o PAF (platelet activating factor).

Acredita-se que esse mesmo mecanismo ocorra *in vivo* e poderia explicar a associação entre a inflamação eosinofílica de vias aéreas e a hiper-responsividade nas exacerbações da DPOC (White et al., 2003). Outro mecanismo possível poderia ser a liberação de ACh por via extra-neuronal mediada pela inflamação e a ativação de receptores muscarínicos nos linfócitos T e/ou no músculo liso das vias aéreas periféricas (Barnes, 2004). A análise dos receptores muscarínicos no tecido pulmonar periférico de pacientes com DPOC certamente contribuiria para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil aumentada do pulmão distal destes pacientes.

Ao contrário de alguns estudos anteriores que mostraram um aumento bioquímico e histológico de colágeno alveolar no enfisema centrilobular, este estudo não apontou diferenças significativas no conteúdo de colágeno entre os dois grupos (Cardoso et al., 1993; Vlahovic et al., 1999). O contraste entre estes resultados pode estar relacionado a diferenças na caracterização dos pacientes e nas amostras de tecido, uma vez que não foram selecionados pulmões enfisematosos pela análise morfométrica. Embora todos os pacientes do grupo DPOC sejam obstruídos, não se sabe quantos apresentavam enfisema. Os estudos que investigaram o conteúdo elástico do tecido alveolar na DPOC mostraram tanto redução (Black et al., 2008) quanto aumento (Vlahovic et al., 1999) de fibras elásticas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nos valores de elastância entre os dois grupos, houve uma diminuição significativa no conteúdo de fibras elásticas nas fatias de tecido pulmonar do grupo DPOC quando comparadas às do grupo controle. Além disso, houve uma correlação

negativa significativa entre o conteúdo de fibras elásticas e a densidade de neutrófilos no parênquima pulmonar, indicando o papel destas células na lesão tecidual neste grupo de pacientes.

Portanto, os resultados deste estudo mostram que a resposta colinérgica de fatias de parênquima pulmonar periférico está aumentada em pacientes com DPOC e está associada à infiltração de eosinófilos e linfócitos CD8+ no tecido alveolar, reforçando a idéia de que a hiper-responsividade é uma característica fisiopatológica da DPOC e que não está restrita às vias aéreas, coexistindo em um nível pulmonar mais distal. O significado fisiopatológico deste comportamento do tecido pulmonar no mecanismo de hiper-responsividade *in vivo* deve ser ainda investigado.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica apresentam maior resposta contrátil do tecido pulmonar periférico em relação a indivíduos controles.
- A responsividade do tecido pulmonar periférico de pacientes com DPOC está associada tanto à inflamação tecidual eosinofílica e de linfócitos CD8+, quanto ao grau de obstrução ao fluxo aéreo determinado pela prova de função pulmonar.

Anexos

7. ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

ANEXO A. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq - HCFMUSP)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.09.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **086/03**, intitulado: "**Oscilação mecânica de tecido pulmonar periférico em pacientes com doenças obstrutivas: resposta a agentes broncoconstritores**" apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: **PROFA. DRA. MARISA DOLHNIKOFF**

CAPPesq, 10 de Setembro de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

ANEXO B. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C.

Camargo.

São Paulo, 09 de maio de 2002

À

Dra. Marisa Dolhnikoff

Ref. Comunicação da Comissão de Ética em Pesquisa

Projeto: "Oscilação Mecânica de Tecido Pulmonar Periférico em Pacientes com Doenças

Obstrutivas: Resposta a Agentes Broncoconstritores". (CEP – n.º 415/02)

Prezada Dra. Marisa,

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 30/04/2002. Os membros desta comissão **aprovaram** a realização deste estudo. Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Agnaldo Anelli

Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa

C/c: Prof. Dr. Riad Naim Younes / Dr. Fábio José Haddad / Dr. Jeferson Gross / Dr. Daniel Deheinzelin / Dr. David Itiro Kasahara / Dra. Elnara Márcia Negri / Prof. Dr. Milton de Arruda Martins / Prof. Dr. Paulo Hilário N. Saldiva.

Comissão de Ética em Pesquisa - CEP

Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP
CEP – 01509-900 – Tel. (0**11) 3272-5000 ramal 1117

ANEXO C. Tabela de dados dos pacientes do estudo.

Casos	Classificação	Iniciais	Sexo	Idade	Hospital	Tabagismo
SH - 26	Controle	MSE	F	65	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 30	Controle	JJ	F	61	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 31	Controle	AMBV	F	73	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 40	Controle	FTK	F	53	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 49	Controle	TMR	F	62	HC	Não tabagista
SH - 57	Controle	BSR	F	52	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 59	Controle	JCS	F	58	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 63	Controle	FADP	M	19	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 71	Controle	JLO	M	33	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 74	Controle	MFB	F	60	A.C. Camargo	Não tabagista
SH - 46	DPOC	CROS	M	58	HC	Ex-tabagista (67 a/m). Parou há 1 mês.*
SH - 47	DPOC	HT	M	71	HC	Ex-tabagista (36 a/m). Parou há 7 meses.*
SH - 48	DPOC	EG	F	41	A.C. Camargo	Tabagista (40 a/m)
SH - 51	DPOC	HF	F	64	HC	Tabagista (50 a/m)
SH - 61	DPOC	RCL	M	79	A.C. Camargo	Tabagista (60 a/m)
SH - 77	DPOC	PSV	M	72	HC	Tabagista (90 a/m)
SH - 88	DPOC	GAS	M	65	HC	Tabagista (75 a/m)

SH - 50	DPOC	ATS	M	75	HC	Ex-tabagista (60 a/m). Parou há 6 meses.*
SH - 73	DPOC	NBV	M	75	A.C. Camargo	Ex-tabagista (150 a/m). Parou há 5 anos.*
SH - 50	DPOC	JAF	M	74	HC	Ex-tabagista (80 a/m). Parou há 10 anos.*

* Cessação do tabagismo referente à data em que o tecido pulmonar foi coletado.

ANEXO D. Tabelas de dados utilizados na análise estatística do estudo.

Caso	Classificação	Resistência basal (N.s/m ²)	Resistência Pós-Acetilcolina (N.s/m ²)	Aumento resistência (%)	Elastância Basal (N/m ²)	Elastância Pós-Acetilcolina (N/m ²)	Aumento elastância (%)
SH - 26	Controle	1348,63	1360,28	0,86	23320,75	23324,91	0,02
SH - 30	Controle	4081,11	4615,33	13,09	83321,73	86559,87	3,89
SH - 31	Controle	2760,63	3006,68	8,91	54144,51	55716,10	2,90
SH - 40	Controle	2975,14	3434,58	15,44	63793,79	82105,91	28,71
SH 57- A	Controle	3742,49	4404,19	17,68	58483,49	64972,22	11,09
SH 57 - B	Controle	3718,98	4657,41	25,23	63450,60	73990,94	16,61
SH 59 - A	Controle	1336,78	1385,68	3,66	27286,43	28027,16	2,71
SH 59 - B	Controle	3022,75	3062,98	1,33	59750,45	59889,79	0,23
SH 63 - A	Controle	3684,52	3760,97	2,07	67386,74	69124,31	2,58
SH 63 - B	Controle	2661,07	2767,46	4,00	52453,25	54333,03	3,58
SH 71 - A	Controle	5734,21	5894,35	2,79	98769,60	103803,70	5,10
SH 71 - B	Controle	1915,90	2229,25	16,36	39226,77	43243,00	10,24
SH 74 - A	Controle	5977,45	6207,21	3,84	103859,10	104597,20	0,71
SH 74 - B	Controle	4042,51	4479,73	10,82	59878,15	64476,62	7,68
SH 49 - A	Controle	2864,96	3323,90	16,02	43466,17	49701,47	14,35
SH 49 - B	Controle	3753,12	4506,70	20,08	74418,90	79892,34	7,35

Caso	Classificação	Resistência basal (N.s/m ²)	Resistência Pós-Acetilcolina (N.s/m ²)	Aumento resistência (%)	Elastância Basal (N/m ²)	Elastância Pós-Acetilcolina (N/m ²)	Aumento elastância (%)
------	---------------	---	--	-------------------------	--------------------------------------	---	------------------------

SH - 46	DPOC	10808,49	13688,22	26,64	149575,60	152898,10	2,22
SH - 47	DPOC	3010,08	3300,53	9,65	58267,38	61519,75	5,58
SH - 48	DPOC	2416,20	3790,91	56,90	47359,00	66267,90	39,93
SH 61 - A	DPOC	7704,15	8256,23	7,17	92710,70	97004,02	4,63
SH 61 - B	DPOC	4711,95	5231,62	11,03	55017,97	63432,14	15,29
SH 77 - A	DPOC	5275,84	5656,91	7,22	76570,98	78502,41	2,52
SH 77 - B	DPOC	8474,67	10553,09	24,53	114154,60	133082,70	16,58
SH 88 - A	DPOC	4419,68	4731,78	7,06	81403,48	85454,86	4,98
SH 88 - B	DPOC	5230,13	5569,00	6,48	90797,99	95591,41	5,28
SH 53 - B	DPOC	3109,60	3665,30	17,87	64683,42	65931,16	1,93
SH 50 - A	DPOC	7358,96	9846,96	33,81	105068,90	112513,90	7,09
SH 50 - B	DPOC	5861,11	7720,79	31,73	71097,53	84535,20	18,90
SH 73 - A	DPOC	2620,78	2989,50	14,07	46874,32	48937,28	4,40
SH 73 - B	DPOC	2500,96	3443,95	37,70	39134,90	44007,81	12,45
SH 51 - A	DPOC	4480,65	7058,05	57,52	74373,03	118705,20	59,61
SH 51 - B	DPOC	4590,80	5466,42	19,07	74961,99	81666,44	8,94

Caso	Classificação	Neutrófilos (células/mm ²)	Eosinófilos (células/mm ²)	Macrófagos (células/mm ²)	Mastócitos (células/mm ²)	Linfócitos CD4+ (células/mm ²)	Linfócitos CD8+ (células/mm ²)
SH - 26	Controle	188,48	10,13	224,47	452,24	195,51	74,14
SH - 30	Controle	86,75	14,94	98,25	468,58	61,24	108,36
SH - 31	Controle	8,91	12,48	86,58	208,84	26,14	55,50

SH - 40	Controle	16,91	49,55	118,40	234,11	16,98	49,92
SH 57- A	Controle	101,75	10,17	597,11	285,71	199,45	279,86
SH 57 - B	Controle	159,65	17,62	372,59	264,42	90,66	111,58
SH 59 - A	Controle	40,65	16,20	327,08	-	6,03	60,08
SH 59 - B	Controle	21,65	9,16	342,05	401,88	4,46	90,54
SH 63 - A	Controle	187,47	37,44	245,88	93,37	-	80,01
SH 63 - B	Controle	236,19	46,07	213,27	139,15	-	39,13
SH 71 - A	Controle	426,16	16,37	399,34	184,08	25,10	59,20
SH 71 - B	Controle	405,06	-	561,88	128,78	29,10	189,03
SH 74 - A	Controle	5,98	12,25	710,89	238,37	21,94	30,99
SH 74 - B	Controle	-	22,78	110,29	129,11	9,93	53,52
SH 49 - A	Controle	171,02	44,40	320,04	-	190,86	-
SH 49 - B	Controle	131,18	85,87	-	-	49,52	-

Caso	Classificação	Neutrófilos (células/mm ²)	Eosinófilos (células/mm ²)	Macrófagos (células/mm ²)	Mastócitos (células/mm ²)	Linfócitos CD4+ (células/mm ²)	Linfócitos CD8+ (células/mm ²)
SH - 46	DPOC	475,64	86,80	274,86	281,28	55,92	162,80
SH - 47	DPOC	324,68	9,82	320,67	406,79	115,89	83,74
SH - 48	DPOC	59,78	29,60	439,37	238,02	50,51	-
SH 61 - A	DPOC	-	-	598,85	-	-	-
SH 61 - B	DPOC	-	-	559,95	402,18	31,63	83,79
SH 77 - A	DPOC	749,73	0	952,39	323,00	46,49	212,31
SH 77 - B	DPOC	454,32	-	506,04	280,42	14,85	153,92

SH 88 - A	DPOC	112,79	15,44	558,45	259,04	-	-
SH 88 - B	DPOC	95,59	18,40	435,63	262,79	-	-
SH 53 - B	DPOC	784,13	61,45	168,53	140,21	64,53	261,99
SH 50 - A	DPOC	189,37	258,93	811,21	423,42	-	206,58
SH 50 - B	DPOC	211,50	149,49	769,61	398,87	22,64	-
SH 73 - A	DPOC	85,51	-	238,84	294,18	74,48	145,26
SH 73 - B	DPOC	95,46	15,55	259,74	441,62	156,71	147,37
SH 51 - A	DPOC	125,06	68,66	1003,02	258,39	143,41	135,28
SH 51 - B	DPOC	54,79	203,37	1472,42	180,62	67,12	-

Caso	Classificação	Actina (proporção)	Colágeno (proporção)	Elástica (proporção)	Vias aéreas (%)	Vasos (%)	Septos alveolares (%)
SH - 26	Controle	0,13	0,37	0,20	0	14	86
SH - 30	Controle	0,21	0,45	0,20	0	4	96
SH - 31	Controle	0,13	0,19	0,19	0	4	96
SH - 40	Controle	0,16	0,12	0,22	0	13	87
SH 57- A	Controle	0,16	0,27	0,16	0	11,56	88,44
SH 57 - B	Controle	0,14	0,24	0,20	0,15	24,85	75
SH 59 - A	Controle	0,15	0,12	0,13	11,11	6,55	82,34
SH 59 - B	Controle	0,11	0,11	0,19	0	15,63	84,38
SH 63 - A	Controle	-	0,19	0,15	2,06	13,84	84,10

SH 63 - B	Controle	0,09	0,14	0,18	0	12,62	87,38
SH 71 - A	Controle	0,08	0,23	0,13	0	4,97	95,03
SH 71 - B	Controle	0,21	0,11	0,09	17,04	17,04	65,92
SH 74 - A	Controle	0,15	0,19	0,24	0,24	22,27	77,49
SH 74 - B	Controle	0,15	0,21	0,22	0	38,15	61,85
SH 49 - A	Controle	0,21	0,26	0,14	7,26	6,44	86,30
SH 49 - B	Controle	-	0,29	0,11	10,37	3,06	86,57

Caso	Classificação	Actina (proporção)	Colágeno (proporção)	Elástica (proporção)	Vias aéreas (%)	Vasos (%)	Septos alveolares (%)
SH - 46	DPOC	-	0,04	0,05	0	16,26	83,74
SH - 47	DPOC	0,18	0,11	0,10	0	15,40	84,60
SH - 48	DPOC	0,13	0,10	0,15	0	26,51	73,49
SH 61 - A	DPOC	-	0,45	0,09	0	10,39	89,61
SH 61 - B	DPOC	0,18	0,42	0,12	1,25	19,95	78,80
SH 77 - A	DPOC	0,11	0,11	0,03	6,33	16,20	77,47
SH 77 - B	DPOC	0,19	0,13	0,04	0	19,14	80,86
SH 88 - A	DPOC	0,20	0,36	0,14	0	15,27	84,73
SH 88 - B	DPOC	0,27	0,20	0,11	3,40	31,53	65,07
SH 53 - B	DPOC	0,11	0,12	0,13	1,24	18,82	79,95
SH 50 - A	DPOC	0,21	0,33	0,14	3,29	23,47	73,24

SH 50 - B	DPOC	0,12	0,30	0,13	11,09	17,31	71,60
SH 73 - A	DPOC	0,11	0,18	0,18	5,38	24,53	70,09
SH 73 - B	DPOC	0,24	0,23	0,19	3,53	29,11	67,36
SH 51 - A	DPOC	0,13	0,15	0,09	16,60	19,57	63,83
SH 51 - B	DPOC	0,18	0,11	0,13	16,63	19,60	63,76

Caso	Classificação	Valores pré-broncodilatador				
		CVF (L)	CVF (% do previsto)	VEF ₁ (L)	VEF ₁ (% do previsto)	VEF ₁ /CVF
SH - 26	Controle	2,14	89	1,78	91	0,83
SH - 30	Controle	2,44	97	1,87	90	0,77
SH - 31	Controle	3,28	136	2,34	121	0,71
SH - 40	Controle	2,72	-	2,19	-	0,81
SH - 49	Controle	1,77	81	1,56	100	0,88
SH - 57	Controle	3,38	131	2,82	130	0,83
SH - 59	Controle	3,26	100	2,70	102	0,83
SH - 63	Controle	3,38	82	2,78	79	0,82
SH - 71	Controle	4,10	89	3,45	90	0,84
SH - 74	Controle	2,59	110	1,88	98	0,73

CVF: capacidade vital forçada; VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo.

Caso	Classificação	Valores pré-broncodilatador					Valores pós-broncodilatador				
		CVF (L)	CVF (%)*	VEF ₁ (L)	VEF ₁ (%)*	VEF ₁ /CVF	CVF (L)	CVF (%)*	VEF ₁ (L)	VEF ₁ (%)*	VEF ₁ /CVF
SH - 46	DPOC	2,14	89	1,78	91	0,83	3,96	107	2,57	86	0,65
SH - 47	DPOC	2,44	97	1,87	90	0,77	3,11	100	1,82	74	0,59
SH - 48	DPOC	3,28	136	2,34	121	0,71	3,62	104	2,30	79	0,64
SH - 51	DPOC	2,72	-	2,19	-	0,81	3,04	87	1,74	64	0,57
SH - 61	DPOC	1,77	81	1,56	100	0,88	-	-	-	-	-
SH - 77	DPOC	3,38	131	2,82	130	0,83	3,92	94	2,28	69	0,58
SH - 88	DPOC	3,26	100	2,70	102	0,83	2,51	76	1,39	55	0,55
SH - 50	DPOC	3,38	82	2,78	79	0,82	2,47	99	1,56	81	0,63
SH - 73	DPOC	4,10	89	3,45	90	0,84	-	-	-	-	-
SH - 50	DPOC	2,59	110	1,88	98	0,73	2,77	-	1,73	-	0,62

CVF: capacidade vital forçada; VEF₁: volume expiratório forçado no primeiro segundo.

* porcentagem do previsto.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agusti AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc AmThorac Soc* 2005; 2: 367-370.
2. Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, Milton D, Schwartz D, Toren K, Viegi G. American Thoracic Society Statement: occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 787-797.
3. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-688.
4. Barnes P. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 345-351.
5. Barnes PJ. Macrophages. In: Barnes PJ. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and molecular mechanisms*. 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005. p. 113-131.
6. Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers. Distinct demographic profiles. *Chest* 2005; 128:1239-1244.

7. Black PN, Ching PST, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 998-1004.
8. Britton J, Pavord I, Richards K, Knox A, Wisniewski A, Wahedna I, Kinnear W, Tattersfield A, Weiss S. Factors influencing the occurrence of airway hyperreactivity in the general population: the importance of atopy and airway caliber. *Eur Respir J* 1994; 7: 881-887.
9. Brutsche MH, Downs0020SH, Schindler C, Gerbase MW, Schwartz J, Frey M, Russi EW, Ackermann-Lieblich U, Leuenberger P; SAPALDIA Team 2006. Bronchial hyperresponsiveness and the development of asthma and COPD in asymptomatic individuals: SAPALDIA cohort study. *Thorax* 2006; 61: 671-677.
10. Burnett D, Chamba A, Hill SL, Stockley RA. Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet* 1987; 2: 1043-1046.
11. Cardoso WV, Sekhon HS, Hyde DM, Thurlbeck WM. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 975-981.

12. Churg A, Tai H, Coulthard T, Wang R, Wright JL. Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1327-1334.
13. Il Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. *J Bras Pneumol* 2004; 30 (Supl 5).
14. Cosio MG. T-Lymphocytes. In: Barnes PJ. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and molecular mechanisms*. 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005. p. 205-252.
15. de Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, van Krieken JH. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1951-1957.
16. De Jongste JC, Mons H, Block R, Bonta IL, Frederiksz AP, Kerrebijn KF. Increased in vitro histamine responses in human small airways smooth muscle from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 549-553.
17. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1277-1285.

18. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1156-1167.
19. Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 160: 1750 –1757.
20. Dolhnikoff M, Morin J, Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1607-1612.
21. Dolovich MB, Ahrens RC, Hess DR, Anderson P, Dhand R, Rau JL, Smaldone GC, Guyatt G; American College of Chest Physicians; American College of Asthma, Allergy, and Immunology. Device selection and outcomes of aerosol therapy: Evidence-based guidelines. *Chest* 2005; 127: 335-371.
22. Ekberg-Jansson A, Anderson B, Bake B, Boijesen M, Enander I, Rosengren A, Skoogh BE, Tylén U, Venge P, Löfdahl CG. Neutrophil-associated activation markers in healthy smokers relates to a fall in DL(CO) and to emphysematous changes on high resolution CT. *Respir Med* 2001; 95: 363-373.
23. Finkelstein R, Ma HD, Ghezzo H, Whittaker K, Fraser RS, Cosio MG. Morphometry of small airways in smokers and its relationship to

emphysema type and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 267-276.

24. Finlay GA, O'Donnell MD, O'Connor CM, Hayes JP, FitzGerald MX. Elastin and collagen remodeling in emphysema. A scanning electron microscopy study. *Am J Pathol* 1996; 149: 1405–1415.
25. Fredberg JJ, Bunk D, Ingenito E, Shore SA. Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1387-1397.
26. Fukui M, Yasui H, Watanabe K, Fujimoto T, Kakuma T, Yoshida R, Ohi M, Kuno K. Hypoxic contraction of contractile interstitial cells isolated from bovine lung. *Am J Physiol* 1996; 270: 962-972.
27. Fust A, Bates JH, Ludwig MS. Mechanical properties of mouse distal lung: in vivo versus in vitro comparison. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 143: 77-86.
28. Gosman MM, Postma DS, Vonk JM, Rutgers B, Lodewijk M, Smith M, Luinge MA, Ten Hacken NH, Timens W. Association of mast cells with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2008; 9: 64.
29. Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, De Boer WI, Stolk J, Han J, van Krieken JM. Chronic obstructive pulmonary disease: role of

bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol* 1997; 151:1785-1790.

30. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of Bronchial Hyperreactivity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 77-87.
31. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28: 523-532.
32. Hogg J. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 709-721.
33. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653.
34. Hogg JC, Chu FS, Tan WC, Sin DD, Patel SA, Pare PD, Martinez FJ, Rogers RM, Make BJ, Criner GJ, Cherniack RM, Sharafkhaneh A, Luketich JD, Coxson HO, Elliott WM, Sciurba FC. Survival after lung volume reduction in chronic obstructive pulmonary disease: insights from small airway pathology. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 454-459.

35. Homma T, Bates JH, Irvin CG. Airway hyperresponsiveness induced by cationic proteins in vivo: site of action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: 413 - 418.
36. Hoppin FG, Jr. Parenchymal mechanics and asthma. *Chest* 1995; 107: 140-144.
37. Hoppers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2000; 356: 1313-1317.
38. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 28–38.
39. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 176-183.
40. Kanner RE, Connett JE, Altose MD, Buist AS, Lee WW, Tashkin DP, Wise RA. Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD: the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 956–961.

41. Kapanci Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G. "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation/perfusion ratio? *J Cell Biol* 1974; 60: 375-392.
42. Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, Last JA. TGF-beta1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax* 2003; 58: 772-777.
43. Lai J, Rogers RA, Ekstein BA, Fredberg JJ. Dynamic changes in alveolar duct geometric in response to 10⁻³ histamine. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 538.
44. Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IFLC, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100: 1610-1616.
45. Langdeau JB, Day A, Turcotte H, Boulet LP. Gender differences in the prevalence of airway hyperresponsiveness and asthma in athletes. *Respir Med* 2009; 103: 401-406.
46. Lauzon AM, Bates JH. Estimation of time-varying respiratory mechanical parameters by recursive least squares. *J Appl Physiol* 1991;71: 1159-1165.

47. Leite-Junior JH, Rocco PR, Faffe DS, Romero PV, Zin WA. On the preparation of lung strip for tissue mechanics measurement. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 134: 255- 262.
48. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD – a 25 years follow-up study of the general population. *Thorax* 2006; 61: 935-939.
49. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006; 27: 397-412.
50. Ludwig MS. Role of lung parenchyma. In PJ Barnes, MM Grustein, AR Leff, and AJ Woolcock, editors. *Asthma*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. P. 1319-1334.
51. Ludwig MS, Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2029-2035.
52. Luna LG. *AFIP manual of histologic staining methods*. New York: McGraw Hill, 1986.

53. Lutchen KR, Hantos Z, Petak F, Adamicza A, Suki B. Airway inhomogeneities contribute to apparent lung tissue mechanics during constriction. *J Appl Physiol* 1996; 80: 1841-1849.
54. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17: 946-953.
55. Manfreda J, Sears MR, Becklake MR, Chan-Yeung M, Dimich-Ward H, Siersted HC, Ernst P, Sweet L, Van Til L, Bowie DM, Anthonisen NR. Geographic and gender variability in the prevalence of bronchial responsiveness in Canada. *Chest* 2004; 125: 1657-1664.
56. Martin TR, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effects of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 254-260.
57. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muino A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG; PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005; 366: 1875-1881.

58. Nagase T, Fukuchi Y, Dallaire MJ, Martin JG, Ludwig MS. In vitro airway and tissue responses to antigen in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 81- 86.
59. Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, Agusti AG. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001; 56: 432-437.
60. Opazo Saez AM, Seow CY, Paré PD. Peripheral airway smooth muscle mechanics in obstructive airways disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 910-917.
61. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 852-857.
62. Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G, Aufiero A, Zanon P, Olivieri D. Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:1311–1316.
63. Postma DS, Kerstjens HAM. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:187-192.

64. Postma DS, Wempe JB, Renkema TE, van der Mark TW, Koeter GH. Hyperresponsiveness as a determinant of the outcome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1458-1462.
65. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.
66. Rahman I. Oxidative Stress. In: Barnes PJ. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and molecular mechanisms*. 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005. p. 279-325.
67. Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2000; 15: 109-115.
68. Rutgers SR, Timens W, Tzanakis N, Kauffman HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Airway inflammation and hyperresponsiveness to adenosine 5-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 657-662.

69. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Calcagni P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1646-1652.
70. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826.
71. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1633-1639.
72. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711-717.
73. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009; 374: 733-743.

74. Sapey E, Stockley RA. Neutrophils. In: Barnes PJ. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and molecular mechanisms*. 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005. p. 133-170.
75. Shapiro SD. Proteinases in COPD. In: Barnes PJ. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and molecular mechanisms*. 1st ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2005. p. 327-341.
76. Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest* 2005; 128: 2099-2107.
77. Sparrow D, O'Connor G, Colton T, Barry CL, Weiss ST. The relationship of nonspecific bronchial responsiveness to the occurrence of respiratory symptoms and decreased levels of pulmonary function: the Normative Aging Study. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:1255–1260.
78. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121(Suppl): 151-155.
79. Sturton G, Persson C, Barnes PJ. Small airways: an important but neglected target in the treatment of obstructive airway diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 340-345.

80. Tashkin DP. Extra-fine corticosteroid aerosols from hydrofluoralkane-134a metered-dose inhalers: potential advantages and disadvantages. *Chest* 1999; 115: 316-318.
81. Tashkin DP, Altose MD, Bleecker ER, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise R for the Lung Health Study Research Group. The lung health study: airway responsiveness to inhaled methacholine in smokers with mild to moderate airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:301–310.
82. Tashkin DP, Altose MD, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise RA. Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(6): 1802-1811.
83. Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Nakahara K, Umeda A. Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1476-1483
84. Tomioka S, Bates JH, Irvin CG. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillation. *J Appl Physiol* 2002; 93: 263- 270.

85. Tulic MK, Hamid Q. The role of the distal lung in asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2002; 23: 347- 359.
86. Van den Boom G, [van Schayck CP](#), [van Möllen MP](#), [Tirimanna PR](#), [den Otter JJ](#), [van Grunsven PM](#), [Buitendijk MJ](#), [van Herwaarden CL](#), [van Weel C](#). Active detection of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in the general population. Results and economic consequences of the DIMCA program. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1730-1738.
87. Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2086-2092.
88. Wang RD, Tai H, Xie C, Wang X, Wright JL, Churg A. Cigarette smoke produces airway wall remodeling in rat tracheal explants. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1232-1236.
89. Wang RD, Wright JL, Churg A. Transforming growth factor-beta1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants. *Am J Respir Cell Mol Bio* 2005; 33: 387-393.
90. Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N, Sugata Y, Orita Y, Takai T, Nishizaki K. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 105 -112.

91. Weibel ER, Cruz-Orive LM. Morphometric methods. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER and Barnes PJ. *The Lung: Scientific Foundations*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven; 1997. p. 333–344.
92. White AJ, Gompertz S, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease. 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2003; 58: 73-80.
93. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Lung parenchymal remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 829-837.
94. Yan K, Salome CM, Woolcock AJ. Prevalence and nature of bronchial hyperresponsiveness in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 25-29.
95. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 2ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1984. p.206-235.
96. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S et al. Exacerbations of bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and

eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:109–116.

Apêndice

Hyperresponsiveness of Peripheral Lung Parenchyma in Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Tatiana Lanças¹, David Itiro Kasahara¹, Jefferson Luiz Gross², Ruy Camargo Pires-Neto¹, Daniel Deheinzelin², Thais Mauad¹, Elnara Márcia Negri^{1,2}, Marisa Dolhnikoff¹.

Experimental Air Pollution Laboratory (LIM05), Department of Pathology, São Paulo University Medical School¹ and Department of Thoracic Surgery, A.C. Camargo Hospital², São Paulo, Brazil.

Address for correspondence and requests for reprints to:

Tatiana Lanças, R.T. Ph.D., Department of Pathology, São Paulo University Medical School, Av. Dr. Arnaldo, 455 – Room 1155, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil. Phone/Fax: 55 11 3061-8521/e-mail: tatilancas@usp.br

Funded by: FAPESP, CNPq, LIMHC-FMUSP.

Running head: **lung strips responsiveness in COPD**

Subject code for classification of the article: 9.13 COPD: Pathogenesis

Word count: 2559

At a glance commentary

Scientific Knowledge on the Subject

Airway hyperresponsiveness (AHR) is present in a high proportion of COPD patients and is associated with a worse prognosis. It is not clear yet if AHR is a pathophysiological feature of COPD or an epiphenomenon of airway obstruction. Whether or not the peripheral lung tissue is involved in the mechanism of AHR in COPD also remains to be established.

What This Study Adds to the Field

The contractile responsiveness of lung parenchyma is increased in COPD patients and is associated with tissue eosinophilic and CD8-lymphocytic inflammation. This exacerbated response supports the hypothesis that hyperresponsiveness is a pathophysiological characteristic of COPD and that it is not restricted to the airways, but coexists at the distal lung level.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at: www.atsjournals.org.

ABSTRACT

Rationale: Up to 60% of COPD patients can present airway hyperresponsiveness. However, it is not known whether the peripheral lung tissue also presents an exaggerated response to agonists in COPD. Methods: In this study we investigated the *in vitro* mechanical behavior as well as the structural and inflammatory changes of peripheral lung tissue in 10 COPD patients and compared them to 10 non-smoking controls. We measured the resistance (R) and elastance (E) of the lung strips at baseline and after acetylcholine (ACh) challenge. We further assessed the alveolar tissue density of neutrophils, eosinophils, macrophages, mast cells and CD8+ and CD4+ cells, and the content of α -smooth muscle actin-positive cells, elastic fibers and collagen fibers. Measurements and main results: Values of R after ACh treatment (R_{ACh}) and percent increase in tissue resistance (%R) were significantly higher in the COPD group than in the controls ($p \leq 0.03$). There was a significantly higher density of macrophages ($p = 0.04$) and CD8+ cells ($p = 0.017$) and a lower elastic fiber content ($p = 0.003$) in the COPD group as compared to controls. We observed a significant positive correlation between %R and both eosinophil density and CD8+ cell density ($r = 0.608$, $p = 0.002$; and $r = 0.581$, $p = 0.001$, respectively), and also a significant negative correlation between %R and FEV₁/FVC ($r = -0.451$, $p < 0.05$). Conclusions: The cholinergic responsiveness of parenchymal lung strips is increased in COPD patients and seems to be related both to alveolar tissue eosinophilic and CD8-lymphocytic inflammation and also to the degree of airway obstruction at the pulmonary function test.

Keywords: distal lung, lung strips, oscillatory mechanics, COPD.

INTRODUCTION

Airway hyperresponsiveness (AHR), defined as an exaggerated response of the airway to nonspecific stimuli, is considered to be a characteristic feature of asthma¹. However, the prevalence of AHR is also high in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), varying from 25% to 87%^{2,3,4}.

In asthma, AHR is considered a hallmark of inflammation and is related to the severity of the disease, but much less is known about its mechanisms in patients with COPD¹. AHR in COPD is associated with reduced lung function⁵, worse prognosis^{6,7}, and increased mortality⁸. Mechanisms proposed for AHR in COPD include airway inflammation, airway remodeling, and structural changes in alveolar parenchyma (emphysema)⁹. The presence of AHR in subjects with COPD seems to greatly depend, therefore, on baseline airflow limitation. However, studies that show that AHR in COPD is associated with the airway inflammatory cell profile^{10,11}, that individuals with AHR at baseline have an increased risk for COPD¹², and that patients with mild or early COPD present AHR⁷ all suggest that AHR may be a pathophysiological feature of COPD, rather than a surrogate marker of airway obstruction^{9,1}.

In order to address the potential role of airway smooth muscle (ASM) in AHR in patients with COPD, *in vitro* studies have been conducted. De Jongste et al.¹³ reported that the response of bronchioles to histamine was significantly greater in COPD patients than in subjects without COPD. It was also reported that isolated bronchioles of obstructed patients generate a higher maximal isometric force in response to acetylcholine (ACh) than do bronchioles from non-obstructed patients¹⁴. This suggests that altered peripheral ASM function may be an important

determinant of abnormal airway function in patients with obstructive airway diseases.

Experimental studies have shown that not only the airways but also the alveolar parenchyma can respond to constrictor agonists¹⁵. We previously demonstrated that human peripheral lung tissue is also able to present a contractile response to ACh *in vitro*¹⁶. Whether this parenchymal contractility is altered in COPD is not known. Although the degree of airflow limitation in COPD patients is largely determined by the inflammatory and structural changes of small airways and lung parenchyma, it is not known whether an increased contractility at the distal level could be part of the mechanism of AHR and obstruction in these patients.

In order to investigate the contribution of the contractile response of the distal lung to the pathogenesis of AHR in COPD, we analyzed the dynamic mechanical behavior of parenchymal strips of COPD patients before and during ACh-induced constriction and compared the response with that of non-smoking controls. We further investigated whether changes in *in vitro* parenchymal mechanics correlated to structural and inflammatory parameters and to *in vivo* pulmonary function.

METHODS

This study was approved by the review boards for human studies of São Paulo University Medical School and A.C. Camargo Hospital. Written consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Subjects: We collected peripheral lung tissue from 20 patients undergoing therapeutic lung resection for primary or metastatic lung tumors from 2003 to 2006.

Patients were divided into two groups: a control group (non-smokers without any previous lung disease) and a COPD group (current or ex-smokers with a clinical diagnosis of COPD and an FEV1/FVC<70% at the pulmonary function test). No patient had a clinical history of asthma.

Tissue Mechanics: The oscillatory mechanics of the subpleural parenchymal strips was evaluated as previously described¹⁷ (additional detail is provided in an online data supplement). One or two strips were obtained from each patient, depending on tissue availability. Measurements of tissue resistance (R) and elastance (E) were obtained at baseline (R_{BAS} and E_{BAS} , respectively) and after adding ACh (10^{-3} M, Sigma Chemical, St. Louis, MO) to the bath (R_{ACh} and E_{ACh} , respectively). The oscillatory frequency was 0.25 Hz. After the mechanical oscillation, the strips were processed for histological analysis. Sections of lung strips were stained with H&E, Luna (eosinophils), Resorcin-Fuchsin (elastic fibers) and Sirius Red (collagen fibers). Alpha-smooth muscle actin (α -SMA)-positive cells, neutrophils, macrophages, mast cells and CD4+ and CD8+ lymphocytes were identified by immunohistochemistry as previously described¹⁸ (Table1).

Morphological Study: By conventional morphometry, we assessed the tissue strip density of inflammatory cells and α -SMA+ cells and the volume proportion of tissue constituents^{18,17}. Using a 100-point grid with a known area, we counted the number of points hitting the tissue strip and the number of inflammatory cells in each field. Inflammatory cell density was determined as the number of cells divided by the alveolar tissue area (cells/mm²). The volume proportion of α -SMA+ cells was determined by the points hitting positive cells divided by the total points hitting the tissue strip. All measurements were performed in 10 to 15 fields per strip at a 400x magnification by an investigator

blinded to the study group. The volume proportions of the airways, blood vessels and parenchyma in the lung strips were determined as the points hitting the airway walls, blood vessel walls or alveolar septa, respectively, divided by the total number of points. Measurements were performed at 200x magnification in the entire strip length. The volume proportion of collagen and elastic fibers in the tissue strip was obtained by image analysis using the software Image-Pro® Plus 4.1 for Windows® (Media Cybernetics–Silver Spring, MD, USA) on a compatible microcomputer connected to a digital camera and coupled to a microscope (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany). Volume proportion is expressed as the area of collagen or elastic fibers within the tissue strip divided by the total strip area.

Statistical analysis was performed using the SPSS 15.0® computer package (SPSS, Chicago, Illinois, USA). After testing the distribution of data, either a Student's *t*-test or a Mann-Whitney U test was used to compare the different parameters between the two groups. Correlations between morphological, mechanical and functional parameters were performed using the Pearson or Spearman rank test. Results are expressed as mean±SD. The level of significance was set at $p<0.05$.

RESULTS

The demographic and functional data of the COPD patients and controls are shown in Table 2. The mean age was higher in the COPD group ($p=0.039$). Mean values of FEV₁, % predicted FEV₁ and FEV₁/FVC were, respectively, 34.3% ($p=0.024$), 43.4% ($p=0.001$) and 35.6% ($p<0.001$) lower in the COPD group

compared to the controls. Among patients with COPD, two were classified as having mild COPD and five as having moderate COPD according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD)¹⁹. Three patients did not have post-bronchodilator data and could not be classified.

Oscillatory Mechanics: Sixteen strips (mean length = 12.2 mm) were analyzed in each group. Figure 1 shows values of R and E (basal and post-agonist challenge) in the two groups. Both groups showed a significant increase in R and E after the agonist challenge ($p < 0.02$). Values of R_{ACh} were significantly higher in the COPD group compared to the controls ($p = 0.032$). We also observed a higher percent increase in tissue resistance (%R) in the COPD group than in the controls ($p = 0.024$) (Figure 2).

Morphological Analysis: Table 3 shows the inflammatory cell density of the parenchymal strips in the two groups. We observed a significantly higher density of macrophages and CD8+ cells in the COPD group compared to controls ($p = 0.04$ and $p = 0.017$, respectively). The volume proportion of α -SMA+ cells and extracellular matrix fibers in lung strips is presented in Table 4. The COPD group showed a significantly lower volume proportion of elastic fibers compared to controls ($p = 0.004$). The mean volume proportion of airways, blood vessels and lung parenchyma in the lung strips was $3.6 \pm 5.5\%$, $16.7 \pm 8.3\%$ and $79.6 \pm 9.7\%$, respectively. In six strips in the COPD group and in nine strips in the control group, the small airways were not present at the histological analysis.

We observed significant positive correlations between the %R and the strips' eosinophil density and CD8+ cell density ($r = 0.58$, $p = 0.001$ for eosinophils; $r = 0.61$, $p = 0.002$ for CD8+ cells) and a significant negative correlation between %R and FEV₁/FVC ($r = -0.45$, $p < 0.05$). There was also a significant negative correlation

between the strips' content of elastic fibers and the neutrophil density ($r=-0.62$, $p<0.001$).

DISCUSSION

In the present study, we showed that the contractile response of peripheral lung tissue is increased in COPD patients and is likely to be associated to the tissue eosinophilic and CD8-lymphocytic inflammation and to the degree of obstruction at the pulmonary function test.

It has been proposed that AHR in COPD patients is largely dependent on the baseline airflow limitation and may represent an epiphenomenon of reduced airway caliber¹. However, studies that show that patients with mild or early COPD, and therefore with only mild obstruction, still present AHR suggest that it may be a pathophysiological feature of COPD rather than a surrogate marker of airway obstruction^{7,9,1}. Few *in vitro* human studies have investigated this issue with an analysis of isolated small airways. De Jongste et al.¹³ showed a greater bronchiolar response to histamine in patients with COPD compared to subjects without COPD. Opazo Saez et al.¹⁴ showed a higher response to ACh of peripheral airways from obstructed subjects, including asthmatics and COPD patients, compared to non-obstructed controls. In the present study, the oscillatory mechanics of human lung strips allowed us to address, for the first time, the behavior of peripheral lung parenchyma in COPD. Taken together, these previous experimental studies and our present results support the hypothesis that hyperresponsiveness is a pathophysiological characteristic of the disease.

Since parenchymal changes are major determinants of airway obstruction in COPD, it is reasonable to question whether a higher contractile response can also occur at this level. The lung strip is mainly comprised of lung parenchyma with a small proportion of small airways and vessels and has been used as a model of parenchymal lung behavior²⁰. We have previously shown that normal human lung strips can respond to an ACh challenge even in the absence of small airways¹⁶. In the present study, we observed that in 6 out of 16 strips of the COPD group, no airways could be identified in the morphological analysis. Interestingly, the strips devoid of airways showed a response of the same magnitude as those strips containing small airways, suggesting that both small airways and alveolar tissue contributed to the increased contractile response of the peripheral lung tissue in COPD patients.

In normal lungs, the tethering effect of the lung parenchyma is crucial for the maintenance of airway patency, and it has been suggested that parenchymal contractility could represent a protective factor for airway narrowing²¹. However, if alveolar attachments are ruptured, such as in centrilobular emphysema, this would alter the airway–parenchyma tethering to favor airway narrowing. In this situation, alveolar contractility would increase the effect of an alveolar rupture on the loss of airway–parenchyma interdependence.

One limitation of our study was the lack of bronchoprovocation tests *in vivo*, so it was not possible to investigate a relationship between *in vivo* and *in vitro* responses. However, we observed a weak but significant relationship between the degree of tissue response to ACh (%R) and the degree of obstruction determined by the pulmonary function test (FEV₁/FVC). This reinforces the idea that

hyperresponsiveness in COPD is associated with the loss of lung function and disease severity^{9,4}.

Although our control group was younger than the COPD group, it is not likely that age could have influenced our results. Previous studies have shown that older age does not represent a higher risk for AHR and that at any given age, atopy and airway caliber are considered to be the major determinants of hyperreactivity in the general population²².

There was a different gender proportion between the two groups, with a predominance of male patients in the COPD group and of female subjects in the control group. It is well known that women present a higher prevalence of AHR compared to men^{3,23,24}, so therefore it is possible that our results are underestimated.

The mechanism involved in the alveolar response to an agonist is not fully understood, and can involve the contraction of alveolar ducts' smooth muscle cells or of alveolar myofibroblasts. This contractile response can also be dependent on the degree and type of alveolar inflammation and on the extracellular matrix composition¹⁷. We did not observe any difference in the content of α -smooth muscle actin+ cells between the COPD strips and the control strips, and there was no correlation between actin content and tissue response. These findings suggest that the increased responsiveness of lung strips in the COPD group may be associated with a change in tissue contractile function rather than a change in muscle mass.

In accordance with previous studies^{25,26,27}, we observed a higher density of alveolar CD8+ cells and macrophages in COPD patients. Few studies have investigated the relationship between inflammation and AHR in COPD. Rutgers et al.¹⁰ demonstrated that hyperresponsiveness to AMP in COPD is associated with

an increased density of CD8+ cells in airway walls and with higher numbers of sputum eosinophils. In the present study, we also found an association between the magnitude of the strip response and the tissue density of CD8+ cells and, although the strip eosinophil density was not significantly different between the two groups, we observed a significant correlation between eosinophil counts and %R. One possible mechanism involved in the strip contractile response could be the release of eosinophilic bronchoconstrictor mediators such as leukotrienes and platelet activating factor. The same mechanism is likely to occur *in vivo* and could explain the association between an eosinophilic infiltration and AHR in COPD exacerbations²⁸. Another possible mechanism could be an inflammation-mediated extraneuronal release of ACh and the activation of muscarinic receptors on T-lymphocytes and/or peripheral ASM²⁹. An analysis of muscarinic receptors in the peripheral tissue of COPD patients would certainly improve our understanding of the mechanisms involved in the increased contractile response of the distal lung in these patients.

In contrast to previous studies that showed a biochemical and histological increase in alveolar collagen in centrilobular emphysema, we did not observe any difference in collagen content between the two groups^{30,31}. These contrasting results may be due to differences in the patients' characterization and in the tissue sampling, as we did not sample emphysematous lung tissue for the morphometric analysis. Although all patients in our COPD group were obstructed, we do not know how many of them presented with emphysema. Studies that have investigated the elastic content of alveolar tissue in COPD have shown either a reduction³² or an increase³¹ in elastic fibers. Although there was no significant difference in elastance values between the two groups, we observed a significant decrease in elastic content in strips from COPD patients compared to controls.

Furthermore, there was a significant negative correlation between the content of elastic fibers and the neutrophil density in the lung strips, indicating the role of neutrophils in tissue injury.

In conclusion, our findings show that the cholinergic responsiveness of parenchymal lung strips is increased in COPD patients and is associated with alveolar tissue eosinophilic and CD8-lymphocytic inflammation. Our results support the idea that hyperresponsiveness is a pathophysiological characteristic of COPD and that it is not restricted to the airways, but rather coexists at the distal lung level. The pathophysiological significance of this pulmonary tissue behavior in the mechanism of AHR *in vivo* needs to be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the members of the Departments of Thoracic Surgery of São Paulo University Medical School and A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil for permission to collect the lung tissue.

REFERENCES

1. Grootendorst DC and Rabe KF. Mechanisms of Bronchial Hyperreactivity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 77-87.
2. Yan K, Salome CM, Woolcock AJ. Prevalence and nature of bronchial hyperresponsiveness in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 25-29.
3. Kanner RE, Connett JE, Altose MD, Buist AS, Lee WW, Tashkin DP, Wise RA. Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD: the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 956–961.
4. Tashkin DP, Altose MD, Bleecker ER, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise R for the Lung Health Study Research Group. The lung health study: airway responsiveness to inhaled methacholine in smokers with mild to moderate airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 301–310.
5. Sparrow D, O'Connor G, Colton T, Barry CL, Weiss ST. The relationship of nonspecific bronchial responsiveness to the occurrence of respiratory symptoms and decreased levels of pulmonary function: the Normative Aging Study. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1255–1260.
6. Postma DS, Wempe JB, Renkema TE, van der Mark TW, Koeter GH. Hyperresponsiveness as a determinant of the outcome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1458-1462.

7. Tashkin DP, Altose MD, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise RA. Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1802-1811.
8. Hespers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2000; 356: 1313-1317.
9. Postma DS and Kerstjens HAM. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 187-192.
10. Rutgers SR, Timens W, Tzanakis N, Kauffman HF, van der Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Airway inflammation and hyperresponsiveness to adenosine 5-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 657–662.
11. Finkelstein R, Ma HD, Ghezzo H, Whittaker K, Fraser RS, Cosio MG. Morphometry of small airways in smokers and its relationship to emphysema type and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 267-276.
12. Brutsche MH, Downs SH, Schindler C, Gerbase MW, Schwartz J, Frey M, Russi EW, Ackermann-Liebrich U, Leuenberger P; SAPALDIA Team 2006. Bronchial hyperresponsiveness and the development of asthma and COPD in asymptomatic individuals: SAPALDIA cohort study. *Thorax* 2006; 61: 671-677.

13. De Jongste JC, Mons H, Block R, Bonta IL, Frederiksz AP, Kerrebijn KF. Increased *in vitro* histamine responses in human small airways smooth muscle from patients with chronic obstructive pulmonary disease. [*Am Rev Respir Dis*](#) 1987; 135: 549-553.
14. Opazo Saez AM, Seow CY, Paré PD. Peripheral airway smooth muscle mechanics in obstructive airways disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 910-917.
15. Fredberg JJ, Bunk D, Ingenito E, Shore SA. Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1387-1397.
16. Dolhnikoff M, Morin J, Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1607-1612.
17. Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100: 1610 – 1616.
18. De Magalhaes Simoes S, S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 602-611.
19. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic

Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.

20. Ludwig [MS](#), [Dallaire MJ](#). Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2029-2035.

21. Hoppin FG, Jr. Parenchymal mechanics and asthma. *Chest* 1995; 107: 140-144.

22. Britton [J](#), [Pavord I](#), [Richards K](#), [Knox A](#), [Wisniewski A](#), [Wahedna I](#), [Kinnear W](#), [Tattersfield A](#), [Weiss S](#). Factors influencing the occurrence of airway hyperreactivity in the general population: the importance of atopy and airway caliber. *Eur Respir J* 1994; 7: 881-887.

23. Manfreda J, Sears MR, Becklake MR, Chan-Yeung M, Dimich-Ward H, Siersted HC, Ernst P, Sweet L, Van Til L, Bowie DM, Anthonisen NR. Geographic and gender variability in the prevalence of bronchial responsiveness in Canada. *Chest* 2004; 125: 1657-1664.

24. Langdeau JB, Day A, Turcotte H, Boulet LP. Gender differences in the prevalence of airway hyperresponsiveness and asthma in athletes. *Respir Med* 2009; 103: 401-406.

25. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. [Proc Am Thorac Soc](#) 2004; 1: 176-183.

26. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1156-1167.
27. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavalllesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8⁺ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711–717.
28. White AJ, Gompertz S, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease. 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2003; 58: 73-80.
29. Barnes P. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 345-351.
30. Cardoso WV, Sekhon HS, Hyde DM, Thurlbeck WM. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 975-981.
31. Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2086–2092.

32. Black PN, Ching PS, Beaumont B, Ranasinghe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 998-1004.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: The graphs show baseline (bas) and post-acetylcholine (ACh) values of resistance (R) and elastance (E) in the Control and COPD groups. *, $p \leq 0.023$ compared to baseline; #, $p = 0.032$ compared to control.

Figure 2: The graph shows the percent increase in tissue resistance and elastance in Control and COPD groups. *, $p = 0.024$ compared to control.

TABLES

Table 1: Antibody types and processing used in immunohistochemical analyses

Antibody	Pre-treatment	Species	Clone	Dilution	Origin
α -smooth muscle actin	Citrate	Mouse	1A4	1:500	Dako, Denmark
Neutrophil elastase	-	Mouse	NP57	1:300	Dako, Denmark
Mast Cell	Citrate	Mouse	AA1	1:1200	Dako, Denmark
Macrophage	Citrate	Mouse	KP1	1:3200	Dako, Denmark
CD4	Citrate	Mouse	OPD4	1:400	Dako, Denmark
CD8	Citrate	Mouse	C8/144B	1:50	Dako, Denmark

Table 2: Characteristics of the subjects

	Controls	COPD
Gender	2M:8F	8M:2F
Age, yr	54 $\pm$ 16	67 $\pm$ 11*
Smoking, pack-years	---	70.8 $\pm$ 32.6
FEV ₁ , L	2.33 $\pm$ 0.59	1.75 $\pm$ 0.44*
FEV ₁ , % pred	100.11 $\pm$ 16.08	69.82 $\pm$ 15.43*
FEV ₁ /FVC	0.80 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.07*

Values expressed as mean $\pm$ SD.

* Significantly different from controls (p<0.04).

M: male; F: female, FEV₁: forced expiratory volume in one second;

%pred: percentage of predicted; FVC: forced vital capacity, L: liters.

Table 3: Lung strip inflammatory cell density (cells/mm²)

	Controls	COPD
Macrophages	278.79 ± 151.29	528.65 ± 322.91 *
Neutrophils	124.74 ± 127.51	303.47 ± 262.42
Eosinophils	25.44 ± 19.36	62.26 ± 69.03
Mast cells	277.46 ± 131.60	302.96 ± 92.16
TCD4 ⁺ cells	68.15 ± 68.59	65.84 ± 37.32
TCD8 ⁺ cells	87.20 ± 48.83	157.95 ± 60.35 *

Values expressed as mean ± SD.

* Significantly different from controls (p<0.02).

Table 4: Volume proportion of α-SMA-positive cells and ECM fibers in lung strips

	Controls	COPD
α-SMA+ cells	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.04
Elastic fibers	0.18 ± 0.04	0.12 ± 0.04 *
Collagen fibers	0.23 ± 0.10	0.18 ± 0.12

Values expressed as mean ± SD.

* Significantly different from controls (p=0.004).

ECM=extracellular matrix, α-SMA=alpha smooth muscle actin

FIGURES

Figure 1

Figure 2

Hyperresponsiveness of Peripheral Lung Parenchyma in Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Tatiana Lanças, David Itiro Kasahara, Jefferson Luiz Gross, Ruy Camargo Pires-Neto, Daniel Deheinzelin, Thais Mauad, Elnara Márcia Negri, Marisa Dolhnikoff.

ONLINE DATA SUPPLEMENT

METHODS

Oscillatory mechanics evaluation: The resting length (L_r) and wet weight (W_0) of each strip were measured. Metal clips were glued to either end of the tissue strip with cyanoacrylate. Steel wires (0.5 mm diameter) were attached to the clips; one end was connected to a force transducer (Model 404A; Aurora Scientific Inc., Ontario, Canada) and the other end was connected to a servo-controlled lever arm (Model 300B; Aurora Scientific Inc., Ontario, Canada). The lever arm was capable of peak-to-peak length excursions of 8mm and length resolutions of 1 μm , and was in turn connected to a function generator (Model 3030; B&K Precision Corp., California, USA), which controlled the frequency, amplitude and waveform of the oscillation. The resting tension (T) was set by movement of a screw thumb wheel system, which effected slow vertical displacements of the force transducer. Length and force signals were converted from analog to digital with an analog-to-digital converter and recorded in a compatible computer. The strips were preconditioned by slowly cycling tension from 0 to 2g three times and, after the third cycle, they were fixed at 1g and maintained in the organ bath containing Krebs solution aerated with 95% of O_2 and 5% of CO_2 for 50 minutes to allow stress relaxation,

during which Krebs solution was changed every 15 minutes. The frequency of oscillation was 0.25 Hz and the amplitude was 2.5% L_r. After stress relaxation the final resting tension was approximately 0.8g.

Measurements of resistance (R) and elastance (E) were obtained at baseline (R_{BAS} and E_{BAS}, respectively) for 5 minutes and after adding ACh 10⁻³ M (Sigma Chemical, St. Louis, MO) to the bath (R_{ACh} and E_{ACh}, respectively) for 10 minutes. Resistance and elastance were estimated by the recursive least-squares algorithm to the equation of motion:

$$(1) \quad T = E\Delta l + R (\Delta l/\Delta t) + K$$

where T = tension, l = length, $\Delta l/\Delta t$ = is the length change per unit time, and K is a constant reflecting resting tension. Results were standardized for strip size. The unstressed cross-sectional area (A₀) of the strip was obtained from the formula:

$$(2) \quad A_0(\text{cm}^2) = W_0 / (\rho \times L_r)$$

where ρ is the mass density of the tissue taken as 1.06g cm⁻³, W₀ is the wet weight in grams, and L_r is the resting length in cm. Values of R and E were multiplied by L_r/A₀.