ERIKA FELTRINI CAGNONI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS LINFONODOS
BRONCOPULMONARES NA ASMA FATAL**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

SÃO PAULO

2014

ERIKA FELTRINI CAGNONI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS LINFONODOS
BRONCOPULMONARES NA ASMA FATAL**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Cagnoni, Erika Feltrini

Análise histológica dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal / Erika Feltrini Cagnoni. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Patologia.

Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Asma 2.Linfonodos 3.Eosinófilos 4.Imunidade nas mucosas
5.Células dendríticas 6.Histologia

USP/FM/DBD-010/14

Dedicatória

Aos meus pais, especialmente a minha mãe Lilyan e avó Valerya (*in memoriam*), com todo meu amor, gratidão e admiração.

Ao meu querido Paulo e as minhas filhas, Gabriela e Manuela, por darem um sentido especial as minhas conquistas.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a Dr^a Thais Mauad, meu sincero agradecimento pela oportunidade de trabalhar neste grupo de pesquisa. Obrigada por dividir comigo ao longo desses anos toda sua sabedoria, competência e excelência em pesquisas.

Ao Paulo Cagnoni, meu marido, pelo apoio incondicional desde o início desse doutorado, pela compreensão, fé e otimismo frente aos momentos mais difíceis.

A Lilyan Feltrini e Teresa Cristina Cagnoni, mãe e sogra respectivamente, que com tanto carinho e dedicação, auxiliaram-me nos cuidados com minhas filhas durante minhas ausências.

À Prof Dr Miriam Sotto, por tão gentilmente disponibilizar seus conhecimentos referentes a células dendríticas, aplicados no Departamento de Dermatologia desta universidade, que muito nos auxiliaram a nortear o início de nossa pesquisa.

Ao Dr Diogenes pela sua generosidade e disponibilidade em auxiliar-me no decorrer desses anos de doutorado.

A Prof Dra Marisa Dolhnikoff e ao Prof Dr Luiz Fernando (Burns), pela valiosa contribuição na frente aos resultados encontrados em meu trabalho. Ao Dr Luiz, obrigado também pelo auxílio sempre presente na análise de imagens.

Aos amigos do laboratório de Patologia Pulmonar, Raquel, Ruy, Monique, Thais Mendes, Renata Calciolari, German.

As queridas Ângela e Maria Cristina, funcionárias do laboratório de imuno-histoquímica, pela enorme dedicação e competência em todas as reações imuno-histoquímicas desta tese.

A todos os funcionários do laboratório de histologia, especialmente à Kelly, sempre tão solícita. À Ana, responsável pelo scanear das lâminas, por sua grande disponibilidade e atenção.

A coordenação da pós-graduação em patologia, representada pelo Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto.

Aos funcionários, técnicos, patologistas, médicos assistentes do SVOC e pesquisadores do “grupo asma”, pela contribuição na coleta das amostras dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos familiares dos indivíduos falecidos que foram sujeitos dessa pesquisa, por permitirem, ainda que num momento pessoal tão conturbado, o estudo dos tecidos e dos dados clínicos para a pesquisa científica.

Aos indivíduos falecidos que foram sujeitos dessa pesquisa, o meu sincero respeito.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

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 Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de anexos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Asma.....	2
1.1.1 Definição e Epidemiologia.....	2
1.1.2 Etiologia e Classificação.....	4
1.1.3 Patologia da Asma.....	5
1.1.4 Asma Fatal.....	6
1.2 Sistema Linfático e Linfonodos Broncopulmonares.....	7
1.3 Fisiopatologia e Resposta Imune na Asma - Tráfego Celular entre Pulmão e Linfonodo Broncopulmonar.....	10
2 OBJETIVOS.....	18
3 MÉTODOS.....	20
3.1 Casuística.....	21
3.2 Coleta e processamento do tecido pulmonar por imuno-histoquímica e histoquímica.....	22
3.3 Análise de imagens.....	24
3.4 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	29

4.1 Características clínicas.....	30
4.2 Morfometria.....	32
4.3 Expressão de Eosinófilo.....	33
4.4 Expressão de Fator XIIIa +.....	36
4.5 Expressão de CD83+.....	39
4.6 Expressão de CD207+.....	42
4.7 Expressão de CD1a+.....	45
4.8 Expressão de CD4+.....	48
4.9 Expressão de CD8+.....	51
4.10 Expressão de CD20+.....	54
4.11 Expressão de CD23+.....	57
4.12 Expressão de VCAM-1+.....	60
4.13 Correlações.....	63
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÕES.....	84
7 ANEXOS.....	86
8 REFERÊNCIAS.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Área cortical
AF	Asma fatal
BALF	Lavado bronco-alveolar
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CE	Camada externa
CI	Camada interna
CM	Camada muscular
Ctrl	Controle
GINA	Global Initiative for Asthma
DATASUS	Departamento de informática do sistema único de saúde
HEV	High endothelial venules
IgE	Imunoglobulina tipo E
IL-3	Interleucina tipo 3
IL-4	Interleucina tipo 4
IL-5	Interleucina tipo 5
LN	Linfonodo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
OMS	Organização mundial de Saúde
OVA	Ovalbumina
SUS	Sistema único de saúde
SVOC-USP	Serviço de verificação de óbito da universidade de São Paulo
VAG	Via aérea grande

VCAM-1 Molécula de adesão celular vascular-1

UTI Unidade de terapia intensiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados Clínicos.....	31
-------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomiografias de via aérea grande de asma com as divisões nomeadas das camadas; CE: camada externa, CI: camada interna, CM: camada muscular.....	26
Figura 2. Fotomiografia de linfonodo broncopulmonar de asma com area cortical selecionada	27
Figura 3. Expressão de eosinófilos em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle	34
Figura 4. Expressão de Fator XIIIa+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	37
Figura 5. Expressão de CD83+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle	40
Figura 6. Expressão de CD207+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	43
Figura 7. Expressão de CD1a+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	46
Figura 8. Expressão de CD4+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	49
Figura 9. Expressão de CD8+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	52

Figura 10. Expressão de CD20+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	55
Figura 11. Expressão de CD23+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle.....	58
Figura 12. Expressão de VCAM-1+ em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controle	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Expressão de eosinófilos nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles.....	35
Gráfico 2. Expressão de Fator XIIIa+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles.....	38
Gráfico 3. Expressão de CD83+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles	41
Gráfico 4. Expressão de CD207+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles.....	44
Gráfico 5. Expressão de CD1a+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles.....	47
Gráfico 6. Expressão de CD4+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles	50
Gráfico 7. Expressão de CD8+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles	53

Gráfico 8. Expressão de CD20+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles56

Gráfico 9. Expressão de CD23+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles.....59

Gráfico 10. Expressão de VCAM-1+ nas camadas interna, camada muscular e camada externa das vias aéreas grandes e na área cortical dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal e controles.....62

Gráfico 11. A e B - Correlações negativas entre as células dendríticas imaturas CD1a+ nas camadas externas e camadas internas das vias aéreas grandes e densidade de eosinófilos nos linfonodos broncopulmonares na asma.....64

C – Correlação positiva entre linfócitos T CD4+ e células dendríticas maduras CD83+ nos linfonodos broncopulmonares dos asmáticos64

Gráfico 12. A - Correlação entre as células dendríticas maduras CD83+ com as células dendríticas de Langerhans CD207+ nos linfonodos broncopulmonares dos asmáticos.....65

B-D- Correlação das células dendríticas de Langerhans CD207+ nas 3 camadas das vias aéreas grandes dos asmáticos, camada interna, camada muscular e camada externa com linfonodos broncopulmonares asmáticos.....65

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq – HCFMUSP)	87
Anexo B. Entrevista	88
Anexo C. Tabela 2. Expressão de Eosinófilos, Fator XIIIa+, CD 83+, CD 207+ nas vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares no controle e na asma.....	90
Anexo D. Tabela 3. Expressão de CD1a+, CD4+, CD8+ nas vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares no controle e na asma	91
Anexo E. Tabela 4. Expressão do CD20+, CD23+ e VCAM-1+ nas vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares no controle e na asma	92

RESUMO

Cagnoni EF. *Análise histológica dos linfonodos broncopulmonares na asma fatal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que envolve diversos tipos de células, especialmente eosinófilos, células T, macrófagos, células epiteliais e células dendríticas. Durante a exposição alérgica, células dendríticas migram para os linfonodos broncopulmonares e iniciam a resposta imune na asma. Em asma humana, poucas informações sobre células dendríticas, células B, células T, eosinófilos, VCAM em linfonodos broncopulmonares são conhecidas. Poucos estudos também descrevem a interação celular entre linfonodos e vias aéreas na asma durante exacerbações. **MÉTODOS:** Foram analisados por método histoquímico, imuno-histoquímico e análise de imagens as expressões de Vermelho Congo, FatorXIIIa+, CD83+, CD207+, CD1a+, CD23+, CD20+, CD4+, CD8+, VCAM, em vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares de 11 indivíduos não asmáticos falecidos por asma e 8 controles não asmáticos. A análise dos marcadores foi realizada na região cortical dos linfonodos e em três regiões das vias aéreas: camadas interna, muscular e externa. **RESULTADOS:** Os indivíduos asmáticos apresentaram maior expressão de eosinófilos nos linfonodos broncopulmonares e nas três camadas das vias aéreas. Os marcadores FatorXIIIa+, CD23+, CD20+, CD4+ e CD8+ apresentaram aumento na camada externa das vias aéreas dos indivíduos asmáticos. **CONCLUSÕES:** Os eosinófilos estão aumentados nos linfonodos broncopulmonares e nas vias aéreas dos asmáticos. Alguns marcadores como o FatorXIIIa+, CD20+, CD4+, CD8+ e CD23+ estão aumentados apenas na camada externa das vias aéreas dos asmáticos. VCAM, CD83+, CD207+, CD1a+ não apresentaram aumento nos asmáticos. Este resultado sugere que esses marcadores não estão relacionados ao evento da asma fatal nos indivíduos estudados. As correlações encontradas entre vias aéreas e linfonodos nos asmáticos sugerem que na asma fatal ocorra um fluxo celular direcionado. Nossos resultados fornecem novas evidências para a participação do linfonodo broncopulmonar na exacerbação da asma.

Descritores: Asma, asma fatal, linfonodo broncopulmonar, células dendríticas, eosinófilos, resposta imune.

SUMMARY

Cagnoni EF. *Histological analysis of bronchopulmonary lymph nodes in fatal asthma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

INTRODUCTION: Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways that involves many different cells, specially mast cells, eosinophils, T cells, macrophages, epithelial cells and dendritic cells (DCs). During allergen exposure, pulmonary DCs migrate to bronchopulmonary lymph nodes (LNs) and prime the immune cells that will characterize the immune response in asthma. In human asthma, there is no information about the composition of DCs, B cells, T cells, and vessels in the regional LNs involved in the immune responses to inhaled antigens. Also, there is little information about the lung – LN cells trafficking occurring in asthma during exacerbations. **METHODS:** Using histochemistry, immunohistochemistry and image analysis, we investigated the expression of Congo Red+ (eosinophil), factor XIIIa+, CD23+, CD4+, CD8+, CD20+, CD207+, CD83+, CD1a+ cells and VCAM-1+ in the large airways and bronchopulmonary lymph nodes of 11 non-smoker patients that died due to an asthma exacerbation and compared with 8 deceased non-asthmatic controls. The analysis of the markers was carried out in the cortical área of the lymph nodes and three layers of the airways: internal, airway smooth muscle and outer layer. **RESULTS:** The LNs of asthmatics had increased expression of eosinophils when compared to controls. The large airways of asthmatics had increased expression of eosinophils in all the layers and factor XIIIa+, CD4+, CD8+, CD20+ and CD23+ had increased in the outer layer. **CONCLUSIONS:** A fatal asthma episode is associated with an altered expression of eosinophils in LNs and large airways. Factor XIIIa+ monocyte dendritic cel, CD4+, CD8+, CD20+, CD23+ cells had increased in the large airways without a concomitant increase in the expression of these cells in bronchopulmonary LNs. However, some DC cell trafficking between the airway mucosa and LNs seems occurs in this severe fatal asthma exacerbation.

Descriptors: Asthma, fatal asthma, bronchopulmonary lymph node, dendritic cells, eosinophil, immune response

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

1.1.1 Definição e Epidemiologia

A asma é definida, pelo *Global Initiative for Asthma –GINA-(2012)*, como

Uma doença inflamatória crônica das vias aéreas resultante da participação de várias células. A inflamação crônica está associada com a hiperresponsividade das vias aéreas, levando a episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, opressão torácica e/ou tosse, especialmente a noite ou no início da manhã. Estes episódios são normalmente associados a obstrução do fluxo de ar nas vias aéreas que pode ser reversível imediatamente ou após terapia broncodilatadora.

A asma é um problema mundial que afeta cerca de 300 milhões de pessoas. Há um aumento de prevalência na África, América Latina e algumas partes da Ásia, demonstrando que a doença configura um problema de saúde mundial (Masoli et al., 2004; Beasley, 2004; Asher et al., 2006).

A mortalidade estimada por asma no mundo é de 250 mil pessoas por ano e, curiosamente, a mortalidade não apresenta correlação com a prevalência da doença (Beasley, 2004; Masoli et al., 2004). De acordo com o GINA, (2012) os dados mundiais existentes sobre a doença são insuficientes para explicar a variação que ocorre entre prevalência e mortalidade por asma.

Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 20 milhões de asmáticos se considerada uma prevalência global de 10%. Anualmente ocorrem em média 350 mil internações de adultos com idade superior a 20 anos por asma. No ano de 2011 foram registradas pelo departamento de informática do sistema único de saúde (DATASUS) 160 mil hospitalizações por asma incluindo todas as faixas etárias, representando para o sistema único de saúde (SUS) a quarta causa de hospitalização no país (Sole et al., 2006; Sole et al., 2007; Ministério da Saúde, 2012).

O impacto da doença não se limita as taxas de mortalidade, mas também a demais fatores como gastos com internações, gastos com visitas médicas, dias de trabalho e/ou escola perdidos e, principalmente, prejuízo na qualidade de vida do paciente (Mahapatra, 1993; Lenney, 1997; Lai et al., 2003; Neffen et al., 2005).

O nível de controle da asma, a gravidade da doença e os recursos médicos utilizados por asmáticos brasileiros são pouco documentados. Segundo Santos e colaboradores (2007) o custo direto da asma para utilização de serviços de saúde e medicações foi o dobro entre pacientes com asma não controlada do que entre aqueles com asma controlada. Os custos

indiretos como número de dias perdidos de trabalho e/ou escola também foram superiores no grupo com asma não controlada.

Os gastos com asma grave representam quase 25% da renda familiar dos pacientes de classes menos favorecidas, sendo que a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é de que esse gasto não exceda a 5% da renda familiar. No Brasil, a implementação do programa que propicia tratamento adequado e distribuição gratuita de medicamentos a partir do ano de 2002, resultou na melhora do controle da doença, da qualidade de vida e da renda familiar, de acordo com estudo realizado por Franco et al (2009).

1.1.2 Etiologia e Classificação

Os fatores determinantes para o surgimento e evolução da asma ainda são pouco compreendidos, motivo pelo qual a definição de prognóstico da doença pode ser tão variável. A asma pode ter início na infância geralmente associada a uma predisposição genética a desenvolver anticorpos do tipo imunoglobulina E (IgE) específicos contra alérgenos ambientais comuns, mecanismo conhecido como atopia. A doença que se inicia na fase adulta normalmente não está relacionada a atopia e, quanto mais idoso o paciente, mais grave costuma ser suas manifestações (Bisgaard e Bonnelykke, 2010).

A patogênese da asma que se inicia na idade adulta é pouco compreendida quando comparada a doença iniciada na infância. Pesquisas apontam que a grande maioria dos pacientes adultos asmáticos, já apresentavam quadros de asma na infância que foram sub-diagnosticados ou não diagnosticados (Musani et al., 2008).

A asma é classificada clinicamente em leve, moderada ou grave de acordo com a frequência dos sintomas, necessidade do uso de broncodilatadores, valores espirométricos, testes de broncoprovocação e medidas seriadas de eosinófilos e IgE (Taylor et al., 2008; GINA, 2012).

1.1.3 Patologia da Asma

Grande parte dos conhecimentos sobre a fisiopatologia da asma originaram-se em estudos de autópsias de pacientes que morreram em mal asmático. Macroscopicamente, os pulmões encontram-se hiperinsuflados, mesmo após a abertura da cavidade pleural. A superfície do corte após a secção do pulmão mostra a presença de tampões mucosos acinzentados e gelatinosos obstruindo as vias aéreas (Jeffery, 1992).

Achados microscópicos encontrados são edema e infiltrado celular de parede brônquica, intensa descamação epitelial, espessamento da membrana basal, hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas e hiperplasias de

glândulas. Esses achados sugerem um infiltrado inflamatório prévio de longa duração (Saetta et al., 1991; Carrol et al., 1996).

O processo inflamatório tem como resultado as manifestações clínico-funcionais características da doença. O estreitamento brônquico intermitente e reversível é causado pela contração do músculo liso brônquico, pelo edema da mucosa e pela hipersecreção brônquica. A hiper-responsividade brônquica é a resposta broncostritora exagerada ao estímulo que seria inócuo em pessoas normais. A inflamação crônica da asma é um processo no qual existe um ciclo continuo de agressão e reparo que pode levar a alterações estruturais irreversíveis, isto é, ao remodelamento das vias aéreas (Cockroft, 2010; GINA, 2012).

1.1.4 Asma Fatal

A asma fatal é definida como óbito em decorrência de um episódio de broncoconstrição em indivíduo com diagnóstico prévio de asma (Woolcock, 1998).

Alguns fatores estão associados ao maior risco de óbito, dentre os quais pode-se citar: inadequado acompanhamento médico, falta de aderência ao tratamento com corticosteroides inalatórios; nove ou mais admissões hospitalares pela doença no periodo de um ano; história prévia de internação

em unidade de terapia intensiva (UTI) com permanência em ventilação mecânica devido a asma, doenças psiquiátricas ou uso de sedativos; uso de três ou mais categorias de drogas para controle da doença associado ao uso excessivo de beta-agonistas para broncoespasmo; hábitos como alcoolismo e tabagismo (Crane et al., 1992; Sidebotham e Roche, 2003; GINA, 2012).

1.2 Sistema Linfático e Linfonodos Broncopulmonares

O sistema linfático apresenta uma importante função imunológica participando ativamente da resposta inflamatória e do controle de infecções através de sua íntima ligação com os vasos sanguíneos (Jackson, 2003). Esse sistema é composto por uma rede de vasos linfáticos; pela linfa, que representa o líquido que circula no interior dos linfáticos e pelos linfonodos (LNs). Os capilares e os vasos linfáticos são muito permeáveis e conseguem capturar os micro-organismos e seus produtos direcionando-os aos LNs (Tortora et al., 2003).

Conhecidos também como nodos linfáticos, os LNs são formações que se dispõem a partir e ao longo dos vasos linfáticos totalizando cerca de 600 a 700 unidades distribuídas por todo o corpo. Desempenham as funções de reguladores da corrente linfática, filtrando as impurezas da linfa, e também como produtores de células de defesa especializadas, tais como os linfócitos (Kay et al., 1979, Ferry e Harris, 1997).

A histologia do LN caracteriza-se por apresentar um envoltório conhecido por cápsula fibrosa e por apresentar em seu interior septos conjuntivos que permeiam o parênquima dividindo-o em duas regiões: o córtex e a medula. Pela região cortical ocorre a entrada dos vasos linfáticos aferentes que trazem a linfa a ser filtrada. Ainda nessa região, encontram-se os centros germinativos que são estruturas ricas em linfócitos tipo B. Abaixo dos centros germinativos, localiza-se a zona paracortical que contém linfócitos tipo T. A célula dendrítica, conhecida por ser uma célula apresentadora de antígeno, pode estar presente tanto na área cortical quanto na área paracortical (Kay et al., 1979; van der Valk e Meijer, 1992; Randolph et al., 2005). Na zona paracortical podem ser observadas estruturas vasculares que representam as veias do endotélio alto, designadas na língua inglesa por “high endothelial venules” (HEVs). As HEVs apresentam a função de recrutar linfócitos provenientes da circulação sanguínea para o interior do LN, caso haja necessidade, através de antígenos e mediadores químicos (Chin et al., 1982; Pals et al., 1986; Othani e Othani, 2008). A região medular do LN é composta por cordões medulares ricos em macrófagos, que direcionam a linfa filtrada juntamente com os linfócitos recém produzidos para a região do hilo linfonodal. Na região do hilo linfonodal encontram-se a artéria e a veia linfonodal. A linfa sairá do LN através dos vasos linfáticos eferentes e se destinará às veias subclávias, retornando para a circulação sanguínea (Ferry e Harris, 1997). Dessa forma, a linfa entra em contato com a circulação sanguínea e os linfócitos recém produzidos nos LNs serão atraídos através de mediadores químicos, para o local da inflamação (Othani e Othani, 2008).

Os antígenos capturados pelas células dendríticas são apresentados no interior do LN para dois tipos de linfócitos: os linfócitos B que são estimulados a se tornarem plasmócitos que produzem anticorpos humorais e aos linfócitos T que se diferenciarão em células T efectoras que são essenciais para o sistema imune celular (Tortora et al., 2003).

Na região pulmonar o sistema linfático é formado por uma densa rede de capilares que margeiam as vias aéreas, compreendendo as vias aferentes que adentram nos LNs broncopulmonares (El-Chemaly et al., 2008). São denominados LNs broncopulmonares os LNs estão dispostos ao longo das grandes vias aéreas (Moyron-Queiroz et al., 2007, Netter, 2008).

De acordo com diversos trabalhos como os de Pump(1972), Nowak et al(2002) e Tscherning e Pabst(2009), acredita-se que o suprimento sanguíneo dos LNs broncopulmonares, assim como ocorre nas vias aéreas cartilaginosas, seja pela circulação brônquica.

1.3 Fisiopatologia e Resposta Imune na Asma - Tráfego Celular entre Pulmão e Linfonodo Broncopulmonar

Os mecanismos fisiopatológicos da asma são parcialmente conhecidos e, diversos estudos para melhor compreendê-lo têm sido realizados em todo o mundo (Wenzel, 2006; Holgate e Davies, 2009).

A resposta imune na asma ocorre através de uma série de eventos em que as células envolvidas no processo inflamatório com os LNs broncopulmonares desempenham papéis fundamentais na fisiopatologia da doença. Em humanos, não há relatos sobre a presença de células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T e demais células inflamatórias nos LNs broncopulmonares envolvidos na resposta imunológica em asmáticos. Além disso, existem poucas informações sobre o tráfego celular entre pulmão e LNs broncopulmonares durante um evento de asma exacerbada (Abbas e Lichtman, 2005).

Entre as células inflamatórias presentes no processo inflamatório da asma destacam-se os eosinófilos, linfócitos T e B, células dendríticas, mastócitos, macrófagos e neutrófilos. Dentre os mediadores inflamatórios já identificados, destacam-se as quimiocinas, citocinas, eicosanoides, histaminas e óxido nítrico (Chung e Barnes, 1999; Kay, 2005; GINA, 2012).

A asma está frequentemente associada a atopia através da resposta mediada por IgE a aeroalérgenos comuns (Holgate, 1993). Alérgenos inalados, quando entram em contato com a mucosa respiratória, são capturados por células dendríticas em estado imaturo, presentes fisiologicamente no epitélio brônquico. Essas células fagocitam e processam os antígenos liberando o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) tipo II e atingindo gradativamente o estado de maturação. Esse processo desencadeia a proliferação de linfócitos T auxiliares 2 (Th2) (Holt et al., 2000; Von Garnier et al., 2005; Hammad e Lambrecht, 2006; Kitamura et al., 2007). Os linfócitos T auxiliares locais irão produzir as substâncias conhecidas como interleucina (IL) tipo 3, IL tipo 4, IL tipo 5 e GM-CSF que determinarão o crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos (Holgate et al., 1993).

As células dendríticas fagocitam os antígenos e migram através dos vasos linfáticos aferentes para os LNs broncopulmonares. Na região cortical dos LNs broncopulmonares, ocorre a apresentação do antígeno para os linfócitos T iniciando uma resposta imune específica. Linfócitos são recrutados da circulação sanguínea através das HEVs e tornam-se específicos para o antígeno apresentado pela célula dendrítica (Butcher et al., 1980; Randolph et al., 2005; Smit e Lukacs, 2006; Buc et al., 2009).

As células dendríticas desempenham um importante papel para o sistema imunológico na reação inflamatória da asma. **Células dendríticas** representam uma complexa e heterogênea classe de células apresentadoras de antígenos e não estão totalmente caracterizadas no parênquima pulmonar

humano (Serti et al., 1986). Essas células são provenientes de células progenitoras comuns da medula óssea que vão se diferenciando até transformarem-se em células dendríticas. São identificadas até o momento duas maiores classes de células dendríticas: as mieloides e as plasmocitoides que podem ser diferenciadas por suas diferentes origens, diferentes expressões de marcadores e por suas diferentes atuações. As células dendríticas do tipo plasmocitoides originam-se de precursores de células linfóides e parecem estar mais relacionadas com respostas a doenças virais. As células dendríticas do tipo mielóide originam-se de precursores de células mieloides e podem ser subdivididas em intersticiais, representadas pelo marcador Fator XIIIa+, células dendríticas de Langerhans, expressas pelo marcador CD207+ (Vermaelen e Pauwels, 2005; Zaba et al., 2007; Gondak et al., 2013). Podem também ser classificadas como células dendríticas foliculares, expressas pelo marcador CD23+ dentro do centro germinativo no interior dos LNs. Outro critério de classificação utilizado é de acordo com o estado de maturação, sendo representada pelo marcador CD83+ as células dendríticas maduras, e pelo marcador CD1a+ expressando as células dendríticas imaturas (Stevens et al., 1982; Lechmann et al., 2001; Lutz e Schuler, 2002; Heer et al., 2005; Von Garnier et al., 2005; Heer et al., 2005; Zaba et al., 2009).

De acordo com Jahsen et al. (2001), indivíduos asmáticos expostos a um evento de broncoprovocação com alérgeno, apresentam um aumento de células dendríticas mielóides na mucosa brônquica. Apesar desse achado nas

vias aéreas, nenhuma informação foi referida em relação a presença de células dendríticas nos LNs broncopulmonares em asmáticos humanos.

Um trabalho com animais mostrou que diante de situações agudas de inflamação, as células dendríticas do tipo de Langerhans podem ser repovoadas por células precursoras da corrente sanguínea, sendo estas células provavelmente do tipo monócitos (Ginhoux, 2006).

O papel das células dendríticas na resposta alérgica na asma em humanos ainda é pouco conhecido. Apesar da complexidade do entendimento dessas células, muito tem sido investigado objetivando-se propor terapêuticas mais apropriadas para os pacientes asmáticos (Van Rijt e Lambrecht, 2005).

Os **eosinófilos** desempenham um importante papel na resposta inflamatória nas vias aéreas na asma e parecem estar relacionados na patogênese de vários aspectos da doença (Kay, 2005). Em estudos histoquímicos, os eosinófilos são marcados pela coloração Vermelho Congo (Grouls e Helpap, 1981, Kelly et al., 2010). Essas células efetoras liberam proteínas altamente tóxicas de seus grânulos produzindo mediadores lipídicos que vão amplificar a resposta inflamatória através do recrutamento e ativação de mais células (Auchincloss et al., 1997). Diversos estudos sobre o número de eosinófilos no sangue, no lavado broncoalveolar e em biópsias brônquicas mostraram que asmáticos apresentaram níveis elevados dessas células quando comparados a indivíduos não asmáticos. Sabe-se também que existe uma correlação entre eosinofilia e gravidade da doença (Djukanovic et al., 1990 e Walker et al., 1991). Estudos em animais têm descrito a presença de

eosinófilos em LNs broncopulmonares com forte expressão de MHC-II, após a sensibilização alérgica provocada. Esse resultado demonstra que, numa situação aguda, os eosinófilos podem ser capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T. Em humanos, não há informações disponíveis até o momento sobre esse achado encontrado em animais (Shi et al., 2000; Padigel et al., 2006; Wang et al., 2007).

Outras células muito importantes na resposta inflamatória da asma são os linfócitos T e linfócitos B. **Linfócitos B** expressam o marcador CD20+ e são células do sistema imunológico responsáveis pela produção de anticorpos específicos, representando a imunidade humoral. Na asma os linfócitos B após encontrarem os antígenos, originam os plasmócitos que produzirão IgE. A imunoglobulina IgE apresenta afinidade por receptores da membrana dos mastócitos e basófilos. Os complexos formados entre as ligações entre IgE, basófilos, mastócitos e os antígenos irão produzir e liberar substâncias como histaminas, heparinas, SRS-A, ECF-A que representam potentes mediadores químicos que atuam na resposta inflamatória (Kircher e Marquardt, 2008; Musani et al, 2008). Poucos estudos analisam a presença de linfócitos B na asma. Um estudo de Simões e col. encontrou uma predominância de linfócitos T sobre linfócitos B em asmáticos que faleceram num episódio fatal de asma.

Outro componente importante na reação inflamatória da asma é o marcador **CD23+** ou **FcεRII** pode ser encontrado em forma solúvel ou ligado a membrana da sua proteína. FcεRII é conhecido como um receptor de baixa

afinidade por IgE e apresenta um importante papel na síntese dessa imunoglobulina. Na sua apresentação solúvel, esse marcador está vinculado ao CD21+ e IgE, estimulando a síntese de IgE. Por outro lado, o marcador CD23+ ligado a membrana, quando em contato com o complexo alérgeno-IgE, promove uma regulação negativa de IgE. O marcador CD23+ pode também ser expresso por células dendríticas foliculares podendo estar presente nos centros germinativos dos linfonodos, facilitando a apresentação dos antígenos para os linfócitos T (Kircher, 2008; Gould e Sutton, 2009; Denning et al., 2009). Nas vias aéreas, o CD23+ além de representar marcação de baixa afinidade de IgE, também pode representar os linfócitos B em repouso, ou seja, sem ativação para tornarem-se plasmócitos. De acordo com a literatura, poucos achados em asma humana descrevem o marcador CD23+ ligado a membrana, resultando dessa forma em limitadas informações sobre a regulação negativa de IgE (Simões et al., 2005).

Os **linfócitos T** apresentam duas principais subpopulações conhecidas como CD4 e CD8 que são encontrados na mucosa brônquica tanto em indivíduos não-asmáticos como em asmáticos (Ying et al., 1997). A principal participação dessas células na asma ocorre através da produção de citocinas que vão promover os eventos relacionados aos achados patológicos da doença, tais como: aumento da síntese de IgE, maturação e ativação de mastócitos e basófilos, e infiltração eosinofílica com consequente dano epitelial. Ambos linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ desempenham um papel importante representando a imunidade celular na modulação da inflamação na asma (Saetta et al., 2003). Simões et al (2005) demonstraram

que pacientes falecidos por uma crise de asma, tiveram uma predominância de linfócito T CD4+ nas vias aéreas. É plausível especular que em LNs broncopulmonares de pacientes que morreram por asma poderíamos encontrar uma maior população de linfócitos T CD4, entretanto essa informação ainda não está disponível (Till et al., 1995; Ying et al., 1997; Chung e Barnes, 1999; O'Sullivan et al., 2001; Cho et al., 2002).

A molécula de adesão celular vascular-1 (**VCAM-1**) está envolvida com o recrutamento de linfócitos para linfonodos em processos inflamatórios, sendo expressa pelas HEVs. Na asma, a expressão aumentada de VCAM-1 nos vasos da mucosa brônquica de pacientes asmáticos após a broncoprovocação com alérgeno pode estar relacionada com o direcionamento de eosinófilos para os pulmões (Schleimer et al., 1992, Boscacci et al., 2010, Dahlin et al., 2012). Não há informações sobre a expressão de VCAM-1 nos linfonodos broncopulmonares de asmáticos.

A falta de conhecimento sobre as possíveis alterações nos LNs broncopulmonares na asma resulta da impossibilidade de obtenção de tal material nos pacientes. O uso de material de autópsia pode representar uma grande possibilidade neste campo de conhecimento. Além disso, a análise dos LNs broncopulmonares de pacientes vítimas de um ataque de asma pode representar uma oportunidade para elucidar um possível tráfego celular entre pulmão e LN broncopulmonar durante uma exacerbação grave.

Nesse estudo, nós hipotetizamos que em pacientes que morreram por uma crise exacerbada de asma haveriam alterações nas populações de

células dendríticas, células FcεRII (CD23+), linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ linfócitos B+, e nas expressões de VCAM-1+ e eosinófilos nos LNs broncopulmonares quando comparados a pacientes não asmáticos. Nós também investigamos se a composição celular do LN broncopulmonar poderia ter correlações com as células presentes na mucosa brônquica das vias aéreas grandes.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Analisar a expressão de células dendríticas maduras CD83+, células dendríticas de Langerhans CD207+, células dendríticas intersticiais Fator XIIIa+, células dendríticas imaturas CD1a+, linfócitos B CD20+, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, marcador de baixa afinidade FcεRII / CD23+, expressão de VCAM-1 e a expressão celular de eosinófilos nos LNs broncopulmonares de pacientes falecidos de asma e comparar com indivíduos não asmáticos falecidos de causas não pulmonares.

2.2 Comparar a expressão de células dendríticas maduras CD83+, células dendríticas de Langerhans CD207+, células dendríticas intersticiais FatorXIIIa+, células dendríticas imaturas CD1a+, linfócitos B CD20+, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, VCAM, marcador de baixa afinidade FcεRII / CD23+, expressão de VCAM-1 e expressão celular de eosinófilos nos LNs broncopulmonares e nas vias aéreas grandes de indivíduos asmáticos e não asmáticos.

2.3 Investigar a existência de correlação entre a expressão dos marcadores e as características clínicas dos pacientes.

3 MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP), Protocolo de Pesquisa nº 1239/09 (anexo A). Foram estudados 11 indivíduos que faleceram em decorrência de uma exacerbação aguda de asma (asma fatal, AF), cujas autópsias foram realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP), ligado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 2004 e 2006. Dados clínicos referentes ao diagnóstico de asma, início da asma, duração da doença, tratamento e hospitalizações prévias foram obtidos por meio de uma entrevista com um parente próximo (anexo B). Os critérios de inclusão utilizados foram: 1. História de asma confirmada por diagnóstico e óbito durante uma crise aguda de asma; 2. Alterações patológicas tais como hiperinsuflação pulmonar e hipersecreção de muco e alterações histológicas relacionadas à asma tais como descamação epitelial, espessamento da membrana basal, espessamento da musculatura lisa brônquica e infiltrado inflamatório brônquico com ou sem eosinófilos; 3. Idade entre 30 e 60anos; 4. Não fumantes. Oito indivíduos falecidos de causas não pulmonares, sem

história prévia de doenças respiratórias e sem alteração macro e microscópicas pulmonares, não fumantes, com idade entre 30 e 60 anos, foram incluídos como controles (Ctrl). Em média, 14 horas decorreram entre o óbito e a realização da autópsia com coleta de tecido pulmonar e linfonodo broncopulmonar.

3.2 Coleta e processamento do tecido pulmonar por imuno-histoquímica e histoquímica

Foi coletado tecido pulmonar e LNs broncopulmonares aleatoriamente de áreas centrais dos pulmões de cada paciente. O tecido foi fixado em formaldeído tamponada a 10%, processado rotineiramente e emblocado em parafina. Cortes de 5µm de tecido pulmonar e de LNs broncopulmonares foram feitos para as reações histoquímica e imuno-histoquímicas.

Inicialmente a parafina dos cortes foi removida com xilol. Uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% foi aplicada durante 35 minutos para inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação antigenica foi realizada utilizando uma solução de citrato por 45 minutos. As secções foram incubadas com o anticorpo primário durante a noite a 4 C. Um kit Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle, UK) foi utilizado para os anticorpos secundários, e 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) foi utilizada como um cromogênio. As secções foram

contrastadas com hematoxilina de Harris. Para controles negativos, o anticorpo primário foi substituído com phosphate buffered saline (PBS).

Os seguintes tipos celulares foram identificados utilizando-se reações imuno-histoquímicas com anticorpos específicos: Células dendríticas maduras (CD83, 1H4b, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA); Células dendríticas de Langerhans (CD207, 12D6, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:200, Abcam, Cambridge, UK); Células dendríticas intersticiais (Fator XIIIa, E980.1, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:400, Leica Biosystems, New Castle, UK); Células dendríticas imaturas (CD1a, 010, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:200, Dako, Glostrup, DNK); Linfócitos T CD4 (CD4, 1F6, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:300, Leica Biosystems, New Castle, UK); Linfócitos T CD8 (CD8, C8/144B, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:400, Dako, Glostrup, Denmark); Linfócito B (CD20, L26, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:12000, Dako, Glostrup, Denmark); Marcador de baixa afinidade de IgE em pulmões e células dendríticas foliculares em linfonodos (CD23, 1B12, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:200, Abcam, Inc, Cambridge, USA). Para a identificação da molécula de adesão vascular VCAM-1 foi utilizado o anticorpo VCAM-1, E-10, anticorpo monoclonal anti-humano produzido em camundongo, diluição 1:450, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.

Para a identificação dos eosinófilos foi utilizada a técnica histoquímica com Vermelho Congo, previamente descrita por Grouls e Helpap (1981) e Kelly et al. (2010).

3.3 Análise de imagens

Duas vias aéreas grandes classificadas de acordo com o perímetro da membrana basal em vias aéreas grandes (VAG), (perímetro da membrana basal > 6mm) e presença de cartilagem, e de um a três linfonodos broncopulmonares foram cortados transversalmente e analisados para cada caso. As lâminas foram digitalizadas pelo aparelho 3DHistech Slide Scanner (3DHistech, Hungary) e as medidas das áreas coradas positivamente foram realizadas com o software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), instalado em um computador pessoal. As medidas foram realizadas por um observador cego para os dois grupos de estudo (Erika Feltrini Cagnoni). Foi realizado o teste entre interobservadores com correlação de Spearman ($r: 0,9 / p > 0,00$).

Cada VAG foi dividida em 3 camadas para a análise, a camada interna (área compreendida entre a membrana basal e a borda interna do músculo liso brônquico, CI), camada muscular (CM) e camada externa (área compreendida entre a borda externa do músculo liso e o parênquima, CE). Nos LNs broncopulmonares, a análise foi realizada na área cortical (AC). A

área com marcação positiva para cada anticorpo dentro da camada delimitada foi determinada por limiar de cor. Para a definição do limiar de cor, diferentes cortes corados para cada anticorpo (entre 6 e 8 cortes por anticorpo), assim como controles negativos, foram avaliados para se obter o melhor intervalo de positividade entre esses casos, e checados pelos patologistas pulmonares Luiz Fernando Ferraz da Silva e Thais Mauad. Para cada reação um padrão de cor foi estabelecido. Estes procedimentos geraram um arquivo contendo todas as informações de seleção de cores, o qual foi aplicado posteriormente para todos os casos corados com o mesmo anticorpo (Araujo et al, 2008). Foram medidas as áreas coradas positivamente em toda a extensão de cada camada da via aérea e em toda a extensão da camada cortical do linfonodo a ser analisado. A expressão de cada proteína é apresentada como área positiva corrigida pela área total da camada em análise. O método da análise do vermelho congo consistiu na contagem das células eosinófilos em toda a extensão das camadas externa, muscular e interna das vias aéreas grandes e contagem de eosinófilos em toda a extensão da área cortical dos linfonodos nos grupos asma e controle. Fotomicrografias representativas de VAG e LNs broncopulmonares estão apresentadas respectivamente na Figura 1 e 2.

Figura 1. Fotomiografias de via aérea grande de asma com as divisões nomeadas das camadas; CE: camada externa, CI: camada interna, CM: camada muscular (A); camada interna (CI) selecionada como exemplo (B); imagem da camada interna (CI) selecionada com vista aproximada para marcação de área positiva de CD4 (C); camada interna (CI) selecionada para exemplificar marcação da area total (D). Observe em A-D o acúmulo de muco na luz brônquica.

Figura 2. Fotomiografia de linfonodo broncopulmonar de asma (A); área cortical selecionada (B); área cortical selecionada com marcação de área positiva de CD20+ (C); área cortical para exemplificar marcação de área total (D).

3.4 Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a distribuição das variáveis. Para as variáveis cuja distribuição foi normal, o teste-t para a comparação de medias foi utilizado. Quando a variável obteve distribuição não paramétrica, o teste de Mann-Whitney foi utilizado. Os testes de correlação utilizados foram o teste de Pearson ou de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Dados numéricos são apresentados como medianas (intervalo interquartil) ou média $\pm$ desvio padrão. Os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas

As características clínicas dos indivíduos estudados estão descritas na tabela 1. A mediana de idade dos asmáticos e controles é 50 e 48,5 anos, respectivamente. O número de mulheres no grupo asma foi de 8 e no grupo controle de 3. Todos os pacientes asmáticos obtiveram diagnóstico prévio da doença mas apenas 36,4% eram acompanhados regularmente por um médico para o tratamento da doença e utilizavam corticoides sistêmicos ou inalatórios. Nove ponto um por cento dos asmáticos utilizavam corticoides inalatórios e 100% dos asmáticos utilizavam broncodilatador de curta duração. Quatro desses pacientes foram hospitalizados em decorrência de uma exacerbação de asma no ano anterior ao óbito e um paciente foi internado em Unidade de Terapia Intensiva por uma crise de asma anteriormente ao óbito. A duração da crise de asma até o óbito apresentou como mediana 96 horas.

Tabela 1. Características clínicas dos grupos estudados

	Asma	Controle
Indivíduos, n (M/F)	11 (3/8)	8 (5/3)
Idade (anos)	50 (36-58)	48.5 (48-53)
Início da asma (anos)	26 (5-41)	-
Duração da asma (anos)	22 (17.5-31)	-
Duração da última crise exacerbada de asma (h)	96 (42-252)	-
Corticoide sistêmico ou inalatório (%)	36.4	0
Corticoide sistêmico (%)	36.4	0
Corticoide inalatório (%)	9.1	0
Broncodilatador de curta ação (%)	100	0
Causa da óbito (n)		
Asma	11	
Doença cardiovascular		8

Dados apresentados como mediana e interval interquartil, ou conforme especificado.

Abreviações F: feminino; M: masculino

4.2 Morfometria

Os perímetros médios das VAG dos asmáticos e controles foram 12.8mm e 13.8mm respectivamente. Os perímetros médios dos LNs dos asmáticos e controles foram $14856952\mu\text{m}^2$ e $12562207\mu\text{m}^2$ respectivamente. Não houve diferença significativa entre os perímetros das VAGs e dos LNs entre os dois grupos estudados. Foram analisadas 38 VAGs, com análise de 114 camadas e 19 a 57 (média de 38) LNs broncopulmonares de cada marcador histoquímico e imuno-histoquímico estudado, perfazendo um total de 1.140 camadas de 380 VAG e 380 LNs broncopulmonares mensurados.

4.3 Expressão de Eosinófilos

Os dados de densidade de eosinófilos em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 2, anexo C.

O eosinófilos foram corados pelo vermelho congo no grupo controle e no grupo asma nas VAG e nos LNs broncopulmonares. O grupo asma apresentou maior densidade de eosinófilos nos LNs broncopulmonares e nas três camadas das VAGs quando comparados ao grupo controle (Figura 3). A densidade de eosinófilos foi maior no grupo dos asmáticos quando comparados ao grupo controle nos linfonodos broncopulmonares ($p<0,01$) (gráfico 1-B), na camada externa ($p<0,01$), camada muscular ($p=0,01$) e camada externa ($p<0,01$) das VAG (gráfico 1-A).

Figura 3. Expressão de eosinófilos em vias aéreas grandes na asma fatal (A) e controle (B). Densidade de eosinófilos em linfonodo broncopulmonar na asma fatal (C) e controle (D). Imagem aproximada de eosinófilos em linfonodo broncopulmonar na asma fatal (E) e controle (F). CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-F).

Gráfico1. Expressão de eosinófilos nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAGs e dos LNs broncopulmonares (Linf) na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal (AF) e as caixas em branco representam os controles (Ctrls). Em A e B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados em cels/mm².

4.4 Expressão de Fator XIIIa+

Os dados da expressão de Fator XIIIa+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 2, anexo C.

O Fator XIIIa+ corou as células dendríticas mielóides intersticiais no grupo controle e grupo asma nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 4). Não houve diferença na expressão de Fator XIIIa+ dos linfonodos broncopulmonares entre o grupo asma e grupo controle (Gráfico 2-B). Houve maior expressão de Fator XIIIa+ na camada externa ($p<0,05$) das VAG dos pacientes asmáticos em relação aos controles. As demais camadas das VAG, muscular e externa, não apresentaram diferença na expressão de Fator XIIIa+ entre grupo asma e controle (Gráfico 2-A).

Figura 4. Expressão de Fator XIII+a em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de Fator XIIIa+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 2. Expressão do Fator XIIIa+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das vias aéreas grandes e nos linfonodos broncopulmonares (Linf) na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A e B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.5 Expressão de CD83+

Os dados da expressão de CD83+ em VAG e linfonodos broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 2, anexo C.

CD83+ corou as células dendríticas maduras no grupo asma e grupo controle nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 5). Não houve diferença na expressão de CD83+ nos LNs broncopulmonares entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 3-B). Também não houve diferença significativa na expressão de CD83+ em nenhuma das 3 camadas (externa, muscular e interna) das VAGs entre grupo asma e controle (Gráfico 3-A).

Figura 5. Expressão de CD83+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD83+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 3. Expressão do CD83+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e dos LNs broncopulmonares na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Em B, os dados são apresentados como média e desvio padrão. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo

4.6 Expressão de CD207+

Os dados da expressão de CD207+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 2, anexo C

O CD207+ corou as células dendríticas mielóides de Langerhans no grupo asma e no grupo controle nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 6). Não houve diferença na expressão de CD207+ nos LNs broncopulmonares entre grupo asma e controle (Gráfico 4-B). Também não houve diferença na expressão de CD207+ em nenhuma das 3 camadas (interna, muscular e externa) das VAG entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 4-A).

Figura 6. Expressão de CD207+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD207+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 4. Expressão do CD207+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e dos LNs broncopulmonares na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A e B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.7 Expressão do CD1a+

Os dados da expressão de CD1a+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 3, anexo D.

O CD1a+ corou as células dendríticas imaturas no grupo asma e grupo controle nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 7). Não houve diferença na expressão de CD1a+ dos LNs broncopulmonares entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 5-B). Também não houve diferença na expressão de CD1a+ em nenhuma das 3 camadas (interna, muscular e externa) das VAG entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 5-A).

Figura 7. Expressão de CD1a+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD1a+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 5. Expressão do CD1a+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e dos LNs broncopulmonares na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A e B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.8 Expressão do CD4+

Os dados da expressão de CD4+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 3, anexo D.

O CD4+ corou os linfócitos tipo T4 no grupo asma e no grupo controle nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 8). Não houve diferença na expressão de CD4+ nos LNs broncopulmonares entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 6-B). Houve diferença na expressão de CD4+ na camada externa ($p=0,03$) das VAG dos pacientes asmáticos em relação aos controles. As demais camadas (muscular e interna) das VAG não apresentaram diferença da expressão de CD4+ entre asmáticos e controles (Gráfico 6-A).

Figura 8. Expressão de CD4+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD4+ em LNs broncopulmonares na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 6. Expressão do CD4+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e dos LNs broncopulmonares na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.9 Expressão do CD8+

Os dados da expressão de CD8+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 3, anexo D.

O CD8+ corou os linfócitos tipo T8 no grupo asma e grupo controle nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 9). Não houve diferença na expressão de CD8+ dos LNs broncopulmonares entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 7-B). Houve diferença na expressão de CD8+ na camada externa ($p=0,02$) das VAG dos pacientes asmáticos em relação aos controles. As demais camadas das VAG (muscular e interna) não apresentaram diferença na expressão de CD8+ entre asmáticos e controles (Gráfico 7-A).

Figura 9. Expressão de CD8+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD8+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 7. Expressão do CD8+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.10 Expressão do CD20+

Os dados da expressão de CD20+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 4, anexo E.

O CD20+ corou os linfócitos tipo B no grupo asma e grupo controle nas vias VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 10). Não houve diferença na expressão de CD20+ dos LNs entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 8-B). Houve diferença na expressão de CD20+ na camada externa ($p=0,02$) das VAG dos asmáticos em relação aos controles. Não houve diferença na expressão do CD20+ nas demais camadas das VAG (muscular e interna) entre asmáticos e controles (Gráfico 8-A).

Figura 10. Expressão de CD20+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD20+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 8. Expressão do CD20+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e LNs broncopulmonares na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A e B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.11 Expressão do CD23+

Os dados da expressão de CD23+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 4, anexo E.

O CD23+ corou os linfócitos tipo B em repouso ainda não ativados por antígenos e receptores de baixa afinidade de IgE nas VAG no grupo asma e grupo controle. Nos LNs broncopulmonares o CD23+ corou as células dendríticas foliculares presentes no centro germinativo (Figura 11). Não houve diferença na expressão de CD23+ dos LNs broncopulmonares entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 9-B). Houve diferença na expressão de CD23+ na camada externa ($p<0,01$) das VAG dos asmáticos em relação aos controles. Não houve diferença na expressão de CD23+ nas demais camadas (muscular e interna) das VAG entre asmáticos e controles (Gráfico 9-A).

Figura 11. Expressão de CD23+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de CD23+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 9. Expressão do CD23+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e dos LNs broncopulmonar na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Em B, os dados são apresentados como média e desvio padrão. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.12 Expressão de VCAM-1+

Os dados da expressão de VCAM-1+ em VAG e LNs broncopulmonares nos dois grupos analisados estão apresentados na tabela 4, anexo E.

O VCAM-1+ corou as paredes endoteliais com características inflamatórias no grupo asma e grupo controle nas VAG e nos LNs broncopulmonares (Figura 12). Não houve diferença na expressão de VCAM-1+ dos LNs broncopulmonares entre pacientes asmáticos e controles (Gráfico 10-B). Também não houve diferença na expressão de VCAM-1+ em nenhuma das 3 camadas (externa, muscular e interna) das VAG dos asmáticos e controles (Gráfico 10-A).

Figura 12. Expressão de VCAM-1+ em VAG na asma fatal (A) e controle (B). Expressão de VCAM-1+ em LN broncopulmonar na asma fatal (C-D). AC, área cortical; CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular. Estas abreviações se referem as camadas correspondentes em todas as fotomicrografias (A-D).

Gráfico 10. Expressão do VCAM-1+ nas camadas interna (CI), camada muscular (CM) e camada externa (CE) das VAG e nos LN broncopulmonares na asma fatal (AF) e controles (Ctrl). As caixas em cinza representam a asma fatal e as caixas em branco representam os controles. Em A e B, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e o eixo vertical se estende do menor ao maior valor. Os dados são apresentados como área positiva corrigida pela área total da camada em análise ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). NS, não significativo.

4.13 Correlações

Nos pacientes asmáticos foram encontradas algumas correlações interessantes principalmente relacionadas aos LNs broncopulmonares. Correlações significativas inversas ocorreram entre as células dendríticas imaturas CD1a+ nas camadas externas (CE) e camadas internas (CI) das VAG e a densidade de eosinófilos nos LNs broncopulmonares (Gráfico 11-A e B). Houve uma correlação positiva entre linfócitos T CD4+ e células dendríticas maduras CD83+ nos linfonodos dos asmáticos (Gráfico 11-C). As células dendríticas maduras CD83+ também correlacionaram-se com as células dendríticas de Langerhans CD207+ nos linfonodos dos asmáticos (Gráfico 12-A). As 3 camadas (externa, muscular e interna) das VAGs dos asmáticos correlacionaram-se com seus respectivos LNs em relação as células dendríticas de Langerhans CD207+ (Gráfico B-D).

Não foi encontrada nenhuma correlação clínica entre os marcadores analisados.

Gráfico 11. Correlações entre as células dendríticas imaturas CD1a+ nas camadas externas – CE (A) e camadas internas-CI (B) das VAG e a densidade de eosinófilos nos LNs broncopulmonares. Correlação positiva entre linfócitos T CD4+ e células dendríticas maduras CD83+ nos LNs broncopulmonares dos asmáticos (C).

Gráfico 12. Correlação entre as células dendríticas maduras CD83+ com as células dendríticas de Langerhans CD207+ nos LNs broncopulmonares (A). Correlação das células dendríticas de Langerhans CD207+ nas 3 camadas das VAG dos asmáticos, camada interna - CI (B), camada muscular - CM (C) e camada externa – CE (D) com LNs broncopulmonares asmáticos.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo nós analisamos a expressão celular dos principais componentes envolvidos no processo inflamatório da asma (eosinófilos, alguns tipos de células dendríticas, linfócitos B CD20+, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, marcação de CD23+ e VCAM-1+) nas grandes vias aéreas e nos linfonodos broncopulmonares de onze asmáticos que morreram numa crise de asma fatal. Nos linfonodos broncopulmonares a única alteração encontrada dentre todas as células analisadas foi o aumento de eosinófilos na asma. Os eosinófilos também estiveram aumentados nas 3 camadas das grandes vias aéreas dos asmáticos. Houve um aumento de linfócitos B CD20+, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, marcação de CD23+, assim como células dendríticas derivadas de monócitos Fator XIIIa+ nas camadas externas das vias aéreas dos asmáticos, sem alterações dessas mesmas células nos linfonodos. De nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia os linfonodos broncopulmonares de asmáticos em humanos.

Os trabalhos existentes sobre LNs broncopulmonares e sobre o tráfego celular diante de um evento alérgico em asma foram todos realizados em animais. Por meio de modelos experimentais de broncoprovocação, animais, principalmente camundongos, são expostos a alérgenos como ovalbumina (OVA) e os eventos celulares são descritos. Esses são os únicos exemplos que possuímos para comparação de linfonodos broncopulmonares na asma.

Eosinófilos, dentre todas as outras células estudadas, foram as únicas células aumentadas nos linfonodos broncopulmonares dos asmáticos quando comparados ao grupo controle.

Shi e colaboradores (2000) realizaram um estudo em camundongos examinando por meio de fluorescência o tráfego de eosinófilos da traquéia até o linfonodo peritraqueal após um evento alérgico provocado por OVA. Nesse trabalho, além de ter sido evidenciada a movimentação de eosinófilos em direção aos linfonodos, também foi identificada substâncias no interior dos eosinófilos que podem sinalizar a capacidade de apresentação de antígenos OVA aos linfócitos T.

Outro estudo também em animais reproduziu o experimento de broncoprovocação para avaliar a capacidade dos eosinófilos apresentarem antígenos. Discordando com os estudos de Shi et al (2000), os eosinófilos apresentaram uma baixa capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos T. Entretanto, no decorrer da metodologia desse grupo de pesquisa, notou-se que foram utilizados eosinófilos presentes no lavado bronco-alveolar BALF e não nos linfonodos (van Rijt et al., 2003).

Corroborando com a característica de apresentação de antígeno, Duez et al.(2004) em seu estudo com camundongos encontraram uma forte capacidade de eosinófilos migrarem das vias aéreas para os linfonodos broncopulmonares e apresentarem antígenos aos linfócitos T através da alta expressão de MHC-tipo II.

Os eosinófilos podem expressar MHC-tipII e co-estimular algumas moléculas, sugerindo-se com essas características que essas células podem atuar como apresentadoras de antígenos em modelos experimentais alérgicos. Os estudos com animais demonstraram eosinófilos no interior de linfonodos broncopulmonares principalmente na area paracortical abundante em linfócitos T (van Rijt et al., 2003; Wang et al., 2007).

Eosinófilos representam uma classe celular muito estudada na asma pois liberam mediadores e citocinas que provocam alterações patológicas e funcionais nas vias aéreas (Filipovic e Cekic, 2001). Sabe-se que essas células estão presentes em situações parasitárias e em reações alérgicas e podem, eventualmente, servirem de fracos apresentadores de antígenos. Os eosinófilos encontrados em linfonodos broncopulmonares parecem originar-se principalmente a partir do lúmen das vias aéreas e expressam maiores níveis de MHC-tipII e moléculas coestimuladoras quando comparados aos eosinófilos encontrados nas vias aéreas, no sangue ou no BALF, sugerindo que possa haver um fenótipo específico de célula (Shi et al., 2000; Liu et al., 2006).

Em humanos, estudos *in vitro* também demonstram que os eosinófilos expostos a um ambiente rico em citocinas podem expressar a molécula HLA-DR sendo que os eosinófilos dos asmáticos apresentam um alto nível dessas moléculas (van Rijt et al., 2003).

Além do aumento nos linfonodos, nosso estudo também evidenciou o aumento de eosinófilos nas três camadas das grandes vias aéreas dos

asmáticos. Esse achado já é amplamente conhecido e diversas informações sabe-se a esse respeito inclusive relacionando a eosinofilia com a gravidade da doença. Os eosinófilos estão definitivamente envolvidos com a resposta inflamatória, com a perpetuação da inflamação nas vias aéreas, com a estimulação de plasmócitos e, em animais, os eosinófilos também estão relacionados fracamente com a apresentação de antígenos (Simões et al., 2005; Kelly et al., 2010).

Ainda faltam evidências e mais trabalhos para podermos especular que eosinófilos possuam a função de células apresentadoras de antígenos num episódio agudo e fatal de asma em humanos. Entretanto, há um forte debate sobre sua eficácia como apresentadores de antígenos (Shi et al., 2000; van Rijt et al., 2003).

Em nosso trabalho quantificamos alguns tipos de células dendríticas nas vias aéreas grandes e nos LN broncopulmonares, tais como células dendríticas mielóides maduras (CD83+) e imaturas (CD1a+), células de Langerhans (CD207+) e células dendríticas intersticiais derivadas de monócitos (Fator XIIIa+). Nós encontramos um aumento na expressão celular das células dendríticas intersticiais derivadas de monócitos Fator XIIIa+ nas camadas externas das vias aéreas sem alterações nos LN broncopulmonares do grupo dos asmáticos. Não houve também nenhum aumento dos outros subtipos de células dendríticas nas vias aéreas ou nos LN broncopulmonares em nenhum dos grupos.

Esse aumento de células dendríticas somente do tipo derivadas de monócitos Fator XIIIa+ pode ser explicado através de alguns estudos prévios. Células Fator XIIIa+ tem sido melhor caracterizadas em estudos com pele humana e representam uma população específica conhecida como células dendríticas intersticiais, distintas das células de Langerhans e que compartilham algumas características comuns aos fagócitos mononucleares (Nestle et al., 1993; Tager et al., 1999; Duperrier et al., 2000; Condon et al., 2011). A presença dessas células em pulmões humanos foi descrita a partir de estudos *in vitro* pelos autores Vermaelen e Pauwels, 2005.

Não existem estudos que quantificaram as células Fator XIIIa+ em humanos na asma (Lipscomb e Masten, 2002). Estudos em camundongos mostraram que as células dendríticas podem ser derivadas através de dois precursores: um precursor comum de célula dendrítica que dará origem tanto a célula dendrítica mieloide quanto a plasmocitoide; e um precursor de uma linhagem monocitária (Tager et al., 1999; Geissmann et al., 2010). Em estados de homeostase, as células dendríticas presentes nas mucosas dos tecidos são provenientes de um precursor comum de célula dendrítica. No entanto, quando o organismo é exposto a condições inflamatórias, ocorre uma proliferação de grande quantidade de células dendríticas derivadas de monócitos que podem expressar Fator XIIIa+ (Grassi et al., 1998, Tager et al., 1999, Auffray et al., 2009, Geissmann et al., 2010). Essa célula talvez possua uma função imunológica complementar as células dendríticas mielóides (Cerio et al., 1989, Plotnicky et al., 2001) e, em nossos pacientes, numa crise

exacerbada, estariam sendo recrutadas do sangue, atuando localmente, o que explicaria seu aumento nas vias aéreas dos asmáticos.

Mesnil e colaboradores (2012) mostraram que células dendríticas residentes são capazes de induzir a resposta Th2 enquanto que as células dendríticas derivadas de monócitos não apresentam essa mesma capacidade. Ambas as populações também diferem nas suas propriedades migratórias. As células dendríticas derivadas de monócitos parecem manter-se principalmente no pulmão após a exposição ao alérgeno, reativando linfócitos T específicos aos antígenos, promovendo uma resposta predominantemente local (Thornton et al., 2012).

Não há nenhuma informação semelhante em seres humanos, entretanto os dados encontrados em nosso trabalho estão concordantes/ em linha com o que foi descrito previamente em animais. É possível que em indivíduos previamente sensibilizados, a re-exposição ao antígeno resultaria no recrutamento de células dendríticas derivadas de monócitos presentes no sangue. Essas células dendríticas derivadas de monócitos promoveriam um reativamento de células linfóides condicionadas.

Interessantemente as alterações na quantificação de células Fator XIIIa+ foram encontradas somente nas camadas externas das grandes vias aéreas. As justificativas para esse achado nesses locais em oposição a camada interna das vias aéreas não são totalmente conhecidas. Mais de um estudo descreve que a captura do antígeno nas vias aéreas pode ocorrer na traquéia (Lambrecht et al, 1998; Holt e Jones, 2000). Entretanto, num modelo

de estudo em camundongos por sensibilização alérgica com OVA, mostrou que nos pulmões, células dendríticas alveolares CD11+c de linhagem monocítica são mais eficazes na captura de antígenos quando comparadas as células dendríticas presentes nos brônquios (Thorton et al., 2012).

Após a captura do antígeno, as células dendríticas deslocam-se entre as regiões ao redor das vias aéreas. Acredita-se que a apresentação do antígeno para as células T a este nível provavelmente possa permitir respostas imunes locais e adaptativas a alérgenos. Essa resposta ocorreria rapidamente sem a necessidade das células dendríticas migrarem para os linfonodos broncopulmonares (Mesnil et al., 2012). Se isto é aplicável em seres humanos, ainda não existem dados. Entretanto esse achado de respostas imunológicas locais em estudos em animais poderia explicar o aumento de linfócitos CD4+, CD8+ e Fator XIIIa+ nas camadas externas das vias aéreas sem as mesmas alterações nos respectivos linfonodos.

O tráfego celular que ocorre entre vias aéreas e linfonodos broncopulmonares após o evento alérgico na asma só foi descrito em animais. Modelos experimentais em camundongos demonstraram o aumento de células dendríticas MHCII+/CD11+ nos linfonodos torácicos dois dias após a exposição a OVA (Hammad et al., 2003). Outro trabalho com esse mesmo tipo de célula dendrítica demonstrou o aumento dessa célula no linfonodo cerca de 6 horas após a provocação alérgica com OVA, com um máximo de número de células em 24 horas (Vermaelen et al., 2001).

Em nosso estudo, não encontramos o aumento de nenhum subtipo de célula dendrítica mieloide nos linfonodos broncopulmonares. Nossos pacientes asmáticos tiveram uma mediana de 96 horas desde o início da crise até o óbito. Em humanos, desconhece-se quanto tempo as células dendríticas levam para migrarem das vias aéreas para os linfonodos broncopulmonares após o evento alérgico. Também não encontramos correlação entre o tempo de crise e aumento de algum subtipo de célula dendrítica. Postulamos que talvez, em nossos pacientes asmáticos que faleceram, as células dendríticas já tenham sido estimuladas e já migraram para o linfonodos para apresentar os antígenos a célula T. Essa suposição pode ser reforçada pela existência de correlação entre células dendríticas maduras CD83+ e linfócitos T CD4+ nos linfonodos dos asmáticos sugerindo apresentação de antígenos em algum momento a este nível.

Apesar de não haver aumento na densidade celular, encontramos em nosso estudo correlações de células dendríticas CD83+ e CD207+ entre vias aéreas e linfonodos broncopulmonares. Essas correlações reforçam a hipótese de que tenha ocorrido algum mecanismo de tráfego de células dendríticas entre pulmão e linfonodos anterior ao óbito dos pacientes.

Em relação as vias aéreas, alguns trabalhos sobre células dendríticas demonstraram o aumento dessas células em animais após broncoprovocação com alérgenos principalmente do tipo OVA (Hammad et al., 2003). Janhsen e colaboradores (2001) demonstraram pela primeira vez o aumento de células dendríticas em vias aéreas em humanos. O aumento das células foi detectado

através de biópsias cerca de 4 a 5 horas após o evento de broncoprovocação. Outros trabalhos em humanos, com escarro induzido detectaram aumento de células dendríticas em 24 horas, resultado que sugere o aumento dessas células nas vias aéreas (Bratke et al, 2007).

Entretanto, apesar de resultados de outros trabalhos apontarem para o aumento de célula dendrítica nas vias aéreas após um evento alérgico, ainda encontramos algumas discordâncias sobre os tipos de células dendríticas presentes na asma e como ocorre o comportamento dessa célula. Yerkovich et al (2009), realizaram trabalhos em animais e observaram o aumento de células dendríticas mielóides tipo 2 (mDC2s) identificadas pela expressão de BDCA-3 no sangue, nas vias aéreas e no lumen da via aérea. Dua e colaboradores (2013) reproduziram o mesmo método em humanos e encontraram alguns resultados diferentes do trabalho prévio de Yerkovich. A mesma célula dendrítica mDC2s apresentou-se diminuída após a broncoprovocação no sangue dos asmáticos, postulando-se então que essas células tenham migrado do sangue periférico para as vias aéreas. Entretanto, essa relação é uma especulação, pois não se sabe ao certo o que aconteceu com as células dendríticas após a broncoprovocação.

Em nosso trabalho, analisamos alguns tipos de células dendríticas que, talvez, não sejam de fenótipos mais prevalentes nos asmáticos. Devido ao fato de possuírem uma classe muito heterogênea, pode ser que as células dendríticas estudadas não façam parte da resposta imune na doença asma.

A expressão de CD23+ na forma ligada a membrana, é conhecido como receptor de baixa afinidade para IgE, podendo expressar linfócitos B em repouso e, no interior dos linfonodos, podendo estar presente nas células dendríticas foliculares. Esse receptor CD23+ possui um efeito regulatório e inibitório na síntese de IgE (Tunon-de-lara et al., 1996; Djukanovic et al., 2004, Gould e Sutton, 2008). Nesse estudo, nós mostramos o aumento da expressão de CD23+ (FCRII) em todas as camadas das vias aéreas dos asmáticos em relação aos controles. Nenhuma diferença foi encontrada na expressão de CD23+ nos linfonodos. Nas vias aéreas grandes, den Otter et al (2010), demonstraram o aumento da expressão do receptor de alta afinidade para IgE em asmáticos comparados a controles. Nosso resultado corrobora com esse estudo demonstrando que nossos pacientes, durante uma crise exacerbada de asma, tiveram a expressão de receptores de baixa afinidade para IgE provavelmente numa tentativa inibitória do aumento excessivo dessa imunoglobulina.

Linfócitos T CD8+, linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD20+ também apresentaram suas expressões celulares aumentadas nas vias aéreas mas não nos linfonodos. Linfócitos T CD8+ apresentaram suas densidades aumentadas nas camadas externas das vias aéreas dos asmáticos. Esses linfócitos têm sido evidenciados em maior número em tecidos pulmonares de asmáticos quando comparados a controles (O'Sullivan et al., 2001). Já foi demonstrado também que esses linfócitos podem estar associados com o declínio da função pulmonar em asmáticos, culminando com a severidade da doença (van Rensen, 2005). Linfócitos CD8+ podem modificar o padrão de

citocinas na decorrência de uma infecção viral em asmáticos, podendo perpetuar o processo inflamatório através da produção de interleucinas (especialmente IL-5) e na produção de eosinofilia nas vias aéreas (Azzawi et al., 1990; Coyle et al., 1995; Ying et al., 1995; Schawarze et al., 1999).

Linfócitos T CD4+ tiveram suas expressões aumentadas nas camadas externas das vias aéreas dos asmáticos sem aumento nos linfonodos. Estudos prévios também obtiveram resultado semelhante em relação ao aumento de linfócitos T CD4+ em asmáticos, demonstrando que esse linfócito apresenta um papel importante na resposta inflamatória da asma (Bentley et al., 1992; Amin et al., 2000; Cho et al., 2002). Após episódio de broncoprovocação alérgica, asmáticos evoluem com diminuição de linfócitos CD4+ no sangue periférico e concomitante aumento no lavado broncoalveolar (Gerblich et al., 1991).

Linfócitos B CD20+ também obtiveram um aumento significativo nas vias aéreas nos asmáticos quando comparados aos controles. Esses linfócitos participam da inflamação na asma através da produção de IgE em resposta a IL-4 (Pearlman, 1999). Trabalhos prévios demonstram o aumento de linfócito B CD20+ em vias aéreas grandes e aumento no escarro induzido em asmáticos quando comparados a controles (Kidney et al., 1996; Simões et al., 2005).

O aumento dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e B CD20+ apenas nas vias aéreas dos asmáticos em nosso trabalho, corrobora com a “suposição” de

haver um mecanismo imunorregulatório da mucosa local durante uma exacerbação de asma.

A molécula de adesão VCAM-1 não apresentou diferença na sua expressão nas vias aéreas e nos linfonodos entre asmáticos e controles. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o VCAM-1 não esteja envolvido na regulação do tráfego de células para os pulmões ou linfonodos broncopulmonares na asma fatal.

Esse estudo apresenta algumas limitações: não conseguimos analisar um importante subtipo de célula dendrítica, conhecida como plasmocitoide. Células dendríticas representam um grupo muito diversificado de células e o uso de parafina em nosso material, limita a utilização de alguns marcadores como o marcador para célula dendrítica plasmocitoide (CD123+). De acordo com a literatura encontrada e informações obtidas com outros grupos de pesquisa em dermatologia, células dendríticas plasmocitoides representam um grupo de difícil identificação em estudos imunohistoquímicos. Os resultados para a identificação dessas células são conseguidos em materiais conservados congelados e não emblocados em parafina. A identificação dessa célula poderia sinalizar algum outro resultado na asma humana. Apesar dessa limitação, alguns achados em trabalhos sobre células dendríticas em tecido pulmonar demonstraram que a quantidade de células dendríticas mielóides é bem maior que as plasmocitoides (Demedts et al., 2005; Masten et al., 2006).

A entrevista realizada com o familiar após o óbito do paciente obteve informações sobre a doença prévia, a frequência das crises, as medicações utilizadas, hábitos do paciente e duração da última crise fatal. Entretanto, não obtivemos informações mais detalhadas como a classificação da asma baseada na prova de função pulmonar, exames complementares e, principalmente, informações sobre o estado alérgico dos pacientes. Sem o diagnóstico alérgico, desconhecemos quais foram os “gatilhos” específicos do ataque fatal que podem ter influenciado em populações específicas de células dendríticas nos pulmões e nos linfonodos broncopulmonares. Sabemos que a atopia em muitos casos, pode influenciar na população celular. Essa é uma limitação existente, embora Tsoumakidou et al (2007) tenha demonstrado em seu trabalho com biópsia de tecido pulmonar, não haver diferença de células dendríticas maduras CD83+ e linfócitos B entre indivíduos asmáticos atópicos e não atópicos.

Estudos em pacientes que falecem durante uma crise de asma nem sempre apresentam as mesmas características clínicas da doença em vida (Messer et al., 1960). Em nosso grupo de pacientes, apesar de apresentarem como mediana 22 anos com a doença, uma minoria fazia uso regular de corticosteróide oral ou inalatório, razão que caracteriza que talvez, nossos pacientes não apresentassem de fato uma história de asma grave mas sim, de uma doença inadequadamente tratada capaz de desencadear uma crise fatal.

Nosso estudo identifica o final instantâneo da exacerbação aguda e severa e, obviamente não nos informa sobre todo o ocorrido no processo dinâmico, ou seja, a movimentação celular desde o início da crise até o óbito. Por outro lado, tecidos de autópsia de asmáticos representam a única alternativa para estudar esse aspecto da asma em humanos.

6 CONCLUSÃO

6 Conclusões

- Indivíduos falecidos devido a uma crise de asma apresentaram maior expressão de eosinófilos nos linfonodos broncopulmonares.

- Indivíduos falecidos de asma apresentaram maior expressão nas vias aéreas grandes de eosinófilos e dos marcadores Fator XIIIa+, CD4+, CD8+, CD20+, CD23+ sem um aumento correspondente nos linfonodos broncopulmonares.

- As características clínicas dos pacientes não foram associadas a expressão de nenhum marcador estudado nesse trabalho.

7 ANEXOS

Anexo A

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA
RUA PÉDRO ZANUZZI, 100 - JARDIM SÃO JOÃO DEL REI - 13049-900 - RIBEIRÃO PRETO - SP

Diretoria Clínica
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPEQ

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 1239/09	Data de entrada: 05 nov 2009 Data sessão: 16/12/2009
-----------------------------------	---

TÍTULO DA PESQUISA: Análise histológica das Linfonodas Torácicos na Asma Fatal.

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Thais Mauad

PESQUISADOR (A) EXECUTANTE: Erika Feltrin Cagnoni

DEPARTAMENTO: Patologia

CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:

Trata-se de um estudo retrospectivo de análise de banco de amostras do SVO-SM-Capital, disponíveis em arquivo de estudos já aprovados pela CAPPEQ. Não se aplica TCLE.

Recomendo modificar o Resumo do trabalho, onde deve ser colocado os objetivos do projeto, e a metodologia a ser utilizada.

CONCLUSÃO
APROVADO

ENVIAR À CONEP	SIM () INFORME À ÁREA TEMÁTICA	NÃO (X)
----------------	------------------------------------	----------

[Assinatura]

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas - CAPPEQ
Secretaria: CEA/Secretaria de Clínica Médica e Diagnóstico - Rua do Hospital, 100 - Jardim São João Del Rei - 13049-900 - Ribeirão Preto - SP
Fone: (16) 3394-4111 - Fax: (16) 3394-4112 - E-mail: cappeq@hsp.br
Site: www.hsp.br - Site: www.cappeq.hsp.br

Anexo B

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ÓBITOS POR ASMA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E CLÍNICA MÉDICA

Nome:_____

1. Diagnósticos anteriores:

() Asma () Bronquite () Bronquite asmática () Rinite () Sinusite

() Outros:_____

Sintomas:_____

2. Há quanto tempo recebeu este(s) diagnóstico(s)?_____

3. Tabagismo:

() Fumante () Ex-fumante () Nunca fumou

Total de maços por dia:_____

Total de anos de tabagismo:_____

4. Profissão (elementos que possam ter relação com a doença):

5. Medicamentos que tomava nos seis meses anteriores ao óbito (e doses): _____

6. Internações no ano anterior ao óbito (número e tempo de internação): _____

7. Foi alguma vez internado em UTI? _____
Quando? _____

8. Há quanto tempo estava com sintomas de crise antes do óbito (descrever quando começou a crise e quais sintomas apresentava: tosse, falta de ar, chiado, _____ aperto _____ no _____ peito)

9. Estava sob acompanhamento médico? _____ Foi atendido(a) pelo seu médico durante a crise que o(a) levou ao óbito? _____

10. Se faleceu em casa, por que não foi levado(a) ao hospital? _____

11. Se faleceu no hospital, quanto tempo após ter sido internado? _____

12. Hospital onde faleceu: _____

Anexo C

Tabela 2. Expressão de Eosinófilos (mm^2); expressão de Fator XIIIa+, CD 83+, CD 207+ ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) nas vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares no controle e na asma

	Controle	Asma
Eosinófilo CI	11,65±12,56	792,89±463,24*
Eosinófilo CM	1,27±1,83	17,35±18,19 [†]
Eosinófilo CE	4.94(11)	301,29(321)*
Eosinófilo LN	0.00000296(0.000016)	0.00009276(0.000216)*
Fator XIIIa+ CI	0.002(0.009)	0.003(0.004)
Fator XIIIa+ CM	0.002240(0.0057)	0.002390(0.0468)
Fator XIIIa+ CE	0.008184(0.0173)	0.021998(0.0618) [‡]
Fator XIIIa+ LN	0.06396(0.216)	0.04184(0.107)
CD83+ CI	0.0005(0.005)	0.004(0.01)
CD83+ CM	0.004(0.003)	0.003(0.008)
CD83+ CE	0.003(0.002)	0.006(0.01)
CD83+ LN	0.03±0.03	0.30±0.02
CD 207+ CI	0.002(0.009)	0.003(0.004)
CD 207+ CM	0.0007±0.001	0.0004±0.0005
CD207+ CE	0.002(0.003)	0.001(0.004)
CD 207+ LN	0.02(0.01)	0.01(0.02)

Dados apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). Abreviações: CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular; LN, linfonodo.

*p<0,00

[†]p=0,01

[‡]p<0,05

Anexo D

Tabela 3 . Expressão de CD1a+, CD4+, CD8+ nas vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares no controle e na asma ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

	Controle	Asma
CD1a+ CI	0.0009(0.011)	0.0015(0.003)
CD1a+ CM	0.001± 0.001	0.001±0.0007
CD1a+ CE	0.001± 0.001	0.001±0.0007
CD1a+ LN	0.0009(0.011)	0.0015(0.003)
CD4+ CI	0.0040152±0.00213168	0.0082999±0.00469564
CD4+ CM	0.0003496±0.00011422	0.000285(0.0003)
CD4+ CE	0.0032333(0.00562)	0.0129708(0.00889)*
CD4+ LN	0.1121699±0.06346491	0.0958669±0.3999478
CD8+ CI	0.0042683±0.00227741	0.0082891±0.00515993
CD8+ CM	0.000329(0.0003)	0.000285(0.0003)
CD8+ CE	0.003730±0.0022270	0.009082(0.0033519) [†]
CD8+ LN	0.0130856(0.02690)	0.0238648(0.02682)

Dados apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (interval interquartil).

Abreviações: CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular; LN, linfonodo.

*p=0,03

[†]p=0,02

Anexo E

Tabela 4. Expressão do CD20+, CD23+ e VCAM-1+ nas vias aéreas grandes e linfonodos broncopulmonares ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

	Controle	Asma
CD 20+ CI	0.000490032(0.0010763)	0.001741138(0.0026554)
CD 20+ CM	0.000011911(0.0000611)	0.000013396(0.0000395)
CD 20+ CE	0.001405795 $\pm$ 0.0010733525	0.005334684 $\pm$ 0.0042737522*
CD 20+ LN	0.8984514(0.066145)	0.8993708(0.047787)
CD 23+ CI	0.001215(0.0019)	0.001634(0.0033)
CD 23+ CM	0.000051(0.0009)	0.000214(0.0001)
CD 23+ CE	0.001177(0.0009)	0.003561(0.0111) [†]
CD 23+ LN	0.06391(0.32433)	0.08213(0.060652)
VCAM-1+ CI	0.002(0.01)	0.005(0.02)
VCAM-1+ CM	0.0004(0.003)	0.000214(0.0001)
VCAM-1+ CE	0.001177(0.0009)	0.003(0.01)
VCAM-1+ LN	0.024 $\pm$ 0.026	0.025 $\pm$ 0.025

Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (interval interquartil).

Abreviações: CE, camada externa; CI, camada interna; CM, camada muscular; LN, linfonodo.

*p=0,02

[†]p<0,01

8 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cells and tissues of the immune system. In: Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. P.275-297

Amin K, Ludviksdottir D, Janson C, Nettelbladt O, Bjornsson E, Roomans GM, Boman G, Seveus L, Venge P. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(6):2295-301.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, et al. Extracellular matrix components and regulators within the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J*. 2008;32:1-9.

Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H, ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood:ISSAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733-43.

Auchincloss HJ, Geha RS, Kay AB, Lecher R, Ito YW, Sprent J, Wraith D. Allergy and Hypersensitivity. In: C.A.J. Janeway, P. Travers, S. Hunt, M. Walport. Immunobiology. 3rd Edition. New York: Garland Publishing; 1997.p.11:1-11:25.

Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, Leemput J, Bigot K, Campisi L, Abitbol M, Molina T, Charo I, Hume DA, Cumano A, Lauvau G, Geissman F. CX3CR1+CD115+CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*. 2009;206(3):595-606.

Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142 (6 Part 1):1407–13.

Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, et al. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol*. 1994;77:1011-4.

Babu SK, Puddicombe SM, Arshad HH, Wilson SJ, Ward J, Gozzard N, Higgs G, Holgate ST, Davies DE. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. *Clinical Immunology*. 2011;140:18-25.

Beasley R. The Global Burden of Asthma Report, Global Initiative for Asthma (GINA). Available from <http://www.ginaasthma.org> 2004.

Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB. Identification of T lymphocytes, macrophages and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(2):500-6.

Bisgaard H, Bonnelykke K. Long-term studies of the natural history of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 126(2):187-97; quiz 198-9.

Boscacci RT, Pfeiffer F, Gollmer K, Sevilla AIC, Martin AM, Soriano SF, Natale D, Henrickson S, Von Andrian UH, Fukui Y, Mellado M, Deutsch U, Engelhardt B, Stein JV. Comprehensive analysis of lymph node stroma expressed Ig superfamily members reveals redundant and nonredundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood*. 2010;116(6).

Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Kleine HD, Luttmann W, Virchow JC. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax*. 2007; 62(2):168-75.

Butcher EC, Scollay RG, Weissman IL. Organ aspecificity of lymphocytic migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high-endothelial venules. *Eur J Immunol*. 1980; 10:556-561.

Carrol N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J*. 1996;9(4):709-15.

Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol*. 1989;121(4):421-31.

Chin YH, Carey GD, Woodruff JJ. Lymphocyte recognition of lymph node high endothelium. IV. Cell surface structures mediating entry into lymph nodes. *J Immunol.* 1982; 129:1911-1915.

Cho SH, Stanciu LA, Begishivili T, Bates PJ, Holgate ST, Johnston SL. Peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell type 1 and type 2 cytokine production in atopic asthmatic and normal subjects. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(3):427-33.

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999;54(9):825-57.

Coyle AJ, Erard F, Bertrand C, Walti S, Pircher H, Le Gros G. Virus-specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *J Exp Med.* 1995;181(3):1229-33.

Crane J, Pearce N, Burgess C, Woodman K, Robsn B, Beasley R. Markers of risk of asthma death or readmission in the 12 months following a hospital admission for asthma. *Int J Epidemiol.* 1992; 21(4):737-44.

Dahlin, J S, Feinstein R, Cui Y, Heyman B and Hallgren J. CD11c+ cells are required for antigen-induced increased of mast cells in the lung. *J Immunol.* 2012; 189:3869-3877.

Demedts IK, Brusselle KY, Vermaelen KY, Pauwels RA. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32:177-184.

Den Otter I, Silva LFF, Carvalho ALN, Pires-Neto RC, Annoni R, Ferreira DS, Bajema I, van Schadewijk A, Rabe KF, Dolhnikoff M, Sterk PJ, Hiemstra PS, Mauad T. High-affinity immunoglobulin E receptor expression is increased in large and small airways in fatal asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2010;(40):1473-1481.

Denning K L, Olson P R, Maley Jr R H, Flati V R, Myers J L, Silverman. Primary pulmonary follicular dendritic cell neoplasm: A case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133: 643-47.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol*. 2012;38(1):1-46.

Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howart RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1990;142:434-457.

Djukanovic R, Wilson S J, Kraft M, Jarjour N N, Steel M, Chung K F, Bao W, Fowler-Taylor A, Matthews J, Busse W W, Holgate S T, Fahy J V. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004(170):583-593.

Dua B, Smith S, Kinoshita T, Imaoka H, Gauvreau G, O'Byrne P. Myeloid dendritic cells type 2 in allergic asthma. *Allergy*. 2013.

El-Chemaly S, Levine SJ, Moss J. Lymphatics in Lung Disease in The Lymphatic Continuum Revisited 2008;1131:195-202.

Franco R, Nascimento HF, Cruz AA, Santos AC, Souza-Machado C, Ponte EV, et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy*. 2009;64(3):478-83.

Ferry J A, Harris N L. Atlas of Lymphoid Hiperplasia and Lymphoma, 1997, Saunders.

Filipovic M, Cekic S. The role of eosinophils in asthma. *Medicine and Biology*. 2001;8(1):6-10.

Geissmann F, Markus G. M, Steffen J, Sieweke M, Merad M, Ley K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*. 2010; 327:656-61.

Gerblich AA, Salik H, Schuyler MR. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(3):533-7.

GINA. Global Strategy for Asthma management and Prevention, Global Initiative for Asthma 2012 [cited 2012 dezembro]; Available from: <http://www.ginasthma.org>

Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol.* 2006;7(3):265-73.

Gondak R, Mauad T, Schultz L, Soares F, Kowalski LP, Vargas PA. Decreased CD1a+, CD83+ and factor XIIIa+ dendritic cells in cervical lymph nodes and palatine tonsils of AIDS patients. *Histopathology.* 2013.

Gould H J and Sutton B J. IgE in allergy and asthma today. *Nature.* 2008; 8:205-217.

Grassi F, Dambuyant CD, McIlroy D, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Bousmell L, Schmitt D, Autran B, Debré P, Hosmalin A. Monocyte-derived dendritic cells have a phenotype comparable to that of dermal dendritic cells and display ultrastructural granules distinct from Birbeck granules. *Journal of Leukocyte Biology.* 1998;64:484-493.

Grouls V e Helpap B. Selective staining of eosinophils and their immature precursors in tissue sections and autoradiographs with congo red. *Stain Technology.* 1981;56(5):323

Hammad H, Heer H J, Soullie T, Hoogsteden H C, Trottein F, Lambrecht B N. Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol.* 2003; 171:3936-3940.

Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:331-336.

Heer H J; Hammad H; Kool M; Lambrecht B N. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Seminars in Immunology*.2005(17): 295-303.

Holgate ST, Davies DE. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity*. 2009;31:362-367.

Holgate ST. Asthma – Pathophysiology. In: ST Holgate, MK Churchs. Allergy. London: Gower Medical Publishing; 1993:13.1-13.12.

Holt P G, Jones C A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*. 2000;55:688-97.

Jackson DG. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovascular Medicine*. 2003;13(1):1-7.

Jahsen F L, Moloney E D, Hogan T, Upham J W, Burke C M, Holt, P G. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*. 2001;56:823-826

Jeffery PK, Godfrey RW, Adelroth E, Nelson F, Rogers A, Johansson SA. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma: a quantitative light and electron microscopic study. *American Review of Respiratory Disease*.. 1992;145(4):890-899.

Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol. Med.* 2005;11:148-152.

Kay NE, Ackerman SK, Douglas SD. Anatomy of the immune system. *Seminars in Hematology.* 1979;16(4):252-281.

Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, Otis J, Gwozd C, Gauvreau GM, Gauldie J, O'Byrne PM. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2):349.

Kidney JC, Wong AG, Efthimiadis A, Morris MM, Sears MR, Dolovich J, Hargreave FE. Elevated B cells in sputum of asthmatics. Close correlation with eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(2):540-4.

Kircher S, Marquardt D. Introdução ao sistema immune. In: Adelman DC, Casale TB, Corren J. Manual of allergy and immunology. 5 edition. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2008.

Lai CKW, de Guia TS, Kim YY, Kuo SH, Mukhopadhyay A, Soriano JB, Trung PL, Zhong NS, Zainudin N, Zainudin BMZ. Asthma control in the Asia-Pacific region: The asthma insights and reality in Asia-Pacific study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2003;111(2):263-268.

Lechmann M, Kroshoop D J E B, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor C G, Schuler G, Steinkasserer A. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2001;194(12): 1813-1821.

Lenney W. The burden of pediatric asthma. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 1997;15:13-6.

Lipscomb M F and Masten B J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002; 82:97-130.

Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002;23(9):445-9.

Mahapatra P. Social, economic and cultural aspects of asthma: an exploratory study in Andhra Pradesh, India. Hyderabad, India: Institute of Health Systems; 1993.

Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59(5):469-78.

Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, Archibeque T, Lipscomb MF. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *The Journal of Immunology.* 2006;177:7784-7793.

Mesnil C, Sabatel C M, Marichal T, Toussaint M, Cataldo D, Drion P V, Lekeux P, Bureau F, Desmet C J. Resident CD11b+Ly6C2 Lung Dendritic Cells Are Responsible for Allergic Airway Sensitization to House Dust Mite in Mice. *Plos One*.2012; 7(12):1-12.

Messer JW, Peters GA, Bennett WA. Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma. *Chest*. 1960;38:616-24.

Ministério da Saúde do Brasil. Departamento de Informática do SUS [homepage on the Internet].Brasília: DATASUS [cited 2012 Jan 25]. Morbidade hospitalar do SUS – por local de internação – Brasil. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>

Moyron-Quiroz J, Rangel-Moreno J, Carragher DM, Randall TD.. The Function of local lymphoid tissue in pulmonary immune responses. *Adv Exp Med Biol*. 2007;590:55-68.

Neffen H, Fritscher C, Schacht FC, Levy G, Chiarella P, Soriano JB, et al. Asthma control in Latin America: the asthma insights and reality in Latin America (AIRLA) survey. *Rev Panam Salud Publica*. 2005;17(3):191-7.

Netter FH. Atlas of Human Anatomy. 5th edition. Elsevier. 2010. New York.

Nowak K, Kamler M, Bock M, Motsch J, Hagl S, Jakob H, Gebhard M M. Bronchial artery revascularization affects graft recovery after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:216-220.

O'Sullivan S, Cormican L, Faul JL, Ichinohe S, Johnston SL, Burke CM, Poulter LW. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(4):560-4.

Othani, O; Othani, Y. Structure and function of rat lymph nodes. *Arch Histol Cytol*. 2008; 71(2), 69-76.

Padigel U M, Lee J J, Nolan T J, Schad G A, Abraham D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun*. 2006, 74(6):3232.

Pals ST, Kraal G, Horst E, de Groot A, Schepes RJ, Meijer CJLM. Human lymphocyte-high endothelial venule interaction: organ selective binding of T and B lymphocyte populations to high endothelium. *J Immunol*. 1986; 137:760-763.

Pearlman DS. Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(4 Pt 1):S132-7.

Plantinga M, Guillems M, Vanheerswynghe M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, Vanhoutte L, Neyt K, Killeen N, Malissen B, Hammad H, Lambrecht B N. Conventional and monocyte-derived CD11b⁺ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*. 2013; 38:322-335.

Plotnicky GH, Cyblat D, Aubry J P, Delneste Y, Blaecke A, Bonnefoy J Y, Corvaia N, Jeannin P. Differential effects of parainfluenza virus type 3 on human monocytes and dendritic cells. *Virology*. 2001; 285:82-90.

Pump KK. Distribution of bronchial arteries in the human lung. *Chest*. 1972; 62:447-451.

Randolph G J, Angeli V, Swartz M A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature*. 2005(5):617-28.

Saetta M, Baraldo S, Turato G, Beghé B, Casoni G L, Bellettato C M, Rea F, Zuin R, Fabbri L M, Papi A. Increased proportion of CD8+ T-lymphocytes in the paratracheal lymph nodes of smokers with mild COPD. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Disease*. 2003; 20:28-32.

Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *American Review of Respiratory Disease*. 1991;143(1):138-43.

Santos LA, Oliveira MA, Faresin SM, Santoro IL, Fernandes AL. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(7):943-8.

Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikemura T, Hamelmann E, Gelfand EW. CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol*. 1999;162(7):4207-11.

Schleimer RP, Sterbinsky CA, Kaiser CA et al. Interleukin-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not VCAM-1. *J Immunol* 1992.

Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans V J, Kaliner M A, Shevach E M. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma and visceral pleura. *Journal of Experimental Medicine*. 1986(163):436-451.

Shi H Z, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller P F. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest*. 2000.105:945-953.

Sidebotham HJ, Roche WR. Asthma deaths; persistent and preventable mortality. *Histopathology*. 2003; 43(2):105-17.

Simões S M, Santos M A, Oliveira M S, Fontes E S, Garippow A L, Castro I, Castro F F, Martins M A, Saldiva P H N, Mauad T and Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:602–611.

Solé D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Pastorino AC, Jacob CM, Gonzalez C. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and atopic eczema in Brazilian adolescents related to exposure to gaseous air pollutants and socioeconomic status. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007; 17(1):6-13.

Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)- Phase 3. *J Pediatr (Rio J)*. 2006 Sep-Oct; 82(5):341-6.

Stevens SK, Weissman IL, Butcher EC. Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition. *J Immunol*. 1982; 128:844-851.

Tager AM, Luster AD, Leary CP, Sakamoto H, Zhao LH, Preffer F, Kradin RL. Accessory cells with immunophenotypic and functional features of monocyte-derived dendritic cells are recruited to the lung during pulmonary inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999; 66:901-908.

Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. *Eur Respir J*. 2008;32(3):545-54.

Thornton E E, Looney M R, Bose O, Sen D, Sheppard D, Locksley R, Huang X, Krummel M F. Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *J. Exp. Med*. 2012; 209(6): 1183-1199.

Till S, Li B, Durham S, Humbert M, Assoufi B, Huston D, Dickason R, Jeannin P, Kay AB, Corrigan C. Secretion of the eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4+ and CD8+ T cell lines in atopic asthmatics, and atopic and non-atopic controls. *Eur J Immunol.* 1995;25(10):2727-31.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: An Introduction 2003;8th Ed.

Tschernig T, Pabst R. What is the clinical relevance of different lung compartments? *BMC Pulmonary Medicine.* 2009; 9:39.

Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, Wang Z, Gamble E, Slafakas N M, Barnes N C, Jeffery P K. Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Resp Crit Care Med.* 2007; 175:919-925.

Tunon-de-Lara J M, Redington A E, Bradding P, Church M K, Hartley J A, Semper A E, Holgate S T. Dendritic cells in normal and asthmatics airways: expression of the α subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor FC ϵ RII. *Clinical and Experimental Allergy.*1996; 26:648-655.

Van der Valk, P and Meijer CJLM. Reactive Lymph Nodes. Chapter 10. Histology for Pathologists. Raven Press, New York 1992.

Van Rensen ELJ, Sont JK, Evertse CE, Willems LNA, Mauad T, Hiemstra PS, Sterk P, AMPUL Study Group. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:837-841.

Vassalo R, Walters P R, Lamont J, Kottom T J, Yi E S, Limper A H. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a lung tissue research consortium study. *Respiratory Research*. 2010; 11:45

Vermaelen K e Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:530-551.

Vermaelen K Y; Carro-Muino I; Lambrecht B N; Pauwels R A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp Med*. 2001;193(1):51-60.

Von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA, Strickland DH, Holt PG, Stumbles PA. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol*. 2005;175(3):1609-1618.

Wang H B, Ghiran I, Matthaei K, Weller P F. Airway eosinophils:allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. *J Immunol*. 2007; 179:7585-7592.

Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368:804-813.

Woolcock AJ. Natural history of fatal asthma. In: A.L.Sheffers. Fatal Asthma. New York: Marcel Dekker, Inc.;1998. P 179-96.

Yerkovich ST, Roponen M, Smith ME, McKenna K, Bosco A, Subrata LS et al. Allergen-enhanced thrombomodulin (blood dendritic cell antigen 3.CD141) expression on dendritic cell is associated with a TH2-skewed immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:209-16.

Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatics and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(5):477-87.

Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Larche M, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol.* 1997;158(7):3539-44.

Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and inflammatory dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(2):302-8.