

**SILVIA DE MAGALHÃES SIMÕES**

**Distribuição do infiltrado inflamatório em  
parênquima pulmonar periférico e vias aéreas  
na asma fatal**

Tese apresentada ao Departamento de  
Clínica Médica da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

São Paulo  
2004

**SILVIA DE MAGALHÃES SIMÕES**

**Distribuição do infiltrado inflamatório em  
parênquima pulmonar periférico e vias aéreas  
na asma fatal**

Tese apresentada ao Departamento de  
Clínica Médica da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff

São Paulo  
2004

## **DEDICATÓRIA**

**A meus pais Lectícia e Jairo Simões (*in memoriam*) com todo meu amor, gratidão e saudade.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Dra. Marisa Dolhnikoff, minha orientadora que se revelou sempre tão brilhante na arte de ensinar. Sua sinceridade e bom humor tornaram o convívio fácil, agradável e capaz de render grandes frutos científicos. Em meio a tanta ciência, aprendi a admirá-la como pessoa e profissional.

A Mario Adriano dos Santos, meu companheiro de vida, pelo incentivo diário, pela compreensão e principalmente pelos ensinamentos científicos e ajuda em questões de informática.

A Dinéia Britto Miranda Silva e José Ribamar Miranda Silva, pelo carinho dedicado a meu filho André e pelos cuidados dispensados a ele durante a minha ausência.

Ao Dr. Fábio Fernandes Morato Castro, pelo incentivo em percorrer o caminho da pesquisa e por tantos conselhos profissionais, verdadeiros atalhos facilitadores nessa caminhada.

A Dra. Thais Mauad e Dr. Mario Adriano dos Santos, responsáveis pela criação do Banco de Tecidos em Asma Fatal. O material colhido permitiu o desenvolvimento desse estudo e meu crescimento científico.

Aos Professores e Doutores do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia, pela oportunidade de discutirem esse trabalho, trazendo valiosas contribuições. Em especial, ao Professor Jorge Kalil, pela dedicada atenção aos seus alunos na busca de orientar o pensamento científico e formar profissionais mais capacitados.

A todos do Departamento de Patologia, em especial, ao Professor Paulo Hilário Nascimento Saldiva e Dra. Thais Mauad pelos comentários e sugestões importantes ao longo da realização desse trabalho.

A todos do Laboratório de Poluição, pela acolhida tão calorosa e pelo tempo cedido no microscópio e analisador de imagem para que eu pudesse chegar aos meus resultados.

A Ana Lúcia, Sandra, Ângela e Esmeralda, funcionárias do Laboratório de Imuno-histoquímica, pela paciência nas diversas etapas da reação.

A Tânia Motta, secretária da Imunologia, pelo carinho e disposição em resolver todos os problemas.

## **APOIO INSTITUCIONAL**

Bolsa de Doutorado pelo CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Ministério de Ciência e Tecnologia)

Financiamento do Projeto pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**Esta tese está de acordo com:**

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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. - Asma: Definição e Classificação.....	02
1.2. - Asma fatal.....	03
1.3. - Epidemiologia da Asma.....	04
1.4. - Patologia da Asma.....	06
1.5. - Compartimentos histológicos das vias aéreas.....	08
1.6. - Inflamação na Asma.....	09
1.7. - Pulmão distal na Asma.....	16
1.8. - A autópsia como instrumento de estudo na asma.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. - Obtenção e preparação do material.....	26
3.2. - Imuno-histoquímica .....	28
3.3. - Estudo Morfométrico.....	29
3.4. - Análise de Imagem.....	31
3.5. - Análise Estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. - Caracterização dos Pacientes.....	36
4.2. - Densidade Inflamatória.....	43
4.2.1. - Eosinófilos.....	43
4.2.2. - Mastócitos.....	47



4.2.3. - Neutrófilos.....	50
4.2.4. - Linfócitos.....	52
4.2.5. - Correlações.....	57
4.3. - Análise de outros tecidos.....	63
4.4. - Resumo dos resultados.....	63
5. DISCUSSÃO.....	66
5.1. - Eosinófilos.....	67
5.2. - Linfócitos.....	74
5.3. - Neutrófilos.....	77
5.4. - Mastócitos.....	78
5.5. - Pacientes.....	80
5.6. - Pulmão Distal.....	81
6. CONCLUSÕES.....	85
7. ANEXOS.....	87
A - Entrevista.....	88
B - Densidade Celular.....	93
8. REFERÊNCIAS.....	100

## LISTA DE SIGLAS

IgE	Imunoglobulina E
MHC II	“Major Histocompatibility Complex Class II”
Th2	Linfócitos “T helper 2”
IL	Interleucina
FC $\epsilon$ RI	Receptor de alta afinidade para IgE
GM-CSF	“Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”
TGF- $\beta$	“Transforming Growth Factor- $\beta$ ”
bFGF	“Basic Fibroblast Growth Factor”
VCAM-1	“Vascular Cell Adhesion Molecule-1”
VLA-4	“Very Late Antigen-4”
TNF- $\alpha$	“Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ”
ICAM-3	“Intercellular Adhesion Molecule-3”

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> - História clínica dos pacientes asmáticos.....	38
<b>TABELA 2</b> - Características clínicas dos controles.....	41
<b>TABELA 3</b> - Correlação de Spearman para neutrófilos em asmáticos.....	59
<b>TABELA 4</b> - Correlação de Spearman para mastócitos em asmáticos .....	59
<b>TABELA 5</b> - Correlação de Spearman para eosinófilos em asmáticos .....	60
<b>TABELA 6</b> - Correlação de Spearman para linfócitos CD3+ em asmáticos.....	60
<b>TABELA 7</b> - Correlação de Spearman para linfócitos CD4+ em asmáticos.....	61
<b>TABELA 8</b> - Correlação de Spearman para linfócitos CD8+ em asmáticos.....	61
<b>TABELA 9</b> - Correlação de Spearman para linfócitos CD20+ em asmáticos.....	62
<b>TABELA 10</b> - Densidade celular em asmáticos tabagistas e não tabagistas.....	62
<b>TABELA 11</b> - Comparação da densidade celular entre o parênquima e as vias aéreas nos controles.....	65
<b>TABELA 12</b> - Comparação da densidade celular entre o parênquima e as vias aéreas nos asmáticos.....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Aspecto macroscópico do pulmão de um indivíduo que morreu Por asma.....	07
<b>Figura 2</b> - Achados microscópicos do pulmão na asma fatal .....	07
<b>Figura 3</b> - Diferentes camadas de uma via aérea normal.....	09
<b>Figura 4</b> - Reação mediada por IgE.....	13
<b>Figura 5</b> - Retículo de 100 pontos colocado sobre o tecido pulmonar.....	31
<b>Figura 6</b> - Representação de uma via aérea de grande calibre mostrando a delimitação de área interna e área externa.....	32
<b>Figura 7</b> - Representação de via aérea de pequeno calibre mostrando a delimitação de área interna e área externa.....	33
<b>Figura 8</b> - Aspectos histológicos em pulmões de pacientes asmáticos e não-asmáticos.....	42
<b>Figura 9</b> - Corte histológico da via aérea grande com infiltrado eosinofílico em indivíduo asmático e controle.....	44
<b>Figura 10</b> - Corte histológico de parênquima distal com infiltrado eosinofílico em indivíduo asmático e controle.....	44
<b>Figura 11</b> - Corte histológico da pequena via aérea com infiltrado mastocitário em indivíduo asmático e controle.....	48
<b>Figura 12</b> - Esquema ilustrativo das células inflamatórias presentes em maior densidade nos asmáticos em relação aos controles nos diversos compartimentos estudados .....	64

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 A</b> - Densidade de eosinófilos .....	45
<b>Gráfico 1 B</b> - Densidade de eosinófilos em asmáticos .....	46
<b>Gráfico 1 C</b> - Densidade de eosinófilos em 3 pacientes asmáticos .....	46
<b>Gráfico 1 D</b> - Densidade de eosinófilos nos controles .....	47
<b>Gráfico 2 A</b> - Densidade de mastócitos .....	48
<b>Gráfico 2 B</b> - Densidade de mastócitos em asmáticos .....	49
<b>Gráfico 2 C</b> - Densidade de mastócitos em controles .....	49
<b>Gráfico 3 A</b> - Densidade de neutrófilos .....	51
<b>Gráfico 3 B</b> - Densidade de neutrófilos em controles .....	51
<b>Gráfico 3 C</b> - Densidade de neutrófilos em asmáticos .....	52
<b>Gráfico 4 A</b> - Densidade de linfócitos T CD3+ .....	53
<b>Gráfico 4 B</b> - Densidade de linfócitos T CD4+ .....	53
<b>Gráfico 4 C</b> - Densidade de linfócitos T CD8+ .....	54
<b>Gráfico 4 D</b> - Densidade de linfócitos T CD20+ .....	54
<b>Gráfico 5 A</b> - Densidade de linfócitos T CD4+ em asmáticos .....	55
<b>Gráfico 5 B</b> - Densidade de linfócitos T CD20+ em asmáticos.....	56
<b>Gráfico 5 C</b> - Densidade de linfócitos T CD3+ em asmáticos .....	56
<b>Gráfico 5 D</b> - Densidade de linfócitos T CD8+ em asmáticos .....	57

## **SUMMARY**

Simões, S.M. Inflammatory cell distribution in alveolar tissue and airways in fatal asthma [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004.

The site and distribution of inflammation in the airways of asthmatic patients has been largely investigated. Inflammatory cells are distributed in both large and small airways in asthma. It has been demonstrated that distal lung inflammation in asthma may significantly contribute to the pathophysiology of the disease. Although it is now accepted that lung inflammation is not restricted to the intrapulmonary airways in asthma, little is known about cell distribution in the other lung compartments and their relation to the intrapulmonary airways. In this study we aimed to map the inflammatory process in fatal asthma, from the large airways to the lung parenchyma. Immunohistochemical staining, image analysis and morphometric analysis were used to determine cellular density in inner and outer areas of large and small airways and in parenchyma (peribronchiolar and distal). Eosinophil, neutrophil, mast cell and lymphocyte content was determined in each compartment of 20 patients with fatal asthma and 10 controls. Eosinophil density was higher in all studied areas in fatal asthma compared with controls ( $p < 0.02$ ), but, in asthmatics, it was significantly decreased in distal parenchyma only when compared to inner wall of large airways ( $p < 0.01$ ). Mast cell content was higher in the outer area of large and small airways and in peribronchiolar parenchyma of fatal asthma compared with control ( $p < 0.04$ ). In asthmatics, the outer area of small airways showed the highest content of mast cell and it was significantly increased when compared to outer area of large airways ( $p < 0.01$ ) and peribronchiolar and distal parenchyma ( $p < 0.001$ ). CD3+, CD4+ and CD20+ cells showed increased content in fatal asthma intrapulmonary airways compared with controls ( $p < 0.05$ ). Increased neutrophil content was observed only in peribronchiolar parenchyma of fatal asthma ( $p = 0.029$ ). We conclude that eosinophils present a widespread distribution within the respiratory tract in fatal asthma, from the large airway to the distal lung. The outer wall of airways is the main site of inflammatory changes in fatal asthma. There is a localized distribution of alveolar inflammation at the peribronchiolar region for mast cells and neutrophils. Our findings provide further evidence of the importance of the lung periphery in the pathophysiology of fatal asthma.



## **1 - INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Definição e Classificação da Asma

Asma é definida como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas resultante da participação de várias células. A inflamação ocasiona um aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, levando a episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, tosse e/ou opressão torácica. A obstrução das vias aéreas pode ser reversível espontaneamente ou após terapia broncodilatadora [1]

A asma é classificada clinicamente em leve intermitente, leve persistente, moderada ou grave de acordo com a frequência dos sintomas, necessidade do uso de broncodilatadores e os valores espirométricos [1]. Esse tipo de classificação por gravidade orienta decisões quanto a abordagem terapêutica do paciente.

Menos de 5% dos pacientes asmáticos evoluem com asma grave. No entanto, fatores preditivos para o desenvolvimento da forma grave da doença são desconhecidos [2]. Alguns estudos sugerem que um tempo mais longo de asma poderia favorecer alterações estruturais irreversíveis no pulmão e conseqüentemente uma forma mais grave da doença. Gibbs et al estudaram 100 asmáticos graves e observaram que a maioria tinha uma história de doença desde a infância e apenas um terço iniciou sintomas após 20 anos de idade [3]. Contrariamente, estudos europeus sugerem que asma



de início tardio evolui mais rapidamente para um declínio da função pulmonar [4,5] .

Fatores genéticos podem estar relacionados com asma grave. Mutações nos genes de interleucina 4 (IL-4) e receptor de IL-4 têm sido associadas a perda da função pulmonar ou a exacerbações quase fatais [6,7]. Alterações no genes reguladores da produção de “Monocyte Chemotactic Protein-1” (MCP-1) e de “Transforming Growth Factor- $\beta$ ” (TGF- $\beta$ ) têm sido associadas a asma grave através do promoção de alterações fibróticas nas vias aéreas [8,9].

Infecções respiratórias podem contribuir para a gravidade da doença: vírus sincicial respiratório na infância e *Micoplasma pneumoniae* nos adultos [10,11]. Doenças concomitantes como refluxo gastroesofágico e sinusite crônica, assim como a falta de aderência ao tratamento podem também favorecer o desenvolvimento de asma grave [12].

## **1.2 - Asma fatal**

A asma fatal é definida como óbito em decorrência de um episódio de broncoconstrição em indivíduo com diagnóstico prévio de asma [13]. Alguns estudos têm caracterizado os pacientes vítimas de morte por asma de acordo com o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o desfecho fatal. Instituiu-se, assim o termo “morte súbita por asma” quando o óbito ocorreu poucas horas (1 a 2 horas) após o início dos sintomas [14,15].

Independente da gravidade, o paciente pode apresentar um episódio fatal de asma. Alguns fatores têm sido associados ao maior risco de óbito: inadequado acompanhamento médico e falta de aderência ao tratamento com corticosteróides inalatórios; nove ou mais admissões hospitalares pela doença num período de um ano; história prévia de internação em Unidade de Tratamento Intensivo (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 e uso excessivo de beta-agonistas para broncoespasmo; hábitos como alcoolismo e tabagismo [1,16,17].

### **1.3 - Epidemiologia da Asma**

A prevalência de asma varia entre as diversas regiões do mundo, com índices variando de 0,6% em Papua Nova Guiné, a 49% nas Ilhas Carolinas Ocidentais [18]. Nas crianças as taxas variam de 0 a 30% em diferentes populações [1].

Nas últimas décadas houve um aumento mundial nas taxas de prevalência da doença entre crianças e adultos jovens em aproximadamente 5 a 6% por ano, a despeito dos avanços do tratamento [19]. No Brasil, não se conhece as taxas reais de prevalência e incidência da asma. Alguns estudos direcionados a faixas etárias específicas estão disponíveis. Estudo baseado no “International Study of Asthma and Allergies in Childhood” (ISAAC) realizado em algumas cidades brasileiras mostrou que a

prevalência de asma oscilou entre 4,7% e 20,7% na faixa etária de 6 a 7 anos e, na faixa etária de 13 a 14 anos, a prevalência variou de 4,8% a 21,9%. Considerando-se as duas populações, a prevalência cumulativa média foi de 13,3% [20].

A partir da segunda metade do século XX, asma tem sido considerada um sério problema de saúde pública devido ao aumento das taxas de mortalidade observado em vários países [1,21]. Alguns fatores são apontados como responsáveis por esse aumento: crescentes taxas de incidência e prevalência da doença e alterações nos critérios diagnósticos e na Classificação Internacional de Doenças (CID) [22].

Análise dos dados de mortalidade por asma no Brasil, baseado no Sistema de Informação de Mortalidade do DATASUS, durante o período de 1980 a 1998 foi feita recentemente por Campos [23]. Os coeficientes de mortalidade variaram entre 1,93 (1980) a 1,41(1998) mortes por 100.000 habitantes. Em um primeiro período (de 1980 a 1991) observou-se diminuição da mortalidade, alcançando taxas de 1,16/100.000 habitantes. Em um segundo momento, entre 1992 e 1995, houve um aumento dos índices de 1,36 a 1,58. A partir de 1996, os índices assumiram uma queda discreta e gradual com valores que variaram de 1,38 a 1,43/100.000 habitantes. As taxas de mortalidade não mostraram diferenças significativas em relação ao sexo. Os maiores coeficientes foram encontrados nos extremos de idade, idosos com mais de 65 anos e crianças menores que 1 ano, o que pode representar valores superestimados considerando as dificuldades do diagnóstico diferencial com outras doenças

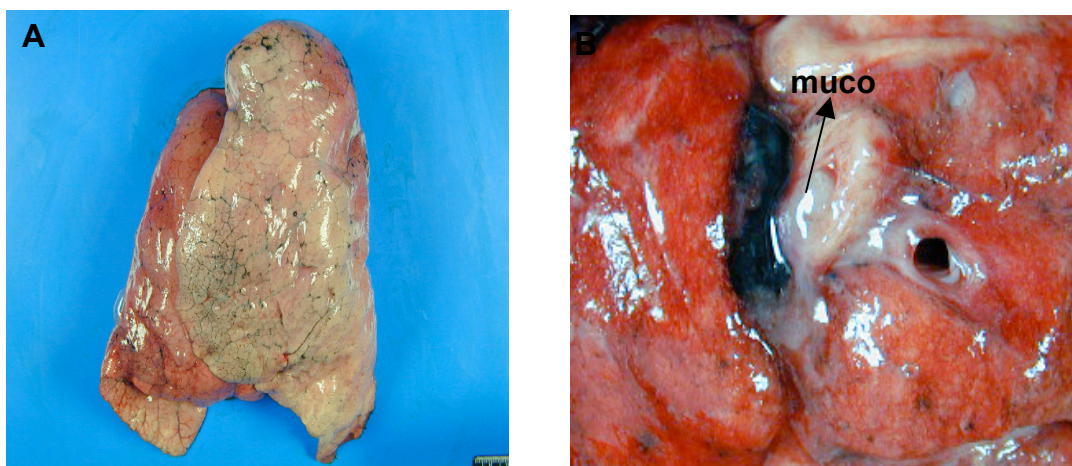
cardiorrespiratórias nessas faixas etárias. Análise do grupo de 5 a 34 anos separadamente, cujo acerto do diagnóstico é maior que 90% [24], mostrou variação de coeficientes de 0,29 a 0,18/100.000 habitantes no período de 1980 a 1991 e de 0,24 a 0,2/100.000 habitantes no período de 1992 a 1998. Cerca de 70% das mortes ocorreram em hospitais, sugerindo que esse fato possa resultar de falhas no atendimento ou de uma subnotificação na comunidade [23].

No estado de São Paulo, dados obtidos da Fundação SEADE revelaram um aumento do índice de morte de 0,2/100.000 habitantes em 1970 para 0,4 em 1996 nos indivíduos de 5 a 34 anos de idade [25].

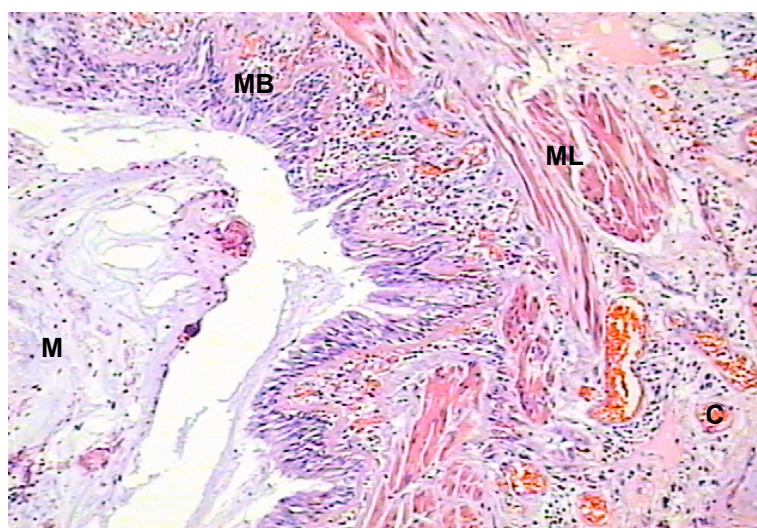
#### **1.4 - Patologia da Asma**

Grande parte dos conhecimentos sobre fisiopatologia da asma se originou em estudos de autópsias de pacientes que morreram em mal asmático. Macroscopicamente, os pulmões são hiperinsuflados, mesmo após abertura da cavidade pleural (Figura 1A). A superfície do corte após secção do pulmão mostra a presença de tampões mucosos acinzentados e gelatinosos obstruindo a luz das vias aéreas (Figura 1B) [26]. Achados microscópicos encontrados são edema e infiltrado celular de parede brônquica, intensa descamação epitelial, espessamento de membrana basal, hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas e hiperplasia de glândulas (Figura 2). Esses achados sugerem um infiltrado inflamatório prévio de longa duração [27] [15]. Aikawa et al descreveram presença de

tampões mucosos se correlacionando significativamente com hiperplasia de glândulas calciformes em vias aéreas periféricas de vítimas de asma fatal comparada a asma não fatal [28].



**FIGURA 1** - Aspecto macroscópico do pulmão de um indivíduo que morreu por asma. As duas principais características macroscópicas da asma fatal são representadas nas figuras: A - hiperinsuflação pulmonar e B - hipersecreção mucosa. Note a obstrução total da luz de um bronquíolo por tampão mucoso

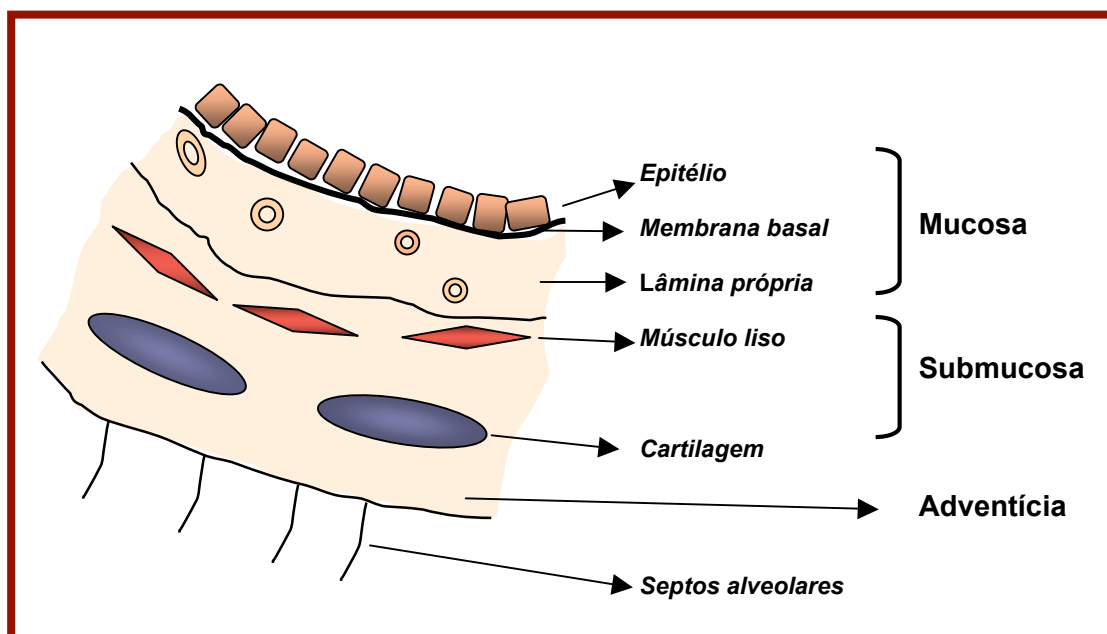


**FIGURA 2** - Achados microscópicos do pulmão na asma fatal. A figura mostra segmento de parede de via aérea com presença de muco (M) obstruindo parcialmente a luz, espessamento da membrana basal (MB), hipertrofia de músculo liso (ML), proliferação capilar (C) e infiltrado inflamatório difuso. HE, 200x

## 1.5 - Compartimentos histológicos das vias aéreas

Nos últimos anos a via aérea pulmonar vem sendo estudada por vários autores com base em uma classificação proposta por Bai et al que propuseram uma divisão em compartimentos (Figura 3) [29]:

- a. mucosa brônquica: compreendendo o epitélio de revestimento, membrana basal e lâmina própria. Considera-se lâmina própria a **área interna da via aérea**, ou seja, a região situada entre a membrana basal e a borda interna do músculo liso. Essa região contém basicamente elementos da matriz extra-celular, vasos e células inflamatórias. O material obtido nas biópsias brônquicas em geral representa a região da mucosa.
- b. submucosa: região situada a partir da borda externa da lâmina própria, incluindo o músculo liso até a cartilagem;
- c. adventícia: para as vias aéreas cartilagosas, considera-se o tecido conjuntivo pós cartilagem que se insere no parênquima. Para as vias aéreas membranosas, ou seja, desprovidas de cartilagem, os limites entre a submucosa e a adventícia são menos claros. Os autores propõem, assim, que a submucosa seja considerada toda a parte do brônquio externa à lâmina própria até o limite do parênquima. Essa região, também chamada de **área externa da via aérea**, é a região na qual as forças do parênquima se refletem através de um adequado acoplamento entre via aérea e parênquima.



**FIGURA 3** - Diferentes camadas de uma via aérea normal. Adaptado de Bai et al [29]

O **pulmão distal** corresponde à região compreendida entre vias aéreas menores que 2 mm de diâmetro e todo o parênquima pulmonar periférico [30,31].

### 1.6 - Inflamação na Asma

A inflamação crônica das vias aéreas resulta da participação de várias células como mastócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. Broncoconstrição, edema de mucosa e formação de “plugs” mucosos caracterizam a obstrução das vias aéreas e resultam de uma reação inflamatória provocada pela exposição a antígenos, como aeroalérgenos, em indivíduos suscetíveis. A inflamação crônica

desencadeia danos teciduais persistentes estimulando processo de reparação e levando ao remodelamento da parede brônquica [1].

Asma é frequentemente associada a atopia, isto é, predisposição genética apresentada por alguns indivíduos para desenvolver resposta mediada por Imunoglobulina E (IgE) a aeroalérgenos comuns [32]. Alérgenos inalados entram em contato com a mucosa respiratória e são capturados por células dendríticas presentes no epitélio brônquico que são capazes de reconhecer, processar o antígeno e apresentar seus fragmentos peptídicos ligados à molécula do “Major Histocompatibility Complex Class II” (MHC II) aos linfócitos T auxiliares. Estes vão produzir um padrão de citocinas, sobretudo de interleucinas (IL) (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) que caracterizam uma resposta predominantemente humoral, induzindo a proliferação de linfócitos do subtipo “T helper 2” (Th2). Essas citocinas desempenham importante papel na mudança de isótipo para IgE, proliferação de mastócitos e ativação e aumento da sobrevivência de eosinófilos. A IgE funciona como receptor antigênico na superfície de mastócitos e basófilos através da sua ligação a receptores de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI). Exposições subseqüentes ao antígeno proporcionam ativação de mastócitos através de sua ligação com a IgE na superfície celular, dando início à fase efetora da reação de hipersensibilidade tipo I ou reação mediada por IgE (Figura 4, Quadro 1) [33].

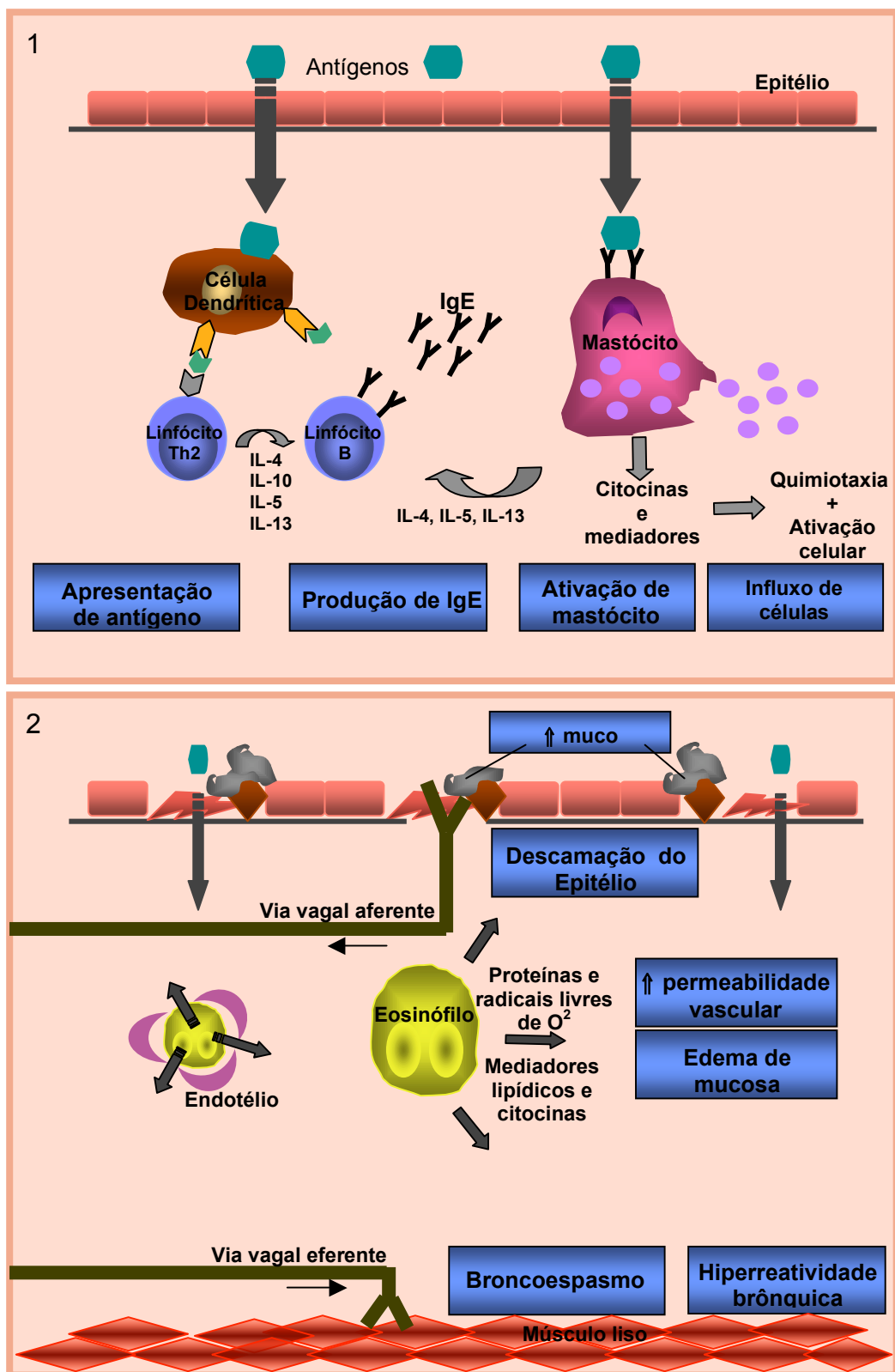
**Mastócitos** são células residentes do epitélio brônquico e da submucosa encontrados em maior número nos indivíduos asmáticos que nos não-asmáticos [34,35]. Uma vez ativados, sofrem degranulação e



liberam mediadores pré-formados como histamina e fatores quimiotáticos para neutrófilos e eosinófilos; mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos), citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6) e “Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor” (GM-CSF). Essas substâncias atuam diretamente nas vias aéreas ou indiretamente através de mecanismos neurais, causando contração de músculo liso, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, incremento na produção de muco, bem como recrutando e ativando novas células como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos para o sítio inflamatório [33]. Mastócitos são também capazes de atuar como mitógenos de músculo liso através da produção de proteases neutras como histamina, “Transforming Growth Factor- $\beta$ ” (TGF- $\beta$ ), “Basic Fibroblast Growth Factor” (bFGF), triptase e quimase que podem contribuir para hipertrofia do músculo liso [36]. Carroll et al demonstraram recentemente maior densidade de mastócitos circundando glândulas submucosas de pulmões obtidos de vítimas de asma fatal e de asma não fatal em relação a controles não asmáticos, correlacionando esse achado com maior área de muco na luz das vias aéreas [37]. Mastócitos degranulados foram evidenciados no músculo liso da parede brônquica de indivíduos vítimas de asma fatal comparados a asma não fatal e controles. Além disso, esses autores constataram que a intensidade da degranulação de mastócitos se correlacionou com a gravidade da doença [38]. Análise de biópsias brônquicas revelou presença de infiltrado mastocitário no músculo liso de pacientes com asma brônquica, ao contrário dos casos de bronquite

eosinofílica e dos controles, sugerindo que alterações funcionais da asma possam estar relacionadas a esse achado [39].

**Eosinófilos** são recrutados da circulação numa fase tardia da inflamação. Interleucina 4 participa desse recrutamento através da indução de expressão de VCAM-1 (“Vascular Cell Adhesion Molecule-1”) nas células endoteliais que se ligam ao VLA-4 (“Very Late Antigen-4”) da superfície do eosinófilo. A produção e ativação dos eosinófilos estão sob controle dos linfócitos T auxiliares: IL-3, IL-5 e GM-CSF constituem fatores de crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos [33]. Essas células têm papel efetor, liberando proteínas altamente tóxicas de seus grânulos (Proteína Básica Principal, Proteína Catiônica Eosinofílica, Endoperoxidase Neutra, Neurotoxina Derivada do Eosinófilo) e radicais livres de oxigênio que vão causar dano tecidual. Produzem também mediadores lipídicos que vão amplificar a resposta inflamatória através do recrutamento e ativação de mais células [40]. A lesão do epitélio brônquico facilita a penetração de alérgenos e favorece a exposição de terminações nervosas com subsequente liberação de neuropeptídeos pelas fibras C sensitivas que compõem o sistema nervoso autônomo não adrenérgico não colinérgico e atuam como potentes mediadores do processo inflamatório das vias aéreas (Figura 4, Quadro 2) [33]. A medida do número de eosinófilos no sangue, lavado broncoalveolar e biópsia brônquica em indivíduos asmáticos é maior quando comparada com controles normais, havendo correlação entre eosinofilia e gravidade da doença [41,42].



**FIGURA 4** - Reação mediada por IgE. Quadro 1 mostra a fase de sensibilização e produção de IgE. Quadro 2 mostra a fase efetora da resposta inflamatória com participação do eosinófilo

A participação dos **neutrófilos** na fisiopatologia da asma brônquica é pouco conhecida. Infiltrado inflamatório neutrofílico tem sido reportado em alguns casos de asma fatal [43]. Sur et al relataram aumento do número de neutrófilos e escassez de eosinófilos nos pacientes com morte súbita por asma [14]. Há evidências de que neutrófilos desempenhem importante papel na hipersecreção através da elastase presente em seus grânulos que constitui importante secretagogo de células caliciformes e glândulas submucosas das vias aéreas [44,45]. Outros autores, entretanto, não mostraram correlação significativa entre o número de neutrófilos presentes no tecido periglandular e a área de muco na luz das vias aéreas [37].

A participação dos neutrófilos na asma foi estudada em casos de mal asmático. Lambling et al evidenciaram aumento de neutrófilos em lavado brônquico de pacientes com crise grave de asma submetidos a ventilação mecânica quando comparados a asma leve e controles não asmáticos [46]. O aumento de neutrófilos em asmáticos graves corticodependentes comparados a asmáticos moderados foi também documentado por Wenzel et al através de material obtido de biópsia endobrônquica e transbrônquica [47]. Esse achado poderia estar associado a altas doses de corticosteróide utilizadas, a uma eventual infecção respiratória concomitante ou a um perfil específico de asma grave. Esse mesmo grupo de pesquisadores evidenciaram, posteriormente, maior número de neutrófilos na submucosa brônquica de asmáticos graves comparados a asmáticos leves e controles. Além disso, ao caracterizarem dois grupos distintos de asma grave baseado

na presença e ausência de eosinófilos, não encontraram diferença no número de neutrófilos entre eles [48].

**Linfócitos T** são encontrados na mucosa brônquica tanto em indivíduos não-asmáticos como em asmáticos. A principal participação dessas células na asma ocorre através da produção de citocinas que vão promover os eventos relacionados aos achados patológicos da doença. São eles: aumento da síntese de IgE, maturação e ativação de mastócitos e basófilos e infiltração eosinofílica com conseqüente dano epitelial [49]. Apesar da forte tendência em inferir o principal papel aos linfócitos T do subtipo CD4, estudos já mostram que linfócitos T CD8 também são capazes de produzir IL-4 e IL-5 em pacientes asmáticos [50,51,52]. Alguns estudos inclusive, retrataram maior expressão de IL-4 e “Interferon-gama” (INF- $\gamma$ ) por células CD8 em casos de asma fatal comparados a controles. Os autores atribuem esse achado a provável infecção viral associada [53].

**Macrófagos** residem tanto em alvéolos como na interface ar superfície das vias aéreas de condução do trato respiratório em humanos e possuem receptores de baixa afinidade para IgE na sua superfície [54]. Macrófagos de asmáticos expressam maior número desses receptores do que indivíduos não-asmáticos [55]. Através da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1,IL-6, “Tumor necrosis factor alpha” -TNF $\alpha$ - e GM-CSF) podem promover ativação de célula endotelial, recrutamento celular e aumentar a sobrevivência do eosinófilo [56].

**Células epiteliais** brônquicas participam ativamente do processo inflamatório através da produção de citocinas e de outros mediadores

inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF- $\beta$ , endotelina, fibronectina e derivados do ácido araquidônico [57,58].

As alterações estruturais do epitélio e submucosa resultantes da inflamação crônica nos pacientes asmáticos têm sido referidas no processo de remodelamento das vias aéreas que pode se associar a uma queda da função pulmonar ao longo do tempo [59]. Eventos importantes nesse processo são: espessamento da membrana basal reticular às custas da deposição de colágeno tipo I, III, tenascina e fibronectina produzidos por miofibroblastos ativados [60]; fragmentação de fibras elásticas [61]; neovascularização e angiogênese [59,62]; hipertrofia e hiperplasia de músculo liso [63] e metaplasia de células caliciformes com incremento da produção de muco [64].

### **1.7 - Pulmão distal na Asma**

Vários estudos anatomopatológicos têm apontado para a presença de inflamação em vias aéreas distais na asma. A parede das pequenas vias aéreas de pacientes com asma fatal são mais espessas em comparação com controles, principalmente às custas de hipertrofia de músculo liso, apresentando intenso infiltrado eosinofílico associado [27]. Carroll et al documentaram alterações estruturais na parede das vias aéreas grandes e pequenas em casos de asma fatal e não fatal, sendo que esses achados foram mais proeminentes nas vias aéreas pequenas do segundo grupo [63]. Synek et al observaram que a intensidade do infiltrado celular (mastócitos,

eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos) em pequenas vias aéreas de asmáticos era independente da gravidade da doença [65]. Contrariamente, Carroll evidenciou um infiltrado eosinofílico mais intenso nas vias aéreas de grande e de pequeno calibre em vítimas de asma fatal comparado a asma não fatal, sugerindo que o recrutamento de eosinófilos tenha relação com a gravidade da asma [66]. A análise de ressecções brônquicas obtidas de pacientes com asma leve mostram que a inflamação das vias aéreas distais é mais intensa que a das vias aéreas centrais [67].

Além de importantes sítios inflamatórios, vias aéreas distais constituem sítios importantes de obstrução em pacientes asmáticos [68]. Wagner et al evidenciaram aumento da resistência das vias aéreas periféricas em asmáticos leves assintomáticos comparados a controles normais, utilizando técnica de medida direta da resistência através de broncoscopia [69]. Estudos com tomografia computadorizada de alta resolução têm mostrado constrição de vias aéreas distais em asmáticos submetidos a broncoprovocação com metacolina [70,71]. James et al demonstraram que o espessamento de parede das vias aéreas membranosas de asmáticos, às custas da inflamação, pode aumentar em até dez vezes a resistência dessas vias aéreas [72].

Alguns estudos sugerem que a resposta inflamatória na asma não esteja limitada às vias aéreas, mas comprometa também o parênquima pulmonar periférico [67,73,74]. A participação do parênquima alveolar na fisiopatologia da asma tem sido alvo de interesse, uma vez que estudos

mostram que o tecido pulmonar periférico responde a estímulos broncoconstritores mesmo na ausência de vias aéreas [75].

Medida direta da pressão alveolar tem sido realizada em animais através do uso de cápsulas alveolares coladas à superfície pleural submetida a punções [76]. Dessa forma, vários estudos têm mostrado aumento da resistência do parênquima durante a constrição pulmonar total [77,78]. Ludwig et al evidenciaram aumento da resistência tissular em pulmões de cobaias após inalação com histamina e Prostaglandina F<sub>2α</sub> [77]. Dreshaj et al mostraram resultado semelhante após administração venosa de Substância P [79]. Há relatos, inclusive, de que a resposta do tecido pulmonar periférico a agentes broncoconstritores seja superior à das vias aéreas. Martins et al mostraram em cobaias que a resistência do tecido pulmonar aumenta mais que a das vias aéreas em resposta à capsaicina (substância que age em terminações nervosas sensitivas com liberação de neuropeptídeos - substância P e neurocinina A) [80]. Ingenito et al observaram que a resistência tissular aumentou proporcionalmente mais do que a das vias aéreas após estímulo com metacolina [81]. Assim, o parênquima pulmonar demonstra ter participação na resistência pulmonar total, sugerindo importante implicação nas provas de hiperresponsividade para diagnóstico de asma [76].

Fatias de tecido pulmonar têm sido utilizadas para avaliar o comportamento do parênquima periférico submetido a oscilação mecânica *in vitro*, bem como sua resposta a agonistas constritores [82,83,84]. Esse modelo oferece como vantagem a possibilidade de estudar o parênquima



sem a participação das vias aéreas e da interface ar-líquido [76]. Diversos elementos anatômicos são encontrados nas fatias de parênquima pulmonar tais como pequenos vasos sanguíneos, pequenas vias aéreas e parênquima alveolares. A análise morfométrica desse tecido, em ratos, mostrou que o parênquima alveolar, vaso sanguíneo e parede brônquica correspondiam respectivamente a 86,5%, 8,4% e 5,3% da área total. A participação de cada um desses elementos na oscilação da fatia de parênquima pulmonar é assunto controverso [85].

Kapanci et al demonstraram em ratos, células intersticiais alveolares que correspondiam a 42% da área da parede alveolar e possuíam filamentos de actina, sugerindo uma atividade contrátil [86]. Fatias de parênquima se contraíam em vigência de hipóxia ou estimuladas com epinefrina, provavelmente às custas dessas células interalveolares que receberam a denominação de “células intersticiais contráteis”. Fukui et al, posteriormente, reafirmaram resposta contrátil dessas células isoladas de tecido pulmonar bovino submetidas a hipóxia [87].

Alguns mecanismos responsáveis pela possível resposta contrátil do tecido pulmonar periférico são propostos: contração de células intersticiais alveolares (miofibroblastos) e contração de células musculares lisas presentes nos ductos alveolares, nas pequenas vias aéreas ou nos vasos. [76].

Bertram et al evidenciaram diferentes respostas de fatias de parênquima pulmonar de humanos à serotonina e norepinefrina dependendo da quantidade de vasos e vias aéreas presentes [88]. Por outro lado,

Dolhnikoff et al demonstraram que fatias de tecido pulmonar periférico humano desprovidas de vias aéreas respondiam a acetilcolina de forma similar àquelas contendo vias aéreas, sugerindo que o parênquima alveolar seja responsável pela resposta contrátil observada [75]. A provocação com acetilcolina de vasos de pequeno calibre (<0,2mm), à semelhança dos encontrados na fatia de tecido pulmonar periférico, não mostrou resposta. Esse achado aponta para uma improvável participação dos vasos sanguíneos na resposta contrátil do parênquima pulmonar [89]. Por outro lado, alguns autores não conseguiram evidenciar aumento da contratilidade do parênquima pulmonar de asmáticos comparado a controles não asmáticos [90].

Em humanos, o papel do parênquima pulmonar periférico na resposta aos agonistas constritores não está totalmente estabelecido. Kaczka et al mostraram que a resistência do parênquima alveolar corresponde a 40% da resistência pulmonar total e aumenta com uso de broncoconstritores [91]. Outros autores, no entanto, estimaram que essa resistência tecidual equivale a 9% da resistência total e não sofre alteração após indução com metacolina, mas após mudanças no volume pulmonar [92].

Existem poucos estudos em humanos sobre a participação do parênquima pulmonar na asma: Kraft et al evidenciaram infiltrado eosinofílico predominantemente alveolar em pacientes com asma noturna, correlacionando esse achado com a queda da função pulmonar [73]. Minshal et al mostraram maior expressão de IL-5 no tecido alveolar de indivíduos asmáticos quando comparados a controles não-asmáticos [93]. Hamid et al

mostraram aumento significativo do número de eosinófilos positivos para proteína básica principal (MBP) na parede dos alvéolos de indivíduos asmáticos comparados a controles, mas não encontraram correlação com a queda de volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV1) [67]. Esses estudos foram realizados com amostras de tecido pulmonar de pacientes com asma leve e moderada obtidas através de biópsias endobrônquica e transbrônquica e da ressecção pulmonar em casos de carcinoma. Essas amostras, entretanto, não permitiram uma análise completa do parênquima pulmonar devido à pequena quantidade de material disponível. Recentemente Tanaka e al descreveram alterações tomográficas com aspecto de “*vidro fosco*”, em pacientes asmáticos durante a exacerbação, sugerindo um comprometimento do parênquima pulmonar periférico [94].

### **1.8 - A autópsia como instrumento de estudo em asma**

Pacientes que morrem por asma constituem um grupo heterogêneo com características distintas quanto a história prévia (tempo e classificação da doença), uso prévio de medicações, tempo decorrido após o início do ataque até o óbito. No entanto, todos eles têm em comum um evento final que culminou com o óbito [95]. Trata-se assim de um grupo de pacientes onde há possibilidade de estudar alterações crônicas associadas ao quadro agudo fatal.

O material obtido de autópsia de pacientes que morrem por asma oferece informações mais completas sobre alterações patológicas pulmonares quando comparadas com material de biópsias endobrônquicas que se restringem ao estudo de poucas camadas superficiais das vias aéreas. O tecido obtido de autópsias permite, assim, o estudo de diferentes segmentos da árvore brônquica, bem como de toda a extensão da parede, inclusive do parênquima pulmonar periférico. Não existem, na literatura mundial, até o momento, trabalhos que enfoquem a participação do parênquima pulmonar na asma fatal.

Diante do que foi exposto questionamos se a inflamação na asma fatal está limitada às vias aéreas ou também acomete de forma significativa as unidades distais do pulmão. Pretendemos, assim, caracterizar o infiltrado inflamatório do parênquima pulmonar periférico dos indivíduos que morreram por asma, comparando-o com o conteúdo inflamatório das vias aéreas e com o tecido pulmonar de controles não asmáticos.



## **2 - OBJETIVOS**

## 2 - OBJETIVOS

- 1- Caracterizar o infiltrado inflamatório presente no parênquima pulmonar e nas vias aéreas em pacientes que morreram por asma e comparar com controles não asmáticos;
- 2- Comparar e correlacionar o infiltrado inflamatório do parênquima pulmonar com o das vias aéreas de grande e de pequeno calibre em pacientes que morreram por asma.

### **3 - PACIENTES E MÉTODOS**

### **3 - PACIENTES E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

#### **3.1 - Obtenção e preparação do material**

Foram estudados fragmentos de tecido pulmonar obtidos de 20 pacientes que morreram por asma, autopsiados no Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVOC) da FMUSP no período de 1996 a 2000. Seis fragmentos de tecido pulmonar de regiões proximais e distais dos pulmões foram coletados por médicos patologistas no momento da autópsia, sendo o material arquivado em blocos de parafina, constituindo um banco de tecidos de asma fatal. Amostras de tecidos de outros órgãos (fígado, baço, rim e miocárdio), obtidas como procedimento de rotina, foram também estudadas.

Os pacientes submetidos a autópsia no SVOC vêm de diferentes hospitais ou de suas casas. Em muitos casos os dados clínicos são ausentes. Um breve questionário é realizado com parentes previamente à autópsia no intuito de obter informações relativas a doenças principais (cardiopatias, diabetes, asma, bronquite), assim como hábitos (alcoolismo, fumo) e tratamentos anteriores.



Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados: 1. História de asma: todos os pacientes incluídos neste estudo eram sabidamente asmáticos e morreram durante uma crise aguda de asma. 2. Alterações patológicas consistentes com asma fatal: todos os pacientes mostraram hipersecreção e hiperinsulflação pulmonar e mostraram alterações histológicas compatíveis com asma (descamação do epitélio, espessamento da membrana basal, hipertrofia de glândulas submucosas, hipertrofia de músculo liso, inflamação da mucosa com ou sem eosinófilos). Critério de exclusão: todos os pacientes cuja análise histológica mostrou sinais de qualquer outra patologia pulmonar não diagnosticada previamente foram excluídos.

Posteriormente ao período de luto, um questionário aplicado aos parentes por assistentes sociais foi realizado para obtenção de informações clínicas adicionais sobre tabagismo, tempo de doença, tratamento da asma, acompanhamento médico, internações anteriores relacionadas à asma e caracterização da crise final (Anexo A: entrevista).

Dez pacientes que morreram de causas não pulmonares, sem doenças pulmonares prévias, não fumantes, foram selecionadas como controles. Nenhum dos pulmões utilizados como controle mostrou sinais de bronquite crônica, enfisema ou pneumonia. Todos os pulmões dos controles apresentavam exame macroscópico e microscópico sem alterações.

Os fragmentos de tecido pulmonar e dos outros tecidos foram fixados em paraformaldeído a 4%, processados rotineiramente e emblocados em parafina. Cortes de 4  $\mu$ m de espessura foram corados pela Hematoxilina

Eosina (HE) para avaliação histológica. Fragmentos pulmonares foram também submetidos a imuno-histoquímica.

### **3.2 - Imuno-histoquímica**

Os cortes foram submetidos à desparafinização em xilol, e hidratação em banhos de álcool absoluto, 95% e 70% por 1 minuto. A fim de inibir a peroxidase endógena foi aplicada solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 volumes, sendo que, para o marcador de eosinófilo foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5% em metanol. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em solução de citrato por 30 minutos para os marcadores dos mastócitos e subtipos de linfócitos ou com pré-tratamento com tripsina a 0,1% para os marcadores de eosinófilos. Marcadores de neutrófilos não sofreram tratamento para recuperação antigênica. Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas com leite desnatado a 2% por 10 minutos. As lâminas foram, então, incubadas com anticorpos primários.

Os seguintes tipos celulares foram identificados utilizando-se anticorpos específicos: Linfócitos T CD3+ (anti-CD3, “rabbit anti-human T cell CD3”, PC3/188 A; DAKO, Glostrup, Dinamarca); Linfócito T CD8 + (anti-CD8, “monoclonal mouse anti-human CD8”, T cell; DAKO, Glostrup Dinamarca); Linfócito T CD4+ (anti-CD4, “monoclonal mouse anti-human CD4”, clone OPD4; DAKO, Glostrup, Dinamarca); Linfócito B (anti-CD20, “monoclonal mouse anti-human CD20 B-cell”, L26; DAKO, Carpinteria, CA, E.U.A.); Neutrófilos (anti-elastase neutrofilica, “monoclonal mouse anti-human

neutrophil elastase”; DAKO, Glostrup, Dinamarca), Eosinófilos (anti-proteína básica principal, “anti-human eosinophil Major Basic Protein/MBP”, BMK13; RDI, Flanders, NJ, E.U.A.) e Mastócitos (anti-triptase, “monoclonal mouse anti-human mast cell”, AA1; DAKO, Glostrup, Dinamarca).

Após aplicação dos Anticorpos, os cortes foram incubados por 24 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavados com PBS (“Phosphate Buffered Saline”) por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem, e o anticorpo secundário foi aplicado por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, foi aplicado o complexo Estreptovidina-Biotina (kit LSAB<sup>®</sup> Plus HRP; DAKO, Carpinteria, CA, E.U.A.) permanecendo por 60 minutos. As lâminas foram reveladas com o cromógeno DAB (diaminobenzidina, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, E.U.A.) e contra-coradas com hematoxilina de Harris. Para a marcação do eosinófilo foi necessária a utilização de um sistema de amplificação de sinal (“Catalyzed Signal Amplification – CSA – System”, Peroxidase; DAKO, Carpinteria, CA, E.U.A.).

### **3.3 - Estudo morfométrico**

Através da análise morfométrica, as diferentes células foram quantificadas no tecido alveolar. Foram analisados em cada caso, com aumento de 400x, 10 campos nas áreas de acoplamento alveolar e 10 campos ao longo do parênquima distal. Os acoplamentos alveolares foram definidos como os septos alveolares que se estendem radialmente a partir da parede das pequenas vias aéreas ( $\leq 2,0$  mm de perímetro) [96].

O parênquima distal foi definido como aquele distando pelo menos 1 campo (aumento de 100x) da parede das pequenas vias aéreas. Utilizando-se um retículo de 100 pontos de área conhecida ( $62.500 \mu\text{m}^2$  no aumento de 400x), acoplado à ocular do microscópio, foram computados em cada campo o número de células inflamatórias e o número de pontos que incidiam no septo alveolar (Figura 5). O número de pontos que incidiam no parênquima pulmonar era proporcional à área do retículo ocupada pelo tecido. Assim, foi possível calcular a área de tecido alveolar estudada em cada campo através da fórmula:

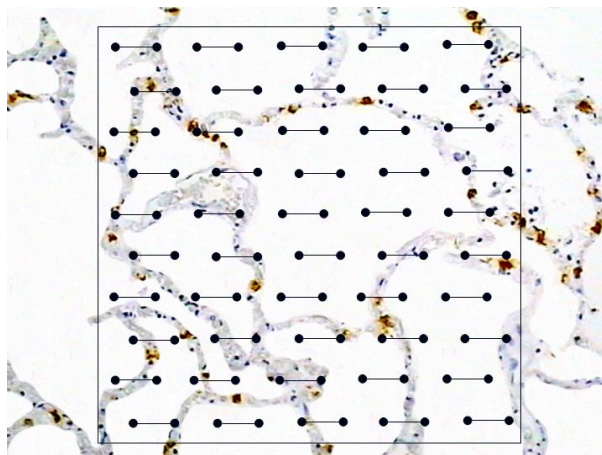
$$\text{Área} = \text{Ptos} \times 62.500/100 \quad (1)$$

onde Ptos correspondeu ao número de pontos incidentes no tecido alveolar por campo.

Através desse estudo morfométrico, foi calculada a densidade de células inflamatórias (D.infl.) a partir da fórmula:

$$\text{D.infl.} = \text{N}^{\circ}\text{cel} / \text{Área} \quad (2)$$

onde  $\text{N}^{\circ}\text{cel}$  correspondeu ao número de células inflamatórias no tecido por campo. Para cada caso foi calculada a média de D.infl. entre os dez campos analisados [97,98]. Os resultados foram obtidos como células/ $\mu\text{m}^2$  e, após ajuste das unidades, expressos como células/ $\text{mm}^2$ .



**FIGURA 5** - Um retículo de 100 pontos colocado sobre o tecido pulmonar. A área total do retículo é previamente conhecida ( $62.500 \mu\text{m}^2$ ). O número de pontos que incidem sobre o tecido analisado é proporcional à área que este ocupa no retículo

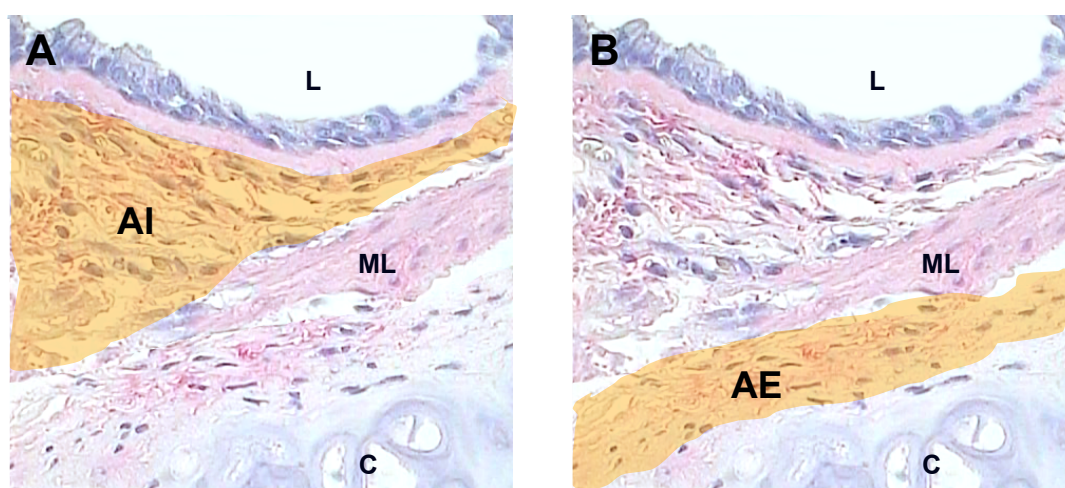
### 3.4 - Análise de imagem

A quantificação do infiltrado inflamatório das vias aéreas foi realizada com uso de um Sistema de Análise de Imagens, constituído pelo “software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows®” (“Media Cybernetics - Silver Spring”, MD, E.U.A.), instalado em um microcomputador PC, conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 “Color Video Camera”, Victor Company of Japan Limited, Japão), acoplada a um microscópio óptico (“Leica DMR”, “Leica Microsystems”, Wetzlar GmbH, Alemanha).

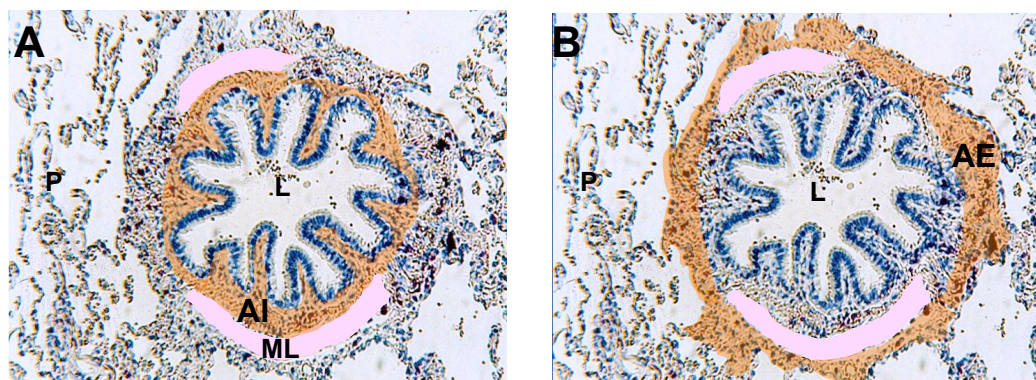
O método consistiu na contagem das diferentes células inflamatórias em uma área de interesse localizada em duas regiões específicas da parede das vias aéreas: 1) área interna, localizada entre a membrana basal e a borda interna da musculatura lisa, e 2) área externa, localizada entre a borda externa da musculatura lisa e a cartilagem, glândulas ou alvéolos (Figuras 6 e 7). Em cada caso, foram medidos, nas áreas de interesse, 10 campos com

aumento de 400x em grandes vias aéreas (perímetro >2 mm)) e toda a circunferência de duas vias aéreas pequenas (perímetro  $\leq$  2mm). A escolha desse valor de perímetro foi baseada em estudos prévios que abordaram alterações estruturais na asma [63,65,67]. Perímetro interno menor que 2 mm define um grupo bem específico de vias aéreas: os pequenos bronquíolos membranosos (terminais). As vias aéreas maiores que 2 mm, por sua vez, incluem os bronquíolos membranosos maiores e os brônquios subsegmentares, segmentares e lobares. Assim como para as medidas de densidade inflamatória no tecido alveolar, os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cels/mm<sup>2</sup>).

Assim, foram estudadas 6 regiões pulmonares em cada paciente: área interna de via aérea de grande calibre (IG), área externa de via aérea de grande calibre (EG), área interna de via aérea de pequeno calibre (IP), área externa de via aérea de pequeno calibre (EP), parênquima peribronquiolar (PBq) e parênquima distal (PD).



**FIGURA 6** – Representação de uma via aérea de grande calibre mostrando, no painel A, a delimitação da área interna (AI) e, no painel B, a da área externa (AE). ML = músculo liso; L = luz; C = cartilagem



**FIGURA 7** - Representação de uma via aérea de pequeno calibre mostrando, no painel A, a delimitação da área interna (AI) e, no painel B, a da área externa (AE). ML = músculo liso; L = luz; P = parênquima

O presente trabalho deu continuidade à tese de Doutorado do Dr. Mario Adriano dos Santos, desenvolvida no Departamento de Patologia da FMUSP, que caracterizou a densidade de mastócitos, eosinófilos e neutrófilos nas vias aéreas superiores (mucosa nasal e traquéia) e nas diferentes camadas das vias aéreas de grande e pequeno calibre de pacientes com asma fatal autopsiados no SVOC no período de 1998 a 2000 [99]. Os dados quantitativos referentes à inflamação das vias aéreas de alguns desses casos foram aqui utilizados.

### 3.5 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas SPSS® 10 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA) e “Graphpad Prism® 3 for Machintosh” (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar resultados entre asmáticos e controles. Comparações das densidades celulares entre as diversas regiões

foram feitas através da “análise de variância para medidas repetidas de Friedman” com “pós-teste de Dunnett” e Correlação de Spearman. Teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras dependentes foi utilizado para comparação entre a densidade de neutrófilos e de eosinófilos em cada região de pacientes asmáticos. Os resultados foram expressos em medianas e limites superiores e inferiores.

Teste T para amostras independentes foi utilizado para comparar o perímetro das vias aéreas estudadas entre asmáticos e controles, sendo os resultados expressos em médias e desvios padrão.

Teste T com correção de Welch foi utilizado para comparar subgrupos dos pacientes asmáticos quanto ao uso de medicações e tabagismo. Idade e tempo de doença e da crise foram correlacionadas com as densidades celulares através da Correlação de Spearman.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos para todas as análises estatísticas.





## **4 - RESULTADOS**



## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Caracterização dos Pacientes

De acordo com os critérios estabelecidos previamente, foram coletados fragmentos de pulmões de 23 pacientes que morreram por asma. Desses, três foram excluídos por apresentarem doenças pulmonares associadas (dois casos de tuberculose e um caso de comprometimento pulmonar secundário a septicemia). O tempo máximo ocorrido entre o óbito e a realização da autópsia foi menor que 24 horas, não se observando sinais de autólise tecidual.

A Tabela 1 apresenta os dados clínicos dos pacientes asmáticos. A idade dos pacientes variou de 15 a 67 anos (mediana de 39 anos), sendo 11 do sexo feminino. Todos os pacientes residiam na grande São Paulo. Dos vinte pacientes estudados, cinco tinham história de tabagismo. A grande maioria apresentava uma asma de longa duração: quinze indivíduos haviam iniciado sintomas na infância ou adolescência e apenas cinco na idade adulta. Sete pacientes (menos de 50%) tiveram acompanhamento médico regular pela doença e apenas quatro fizeram uso de corticosteróides. Destes, dois recebiam corticóides orais somente nas crises, um dos quais utilizava também medicação inalatória (Beclometasona) regularmente. Os outros dois pacientes faziam uso diário de Beclometasona, sendo um deles usuário contínuo de corticóide oral associado. Agonista  $\beta_2$  nas crises era a

única droga utilizada por todos pacientes, sem exceção. Em dez pacientes, familiares referiram uso associado de aminofilina. A grande maioria dos pacientes (14) vinha com descompensação da asma alguns dias antes do óbito: seis evoluíram com sintomas em menos de 24 horas antecedendo o óbito, e destes, quatro se enquadraram em casos de morte súbita por asma (pacientes de nº 5, 7, 17 e 20 da Tabela 1). Dos vinte pacientes, apenas dois conseguiram chegar no hospital com vida, porém faleceram logo em seguida sem responderem às manobras de reanimação. O restante faleceu em casa ou a caminho do hospital. Outras doenças relatadas pelos familiares foram hipertensão arterial sistêmica em três pacientes (pacientes de nº 2, 7 e 10) e diabetes em um paciente (paciente nº 15).

A Tabela 2 mostra os dados clínicos e causa de óbito dos pacientes controles. A idade variou de 20 a 74 anos (mediana de 50 anos), sendo 8 do sexo feminino. Nenhum dos pacientes utilizados como controle tinha história de tabagismo.

Não houve diferença significativa quanto à idade entre os pacientes asmáticos e controles ( $p=0,095$ ). Nos dois grupos estudados houve predominância do sexo feminino.

TABELA 1 – História clínica dos pacientes asmáticos

Paciente	Idade (Anos)	Gênero	Corticóide oral ou inalatório *	Tabagismo	Internações prévias por asma	Duas ou mais categorias de drogas **	Acompanhamento médico	Duração da asma (anos)	Duração da crise (horas)
1	19	M	N	S	S	S	N	Desde a infância	>24
2	49	F	N	N	S	N	S	Desde a infância	>24
3	46	M	N	S	N	S	N	4	>24
4	47	M	N	S	N	N	N	6	>24
5	31	F	N	N	N	N	S	Desde a infância	1
6	40	M	N	S	N	S	N	30	>24

continua

TABELA 1 – História clínica dos pacientes asmáticos (continuação)

Paciente	Idade (Anos)	Gênero	Corticóide oral ou inalatório *	Tabagismo	Internações prévias por asma	Duas ou mais categorias de drogas **	Acompanha-mento médico	Duração da asma (anos)	Duração da crise (horas)
7	52	M	S	N	S	S	S	35	2
8	36	M	N	S	...	S	N	16	>24
9	23	F	N	N	S	S	N	Desde a infância	>24
10	63	F	N	N	N	S	S	25	>24
11	68	F	N	N	S	S	N	15	24
12	38	F	S	N	S	S	S	25	>24
13	38	F	N	N	N	S	N	26	6

continua

TABELA 1 – História clínica dos pacientes asmáticos (conclusão)

Paciente	Idade (anos)	Gênero	Corticóide oral ou inalatório *	Tabagismo	Internações prévias por asma	Duas ou mais categorias de drogas **	Acompanhamento médico	Duração da asma (anos)	Duração da crise (horas)
14	57	M	S	N	S	S	S	17	>24
15	67	M	N	N	S	S	N	2	>24
16	20	M	N	N	N	N	N	19	>24
17	11	F	S	N	S	S	S	7	1,5
18	15	F	N	N	N	N	N	12	>24
19	48	F	N	N	N	N	N	Desde a infância	4
20	22	F	N	N	N	N	N	2	2

M = masculino; F = feminino; S = sim; N = não

\* uso de corticóide irregular ou contínuo

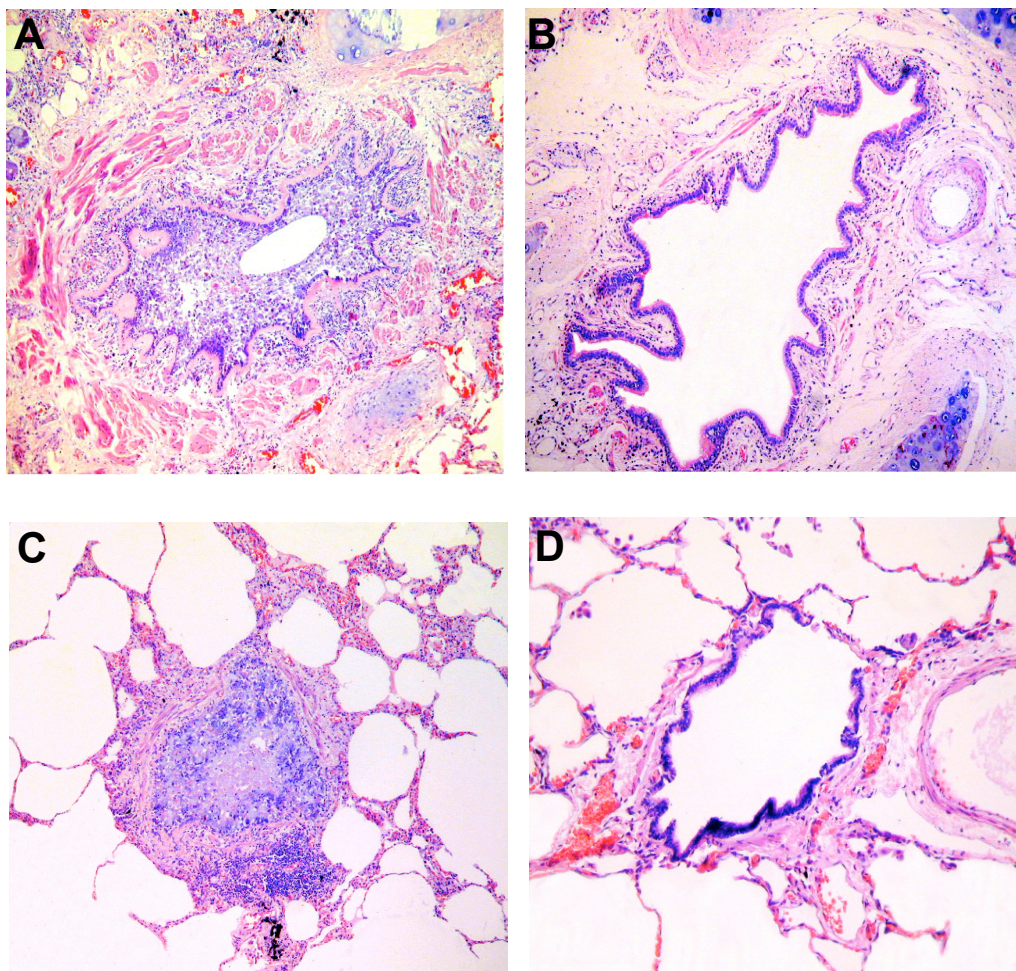
\*\* categorias de drogas =  $\beta$ 2-agonistas, xantinas, anti-leucotrienos, anti-colinérgicos

**TABELA 2** - Características clínicas dos pacientes controles

<b>IDADE</b> <b>(anos)</b>	<b>GÊNERO</b>	<b>TABAGISMO</b>	<b>CAUSA DO ÓBITO</b>
46	F	N	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
28	F	N	Choque Hipovolêmico
43	M	N	Indeterminada
74	F	N	Infarto Agudo do Miocárdio
42	F	N	Infarto Agudo do Miocárdio
53	F	N	Infarto Agudo do Miocárdio
71	M	N	Infarto Agudo do Miocárdio
62	F	N	Infarto Agudo do Miocárdio
57	M	N	Infarto Agudo do Miocárdio
47	F	N	Valvulopatia Mitral

F = feminino, M = masculino; N = não

Todos pacientes asmáticos estudados apresentaram quadro histológico compatível com asma fatal. Todos pacientes do grupo controle apresentaram pulmões histologicamente preservados. A figura 8 ilustra o aspecto histológico observado nos dois grupos.



**FIGURA 8** - Aspecto histológico das vias aéreas grandes e pequenas observado nos pulmões de pacientes asmáticos (A e C, respectivamente) e de pacientes não-asmáticos (B e D, respectivamente). As vias aéreas normais mostram luz patente, epitélio íntegro, camada muscular delicada e ausência de infiltrado inflamatório. As vias aéreas dos pacientes asmáticos mostram obstrução da luz por muco e descamação epitelial, espessamento da membrana basal, hipertrofia muscular e infiltrado inflamatório. Note que na via aérea pequena o infiltrado inflamatório se estende para o parênquima pulmonar adjacente. HE, A e B: 100x, C e D: 200x



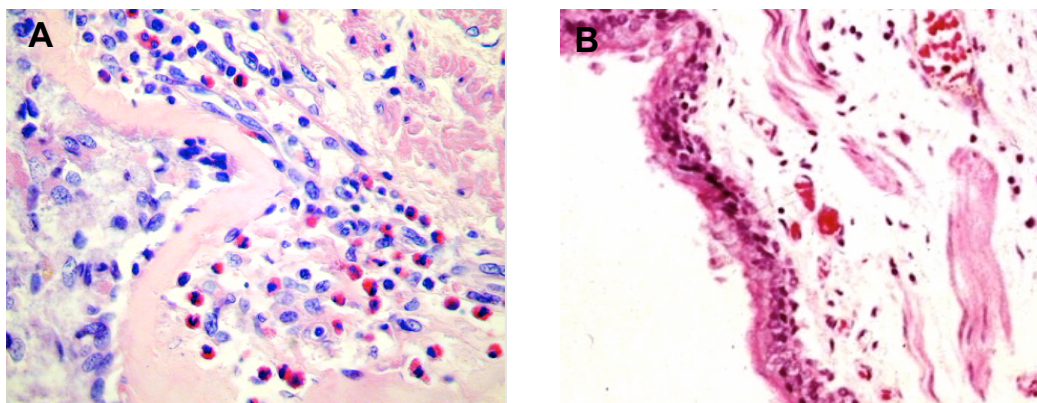
## 4.2 - Densidade Inflamatória

A densidade de cada tipo celular nos diversos compartimentos estudados em asmáticos e controles está apresentada nos anexos B.

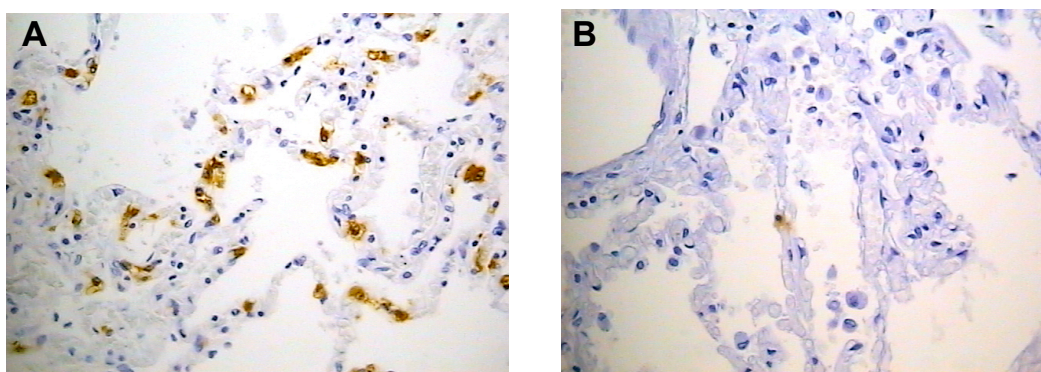
Foram medidas 1 a 3 vias aéreas grandes e 1 a 4 vias aéreas pequenas para cada célula em cada paciente, resultando num total de 228 vias aéreas grandes e 315 vias aéreas pequenas. O perímetro médio das vias aéreas de grande calibre foi 5,36 mm (2,1 a 9,2 mm) e 5,67 mm (2,2 a 9,9 mm) nos pacientes asmáticos e controles respectivamente. As vias aéreas pequenas tiveram um perímetro médio de 1,3 mm (0,31 a 2,0 mm) e 1,2 mm (0,3 a 1,9 mm) respectivamente em pacientes asmáticos e controles. Não foi observada diferença significativa no perímetro das vias aéreas entre os grupos.

### 4.2.1 - Eosinófilos

A densidade de eosinófilos foi significativamente maior em todas as regiões das vias aéreas e do parênquima pulmonar de asmáticos comparados aos controles ( $p < 0,02$ ) (Gráfico 1A). As figuras 9 e 10 mostram o infiltrado eosinofílico na parede da via aérea e no parênquima distal no asmático e no controle.



**FIGURA 9** - Corte histológico de via aérea grande mostrando infiltrado eosinofílico em paciente asmático (A), não observado no pulmão controle (B). HE, 400x



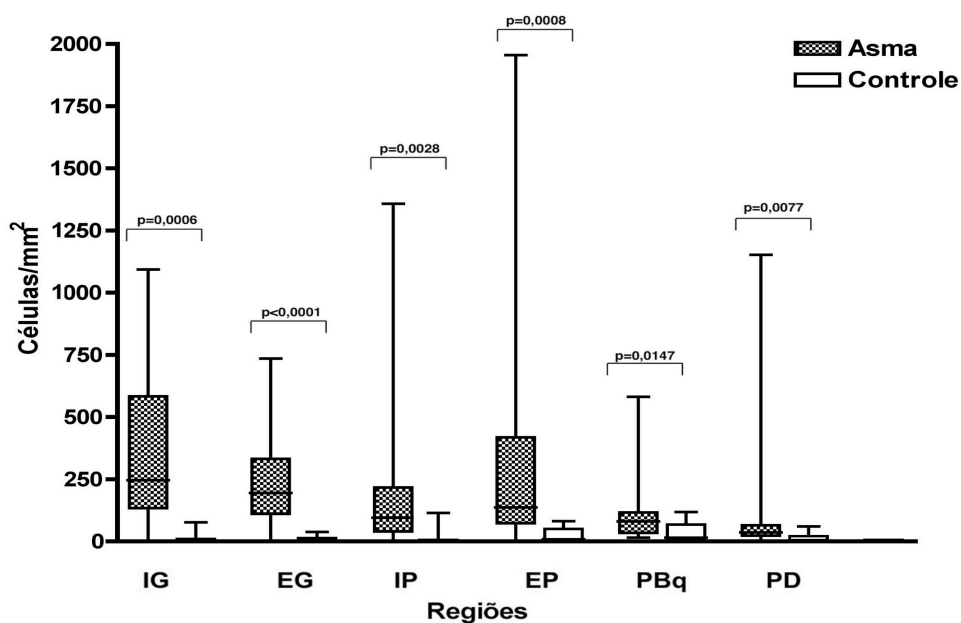
**FIGURA 10** - Corte histológico de parênquima distal mostrando denso infiltrado eosinofílico em paciente asmático (A). Presença de raros eosinófilos no pulmão controle (B). Imuno-histoquímica, anti-Proteína Básica Principal, 400x

A densidade eosinofílica na asma fatal nas duas regiões do parênquima se mostrou menor do que a das vias aéreas, porém somente encontramos diferença significativa entre a área interna da via aérea grande e o parênquima distal ( $p < 0,01$ ). Não foram observadas diferenças significativas na densidade de eosinófilos entre vias aéreas centrais e periféricas (Gráfico 1B). Apesar da densidade de eosinófilos ser maior em asmáticos que

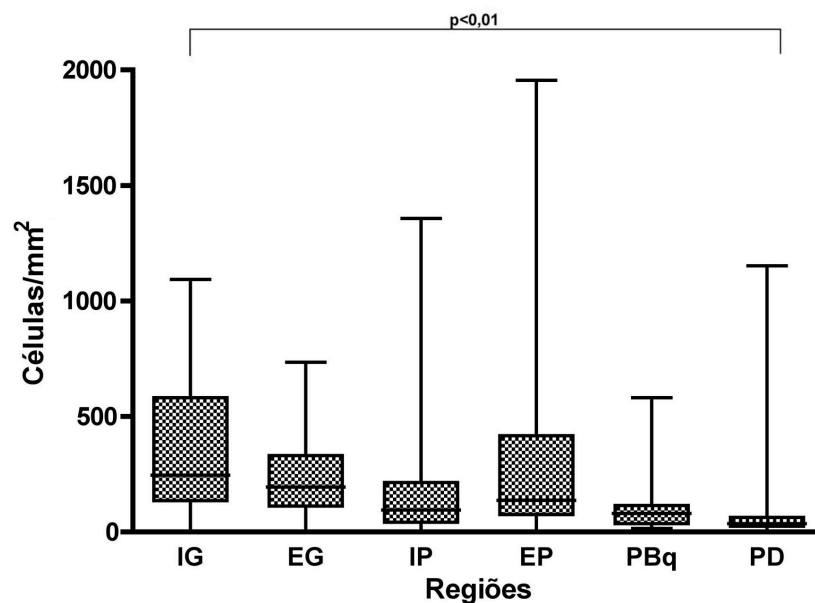
controles em todas as regiões estudadas, a distribuição do infiltrado eosinofílico nos pacientes asmáticos se mostrou bastante heterogênea. Observamos uma grande variabilidade na densidade de eosinófilos nos diferentes compartimentos num mesmo indivíduo e também entre os diversos pacientes. O Gráfico 1C exemplifica a distribuição eosinofílica em três pacientes asmáticos.

Não foram observadas diferenças significativas entre as diversas regiões estudadas nos controles (Gráfico 1D).

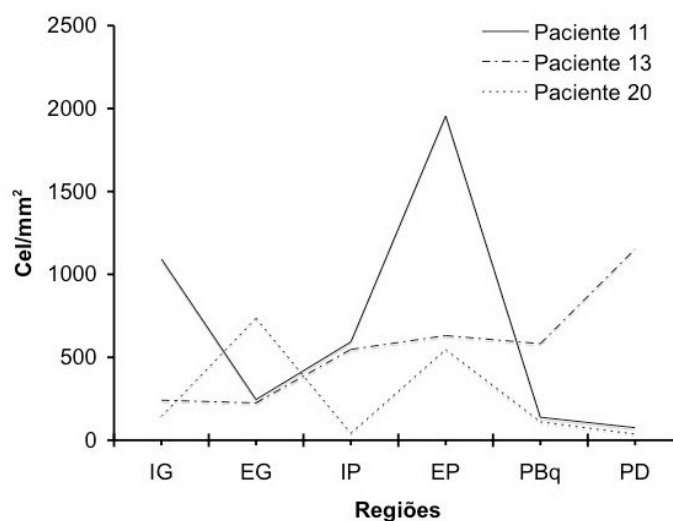
**GRÁFICO 1 A - DENSIDADE DE EOSINÓFILOS**



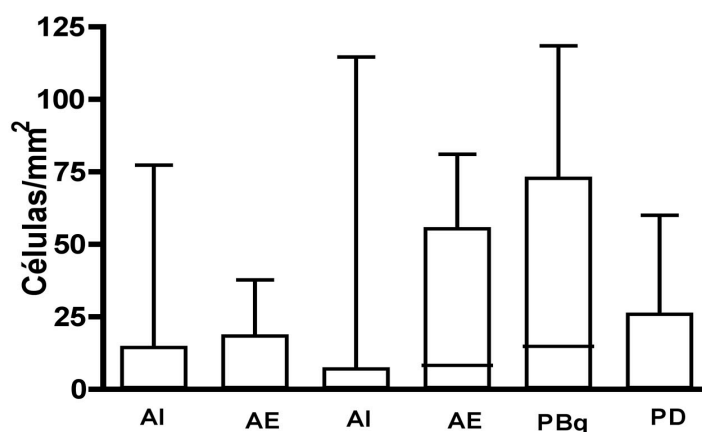
NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**GRÁFICO 1 B - DENSIDADE DE EOSINÓFILOS EM ASMÁTICOS**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**GRÁFICO 1 C - DENSIDADE DE EOSINÓFILOS EM 3 PACIENTES ASMÁTICOS**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal. Pacientes nº 11, 13 e 20 da Tabela 1.

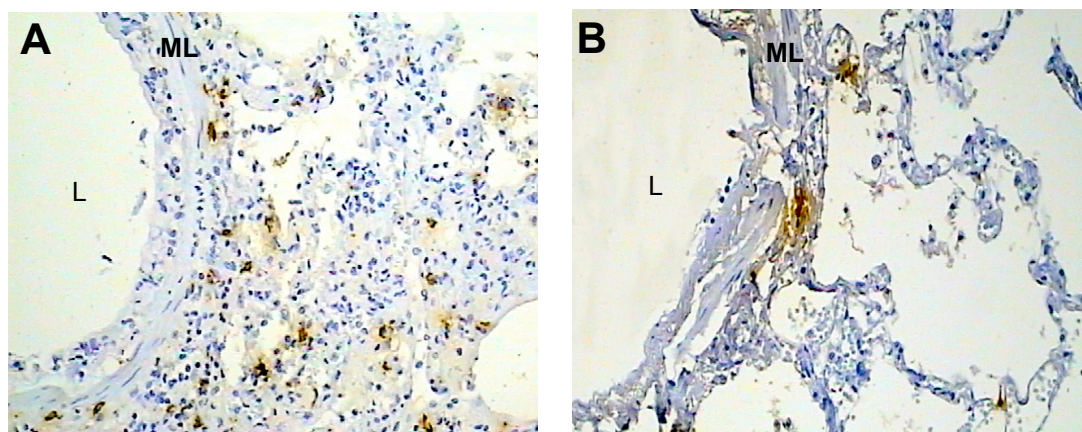
**GRÁFICO 1 D - DENSIDADE DE EOSINÓFILOS NOS CONTROLES**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

#### 4.2.3 - Mastócitos

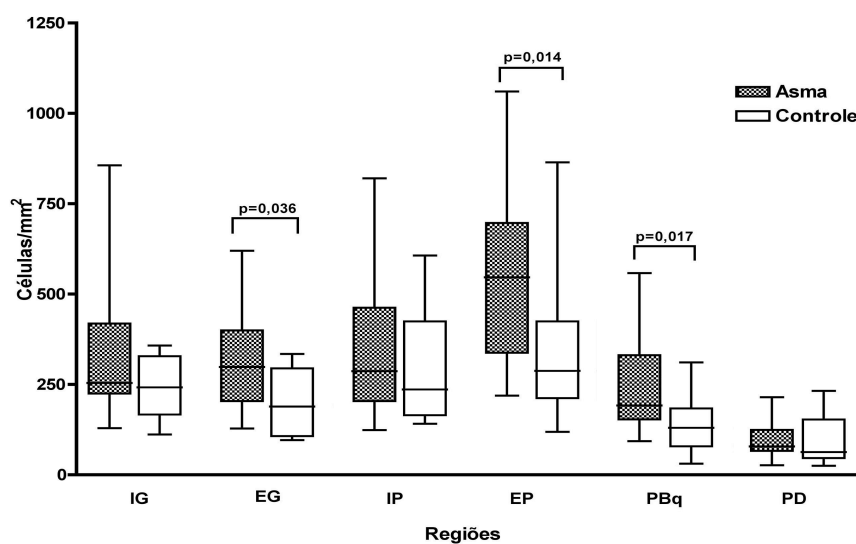
A densidade de mastócitos foi significativamente maior no parênquima peribronquiolar ( $p=0,017$ ) e nas áreas externas de grandes e pequenas vias aéreas dos asmáticos comparados aos controles ( $p=0,036$  e  $p=0,014$  respectivamente) (Gráfico 2A). A figura 11 mostra o infiltrado mastocitário na área externa da via aérea pequena e no parênquima peribronquiolar adjacente no paciente asmático e no controle. A área externa da via aérea pequena dos casos de asma fatal foi a região mais rica em mastócitos, sendo a densidade celular significativamente maior quando comparada à área externa de grandes vias aéreas ( $p<0,01$ ) e às duas regiões do parênquima pulmonar periférico ( $p<0,001$ ). Observou-se também um número significativamente menor de mastócitos no parênquima distal ( $p<0,01$ ) de asmáticos em relação às quatro regiões das vias aéreas (Gráfico 2B). De forma semelhante aos asmáticos, a menor densidade de mastócitos nos

controles foi observada no parênquima distal, sendo significativamente menor quando comparada à área interna de via aérea de grande calibre e às duas regiões da via aérea pequena ( $p < 0,01$ ) (Gráfico 2C).



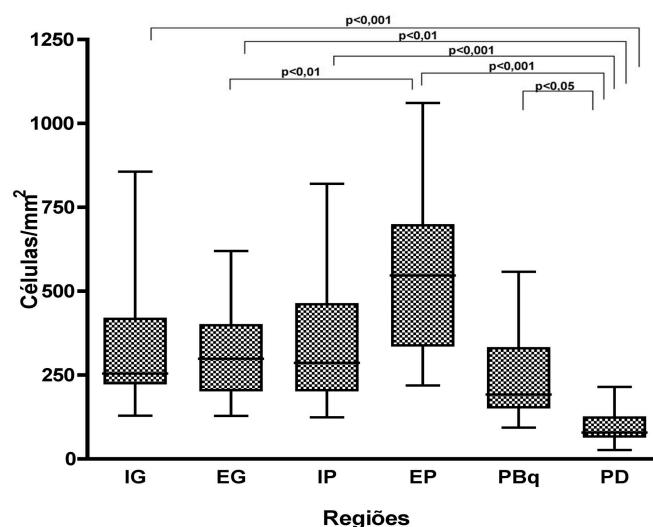
**FIGURA 11** - Corte histológico da via aérea pequena e do parênquima peribronquiolar adjacente, mostrando denso infiltrado mastocitário em paciente asmático (A). ML = músculo liso; L = luz da via aérea. Presença de raros mastócitos no pulmão controle (B). Imuno-histoquímica, anti-triptase, 200x

### GRÁFICO 2 A - DENSIDADE DE MASTÓCITOS



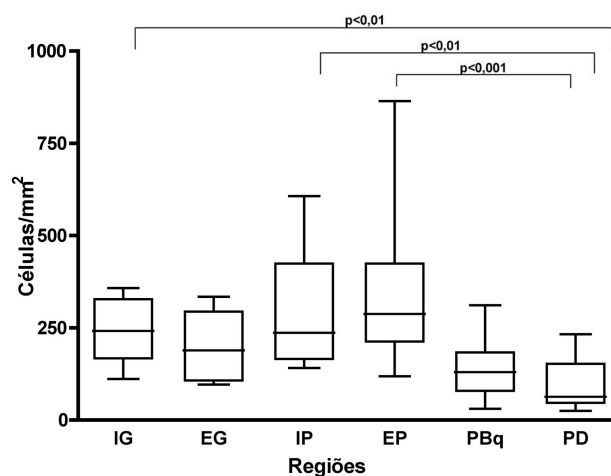
NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

## GRÁFICO 2 B - DENSIDADE DE MASTÓCITOS EM ASMÁTICOS



NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

## GRÁFICO 2 C - DENSIDADE DE MASTÓCITOS EM CONTROLES



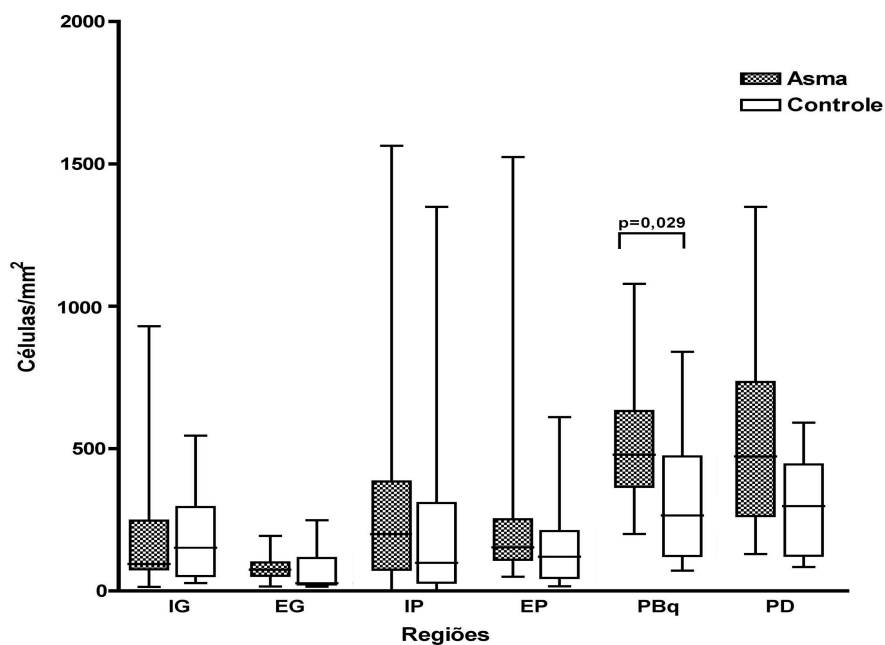
NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

#### 4.2.2 - Neutrófilos

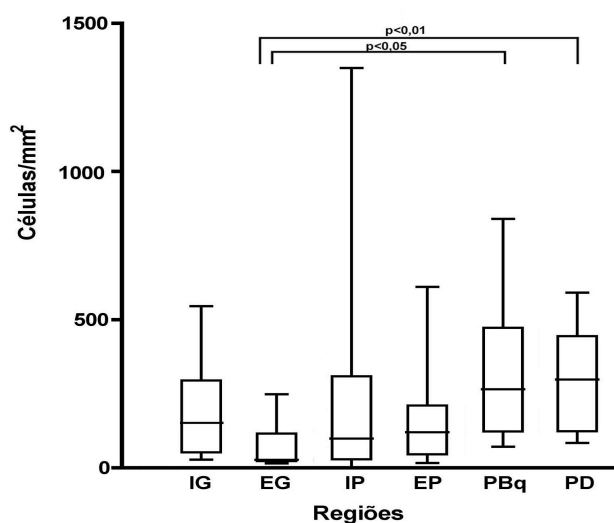
De todas as regiões estudadas, somente o parênquima peribronquiolar dos asmáticos mostrou aumento significativo da densidade de neutrófilos em relação aos controles ( $p=0,029$ ) (Gráfico 3A). As duas regiões de parênquima pulmonar exibiram uma densidade significativamente maior de neutrófilos quando comparado com vias aéreas grandes e área interna de vias aéreas pequenas ( $p<0,05$ ). Este resultado foi observado tanto em asmáticos como nos controles, sendo que nos controles a diferença ocorreu entre as duas regiões do parênquima e a área externa de vias aéreas grandes (Gráficos 3B e 3C).

Os pacientes com morte súbita por asma não apresentaram um número significativamente diferente de neutrófilos quando comparado ao de eosinófilos em nenhum dos compartimentos pulmonares analisados. Nos pacientes que evoluíram para óbito mais tardiamente após o início da crise, a densidade de eosinófilos foi significativamente maior que a de neutrófilos somente na área externa das vias aéreas grandes ( $p=0,002$ ). Quando comparamos a densidade de neutrófilos e de eosinófilos entre os pacientes com morte súbita e os demais asmáticos, não foi evidenciada diferença estatística.



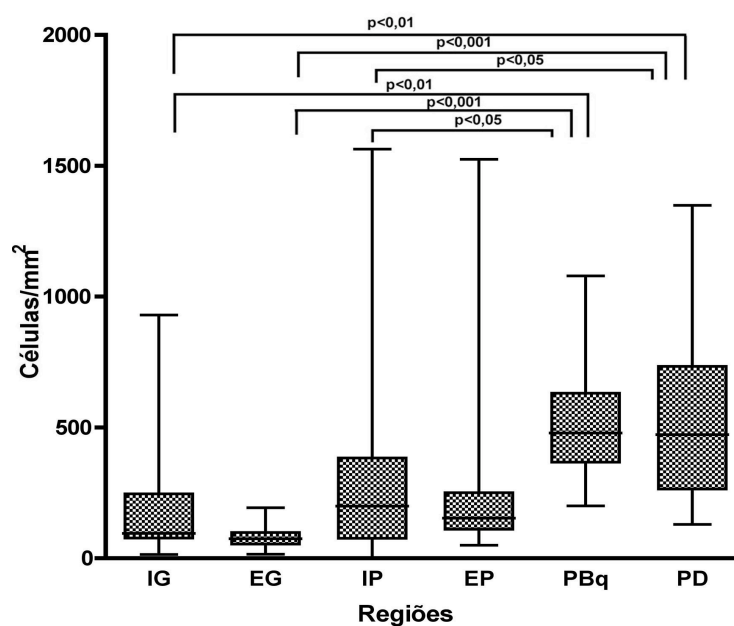
**GRÁFICO 3 A - DENSIDADE DE NEUTRÓFILOS**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**GRÁFICO 3 B - DENSIDADE DE NEUTRÓFILOS EM CONTROLES**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

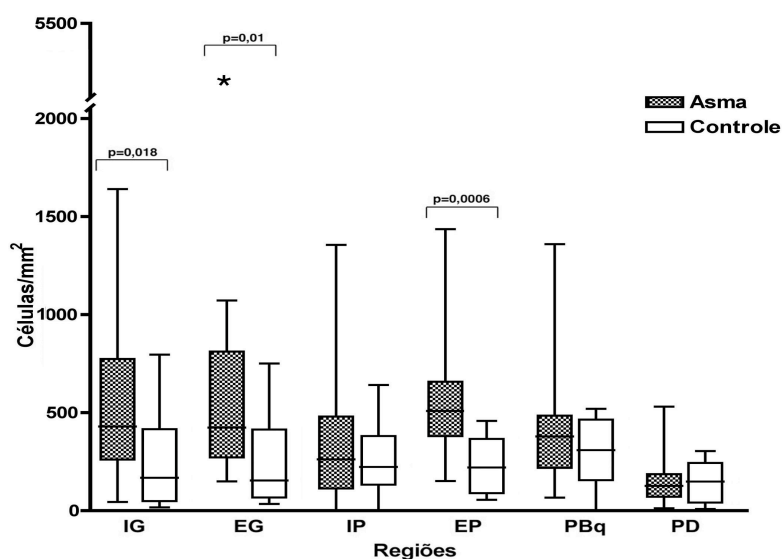
### GRÁFICO 3 C - DENSIDADE DE NEÚTRÓFILOS EM ASMÁTICOS



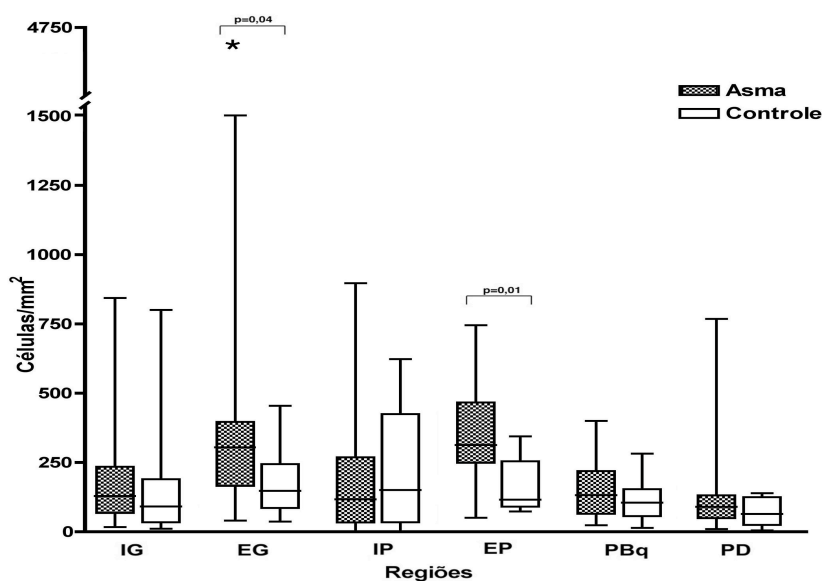
NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

#### 4.2.4 - Linfócitos

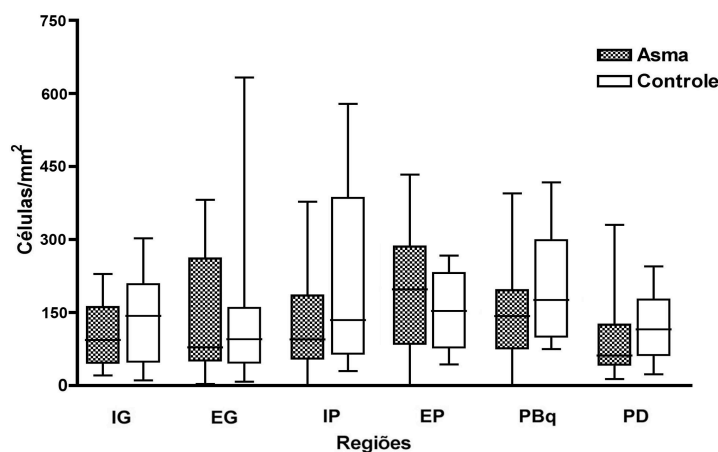
Os Gráficos 4A a 4D mostram a densidade de linfócitos em pacientes asmáticos e controles. Ao se comparar a densidade de linfócitos entre os dois grupos, foi observada uma maior quantidade de células CD3+ (Gráfico 4A) e CD20+ (Gráfico 4D) nas áreas interna e externa das vias aéreas grandes ( $p < 0,02$ ) e na área externa da via aérea pequena dos asmáticos ( $p < 0,009$ ). Somente a área externa das vias aéreas grandes e pequenas revelou maior densidade de linfócitos T CD4+ na asma fatal quando comparado aos controles ( $p = 0,045$  e  $p = 0,01$ , respectivamente) (Gráfico 4B). Não houve diferença significativa entre os grupos na densidade de linfócitos T CD8+ (Gráfico 4C).

**GRÁFICO 4 A - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD3+**

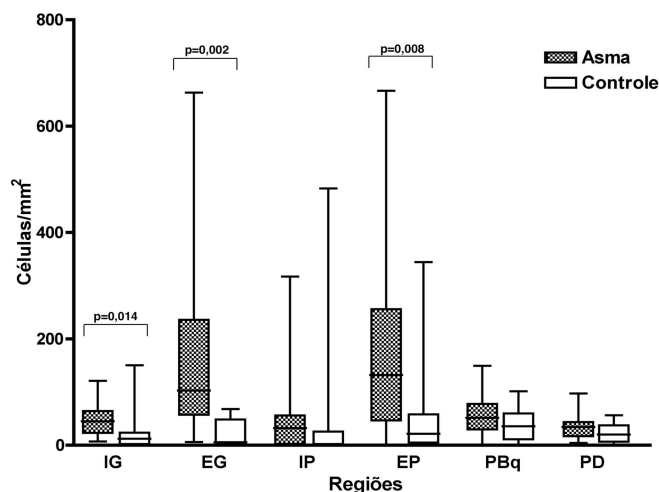
NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal. \* = limite superior de densidade em EG de paciente asmático.

**GRÁFICO 4 B - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD4 +**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal. \* = limite superior de densidade em EG de paciente asmático.

**GRÁFICO 4 C - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD8+**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**GRÁFICO 4 D - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD20+**

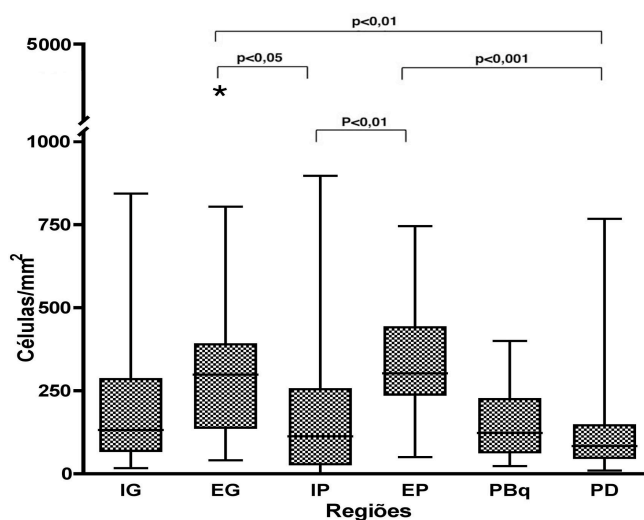
NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

Comparando-se a densidade de linfócitos nas duas regiões do parênquima com as diferentes camadas das vias aéreas nos indivíduos asmáticos, observamos diferenças na densidade de linfócitos apenas no parênquima distal. Notamos uma diminuição significativa da densidade de

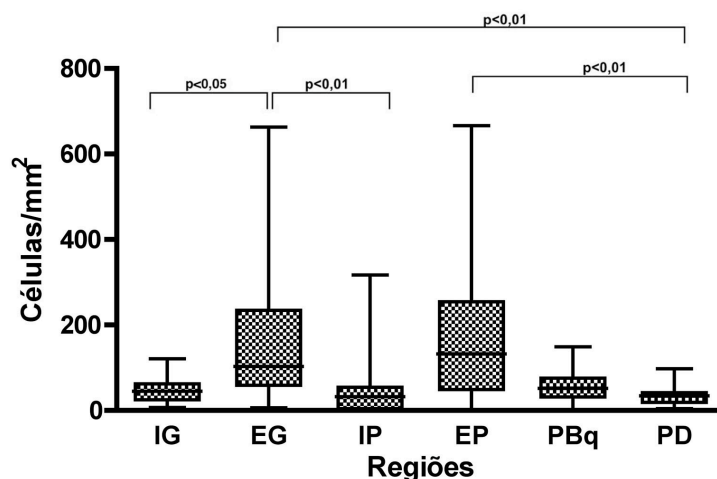
linfócitos CD4+( $p<0,01$ ) e CD20+ ( $p<0,01$ ) no parênquima distal em relação à área externa das vias aéreas grandes e pequenas. A densidade de linfócitos CD3+ no parênquima distal foi menor quando comparada às duas regiões das vias aéreas grandes e à área externa da via aérea pequena ( $p<0,001$ ). Observou-se ainda uma menor densidade de linfócitos CD8+ no parênquima distal comparado à área externa da via aérea pequena ( $p<0,05$ ) (Gráficos 5A a 5 D).

Pacientes controles não apresentaram diferenças significativas na densidade de linfócitos nas diferentes regiões estudadas, exceto na densidade de linfócito T CD4+, que mostrou diminuição significativa no parênquima distal quando comparado à área externa das vias aéreas grandes ( $p<0,01$ ).

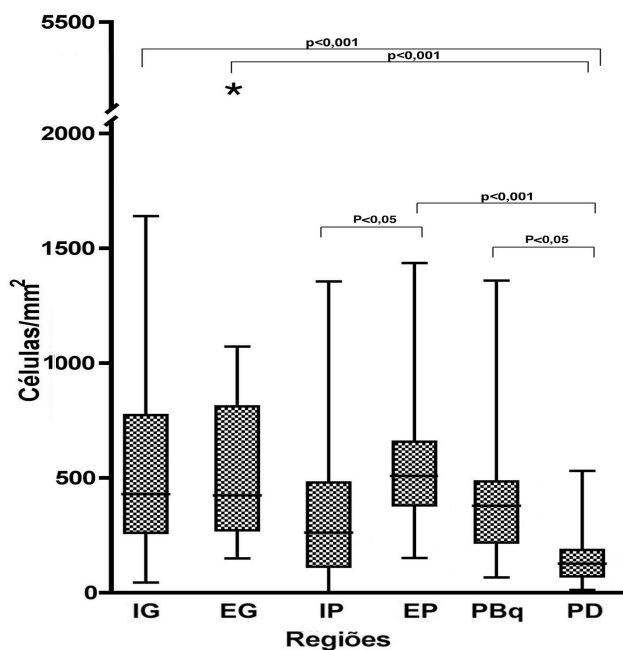
### GRÁFICO 5 A - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD4+ EM ASMÁTICOS



NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal. \* = limite superior de densidade em EG de paciente asmático.

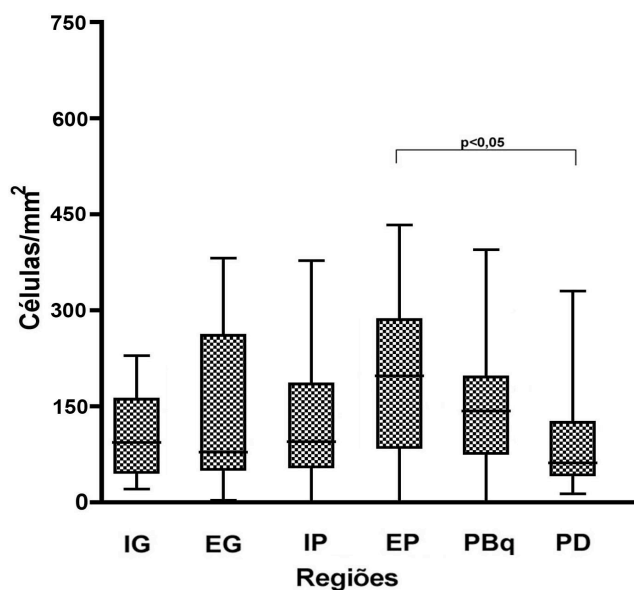
**GRÁFICO 5 B - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD20+ EM ASMÁTICOS**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**GRÁFICO 5 C - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD3+ EM ASMÁTICOS**

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal. \* = limite superior de densidade em EG de paciente asmático.

### GRÁFICO 5 D - DENSIDADE DE LINFÓCITOS CD8+ EM ASMÁTICOS



NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

#### 4.2.5 - Correlações

Nos pacientes com asma fatal, não foram observadas fortes correlações na densidade dos diversos tipos celulares entre os diferentes compartimentos pulmonares estudados. Com exceção dos neutrófilos, todas células inflamatórias estudadas apresentaram correlações significativas marginais entre regiões vizinhas (área interna e externa das vias aéreas ou parênquima peribronquiolar e distal), conforme apresentado nas tabelas 3 a 9. Correlações significativas entre vias aéreas de grande e pequeno calibre ocorreram para neutrófilos, mastócitos, linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+. Correlação significativa entre área interna de via aérea grande e

parênquima distal foi evidenciada apenas para o linfócito T CD8+. Não se observou correlações significativas entre os diferentes tipos celulares estudados.

As características clínicas que foram correlacionadas com a densidade de células (idade, tempo de doença e duração da crise fatal) não mostraram resultados significativos nos pacientes asmáticos.

Não foi evidenciada diferença na densidade celular entre os pacientes que usavam corticóide (n= 5) e os que não faziam uso dessa medicação. Foi observada uma diminuição do infiltrado neutrofílico ( $p=0,005$ ) e mastocitário ( $p=0,03$ ) no parênquima distal, bem como um aumento da densidade de linfócitos CD4+ e CD20+ ( $p=0,04$  e  $p=0,002$ , respectivamente) na área externa de vias aéreas pequenas em asmáticos fumantes comparados a não fumantes (Tabela 10).



**TABELA 3** - Correlação de Spearman para neutrófilos em asmáticos

<b>EG</b>	r	0,35				
	p	0,123				
<b>IP</b>	r	0,55	0,45			
	p	0,010*	0,043*			
<b>EP</b>	r	0,20	0,57	0,29		
	p	0,376	0,008*	0,206		
<b>PBq</b>	r	0,31	0,35	0,27	0,22	
	p	0,184	0,121	0,242	0,346	
<b>PD</b>	r	0,21	0,48	0,22	0,40	0,64
	p	0,373	0,031*	0,348	0,078	0,002*
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 4** - Correlação de Spearman para mastócitos em asmáticos

<b>EG</b>	r	0,37				
	p	0,101				
<b>IP</b>	r	0,57	0,35			
	p	0,008*	0,128			
<b>EP</b>	r	0,37	0,66	0,49		
	p	0,101	0,002*	0,027*		
<b>PBq</b>	r	0,34	0,23	0,13	0,24	
	p	0,136	0,327	0,576	0,297	
<b>PD</b>	r	0,20	0,37	0,32	0,22	0,006
	p	0,389	0,101	0,168	0,349	0,981
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 5** - Correlação de Spearman para eosinófilos em asmáticos

<b>EG</b>	r	0,66				
	p	0,001*				
<b>IP</b>	r	-0,01	-0,10			
	p	0,972	0,681			
<b>EP</b>	r	0,10	0,34	0,64		
	p	0,672	0,140	0,002*		
<b>PBq</b>	r	-0,10	0,10	0,39	0,40	
	p	0,670	0,679	0,086	0,084	
<b>PD</b>	r	0,27	0,22	0,11	0,02	0,66
	p	0,247	0,350	0,635	0,922	0,002*
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 6** - Correlação de Spearman para linfócitos CD3+ em asmáticos

<b>EG</b>	r	0,28				
	p	0,240				
<b>IP</b>	r	0,16	0,47			
	p	0,498	0,036*			
<b>EG</b>	r	-0,39	0,28	0,30		
	p	0,092	0,225	0,200		
<b>PBq</b>	r	0,17	0,10	0,43	0,37	
	p	0,474	0,668	0,056	0,113	
<b>PD</b>	r	0,28	0,37	0,54	-0,05	0,34
	p	0,232	0,108	0,014*	0,826	0,143
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 7 - Correlação de Spearman para linfócitos CD4+ em asmáticos**

<b>EG</b>	r	0,26				
	p	0,268				
<b>IP</b>	r	0,13	0,40			
	p	0,573	0,084			
<b>EP</b>	r	0,02	0,45	0,59		
	p	0,947	0,046*	0,007*		
<b>PBq</b>	r	0,50	0,14	0,40	0,03	
	p	0,026	0,567	0,081	0,910	
<b>PD</b>	r	0,17	0,06	0,55	0,47	0,47
	p	0,486	0,787	0,013*	0,038*	0,038*
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 8 - Correlação de Spearman para linfócitos CD8+ em asmáticos**

<b>EG</b>	r	0,55				
	p	0,012*				
<b>IP</b>	r	0,42	0,54			
	p	0,067	0,013*			
<b>EP</b>	r	0,50	0,78	0,54		
	p	0,026*	0,0001*	0,014*		
<b>PBq</b>	r	0,51	0,48	0,38	0,66	
	p	0,022*	0,034*	0,102	0,001*	
<b>PD</b>	r	0,53	0,36	0,44	0,43	0,80
	p	0,016*	0,118	0,053	0,058	0,0001*
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 9** - Correlação de Spearman para linfócitos CD20+ em asmáticos

<b>EG</b>	r	0,59				
	p	0,006*				
<b>IP</b>	r	-0,04	-0,08			
	p	0,871	0,750			
<b>EP</b>	r	-0,21	-0,18	0,25		
	p	0,384	0,450	0,291		
<b>PBq</b>	r	0,15	0,20	0,12	0,09	
	p	0,518	0,397	0,610	0,700	
<b>PD</b>	r	-0,05	0,13	-0,04	0,02	0,50
	p	0,830	0,587	0,861	0,935	0,025*
		<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>

IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 10** - Densidade celular em asmáticos tabagistas e não tabagistas

	<b>Tabagistas</b> (cels/mm <sup>2</sup> )	<b>Não tabagistas</b> (cels/mm <sup>2</sup> )	<b>p</b>
<b>Neutrófilos (PD)</b>	232,66	621,58	0,005
<b>Mastócitos (PD)</b>	59	105	0,03
<b>Linfócitos CD4+ (EP)</b>	514,91	306,30	0,04
<b>Linfócitos CD20+ (EP)</b>	382,50	104,08	0,002

PD= parênquima distal

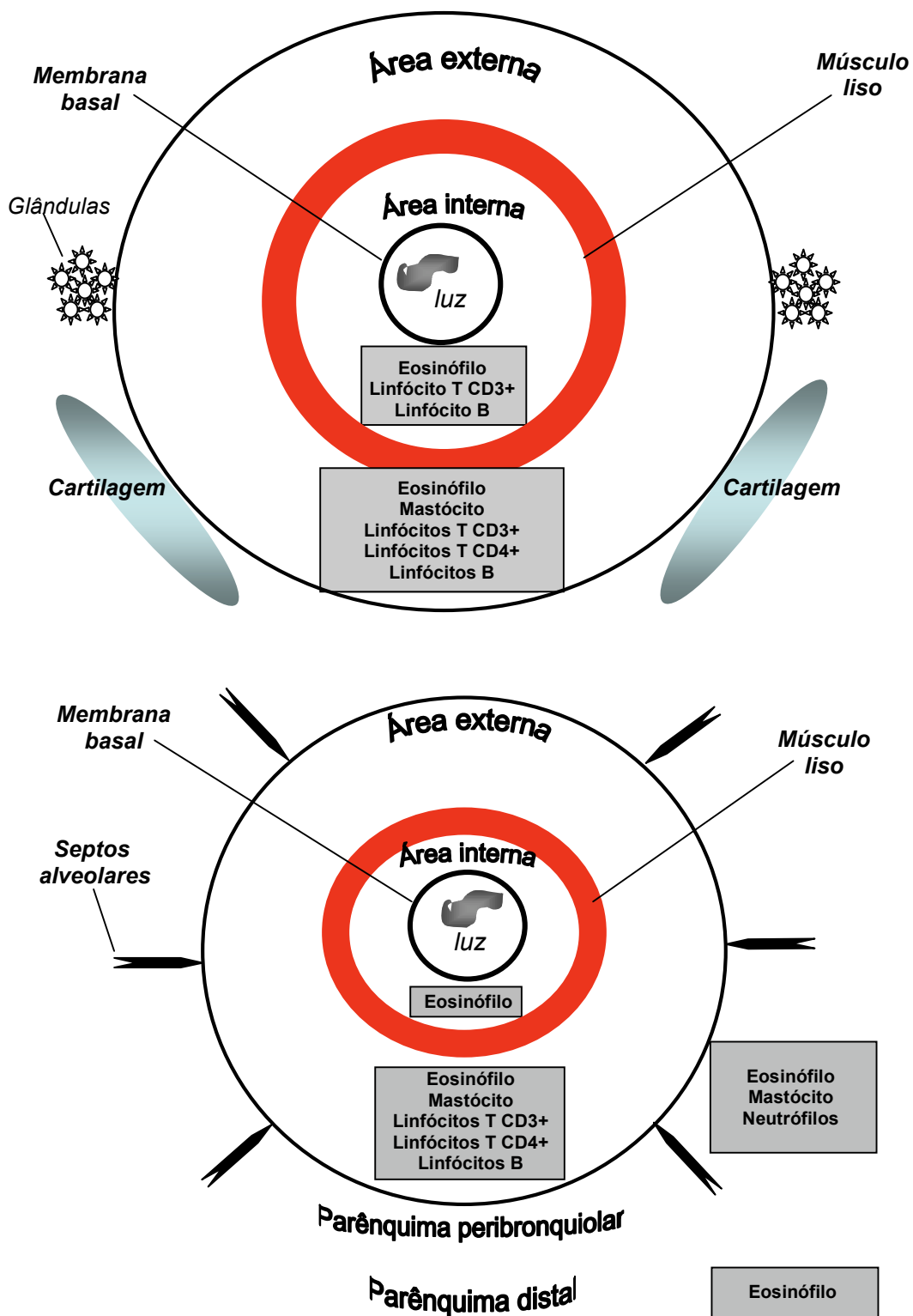
EP= área externa de via aérea pequena

### **4.3 - Análise de tecidos extra-pulmonares**

Cortes representativos de fígado, baço, rim e miocárdio corados por hematoxilina-eosina (HE) foram analisados. Não constatamos alterações microscópicas importantes ou presença de infiltrado eosinofílico nesses tecidos, tanto em asmáticos como em controles.

### **4.4 - Resumo dos resultados de densidade inflamatória em asmáticos e controles**

A Figura 12 mostra uma representação esquemática da via aérea grande e pequena e do parênquima pulmonar, identificando em cada região os tipos celulares que apresentaram maior densidade nos pacientes asmáticos em relação aos controles. A comparação da densidade celular do parênquima pulmonar com a das vias aéreas nos controles e asmáticos é exibida nas tabelas 11 e 12, respectivamente.



**FIGURA 12** - Esquema ilustrativo das células inflamatórias presentes em maior densidade nos asmáticos em relação aos controles nos diversos compartimentos pulmonares estudados

**TABELA 11** - Comparação da densidade celular entre o parênquima pulmonar e as vias aéreas nos controles

Célula	IG	EG	IP	EP	Pbq	PD
Eosinófilo						
Neutrófilo					↑	↑
Mastócito						↓
Linfócito CD3+						
Linfócito CD4+						↓
Linfócito CD8+						
Linfócito CD20+						

↑ = aumento da densidade em relação às regiões marcadas em verde;

↓ = diminuição da densidade em relação às regiões marcadas em verde

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.

**TABELA 12** - Comparação da densidade celular entre o parênquima pulmonar e as vias aéreas nos asmáticos

Célula	IG	EG	IP	EP	Pbq	PD
Eosinófilo						↓
Neutrófilo					↑	↑
Mastócito						↓
Linfócito CD3+						↓
Linfócito CD4+						↓
Linfócito CD8+						↓
Linfócito CD20+						↓

↑ = aumento da densidade em relação às regiões marcadas em verde;

↓ = diminuição da densidade em relação às regiões marcadas em verde

NOTA: IG = área interna de vias aéreas grandes; EG = área externa de vias aéreas grandes; IP = área interna de vias aéreas pequenas; EP = área externa de vias aéreas pequenas; PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal.



## **5 - DISCUSSÃO**





## 5 - DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu avaliar, em casos de asma fatal, uma distribuição mais detalhada do infiltrado inflamatório ao longo do trato respiratório, permitindo a comparação de diferentes compartimentos pulmonares entre si e com controles não asmáticos. Os principais achados desse estudo foram: 1) uma distribuição difusa do infiltrado eosinofílico na asma fatal, com um significativo aumento de eosinófilos tanto em vias aéreas como em parênquima pulmonar; 2) uma maior densidade de mastócitos e neutrófilos em parênquima peribronquiolar nos pacientes asmáticos e 3) a identificação de um compartimento pulmonar - área externa de via aérea - como a principal região que diferencia asmáticos de controle.

Para uma melhor compreensão os resultados serão discutidos a seguir de acordo com cada tipo celular estudado.

### 5.1 - Eosinófilos

A densidade de eosinófilos se mostrou aumentada em todas as regiões das vias aéreas nos asmáticos comparados aos controles. Em relação ao parênquima pulmonar periférico, o eosinófilo foi a única célula encontrada em maior densidade tanto no parênquima peribronquiolar como no distal dos asmáticos comparado aos controles. Esse achado é compatível com relatos prévios: Hamid et al encontraram maior número de linfócitos (CD3+), mastócitos e eosinófilos em vias aéreas centrais e periféricas de indivíduos

com asma leve e moderada, porém somente eosinófilos no parênquima pulmonar dos asmáticos comparado aos controles [67]; Kraft e al evidenciaram infiltrado eosinofílico parenquimatoso em casos de asma noturna, correlacionando esse achado com queda da função pulmonar dos pacientes [73]. Esses autores, entretanto, não definiram regiões específicas de parênquima pulmonar analisado, impossibilitando a comparação precisa com nossos resultados.

O eosinófilo tem papel bem estudado na asma através de seus mediadores e citocinas que provocam alterações patológicas e funcionais nas vias aéreas [100]. Proteínas e radicais livres de oxigênio liberados após degranulação são capazes de danificar o epitélio brônquico, favorecendo a constrição do músculo liso através do estímulo de fibras colinérgicas e liberação de neuropeptídeos [101,102]. Mediadores lipídicos como Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e Leucotrieno C4 (LTC-4) atuam como potentes broncoconstritores [103,104]. No parênquima pulmonar, o papel dos eosinófilos na asma não está esclarecido. Estudos *in vitro* mostram que fatias de tecido pulmonar periférico de animais e humanos respondem a substâncias broncoconstritoras através de aumento de resistência e elastância teciduais [88,85,75]. O mecanismo de resposta do tecido alveolar não está bem estabelecido, podendo resultar da constrição de células intersticiais ou do músculo liso dos ductos alveolares e vasos sanguíneos [86,88]. Substâncias broncoconstritoras liberadas pelos eosinófilos poderiam, assim, estar envolvidas numa resposta alveolar. Entretanto, estudo *in vitro* de fatias de tecido pulmonar periférico não evidenciou

resposta contrátil significativamente maior em asmáticos comparados a não asmáticos [90].

Por outro lado, o recolhimento elástico do pulmão constitui uma das principais funções do parênquima pulmonar periférico. Broncoconstrição e hiperinsuflação recorrentes, associados ao possível dano tecidual decorrente da inflamação poderiam levar a um comprometimento do tecido conectivo parenquimatoso, determinando a diminuição do recolhimento elástico pulmonar [105]. No entanto, Mauad et al não observaram diminuição do conteúdo de fibras elásticas no parênquima distal de indivíduos com asma fatal comparados aos não asmáticos [106]. Assim, o significado clínico e fisiopatológico do infiltrado eosinofílico no parênquima pulmonar distal em casos de asma necessita ser melhor investigado.

A presença de eosinófilos no parênquima peribronquiolar, isto é, nas áreas de acoplamento dos septos alveolares com as vias aéreas periféricas, poderia ter repercussões clínicas e funcionais. Em indivíduos tabagistas, Saetta et al correlacionaram a ruptura dos acoplamentos alveolares com o grau de inflamação da parede das pequenas vias aéreas, sugerindo que esse achado represente um estágio precoce de destruição do parênquima pulmonar com conseqüente perda de recolhimento elástico do pulmão [96]. É possível que enzimas liberadas pelos eosinófilos - elastase [107], lisofosfolipase [108] e colagenase [109] - possam contribuir para esse processo comprometendo o acoplamento das vias aéreas mais distais ao parênquima pulmonar e conseqüentemente aumentando a resistência dessas vias aéreas.

Considerando que a perfusão brônquica e a alveolar são realizadas por diferentes circulações pulmonares (brônquica e pulmonar, respectivamente), o recrutamento de eosinófilos da circulação sistêmica para esses compartimentos pulmonares pode resultar de processos independentes. O recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas resulta da interação entre moléculas de adesão da superfície endotelial (Selectinas e VCAM-1) e de proteínas da matriz extracelular ( $\beta$ 1 integrinas) com ligantes específicos na superfície celular (VLA-4) [110,100]. Em doenças como pneumonias eosinofílicas é descrito aumento de CD44 solúvel (CD44s) e IL-5 no lavado broncoalveolar bem como aumento da expressão de CD44 na superfície dos eosinófilos alveolares, sugerindo que essa molécula de adesão possa estar envolvida no recrutamento de eosinófilos para o espaço alveolar nesses casos [111]. Na alveolite alérgica extrínseca, expressão de *Intercellular Adhesion Molecule 3* (ICAM-3) na superfície dos eosinófilos e de VCAM-1 nas células endoteliais de vênulas e capilares podem estar associadas ao influxo de eosinófilos para o compartimento alveolar [112]. Maiores esclarecimentos quanto aos mecanismos de quimiotaxia do eosinófilo para esse compartimento pulmonar na asma são necessários.

O parênquima pulmonar periférico constitui uma densa rede de capilares, sendo o sangue uniformemente distribuído ao longo da superfície alveolar. Os eosinófilos identificados no parênquima pulmonar poderiam estar localizados na luz capilar, sofrendo processo de marginação ou no interstício. Não foi possível através da microscopia óptica diferenciar a localização exata dessas células. A presença dos eosinófilos no parênquima

pulmonar poderia, portanto, ser apenas o reflexo da eosinofilia sanguínea que sabidamente acomete pacientes asmáticos. Com o objetivo de avaliar a distribuição sistêmica de eosinófilos nesses pacientes, analisamos também outros tecidos (rim, miocárdio, baço e fígado), constatando a ausência dessas células em sítios extra-pulmonares. Esse achado sugere que o infiltrado eosinofílico observado no parênquima seja resultante de um mecanismo de endereçamento para o tecido pulmonar. Por se tratar de um estudo retrospectivo, não foi possível se obter amostras de pele e medula óssea desses pacientes, tecidos mais adequados para refletir a eosinofilia sistêmica.

Considerando-se apenas os pacientes asmáticos, de todas as regiões estudadas, o parênquima alveolar distal mostrou a menor densidade de eosinófilos. Porém a diferença estatística se revelou apenas quando foi comparado com a área interna das grandes vias aéreas (Gráfico 1B). Faul et al encontraram resultado semelhante, observando um número significativamente maior de eosinófilos na lâmina própria de vias aéreas centrais quando comparado ao tecido alveolar adjacente às vias aéreas menores que 1 mm de diâmetro em vítimas de asma fatal [113]. Além de diferenças em relação ao tipo de irrigação sanguínea, esses dois compartimentos diferem entre si quanto ao grau de exposição antigênica. A área interna das vias aéreas grandes é um importante sítio de estímulo antigênico inalado [38], o que deve também contribuir para o padrão inflamatório observado em cada região.

A região de maior acometimento inflamatório na asma é assunto controverso na literatura. Alguns autores sugerem que o infiltrado eosinofílico de asmáticos seja mais importante em vias aéreas centrais que nas vias aéreas periféricas [65, 66,114]. Estudos mais recentes mostram um maior comprometimento inflamatório de vias aéreas periféricas em relação às centrais [67,93,115,116]. O presente estudo não revelou diferença significativa na densidade de eosinófilos entre as vias aéreas grandes e pequenas nos pacientes asmáticos. Além disso, não se evidenciou diferença estatística na densidade eosinofílica entre vias aéreas pequenas e parênquima pulmonar periférico, sugerindo uma importante participação do pulmão distal na asma fatal.

Não foram evidenciadas correlações significativas entre o infiltrado eosinofílico das vias aéreas e do parênquima pulmonar, o que sugere que a análise das vias aéreas de pacientes asmáticos não permite prever o estado inflamatório na periferia do pulmão. Assim, o estudo da inflamação do pulmão distal na asma necessita de procedimentos que permitam a obtenção direta de fragmentos correspondentes a vias aéreas pequenas e tecido alveolar. Alguns autores defendem a realização de biópsias transbrônquicas em asmáticos para fins de pesquisa, considerando as evidências do comprometimento desse compartimento pulmonar na asma [115,117]. Outros consideram que os riscos do procedimento não justificam a sua realização [118].

O papel dos eosinófilos na asma tem sido questionado por alguns autores [119]. Estudos revelam a presença de eosinófilos em várias regiões

do pulmão de asmáticos com diferentes graus de gravidade, correlacionando positivamente o grau de inflamação eosinofílica com hiperresponsividade brônquica [120,121,122]. Outros mostram que certos asmáticos graves apresentam conteúdo inflamatório sem acúmulo significativo de eosinófilos nas vias aéreas [14,48,123,124]. O estudo de asmáticos graves tem mostrado diferentes fenótipos inflamatórios neste grupo de pacientes. Wenzel et al avaliaram 34 asmáticos graves corticodependentes através de biópsias endobrônquicas, evidenciando dois fenótipos patológicos com base na presença e ausência de eosinófilos na submucosa [eosinófilos (+) e eosinófilos (-), respectivamente]. Quando os dois grupos foram comparados entre si, o primeiro apresentou maior número de células inflamatórias (linfócitos, mastócitos e macrófagos) e maior espessamento de membrana basal. Os autores sugerem que esses padrões patológicos possam resultar em diferenças fisiológicas e clínicas nesses pacientes [48]. Em nosso estudo o eosinófilo esteve presente de forma significativa em todos os compartimentos pulmonares dos casos de asma fatal comparados aos controles, porém as repercussões clínicas desse achado não foram aqui analisadas. Diante das divergências da literatura, podemos considerar que diferentes tipos de inflamação caracterizam fenótipos específicos de asma e que a presença de eosinófilos possa não ser essencial em algumas populações de asmáticos. Para outras, no entanto, como mostrado no presente estudo, o eosinófilo pode contribuir de forma efetiva com o processo inflamatório. Consideramos que dois componentes importantes influenciaram a intensidade do infiltrado eosinofílico observado em nossos

pacientes. Primeiramente, todos os casos foram estudados durante a fase de exacerbação da doença. Além disso, a grande maioria dos pacientes recebia tratamento inadequado, geralmente sem uso de corticóide, diferindo de outras populações estudadas.

## 5.2 - Linfócitos

Ao contrário dos eosinófilos, os linfócitos não atingiram de forma significativa a periferia do pulmão, se restringindo às vias aéreas nos pacientes estudados. Moléculas de adesão envolvidas no recrutamento de linfócitos para as vias aéreas são detectadas em biópsias brônquicas de indivíduos asmáticos submetidos a broncoprovocação alérgica [125]. Estudos *in vitro* revelam que linfócitos T de sangue periférico de humanos aderem a vasos brônquicos, mas não a capilares alveolares [126]. Ainslie et al reportaram uma expressão consistente de P-selectina no endotélio das vias aéreas, sugerindo que esta seja a principal molécula de adesão envolvida no endereçamento pulmonar de linfócitos. Os autores não detectaram a presença de P-selectina no tecido alveolar [126]. Por outro lado, doenças inflamatórias alveolares, como pneumonites por hipersensibilidade, são caracterizadas por um influxo de linfócitos T para o parênquima pulmonar [127], com aumento de L- Selectinas no lavado broncoalveolar e maior expressão de E-selectinas nas células endoteliais desses pacientes [128]. Além disso, Kraft et al evidenciaram aumento de linfócitos T CD4+ no interstício pulmonar em pacientes com asma noturna comparados àqueles com asma não noturna [74]. Krug et al sugerem outros



mecanismos que podem influenciar o número de linfócitos no pulmão além do recrutamento do sangue periférico: proliferação local, migração entre os compartimentos pulmonares e apoptose celular [129]. Entretanto, estudos sobre esses mecanismos no pulmão de asmáticos são escassos na literatura.

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> assumem importante papel na orquestração da resposta inflamatória na asma. Células CD4<sup>+</sup> do sangue periférico, lavado broncoalveolar e lâmina própria de vias aéreas de pacientes asmáticos expressam aumento de RNA-m precursor de IL-4 e IL-5, mostrando um predomínio de citocinas com padrão Th2 [130]. Embora o parênquima pulmonar não tenha demonstrado aumento de células T CD4<sup>+</sup> nos asmáticos comparados aos controles, é possível que linfócitos residentes nesse compartimento pulmonar possam estar ativados liberando citocinas capazes de atrair eosinófilos para essa região. Minshal et al, inclusive, evidenciaram presença de IL-5 no parênquima pulmonar periférico de indivíduos com asma [93].

Após broncoprovocação alérgica, asmáticos cursam com diminuição do linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico e aumento no lavado broncoalveolar, indicando um recrutamento de células CD4<sup>+</sup> do sangue para o pulmão [131]. Em nosso estudo, as diferenças quanto à densidade de linfócitos CD4<sup>+</sup> entre asmáticos e controles se concentraram na área externa das vias aéreas. Não observamos diferença significativa na densidade de linfócitos CD4<sup>+</sup> na área interna de vias aéreas grandes entre asmáticos e controles como previamente demonstrado em estudos realizados com biópsias

[120,132]. Apesar desse ser um resultado inesperado, alguns estudos anteriores mostraram achado semelhante: Azzawi et al [133] e Bradley et al [134] observaram um grande número de linfócitos CD3+, CD4+ and CD8+ na biópsia brônquica tanto de asmáticos como de pacientes não-asmáticos, sem diferenças significativas entre os dois grupos.

Em nosso estudo não encontramos densidade significativamente maior de linfócitos T CD8 na asma fatal em relação aos controles, o que não afasta uma possível participação dessa célula na fisiopatologia da asma. Linfócitos T CD8 têm sido evidenciados em tecido pulmonar de casos de asma fatal. Recentemente O'Sullivan demonstrou maior número de células CD8 expressando marcador de ativação CD25, bem como maior expressão de perforina na região peribrônquica de vítimas de asma fatal em comparação com asma não fatal e controles não asmáticos [53]. Já foi demonstrado, inclusive, que linfócitos T CD8 podem modificar seu padrão de citocinas em vigência de infecção viral em asmáticos, perpetuando o processo inflamatório através da produção de IL-5 e indução da eosinofilia de vias aéreas [135,136,137].

O presente estudo mostrou aumento significativo de linfócitos B (CD20+) nas grandes e pequenas vias aéreas dos asmáticos comparado aos controles, sugerindo a participação dessas células na patogênese da asma fatal. Linfócitos B participam da inflamação na asma através da produção de IgE em resposta a IL-4 [138]. Material de autópsia e de biópsia brônquica obtido de pacientes asmáticos mostram menor número de linfócitos B em relação a linfócitos T [139,140]. Kidney et al demonstraram

aumento de linfócitos B (CD19+) no escarro induzido de asmáticos comparados a controles fumantes não asmáticos e correlacionaram esse achado com o aumento de eosinófilos no mesmo material [141]. Nossos dados não permitem concluir se o grande número de linfócitos B observado na asma fatal tem relação com o estado de exacerbação da doença. A inclusão de casos de asma não fatal nesta análise poderia contribuir para o melhor entendimento do papel da exacerbação na distribuição do processo inflamatório ao longo das vias aéreas.

### **5.3 - Neutrófilos**

O parênquima peribronquiolar foi a única região que revelou maior densidade de neutrófilos nos asmáticos em relação aos controles. Elastase neutrofílica, metaloproteinases, bem como radicais livres de oxigênio são produtos de neutrófilos capazes de causar dano epitelial, obstrução das vias aéreas e remodelamento [142]. No parênquima peribronquiolar, esses produtos podem comprometer a integridade dos septos alveolares semelhante à possível ação dos eosinófilos, como já discutido anteriormente.

Casos de morte súbita por asma mostram predominância do infiltrado neutrofílico sobre o eosinofílico nas vias aéreas [14]. Observa-se também maior número de neutrófilos nesses casos quando comparados a indivíduos cujo óbito ocorreu mais tardiamente ao início da crise [14,15]. Na nossa casuística, os quatro pacientes que se enquadraram em casos de morte súbita por asma não exibiram diferença significativa entre infiltrado

neutrófilico e o eosinófilico. Não houve também diferença significativa entre a densidade de neutrófilos dos casos de morte súbita e a dos demais asmáticos. Talvez o número pequeno de pacientes com morte súbita possa ter prejudicado a precisão da análise estatística. No entanto, os resultados aqui mostrados não permitem caracterizar esses pacientes como apresentando uma entidade distinta, como preconizado por Sur et al [14].

A densidade de neutrófilos foi significativamente maior no parênquima pulmonar periférico comparado às vias aéreas, tanto em asmáticos como em controles. Esse achado poderia resultar da marginação de neutrófilos no leito vascular pulmonar em decorrência do óbito.

#### **5.4 - Mastócitos**

Em nosso estudo, ao compararmos asmáticos com controles, evidenciamos aumento de mastócitos nas áreas externas de vias aéreas centrais e periféricas. Observamos também que a camada externa de pequenas vias aéreas foi a mais acometida nos indivíduos asmáticos, à semelhança dos achados de Carroll et al [38]. Contrariamente, Hamid et al não encontraram diferença significativa na densidade de mastócitos em de vias aéreas periféricas de asmáticos em relação a controles [67]. Há controvérsias sobre a quantificação dos mastócitos nas vias aéreas em casos de asma. Estudos que comparam asmáticos com controles mostram que essas células podem estar aumentadas [143], diminuídas [144] ou sem diferenças entre os grupos [134,145,146]. Carrol et al sugerem que alguns

fatores poderiam influenciar a discrepância desses achados como metodologia utilizada, classificação da asma e uso de corticosteróides [38].

Os mastócitos são células amplamente distribuídas no organismo em tecido conectivo e mucosa [147]. A significativa diminuição de mastócitos no parênquima distal em relação às vias aéreas, tanto em asmáticos como em controles, é compatível com o padrão normal de distribuição dessa célula.

Apesar da densidade de mastócitos estar diminuída no parênquima pulmonar quando comparado às vias aéreas, encontramos uma maior densidade mastocitária na região peribronquiolar do parênquima pulmonar nos asmáticos em relação aos não asmáticos. Esse achado poderia ser resultante da extensão do infiltrado mastocitário da área externa das pequenas vias aéreas em direção ao parênquima peribronquiolar. À semelhança dos eosinófilos e neutrófilos, é possível que os mastócitos possam contribuir para a lesão dos septos alveolares através da liberação de enzimas como triptase e quimase.

À semelhança do remodelamento brônquico, recentemente tem se discutido a possibilidade de que possa ocorrer um remodelamento na periferia do pulmão às custas de alterações estruturais na matriz extracelular [148]. A inflamação mastocitária na área externa das pequenas vias aéreas poderia assumir um importante papel nesse processo através da liberação de proteases como metaloproteinase (MMP) -3, MMP-9, triptase e quimase, e de fatores de crescimento (TGF  $\beta$ ) [149,150,151]. Essas substâncias são capazes de ativar metaloproteinases da matriz extracelular, estimular angiogênese, degradar a membrana basal, atuar como mitógenos de

músculo liso e fibroblastos e estimular síntese de colágeno. Esses fatores promovem alterações estruturais que poderiam participar do processo de remodelamento pulmonar [36,152,153,154].

### **5.5 - Pacientes**

Pacientes que morrem durante uma crise de asma constituem um subgrupo específico que nem sempre compartilha das mesmas características clínicas da doença em vida [155]. A população desse estudo apresentava uma idade variável, bem como incluía alguns fumantes. No entanto, os achados anatomopatológicos eram consistentes com asma em todos os indivíduos. A história clínica dos pacientes estudados nesse trabalho foi colhida por uma assistente social através de um questionário minucioso, buscando informações sobre a doença prévia, a frequência das crises, as medicações utilizadas, hábitos do paciente, o episódio fatal. No entanto, esses dados foram obtidos de familiares após o óbito o que não permitiu acesso a informações médicas como classificação da asma baseada na prova de função pulmonar, diagnóstico de alergia e resultados de exames complementares. A ausência desses dados pode ter limitado uma melhor avaliação das implicações clínicas dos nossos resultados.

Ao contrário de outros estudos [65,66,38] percebemos que, apesar de uma longa história de doença, uma minoria dos pacientes fazia uso regular de corticosteróide oral ou inalatório, motivo pelo qual podemos supor que esses pacientes não tinham necessariamente uma asma grave, mas uma doença inadequadamente tratada capaz de desencadear uma crise fatal.

Por outro lado, a ausência da corticoterapia poderia refletir a “evolução natural” das alterações inflamatórias na asma.

No intuito de investigar se a história de tabagismo influenciou a inflamação pulmonar, comparamos as densidades celulares entre asmáticos fumantes e não fumantes. Surpreendentemente, as diferenças observadas entre os grupos se concentraram no pulmão distal, o que sugere que o tabagismo pode causar algum impacto nesse compartimento pulmonar também em asmáticos. No entanto, estudos abordando o processo inflamatório pulmonar em asmáticos tabagistas são escassos na literatura, o que limitou a interpretação dos nossos resultados. De fato, esperaríamos encontrar um aumento da densidade neutrofílica no parênquima pulmonar de tabagistas. Possivelmente, o número reduzido de tabagistas, bem como a existência de outras variáveis (duração e gravidade da doença) podem ter influenciado esses achados.

## **5.6 - O pulmão distal**

A área externa das vias aéreas grandes e pequenas, nesse estudo, foi a região que melhor diferenciou asmáticos de controles, mostrando o maior número de diferenças significativas entre os dois grupos (mastócitos, eosinófilos e linfócitos CD3+, CD4+ e CD20+). Essas diferenças foram mais acentuadas nas vias aéreas pequenas que apresentaram valores de p mais significativos do que nas vias aéreas grandes. Além disso a densidade de mastócitos foi significativamente maior na área externa de vias aéreas

pequenas comparada à área externa de vias aéreas grandes. Balzar et al analisaram material obtido de biópsias endobrônquicas e transbrônquicas e de ressecções cirúrgicas de 12 asmáticos graves corticodependentes, encontrando predominância do infiltrado inflamatório em pequenas vias aéreas, quando comparado a vias aéreas de maior calibre [115]. Haley et al analisaram pulmões de autópsia de asmáticos e de indivíduos com fibrose cística, concluindo que, nos asmáticos, a densidade do infiltrado celular nas vias aéreas pequenas é maior na área externa do que na área interna [156].

O presente estudo demonstrou também que os pacientes asmáticos apresentam inflamação do parênquima pulmonar. Neutrófilos e mastócitos permaneceram limitados à região de acoplamento alveolar, enquanto eosinófilos se difundiram para o parênquima distal.

Como discutido anteriormente, a inflamação do parênquima peribronquiolar poderia ter repercussões clínicas e funcionais. Estudo recente do Departamento de Patologia da FMUSP realizado com o mesmo material desta tese, demonstrou ruptura de septos alveolares na região peribronquiolar de asmáticos comparados a controles na asma fatal [106]. Nesse estudo prévio foi determinado o conteúdo de fibras elásticas na área externa de pequenas vias aéreas e no septo alveolar, assim como a proporção de septos peribronquiolares rotos. Na tentativa de explicar a fisiopatologia da lesão de fibras elásticas na asma, procuramos correlacionar os parâmetros inflamatórios obtidos no presente estudo com os parâmetros de lesão de fibras elásticas determinados previamente. Considerando 14 pacientes asmáticos não tabagistas e 8 controles, realizamos as seguintes



correlações: 1) entre a densidade celular da área externa de pequenas vias aéreas e o conteúdo de fibras elásticas nessa mesma camada e 2) entre a densidade celular do parênquima peribronquiolar e a proporção de septos peribronquiolares rotos. Observamos uma correlação negativa entre densidade eosinofílica e neutrofílica da área externa de via aérea periférica e o conteúdo de fibras elásticas na mesma região ( $p=0,001$ ;  $r= -0,65$  e  $p=0,03$ ;  $r= -0,46$  respectivamente), bem como uma correlação significativa entre densidade eosinofílica e mastocitária do parênquima peribronquiolar e a proporção de septos rotos ( $p=0,02$ ;  $r=0,50$ ). Esses resultados sugerem, portanto, que eosinófilos, mastócitos e neutrófilos participam do processo de lesão distal na asma fatal podendo levar a um desacoplamento entre vias aéreas e parênquima pulmonar.

Considerando seu potencial de determinar alterações funcionais, a inflamação do pulmão distal aponta para a necessidade de que esse compartimento pulmonar seja alvo de tratamento antiinflamatório. Corticosteróides inalatórios, atualmente utilizados como terapia de escolha para o controle da asma [32] e tradicionalmente administrados por meio de aerossóis, se depositam predominantemente em vias aéreas centrais devido ao tamanho da partícula inalada [157]. Estudos têm mostrado que propelente alternativo (hidrofluoroalcano, HFA) combinado ao corticosteróide reduz o tamanho da partícula permitindo que maior percentagem da droga atinja o pulmão, alcançando também as vias aéreas de pequeno calibre. Corticosteróides com HFA exigem menores doses para controle da doença, bem como causam menos efeitos colaterais que a droga combinada ao

propelente tradicional (Clorofluorocarbono - CFC) [158]. Goldin et al registraram menor aprisionamento de ar através de tomografia computadorizada após provocação com metacolina em asmáticos que usaram corticosteróides com HFA por 4 semanas, sugerindo que tenha ocorrido um tratamento mais adequado do pulmão distal [159].

O nosso estudo mostrou, enfim, que o infiltrado inflamatório está presente em todos os compartimentos pulmonares na asma fatal, sendo que a área externa das vias aéreas grandes e pequenas foi a região que melhor diferenciou asmáticos de controles. Mostramos também o comprometimento do parênquima pulmonar que, combinado ao das vias aéreas periféricas, caracteriza a inflamação do pulmão distal acometendo pacientes vítimas de morte por asma. Esses achados podem ter importante implicação em mudanças na terapêutica antiinflamatória inalatória atualmente instituída na asma que não possui potencial alcance periférico. Tornar o pulmão distal um alvo de tratamento antiinflamatório pode contribuir para um melhor controle da doença.



## **6 - CONCLUSÕES**

## 6 - CONCLUSÕES

- 1- O Infiltrado eosinofílico apresenta uma distribuição difusa na asma fatal desde as vias aéreas centrais até o parênquima pulmonar periférico.
- 2- O infiltrado linfocitário não atinge o parênquima pulmonar periférico na asma fatal.
- 3- A área externa das vias aéreas grandes e pequenas é a região que melhor distingue o asmático do controle através do aumento de densidade de diferentes tipos celulares: eosinófilos, mastócitos, linfócitos T (CD3+ e CD4+) e linfócitos B (CD20+).
- 4- O parênquima pulmonar peribronquiolar participa do processo inflamatório na asma fatal com aumento de mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. A inflamação desse compartimento, associado ao da área externa da via aérea pequena reforça o papel do pulmão distal na fisiopatologia da asma.



## **7 - ANEXOS**



## 7 - ANEXOS

## A - Entrevista

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FMUSP  
SERVIÇO SOCIAL MÉDICO  
AMBULATÓRIO DE CLÍNICA MÉDICA GERAL**

**IDENTIFICAÇÃO**

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_  
 Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data de Falecimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
 Sexo : \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_  
 Profissão: \_\_\_\_\_ Religião: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_  
 Outros endereços: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Nome do Entrevistado: \_\_\_\_\_  
 Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Vivia com o paciente: \_\_\_\_\_  
 Primeiro contato: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**COMPOSIÇÃO FAMILIAR**

Nome	Parentesco	Idade	Escolaridade	Profissão	Previd.	Salário

Outras fontes de rendimento: \_\_\_\_\_  
 Total de rendimentos: \_\_\_\_\_  
 Total de pessoas que residem na casa do paciente: \_\_\_\_\_  
 RENDA PER CAPTA: \_\_\_\_\_



**HISTÓRICO DE ESTRUTURA FAMILIAR** (pontos de intersecção entre doença e eventos marcantes desta família, bem como fatores que provocaram a desestrutura familiar quando for o caso)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**HISTÓRICO DO TRATAMENTO** ( início e evolução da doença, cuidados, recursos procurados, especialistas pelos quais passou) \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



**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 internada em UTI? \_\_\_\_\_ Quando? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

8. Há quanto tempo estava com sintomas de crise ante do óbito (descrever quando começou a crise e que 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, porque não foi levado(a) ao hospital? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

12. Hospital onde faleceu: \_\_\_\_\_

**B - Densidade Celular****Densidade de Linfócitos CD3+ em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)**

<b>Paciente Asmático</b>	<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>	<b>PD</b>
1	188.3	357.5	27.17	621.36	544.32	71.7
2	712.7	149.6	0	360.78	177.7	15.48
3	647	591.7	338.2	478.8	447.05	127.38
4	204.8	194	295.5	1435.6	431.74	83.27
5	451.2	248.2	123.13	489.4	411.4	62.1
6	344.9	1072.7	1355.6	1198.6	387.87	240.31
7	391.79	424.15	498.6	527.56	847.05	175.82
8	820.2	488.5	361.2	357.9	533.33	212.94
9	523.15	364	227.4	242.7	68.08	70
10	970.9	834.2	639.38	406.8	315.78	135.42
11	281.6	257.16	116.5	379.2	66.66	12.59
12	739.5	824	229.1	656.2	759.32	51.17
13	229.97	844	522.8	881.3	369.23	80.85
14	44.86	266.4	98.09	151.3	192.48	208.88
15	1544	485	852.8	371	413.7	340.64
16	285.78	571	99.81	670	301.44	19.95
17	408.7	345.4	116	546.6	276.92	125.27
18	1640.7	5183.8	21.27	381.19	173.49	175.95
19	1037	398.57	472.3	614.8	1360	530.45
20	145.97	816.87	442.1	1023.6	233.33	163.18
Mediana	429.95	454.575	262.3	508.48	378.55	126.325
Mínimo	44.86	149.6	0	151.3	66.66	12.59
Máximo	1640.7	5183.8	1355.6	1435.6	1360	530.45

**Densidade de Linfócitos CD3+ em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)**

<b>Paciente Controle</b>	<b>IG</b>	<b>EG</b>	<b>IP</b>	<b>EP</b>	<b>PBq</b>	<b>PD</b>
1	170.33	447.5	287.94	458.3	135.21	139.44
2	60.23	65.16	193.6	349.4	519.48	166.1
3	165.52	164.15	233.46	136.52	177.77	35.55
4	795.62	751.25	213.7	276.85	166.66	158.64
5	233.43	378.22	327	235.13	376.47	304.42
6	380.47	390.73	203.32	206.22	501.9	239.33
7	462.18	59.94	641.67	393.17	350.6	259.31
8	161.8	130.7	61.85	57	438.7	69.8
9	17.17	34.12	0	56	0	8.69
10	27.12	144.5	445.54	110.67	266.66	37.13
Mediana	167.925	154.325	223.58	220.675	308.63	149.04
Mínimo	17.17	34.12	0	56	0	8.69
Máximo	795.62	751.25	641.67	458.3	519.48	304.42

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal

Densidade de Linfócitos CD4+ em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)

Paciente Asmático	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	126.34	298.47	0	627.13	123.07	101.78
2	436.4	135.4	84.8	181.6	360	175.34
3	36.6	40.57	113	272.9	278.26	120.32
4	145	189	16.77	444.6	42.66	44.88
5	54.64	4584	314	697.6	141.7	116.29
6	137.9	794.2	232.7	734	61.53	46.37
7	317.6	219.8	203.4	370.9	228.57	267.61
8	132.3	326.9	286.6	495.9	84.21	768
9	65.82	190.29	0	50.45	60	9.91
10	288.65	55.21	83.14	122.5	115.46	27.51
11	486.7	407.6	121	235	370.03	51.61
12	182.4	343.5	132.4	302.6	195.55	96.96
13	72.7	393.05	257.89	365.67	61.53	50
14	86.5	312.6	115.28	344	166.95	149.57
15	843.9	804.5	897.3	745.5	400	306.13
16	17.14	310.94	25.5	272.9	112.94	26.49
17	17.03	117.87	35	263.2	23.52	103.8
18	187.5	544.2	0	62.34	179.77	33.16
19	62.98	87.23	305.8	324.4	216.94	83.74
20	87.33	294.8	81.64	255.8	60	55.58
Mediana	129.32	304.705	114.14	313.5	132.385	90.35
Mínimo	17.03	40.57	0	50.45	23.52	9.91
Máximo	843.9	4584	897.3	745.5	400	768

Densidade de Linfócitos CD4+ em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)

Paciente Controle	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	11.02	162.25	38.287	220.5	97.59	76.19
2	28.27	110.74	105.2	91.9	96	52.3
3	48.28	36.86	23.1	82.23	58.53	11.51
4	800.57	454.95	196.55	106.28	14.15	124.67
5	236.67	310.3	372.6	295.6	164.1	139.13
6	146.35	156.52	374.3	152.97	112.94	87.5
7	150.4	53.72	482.7	344.39	282.35	132.89
8	94.51	133.56	0	125.18	150.58	31
9	33.95	185.29	41.53	98.04	48	4.89
10	87.97	138.76	622.94	73.5	114.28	42.1
Mediana	91.24	147.64	150.875	115.73	105.265	64.245
Mínimo	11.02	36.86	0	73.5	14.15	4.89
Máximo	800.57	454.95	622.94	344.39	282.35	139.13

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal

Densidade de Linfócitos CD8+ em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)

Paciente Asmático	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	50.22	51.71	65.97	38.7	19.04	53.84
2	95.9	31.8	0	0	0	15.48
3	91.75	329.45	291.9	393.9	73.84	45.35
4	35.28	50.15	90.87	234.5	147.69	71.76
5	57.64	53.38	24.93	274.18	115.94	26.73
6	98.26	349.5	377.7	433.3	240	58.18
7	51.5	17.6	34.8	100.4	145.45	62.83
8	229.1	269.2	244.18	269.16	140.35	68.37
9	39.58	54.69	171.4	105.7	17.77	33.54
10	101.6	71.75	130.6	66.8	74.41	73.9
11	179	133.7	98.80	300.6	186.04	87.9
12	147.47	48.08	179.8	200.3	370.5	227.93
13	34.70	86.1	48.78	115.18	186.3	166.29
14	28.93	28.78	27.82	21.52	21.33	13.52
15	49.4	3.427	151.5	61.98	130.23	60.27
16	183.85	256.8	57.72	194.8	166.03	47.64
17	212.3	335.3	73.45	408.3	394.52	330.15
18	134.59	381.6	194.7	386.5	233	168.94
19	205.54	165.8	296	216.8	210.1	252.8
20	20.82	85.23	73.26	114.47	106.66	36.15
Mediana	93.825	78.49	94.835	197.55	142.9	61.55
Mínimo	20.82	3.427	0	0	0	13.52
Máximo	229.1	381.6	377.7	433.3	394.52	330.15

Densidade de Linfócitos CD8+ em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)

Paciente Controle	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	302.48	632.47	55.12	105.51	75	210.13
2	97.23	78.57	209.6	262.2	323.59	64.19
3	10.73	50.88	71.56	140.67	100	81
4	167.17	114.88	420.27	203.88	96.96	95.43
5	192	60.65	354.43	266.8	417.39	244.58
6	218.2	197	120.6	76.09	195.12	135.42
7	119.22	7.98	148.33	76.03	132.11	136.17
8	23.97	111.61	29.63	43.31	276.9	57.14
9	69.52	38.92	88	166	156.86	23.14
10	202.13	126.14	578.47	181	253.65	147
Mediana	143.195	95.09	134.465	153.335	175.99	115.425
Mínimo	10.73	7.98	29.63	43.31	75	23.14
Máximo	302.48	632.47	578.47	266.8	417.39	244.58

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal

Densidade de Linfócitos CD20+ em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)

Paciente Asmático	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	59.94	91.1	0	247.83	41.02	37.76
2	121.04	58.5	0	34.5	0	22.96
3	96.4	178.9	235.1	491.9	19.75	8.46
4	7.22	28.55	0	317.7	42.66	4.35
5	62.69	71.88	39.32	294.4	115.66	45.24
6	40.68	399.19	28.1	666.6	28.07	42.2
7	24.84	38.64	17.05	162.6	106.66	48.92
8	35.98	157.7	317.2	188.45	149.33	52.11
9	15.6	79.4	0	43.9	0	46.37
10	83.85	473.7	42.3	18.54	72.72	30.57
11	70.15	185.4	32.5	113	68.57	10.25
12	7.19	6	81.46	151.5	27.58	36.6
13	19.07	76.68	32.14	96.04	40.33	28.91
14	23	29.26	149.1	40	0	4.23
15	49	663	0	45.46	33.33	13.38
16	51.65	266.94	59.84	183.86	60.37	36.57
17	26.08	114.4	28.9	53.7	77.42	65.54
18	71.77	297.3	0	0	95.23	32
19	61.57	209.2	34.31	55.46	82.05	97.5
20	13	51.87	56.32	268.2	62.33	16.36
Mediana	44.84	102.75	32.32	132.25	51.515	34.285
Mínimo	7.19	6	0	0	0	4.23
Máximo	121.04	663	317.2	666.6	149.33	97.5

Densidade de Linfócitos CD20+ em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)

Paciente Controle	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	0	68.07	0	14.25	24.24	28.07
2	0	0	26.92	77.87	17.97	4.22
3	7.2	0	0	5.75	45.07	5
4	27.34	5.86	0	0	26.01	22.96
5	22.64	47.45	18	42.4	69.56	56.28
6	6.1	0	0	0	54.23	38.48
7	150.4	53.72	482.7	344.39	0	8.88
8	0	5.7	0	24.93	101.58	40.5
9	24	11.35	0	17.97	50.79	0
10	17.31	0	28.89	40.18	0	17.61
Mediana	12.255	5.78	0	21.45	35.54	20.285
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	150.4	68.07	482.7	344.39	101.58	56.28

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal

Densidade de Eosinófilos em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)

Paciente Asmático	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	0	37	0	36.98	41.03	44.67
2	551.71	167.81	0	0	30.77	36.09
3	0	0	1357.6	553.4	64.00	2.97
4	114.9	105.2	293.2	331.8	96.96	0
5	801.2	340.2	97.3	113	123.08	130.43
6	614.5	335.1	27.7	346.1	28.07	27.04
7	563.9	221.5	0	100.1	19.51	31.06
8	182.8	105	93.8	186.15	100.00	35.87
9	619.2	423.4	115	233.2	18.82	0
10	368.51	163.7	79.52	73.94	14.81	20.1
11	1093.08	245.27	592.5	1955.45	137.93	75.5
12	640.9	233.96	76.98	0	40.51	65.88
13	241.23	225.06	547.53	631.01	581.82	1152.58
14	26.24	15.04	121.44	64.19	17.78	15.04
15	187.65	86.55	151.19	71.41	120.43	95.8
16	428.23	647.7	457.81	502.39	120.43	151.72
17	0	122.2	0	61.66	123.08	34.63
18	251.6	531.2	93.28	145.72	61.54	7.86
19	142.8	108.6	103.8	128	237.84	54.54
20	142.96	735.34	41.62	547.03	111.11	37.57
Mediana	246.415	194.655	95.55	136.86	80.48	35.98
Mínimo	0	0	0	0	14.81	0
Máximo	1093.08	735.34	1357.6	1955.45	581.82	1152.58

Densidade de Eosinófilos em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)

Paciente Controle	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	17.58	25.96	0	53.32	96.00	5.83
2	12.42	0	0	36.88	0.00	0
3	4.92	11.99	0	9.89	29.62	0
4	0	0	0	58.67	0.00	0
5	77.33	37.76	114.66	81.05	50.79	47.29
6	0	0	0	0	0.00	0
7	0	0	0	0	0.00	4.06
8	0	0	0	0	118.50	0
9	0	0	0	0	0.00	0
10	0	6.97	15.37	6.72	50.79	60
Mediana	0	0	0	8.305	14.81	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	77.33	37.76	114.66	81.05	118.5	60

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal

### Densidade de Mastócitos em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)

Paciente Asmático	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	254.4	272.9	269.19	507.8	349.09	44.81
2	216.7	128.2	219.4	342.6	121.52	98.92
3	637.1	321.4	299.84	732.05	384.81	29.78
4	235.4	140.7	203.2	219.1	181.13	26.54
5	383.7	302.6	342	986	276.92	122.82
6	856.3	482	273.2	600	160.00	62.16
7	480.2	358.2	820.4	753.5	558.14	138.75
8	379	222.8	238.58	274.37	320.00	136
9	273.3	135	527.5	265.1	141.18	65.11
10	304.77	283.34	475.78	481.44	100.00	131.23
11	218.7	216.99	199	319.04	160.00	65.11
12	241.07	619.85	127.76	353.6	309.09	214.76
13	254.18	536.6	647.36	1060.73	125.22	194.78
14	687.27	425.05	564.9	548.66	469.57	103.09
15	458.82	325.75	454.31	1055.33	200.00	102.02
16	225.11	294.44	123.94	544.59	93.33	68.68
17	129.25	185.34	178.54	327.6	183.61	72.58
18	142.36	379.7	316.72	575.66	234.67	58.58
19	205.2	173.9	174.6	555.1	347.83	64.97
20	232.09	593.59	441.71	667.71	182.46	84.39
Mediana	254.29	298.52	286.52	546.625	191.80	78.485
Mínimo	129.25	128.2	123.94	219.1	93.33	26.54
Máximo	856.3	619.85	820.4	1060.73	558.13	214.76

### Densidade de Mastócitos em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)

Paciente Controle	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	232.47	225.99	606.86	864.34	140.30	232.4
2	251.04	284.2	265.1	423.79	311.11	204.87
3	160.38	109.68	141.33	256.89	30.70	46.92
4	357.69	310.42	317.79	279.27	69.56	40.22
5	328.79	168.96	494.53	329.02	97.95	63.43
6	179.6	334.36	207.44	229.89	82.75	107
7	167.88	96.22	360	430.97	162.31	57.55
8	333.1	202.57	161.2	296.2	120.00	62.5
9	277.22	174.98	207.5	188.79	200.00	80.2
10	111.65	98.85	163.49	118.88	172.90	24.93
Mediana	241.755	188.775	236.3	287.735	130.15	62.965
Mínimo	111.65	96.22	141.33	118.88	30.7	24.93
Máximo	357.69	334.36	606.86	864.34	311.11	232.4

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal



Densidade de Neutrófilos em pacientes asmáticos (mm<sup>2</sup>)

Paciente Asmático	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	14.57	58.22	0	94.1	228.57	227.93
2	358.37	78.5	206.4	51.26	549.49	371.08
3	88.87	35.23	66.8	231.6	432.43	244.02
4	84.42	21.69	35.68	50.15	244.44	129.81
5	130.5	88.6	216.9	111.5	510.14	479.16
6	97.49	178.7	841.4	1509	563.38	274.71
7	72.8	94.4	286.6	156.9	211.76	238.29
8	33.99	15.43	0	99.65	447.05	286.85
9	71.2	154	194.5	426.3	424.1	780.62
10	264.13	71.09	163.75	149.37	443.07	205.12
11	92.37	150.21	0	280.28	1079	986.36
12	636.44	71.93	490.44	197.92	544.68	672.89
13	87.32	113.87	75.29	139.46	522.44	916.66
14	238.37	41.92	203.92	111.83	200	466.44
15	562.19	82.75	499.75	157.92	343.92	311.68
16	130.34	67.66	526.14	135.15	911.11	751.58
17	15.18	56.8	105.2	484.2	379.66	526
18	193.64	77.73	156.43	157.19	708.57	725.07
19	22.33	39.2	235.1	91	788	544
20	929.79	193.56	1563.45	1524.42	964.1	1348.8
Mediana	94.93	74.83	199.21	153.135	478.595	472.8
Mínimo	14.57	15.43	0	50.15	200	129.81
Máximo	929.79	193.56	1563.45	1524.42	1079	1348.8

Densidade de Neutrófilos em pacientes controles (mm<sup>2</sup>)

Paciente Controle	IG	EG	IP	EP	PBq	PD
1	200.27	27.29	24.09	93.37	203.17	241.5
2	296.28	70.62	374.77	155.33	104.34	83.93
3	545.86	248.34	185.66	151.91	133.33	591.3
4	164.76	38.96	250.92	146.74	305.6	307.9
5	37.49	26.46	110.54	16.17	260	288
6	139.23	15.96	80.34	27.24	71.64	123.73
7	27.75	15.22	1349	273.4	271.18	319
8	59.37	168.6	0	61.24	594.8	317.35
9	300.74	22.18	87.88	56.16	358.6	115.3
10	67.88	23.99	26.33	610.72	840	577.47
Mediana	151.995	26.875	99.21	120.055	265.59	297.95
Mínimo	27.75	15.22	0	16.17	71.64	83.93
Máximo	545.86	248.34	1349	610.72	840	591.3

NOTA: IG = área interna de via aérea grande; EG = área externa de via aérea grande;  
 IP = área interna de via aérea pequena; EP = área externa de via aérea pequena;  
 PBq = parênquima peribronquiolar; PD = parênquima distal



## **8 - REFERÊNCIAS**



## 8 - Referências

1. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH Publication No. 02-3659 Issued January 1995 (updated 2002).* 2002; National Institute of Health: Bethesda, MD.
2. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(12):1622-8.
3. Gibbs R, Miranda C, Wenzel S. Initial demographic information from an extensive data base of severe, steroid dependent asthmatics studied at National Jewish. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:A119.
4. Ulrik CS, Lange P. Decline of lung function in adults with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(3):629-34.
5. ten Brinke A, van Dissel JT, Sterk PJ, Zwinderman AH, Rabe KF, Bel EH. Persistent airflow limitation in adult-onset nonatopic asthma is associated with serologic evidence of Chlamydia pneumoniae infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(3):449-54.
6. Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, Weiss ST, Hasday J, Lilly CM, Ford JG, Drazen JM. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(3):919-22.
7. Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Pare PD. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(1 Pt 1):135-40.
8. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet.* 2001;109(6):623-7.
9. Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(3):375-81.

10. Kraft M, Cassell GH, Henson JE, Watson H, Williamson J, Marmion BP, Gaydos CA, Martin RJ. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the airways of adults with chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(3):998-1001.
11. Wenzel SE, Gibbs RL, Lehr MV, Simoes EA. Respiratory outcomes in high-risk children 7 to 10 years after prophylaxis with respiratory syncytial virus immune globulin. *Am J Med*. 2002;112(8):627-33.
12. Milgrom H, Bender B, Ackerson L, Bowry P, Smith B, Rand C. Noncompliance and treatment failure in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(6 Pt 1):1051-7.
13. Woolcock AJ. Natural history of fatal asthma. In: A.L. Sheffers. *Fatal Asthma*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. p. 179-96.
14. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? [see comments]. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148(3):713-9.
15. Carroll 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.
16. Crane J, Pearce N, Burgess C, Woodman K, Robson 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.
17. Sidebotham HJ, Roche WR. Asthma deaths; persistent and preventable mortality. *Histopathology*. 2003;43(2):105-17.
18. Gergen PJ, Weiss KB. Epidemiology of Asthma. In: W.W. Busse, S. Holgates. *Asthma and Rhinitis*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1995. p. 15-31.
19. Keller MB, Lowenstein MD. Epidemiology of asthma. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;23(4):317-29.

20. Il Consenso brasileiro no manejo de asma (1998) - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Sociedade Brasileira de Alergia e Pneumologia, e Sociedade Brasileira de Pediatria. *J Pneumol.* 1998;24(4):171-276.
21. Jackson R, Sears MR, Beaglehole R, Rea HH. International trends in asthma mortality: 1970 to 1985. *Chest.* 1988;94(5):914-8.
22. Coultas DB, Samet JM. Epidemiology and natural history of childhood asthma. In: D.G. Tinkelman, C.K. Naspitzs. *Childhood asthma pathophysiology and treatment.* New York: Marcel Dekker; 1993. p. 71-114.
23. Campos HS. Asthma mortality in Brazil, 1980-1998. *Pulmo RJ.* 2003;12(4):16-24.
24. Campbell DA, McLennan G, Coates JR, Frith PA, Gluyas PA, Latimer KM, Martin AJ, Roder DM, Ruffin RE, Yellowlees PM. Accuracy of asthma statistics from death certificates in South Australia. *Med J Aust.* 1992;156(12):860-3.
25. Salto Junior JJ, Wandalsen G, Naspitz CK, Sole D. Asthma and respiratory disease mortality rates in the state of Sao Paulo, Brazil: 1970-1996. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2002;30(1):30-5.
26. Jeffery PK. Pathology of asthma. *Br Med Bull.* 1992;48(1):23-39.
27. Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(1):138-43.
28. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest.* 1992;101(4):916-21.
29. Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, Martin J, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M, et al. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol.* 1994;77(2):1011-4.
30. Kraft M. The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J.* 1999;14(6):1403-17.

31. Sutherland ER, Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002;89(2):119-24; quiz 124-5, 211.
32. *National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH Publication No. 97-4051.* 1997, National Institute of Health: Bethesda, MD.
33. Holgate ST. Asthma - Pathophysiology. In: S.T. Holgate, M.K. Church. *Allergy.* London: Gower Medical Publishing; 1993. p. 13.1-13.12.
34. Flint KC, Leung KB, Hudspith BN, Brostoff J, Pearce FL, Johnson NM. Bronchoalveolar mast cells in extrinsic asthma: a mechanism for the initiation of antigen specific bronchoconstriction. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985;291(6500):923-6.
35. Kirby JG, Hargreave FE, Gleich GJ, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136(2):379-83.
36. Bradding P, Holgate ST. The mast cell as a source of cytokines in asthma. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;796:272-81.
37. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax.* 2002;57(8):677-82.
38. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 2002;19(5):879-85.
39. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002;346(22):1699-705.
40. Auchincloss HJ, Geha RS, Kay AB, Lechler R, Ito YW, Sprent J, Wraith D. Allergy and Hypersensitivity. In: C.A.J. Janeway, P. Travers, S. Hunt, M. Walports. *Immunobiology.* 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Garland Publishing; 1997. p. 11:1-11:25.

41. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(2):434-57.
42. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(6):935-42.
43. Fujisawa T, Kephart GM, Gray BH, Gleich GJ. The neutrophil and chronic allergic inflammation. Immunochemical localization of neutrophil elastase. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(3):689-97.
44. Schuster A, Ueki I, Nadel JA. Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200,355. *Am J Physiol*. 1992;262(1 Pt 1):L86-91.
45. Nadel JA, Takeyama K. Mechanisms of hypersecretion in acute asthma, proposed cause of death, and novel therapy. *Pediatr Pulmonol Suppl*. 1999;18:54-5.
46. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, Tonnel AB. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):394-402.
47. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):737-43.
48. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):1001-8.
49. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999;54(9):825-57.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Arm JP, Lee TH. The pathobiology of bronchial asthma. *Adv Immunol*. 1992;51:323-82.
55. Williams J, Johnson S, Mascali JJ, Smith H, Rosenwasser LJ, Borish L. Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects. *J Immunol*. 1992;149(8):2823-9.
56. Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B, Joseph M, Capron A, Tonnel AB. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(3):768-74.
57. Holtzman MJ, Hansbrough JR, Rosen GD, Turk J. Uptake, release and novel species-dependent oxygenation of arachidonic acid in human and animal airway epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1988;963(3):401-13.
58. Nakamura H, Yoshimura K, Jaffe HA, Crystal RG. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*. 1991;266(29):19611-7.



59. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(6 Pt 1):1041-53.
60. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1(8637):520-4.
61. Mauad T, Xavier AC, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):968-75.
62. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1720-45.
63. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):405-10.
64. Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):511-6.
65. Synek M, Beasley R, Frew AJ, Goulding D, Holloway L, Lampe FC, Roche WR, Holgate ST. Cellular infiltration of the airways in asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(1):224-30.
66. Carroll N, Cooke C, James A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J*. 1997;10(2):292-300.
67. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(1):44-51.
68. Yanai M, Sekizawa K, Ohrui T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol*. 1992;72(3):1016-23.
69. Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, Liu MC. Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):447-52.

70. Goldin JG, McNitt-Gray MF, Sorenson SM, Johnson TD, Dauphinee B, Kleeerup EC, Tashkin DP, Aberle DR. Airway hyperreactivity: assessment with helical thin-section CT. *Radiology*. 1998;208(2):321-9.
71. King GG, Muller NL, Pare PD. Evaluation of airways in obstructive pulmonary disease using high-resolution computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(3):992-1004.
72. James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139(1):242-6.
73. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(5):1505-10.
74. Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Holgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(1):228-34.
75. Dolhnikoff M, Morin J, Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158 (5 Pt 1):1607-12.
76. Ludwig MS. Role of Lung Parenchyma. In: P.J. Barnes, M.M. Grustein, A.R. Leff, A.J. Woolcocks. *Asthma*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 1319-34.
77. Ludwig MS, Dreshaj I, Solway J, Munoz A, Ingram RH, Jr. Partitioning of pulmonary resistance during constriction in the dog: effects of volume history. *J Appl Physiol*. 1987;62(2):807-15.
78. Romero PV, Ludwig MS. Maximal methacholine-induced constriction in rabbit lung: interactions between airways and tissue? *J Appl Physiol*. 1991;70(3):1044-50.
79. Dreshaj IA, Martin RJ, Miller MJ, Haxhiu MA. Responses of lung parenchyma and airways to tachykinin peptides in piglets. *J Appl Physiol*. 1994;77(1):147-51.
80. Martins MA, Dolhnikoff M, Zin WA, Saldiva PH. Airway and pulmonary tissue responses to capsaicin in guinea pigs assessed with the alveolar capsule technique. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):466-70.

81. Ingenito EP, Davison B, Fredberg JJ. Tissue resistance in the guinea pig at baseline and during methacholine constriction. *J Appl Physiol*. 1993;75(6):2541-8.
82. Lulich KM, Mitchell HW, Sparrow MP. The cat lung strip as an in vitro preparation of peripheral airways: a comparison of beta-adrenoceptor agonists, autacoids and anaphylactic challenge on the lung strip and trachea. *Br J Pharmacol*. 1976;58(1):71-9.
83. Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 1):1750-7.
84. Fredberg JJ, Bunk D, Ingenito E, Shore SA. Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma. *J Appl Physiol*. 1993;74(3):1387-97.
85. Ludwig MS, Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation [published errata appear in *J Appl Physiol* 1995 Mar;78(3):following table of contents and 1995 Jun;78(6):following table of contents]. *J Appl Physiol*. 1994;77(4):2029-35.
86. Kapanci Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G. "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation-perfusion ratio? Ultrastructural, immunofluorescence, and in vitro studies. *J Cell Biol*. 1974;60(2):375-92.
87. Fukui M, Yasui H, Watanabe K, Fujimoto T, Kakuma T, Yoshida R, Ohi M, Kuno K. Hypoxic contraction of contractile interstitial cells isolated from bovine lung. *Am J Physiol*. 1996;270(6 Pt 1):L962-72.
88. Bertram JF, Goldie RG, Papadimitriou JM, Paterson JW. Correlations between pharmacological responses and structure of human lung parenchyma strips. *Br J Pharmacol*. 1983;80(1):107-14.
89. Salerno FG, Kurosawa H, Eidelman DH, Ludwig MS. Characterization of the anatomical structures involved in the contractile response of the rat lung periphery [published erratum appears in *Br J Pharmacol* 1996 Sep;119(1):183]. *Br J Pharmacol*. 1996;118(3):734-40.

90. Fukushima C, Shimoda T, Matsuse H, Matsuo N, Takao A, Obase Y, Asai S, Ayabe H, Kohno S. In vitro responses to antigen stimulation: comparison between human lung parenchyma resected from asthmatic patients and non-asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999;82(2):179-84.
91. Kaczka DW, Ingenito EP, Suki B, Lutchen KR. Partitioning airway and lung tissue resistances in humans: effects of bronchoconstriction. *J Appl Physiol.* 1997;82(5):1531-41.
92. Kariya ST, Thompson LM, Ingenito EP, Ingram RH, Jr. Effects of lung volume, volume history, and methacholine on lung tissue viscoelasticity. *J Appl Physiol.* 1989;66(2):977-82.
93. Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101(3):386-90.
94. Tanaka H, Hashimoto M, Sahara S, Ohnishi T, Fujii M, Suzuki K, Saikai T, Abe S. Pathological and radiological approach to the small airway disease in asthma: limitation of current corticosteroid therapy. *Allergology International.* 2004;53(1):1-6.
95. Weitzman JB, Kanarek NF, Smialek JE. Medical examiner asthma death autopsies: a distinct subgroup of asthma deaths with implications for public health preventive strategies. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122(8):691-9.
96. Saetta M, Ghezzo H, Kim WD, King M, Angus GE, Wang NS, Cosio MG. Loss of alveolar attachments in smokers. A morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132(4):894-900.
97. Weibel ER, Cruz-Orive LM. Morphometric Methods. In: R.G. Crystal, J.B.e.a. Wests. *The Lung: Scientific Foundations*. Second Edition. Philadelphia: Lippincott - Raven; 1997. p. 333-344.
98. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy* New York: Springer-Verlag & BIOS Scientific Publishers Ltd. 1998.
99. Santos MA, *Asma fatal: caracterização do infiltrado inflamatório em vias aéreas superiores e inferiores*, in *Departamento de Patologia*. 2001, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: São Paulo.

100. Filipovic M, Cekic S. The role of eosinophils in asthma. *Medicine and Biology*. 2001;8(1):6-10.
101. Barnes PJ. Neuropeptides and asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(3 Pt 2):S28-32.
102. Barnes PJ. Is asthma a nervous disease? The Parker B. Francis Lectureship. *Chest*. 1995;107(3 Suppl):119S-125S.
103. Kay AB. Leucocytes in asthma. *Immunol Invest*. 1988;17(8-9):679-705.
104. Sugiura T, Mabuchi K, Ojima-Uchiyama A, Masuzawa Y, Cheng NN, Fukuda T, Makino S, Waku K. Synthesis and action of PAF in human eosinophils. *J Lipid Mediat*. 1992;5(2):151-3.
105. Hoppin FG, Jr. Parenchymal mechanics and asthma. *Chest*. 1995;107(3 Suppl):140S-144S.
106. Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal Alveolar Attachments with Decreased Elastic Fiber Content in Distal Lung in Fatal Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):857-862.
107. Lungarella G, Menegazzi R, Gardi C, Spessotto P, de Santi MM, Bertoincin P, Patriarca P, Calzoni P, Zabucchi G. Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1992;292(1):128-35.
108. Ottolenghi A. The relationship between eosinophilic leukocytes and phospholipase B activity in some rat tissues. *Lipids*. 1970;5(6):531-8.
109. Hibbs MS, Mainardi CL, Kang AH. Type-specific collagen degradation by eosinophils. *Biochem J*. 1982;207(3):621-4.
110. Bochner BS. Cellular adhesion and its antagonism. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(5):581-5.
111. Katoh S, Taniguchi H, Matsubara Y, Matsumoto N, Fukushima K, Kadota J, Matsukura S, Kohno S. Overexpression of CD44 on alveolar eosinophils with high concentrations of soluble CD44 in bronchoalveolar lavage fluid in patients with eosinophilic pneumonia. *Allergy*. 1999;54(12):1286-92.

112. Popper HH, Pailer S, Wurzinger G, Feldner H, Hesse C, Eber E. Expression of adhesion molecules in allergic lung diseases. *Virchows Arch.* 2002;440(2):172-80.
113. Faul JL, Tormey VJ, Leonard C, Burke CM, Farmer J, Horne SJ, Poulter LW. Lung immunopathology in cases of sudden asthma death. *Eur Respir J.* 1997;10(2):301-7.
114. Poutler LW. Central inflammation is more important than peripheral inflammation. *Respir Med.* 1997;91 Suppl A:9-10.
115. Balzar S, Wenzel SE, Chu HW. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. *Eur Respir J.* 2002;20(2):254-9.
116. Martin RJ. Therapeutic significance of distal airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(2 Suppl):S447-60.
117. Boulet LP. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small-airways disease in asthma. Pros. *Eur Respir J.* 2002;20(2):247-8.
118. James A, Carroll N. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small-airways disease in asthma. Cons. *Eur Respir J.* 2002;20(2):249-51.
119. Chu HW, Martin RJ. Are eosinophils still important in asthma? *Clin Exp Allergy.* 2001;31(4):525-8.
120. 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.
121. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323(15):1033-9.
122. Adelroth E, Rosenhall L, Johansson SA, Linden M, Venge P. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. The effects of antiasthmatic treatment with budesonide or terbutaline. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(1):91-9.

123. Vrugt B, Wilson S, Underwood J, Bron A, de Bruyn R, Bradding P, Holgate ST, Djukanovic R, Aalbers R. Mucosal inflammation in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J*. 1999;13(6):1245-52.
124. Gleich GJ, Motojima S, Frigas E, Kephart GM, Fujisawa T, Kravis LP. The eosinophilic leukocyte and the pathology of fatal bronchial asthma: evidence for pathologic heterogeneity. *J Allergy Clin Immunol*. 1987;80(3 Pt 2):412-5.
125. Montefort S, Gratziau C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST, Carroll MP. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest*. 1994;93(4):1411-21.
126. Ainslie MP, McNulty CA, Huynh T, Symon FA, Wardlaw AJ. Characterisation of adhesion receptors mediating lymphocyte adhesion to bronchial endothelium provides evidence for a distinct lung homing pathway. *Thorax*. 2002;57(12):1054-9.
127. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis. In: M. Schwartz, T.E. Kings. *Interstitial lung disease*. Hamilton, ON, Canada: Decker; 1998. p. 393-422.
128. Navarro C, Mendoza F, Barrera L, Segura-Valdez L, Gaxiola M, Paramo I, Selman M. Up-regulation of L-selectin and E-selectin in hypersensitivity pneumonitis. *Chest*. 2002;121(2):354-60.
129. Krug N, Tschernig T, Holgate S, Pabst R. How do lymphocytes get into the asthmatic airways? Lymphocyte traffic into and within the lung in asthma. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(1):10-8.
130. Corrigan CJ, Hamid Q, North J, Barkans J, Moqbel R, Durham S, Gemou-Engesaeth V, Kay AB. Peripheral blood CD4 but not CD8 t-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern: effect of glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(5):567-78.
131. 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.

132. 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.
133. Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(6 Pt 1):1407-13.
134. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;88(4):661-74.
135. 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.
136. 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 asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(5):477-87.
137. 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.
138. Pearlman DS. Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(4 Pt 1):S132-7.
139. Azzawi M, Johnston PW, Majumdar S, Kay AB, Jeffery PK. T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(6):1477-82.



140. Poston RN, Chanez P, Lacoste JY, Litchfield T, Lee TH, Bousquet J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(4 Pt 1):918-21.
141. 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.
142. Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2000;30 Suppl 1:22-7.
143. Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Olivieri D, Oliveri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(3):684-9.
144. Connell JT. Asthmatic deaths. Role of the mast cell. *Jama*. 1971;215(5):769-76.
145. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, Bousquet J. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):403-9.
146. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(4):863-71.
147. Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(5):550-6.
148. Wenzel S. Severe/fatal asthma. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):405S-10S.
149. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkovic R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol*. 2001;167(7):4008-16.
150. Dahlen B, Shute J, Howarth P. Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax*. 1999;54(7):590-6.

151. Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol.* 2001;79(2):149-53.
152. Berger P, Perng DW, Thabrew H, Compton SJ, Cairns JA, McEuen AR, Marthan R, Tunon De Lara JM, Walls AF. Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol.* 2001;91(3):1372-9.
153. Djukanovic R. Asthma: A disease of inflammation and repair. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(2 Pt 2):S522-6.
154. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(1):L193-201.
155. Messer JW, Peters GA, Bennett WA. Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma. *Dis Chest.* 1960;38:616-24.
156. Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Mentzer SJ, Sugarbaker DJ, Doerschuk CM, Drazen JM. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(2):565-72.
157. Leach C. Targeting inhaled steroids. *Int J Clin Pract Suppl.* 1998;96:23-7.
158. Leach CL, Davidson PJ, Boudreau RJ. Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *Eur Respir J.* 1998;12(6):1346-53.
159. Goldin JG, Tashkin DP, Kleerup EC, Greaser LE, Haywood UM, Sayre JW, Simmons MD, Suttorp M, Colice GL, Vanden Burgt JA, Aberle DR. Comparative effects of hydrofluoroalkane and chlorofluorocarbon beclomethasone dipropionate inhalation on small airways: assessment with functional helical thin-section computed tomography. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):S258-67.

## RESUMO

Simões, S.M. Distribuição do infiltrado inflamatório em parênquima pulmonar periférico e vias aéreas na asma fatal [tese]. São Paulo: faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

A distribuição da inflamação nas vias aéreas de pacientes asmáticos tem sido intensamente investigada. A inflamação na asma está presente tanto em vias aéreas grandes como pequenas, tendo sido demonstrado que a inflamação do pulmão distal pode contribuir para a fisiopatologia da doença. Apesar das evidências de que a inflamação na asma não está restrita às vias aéreas intrapulmonares, pouco se sabe sobre a distribuição celular em outros compartimentos pulmonares e sua relação com as vias aéreas. O presente estudo teve como objetivo mapear o processo inflamatório na asma fatal, das grandes vias aéreas até o pulmão distal, e compará-lo com controles não asmáticos. Imuno-histoquímica, análise de imagem e morfometria foram utilizadas para determinar a densidade de eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos nas áreas interna e externa de vias aéreas grandes e pequenas e no parênquima pulmonar peribronquiolar e distal de 20 pacientes que morreram por asma e 10 controles. A densidade de eosinófilos foi significativamente maior em todas as regiões das vias aéreas e do parênquima pulmonar de asmáticos comparados aos controles ( $p < 0,02$ ). Nos pacientes asmáticos, a densidade eosinofílica nas duas regiões do parênquima se mostrou menor do que a das vias aéreas, porém só foi evidenciada diferença significativa entre a área interna da via aérea grande e o parênquima distal ( $p < 0,01$ ). A densidade dos mastócitos foi maior na área externa das vias aéreas de grande e de pequeno calibre, bem como no parênquima peribronquiolar dos asmáticos comparados aos controles ( $p < 0,04$ ). A área externa da via aérea pequena dos casos de asma fatal foi a região mais rica em mastócitos, sendo a densidade celular significativamente maior quando comparada à área externa das vias aéreas grandes ( $p < 0,01$ ) e às duas regiões do parênquima pulmonar periférico ( $p < 0,001$ ). Linfócitos CD3+ e CD20+ apresentaram maior densidade nas duas regiões das vias aéreas grandes e na área externa da via aérea pequena, enquanto o linfócito CD4+ apresentou aumento significativo na área externa das duas vias aéreas de asmáticos comparados a controles ( $p < 0,05$ ). Maior densidade de neutrófilos foi observada apenas no parênquima peribronquiolar de asmáticos ( $p = 0,029$ ). Concluímos que 1) o infiltrado eosinofílico apresenta uma distribuição difusa na asma fatal desde as vias aéreas centrais até o parênquima pulmonar periférico; 2) a área externa das vias aéreas grandes e pequenas é a região que melhor distingue o asmático do controle através do aumento de densidade de diferentes tipos celulares; 3) o parênquima pulmonar peribronquiolar participa do processo inflamatório na asma fatal com aumento de mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Nossos resultados fornecem novas evidências para a participação do pulmão distal na fisiopatologia da asma fatal.