Ana Lúcia Garippo

Estudo morfométrico da imunidade celular e remodelamento no eixo pré-acinar na indução do colágeno tipo V em um modelo de bronquiolite obliterante

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

Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

**SÃO PAULO
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

© reprodução autorizada pelo autor

Garippo, Ana Lúcia

Estudo morfométrico da imunidade celular e remodelamento no eixo pré-acinar na indução do colágeno tipo V em um modelo de bronquiolite obliterante / Ana Lúcia Garippo. – São Paulo, 2006.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração - Fisopatologia Experimental.

Orientadora - Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

Descritores: 1.Bronquiolite Obliterante/imunologia. 2.Bronquiolite obliterante/induzido quimicamente 3. Imunização 4. Colágeno tipo V/imunologia 5.Imunosupressão.

USP/FM/SBD -.343/06

Dedico este trabalho a esta grande 'família', ponto de partida e alicerce para nossa formação humana. Família: a do berço, do estudo, do trabalho, dos amigos, dos que nos perseguem e caluniam, dos mestres e dos superiores, dos que nos amam e ensinam o caminho do bem. Minha vida é compartilhada com todas essas pessoas, nas conquistas e provações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Fonte Eterna de Sabedoria e Luz.

Aos meus pais que em extrema simplicidade souberam ensinar a mim e aos meus irmãos a honrar o trabalho bendito, valorizar nossos estudos e os benefícios da retidão de caráter. Pela boa vontade em nos oferecer o melhor.

Aos meus irmãos Angela e Geraldo pelo companheirismo e pela presença constantes, mesmo à distância e intensos compromissos pessoais e profissionais.

Aos meus sobrinhos Lucas e Gabriel, pela leveza e sabedoria inatas que favorecem para que a vida seja melhor.

À Prof^a. Dra. Vera Luiza Capelozzi, minha orientadora, pela demonstração de força, mesmo sob as intempéries que surgiram ao longo deste trabalho. Por demonstrar ser uma pesquisadora experiente e dedicada aos casos de pacientes que chegam às suas mãos. Pelo interesse em que nossos trabalhos (alunos de pós ou iniciação científica) fossem publicados e assim nos conduzindo no caminho da ciência. Por ter me tratado muitas vezes como filha, confiando suas preocupações e expectativas, ultrapassando os limites propostos por este estudo. Muito obrigada por tudo!

Aos professores e profissionais da Disciplina de Reumatologia da Faculdade e Medicina da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Natalino Hiajime Yoshinari, Dra Walcy Rosolia Teodoro, Dra. Ana Paula Velosa, Cleonice Bueno, Francisca de Souza, Romildo Dias Lima, Antonio dos Santos Filho, Luciano Lopes, Cristiane Karla de Souza e Mariana Spolidoro, pelo apoio, dedicação e experiência apresentados na elaboração e concretização deste estudo. Antes de tudo foram amigos, companheiros e profissionais competentes. Rimos muito e fomos fazendo pesquisa, trocando experiências, técnicas, e aprendendo novos métodos. Muito obrigada pela confiança e auxílio.

Aos meus amigos patologistas, Dr. Edwin Roger Parra e Dr. Alexandre Ab`Saber, agradeço o auxílio na padronização do modelo e o estímulos constantes. Com paciência e questionamentos profundos sobre o homem integral, fomos elaborando nossos trabalhos.

Às amigas Angela Batista dos Santos, Maria Cristina Medeiros, Ana Paula Maria da Silva e Weluma Souza pela presença e estímulos contínuos, elementos fundamentais para que continuemos essa nossa empreitada. Obrigada!

Às experientes profissionais do laboratório de histologia do Departamento de Patologia: Cássia, Celina, Rosely, Kely, Keila, Ady e Marina. Agradeço o respeito, a dedicação e eficiência no trabalho executado na confecção das lâminas.

Aos profissionais do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial Maria Eli, Lenira, Ludovina Vera e Zilá que tanto me auxiliaram nas questões burocráticas.

À Profa. Dra. Adenir Perini e a Dra. Dolores Helena Rodrigues Ferreira Rivero pela orientação no manuseio dos camundongos para o método nasal. Agradeço a experiência e o desprendimento ao ensinar. Obrigada.

Às Dra. Beatriz Stolf e Dra. Márcia Terluk pela colaboração na revisão deste trabalho. Algumas horas foram dispensadas, mas gentilmente trouxeram suas contribuições. Obrigada pela atenção, delicadeza, competência e cooperação e acima de tudo pela amizade. Muito obrigada!

Aos profissionais da Pós-Graduação: Iara, Goreth, Sonia, Tânia e Fátima, pela atenção, esclarecimentos nas dificuldades burocráticas, e acima de tudo pela compreensão e incentivos constantes.

Aos profissionais do Laboratório de Emergências Clínicas (LIM 51), Prof. Dr. Heraldo, Suely, Fátima, Luís, Denise; Museu/Imagem (Departamento de Patologia) Ana Luiza e Reginaldo, pela receptividade e auxílio na utilização do analisador de imagens. Passei muitas horas com vocês e não mesurei somente bronquíolos, células inflamatórias e densidade de colágenos, mas o quanto vocês são competentes, diferentes, divergentes e sábios.

Aos camundongos. Fui muitas vezes levada a questionamentos profundos; acho que perceberam, pois dificultaram meu trabalho em momentos cruciais (para eles!). Procurei ser objetiva e gerar grupos de estudo que respondessem nossas investigações. Entretanto muitas ainda ficaram para serem sanadas, em trabalhos futuros e por outros colegas.

Agradeço a esta Faculdade de Medicina pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Ampliei meus limites profissionais e reafirmei que devemos caminhar juntos, mas confiando em nossos próprios passos, mesmo que pequenos. Observei a angústia pelo poder, e ainda me questiono o quanto isso pode nos cegar, pois muitas vezes não conseguimos enxergar se o que realmente queremos é o melhor para nossas vidas. Ficaram as relações humanas e com elas nosso crescimento individual, um pouco mais difícil de ser mensurado...

EPÍGRAFE

*A virtude da nossa geração é a atividade intelectual;
seu vício é a indiferença moral.*

Lázaro, citado por Kardec em 1863.

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 Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli 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

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de formulas

Lista de figuras

lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivos gerais	3
2.1.1	Objetivos específicos	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1	Aspectos da normalidade do pulmão	5
3.1.1	Arquitetura do pulmão normal	5
3.1.2	Arquitetura bronquiolar	6
3.2	Aparelho respiratório do camundongo	9
3.3	O sistema imune da mucosa	11
3.4	Lesão celular endotelial e epitelial	13
3.5	Alterações patológicas nos bronquíolos	16
3.5.1	Classificação dos grupos histopatológicos bronquiolar	18
3.5.1.1	Bronquiolite celular	19
3.5.1.2	Bronquiolite folicular	19
3.5.1.3	Bronquiolite respiratória	19
3.5.1.4	Bronquiolite com polipo inflamatórios	20
3.5.1.5	Bronquiolite constritiva ou cicatricial	21
3.5.2	Bronquiolite pós-transplante	22
3.5.2.1	Lesão aloimune	25
3.5.2.2	Lesão não-alloimune	26
3.5.3	A BO na infância	28
3.6	Colágenos no pulmão	29
3.7	Mucosas e tolerância	33
3.7.1	Imunização com colágenos	36
3.7.2	Tolerância e o trato respiratório	39
3.8	Modelos experimentais	41

3.8.1 A escolha do modelo	42
3.8.2 Solução salina hipotônica	44
3.8.3 Administração do prednisona	45
3.8.4 Imunização via nasal pelo colágeno tipo V	48
3.8.5 A escolha dos anticorpos	48
4 MÉTODOS	56
4.1 Estudo	56
4.2 Protocolos dos animais	56
4.2.1 Primeiro Protocolo: Modelo da BO via nasal	57
4.2.1.1 Experimento I. Estabelecer o Modelo da BO via nasal	57
4.2.1.2 Experimento II. Indução da BO	58
4.2.2 Segundo Protocolo: Tolerância Preventiva	59
4.2.3 Terceiro Protocolo: Tratamento prednisona vs tolerância	60
4.3 Protocolo de Sedação	61
4.4 Preparação do colágeno tipo V	62
4.4.1 Análise da pureza do antígeno	63
4.4.2 Transferência de proteínas para filtro de nitrocelulose	64
4.4.3 "Immunoblot"	64
4.5 Classificação do diagnóstico histológico	65
4.6 Estudo imunohistoquímico	65
4.6.1 Preparação das lâminas	65
4.6.2 Hidratação e bloqueios	66
4.6.3 Exposição e recuperação dos sítios antigênicos	66
4.6.4 Incubação com os anticorpos	67
4.7 Determinação dos anticorpos anti-colágenos I, III e V por ELISA	68
4.7.1 Sensibilização das placas e bloqueios	68
4.7.2 Diluição dos soros	68
4.7.3 Revelação e leitura	69
4.8 Morfometria	69
4.8.1 Descrição do analisador de imagens	70
4.8.2 Estudo qualitativo do remodelamento broncovascular	71
4.8.3 Deposição das fibras colágenas	71
4.8.4 Estudo quantitativo das células inflamatórias	72
4.9 Análise Estatística	72

5	RESULTADOS	73
5.1	Modelo da BO	73
5.1.1	Análise Qualitativa	73
5.1.2	Análise Quantitativa	74
5.2	Tolerância Preventiva	81
5.2.1	Análise Qualitativa	81
5.2.2	Análise Quantitativa	82
5.3	Tratamento comparativo: prednisona vs tolerância	90
5.3.1	Análise Qualitativa	90
5.3.2	Análise Quantitativa	90
6	DISCUSSÃO	99
6.1	Limitações deste estudo	99
6.1.1	Marcadores imunohistoquímicos	99
6.1.2	Testes sorológicos	100
6.1.3	Lavado bronco-alveolar	100
6.1.4	Cultura de células	101
6.1.5	Teste de função pulmonar	101
6.1.6	Biologia Molecular	102
6.2	Remodelamento pulmonar e colágenos	102
6.2.1	Remodelamento vascular	105
6.3	Imunização e linfócitos	105
6.4	Discussão dos resultados	108
6.4.1	Escolha das técnicas dos marcadores para quantificação	108
6.4.2	Marcadores celulares na BO	108
6.5	Índice de expressão dos marcadores na BO	111
6.5.1	Protocolo 1. Modelo da BO	111
6.5.2	Protocolo 2. Tolerância Preventiva	113
6.5.3	Protocolo 3. Prednisona vs tolerância	115
6.6	A BO e a tolerância	116
6.7	Tolerância e a sorologia para colágenos	121
7	CONCLUSÕES	122
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
	Apêndice	

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABN	<i>Associação Brasileira de Normas Técnicas</i>
AC	<i>Antes de Cristo</i>
ADN	<i>Adenovírus</i>
AFIP	<i>Armed Forces Institute of Pathology</i> <i>(Instituto de Patologia das Forças Armadas)</i>
ANOVA	<i>Análise de variância</i>
APCs	<i>Células apresentadoras de antígenos</i>
APS	<i>persulfato de amônio</i>
AT	<i>Artéria terminal</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i> <i>(Sociedade Americana Torácica)</i>
AR	<i>Artrite Reumatóide</i>
BALB-c	<i>Linhagem isogênica de camundongo</i>
BALT	<i>Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i> <i>(Tecido linfóide associado aos brônquios)</i>
BO	<i>Bronquiolite Obliterante</i>
BO+ctV	<i>Animal que recebeu uma única instilação de HNO₃ e imunização via nasal pelo colágeno tipo V</i>
BO+pr	<i>Animal que recebeu uma única instilação de HNO₃ e tratamento com prednisona</i>
BSA	<i>Soro de albumina bovina</i>
BT	<i>Bronquíolo terminal</i>
Cap.	<i>Capítulo</i>
CD3	<i>Receptor para um “pan” de linfócitos T</i>
CD4	<i>Receptor para linfócitos T helper</i>
CD8	<i>Receptor para linfócitos T citotóxico/supressor</i>
CD20	<i>Receptor para células B</i>
CD68	<i>Receptor para macrófagos</i>
CMV	<i>Citomegalovírus</i>
CNPq	<i>Conselho Nacional de Pesquisa</i>
controle	<i>Animal normal</i>
COP	<i>Pneumonia organizante criptogênica</i>
ctV	<i>Imunização via nasal pelo colágeno tipo V</i>
ctV+BO	<i>Animal que foi imunizado via nasal pelo colágeno tipo V preventivamente</i>
DAB	<i>3-3'- diaminobenzamidina</i>

<i>DDTC</i>	<i>Doenças do tecido conjuntivo</i>
<i>Dr.</i>	<i>Doutor</i>
<i>ed.</i>	<i>Edição</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
<i>ERS</i>	<i>European Respiratory Society</i> <i>(Sociedade Europeia Respiratória)</i>
<i>ESP</i>	<i>Esclerose Sistêmica Periférica</i>
<i>Et. al.</i>	<i>e colaboradores</i>
<i>ex.</i>	<i>Exemplo</i>
<i>FMUSP</i>	<i>Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo</i>
<i>fig.</i>	<i>figura</i>
<i>HC</i>	<i>Hospital das Clínicas</i>
<i>HE</i>	<i>Hematoxilina-Eosina</i>
<i>HLA</i>	<i>Human leukocyte antigens</i>
<i>HTT</i>	<i>Hipersensibilidade do tipo tardia</i>
<i>h</i>	<i>hora</i>
<i>ICB</i>	<i>Instituto de Ciências Biomédicas</i>
<i>IF</i>	<i>Imunofluorescência</i>
<i>IFN-?</i>	<i>Interferom gama, citocina</i>
<i>IHQ</i>	<i>Imunohistoquímica</i>
<i>IL</i>	<i>Interleucina</i>
<i>LIM</i>	<i>Laboratório de Investigação Médica</i>
<i>MALT</i>	<i>Malt Associated Lymphoid Tissue</i> <i>(Tecido linfóide associados à mucosa)</i>
<i>MEC</i>	<i>Matriz extracelular</i>
<i>MHC</i>	<i>Complexo de histocompatibilidade maior</i>
<i>min.</i>	<i>minuto</i>
<i>M</i>	<i>molar</i>
<i>MMP</i>	<i>Metaloprotease</i>
<i>NALT</i>	<i>Tecido linfóide associado à mucosa nasal</i>
<i>NF</i>	<i>fator de necrose</i>
<i>n</i>	<i>número</i>
<i>nM</i>	<i>Nano molar</i>
<i>OP</i>	<i>Pneumonia organizante, antiga BOOP (bronquiolite obliterante com pneumonia em organização)</i>
<i>p.</i>	<i>página</i>
<i>PBS</i>	<i>Tampão Fosfato de Sódio</i>
<i>PMSF</i>	<i>Fluoreto de fenilmetanossulfonila</i>

<i>prof.</i>	<i>professor (a)</i>
<i>salina</i>	<i>Animal que recebeu instilação de NaCl 0,9% via nasal</i>
<i>RGE</i>	<i>Disfunção por refluxo gástrico-esofágico</i>
<i>rpm</i>	<i>Rotações por minuto</i>
<i>RSV</i>	<i>Respiratory Sincicial Vírus (vírus Respiratório Sincicial)</i>
<i>SDS</i>	<i>dodecil sulfato de sódio</i>
<i>TCRs</i>	<i>Receptores de células T</i>
<i>TEMED</i>	<i>N, N, N, N-tetrametiletilenodiamina</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Transforming growth factor - beta</i> <i>(Fator de crescimento de transformação)</i>
<i>T_H</i>	<i>Linfócitos T helper</i>
<i>TH</i>	<i>Tripla hélice</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)</i>
<i>T_{reg}</i>	<i>Linfócitos T reguladores</i>
<i>TCR</i>	<i>Complexo Receptor de Células T</i>
<i>Th1</i>	<i>Resposta T helper 1</i>
<i>Th2</i>	<i>Resposta T helper 2</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Fator de Necrose Tumoral- alfa</i>
<i>TRIS</i>	<i>Tris (hidrometil) aminometano</i>
<i>vol</i>	<i>volume</i>
<i>vs</i>	<i>versus</i>

Lista de Símbolos

$^{\circ}\text{C}$	<i>grau Celsius</i>
$>$	<i>maior que</i>
$<$	<i>menor que</i>
$\pm$	<i>mais ou menos</i>
μl	<i>Microlitro</i>
μm	<i>Micrômetro</i>
μm^2	<i>micrômetro quadrado</i>
$\%$	<i>Porcentagem</i>
P	<i>Significância</i>

Lista de Fórmulas

COOH	<i>Peptídeo carboxi terminal</i>
HNO_3	<i>Ácido nítrico</i>
H_2O_2	<i>Água Oxigenada</i>
NH_2	<i>Peptídeo amino terminal</i>
NH_3	<i>Amônia anidra</i>
NO_2	<i>Dióxido de nitrogênio</i>
COOH	<i>Peptídeo carboxi terminal</i>

Lista de Figuras

<i>Figura 1.</i>	<i>Circulação do ar nas vias aéreas</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2.</i>	<i>Processo do remodelamento nas vias aéreas</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3.</i>	<i>Classificação histopatológica no eixo pré-acinar.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 4.</i>	<i>Registro de sobrevivência de pacientes transplantados em 2002</i>	<i>25</i>
<i>Figura 5.</i>	<i>Etiologia da síndrome da Bronquiolite Obliterante</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6.</i>	<i>Estrutura do colágeno</i>	<i>31</i>
<i>Figura 7.</i>	<i>Mecanismos que interferem no estado da tolerância</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8.</i>	<i>Painel do protocolo no modelo de BO. Histologia de pulmão de camundongo BALB/c, H&E, Picrosírius e IHQ (CD3+)</i>	<i>76</i>
<i>Figura 9.</i>	<i>Os gráficos em barras de erros mostram as correlações dos dados quantitativos do diâmetro de BT em μm (A), e a espessura de parede em (B) nas AT no modelo da BO para os grupos: controle, salina e BO.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 10.</i>	<i>Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de colágeno nos BT e AT (A), e a densidade do infiltrado celular (B) no modelo da BO.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 11.</i>	<i>Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade do infiltrado celular estratificado nos três compartimentos BT, AT e BALT (A), e das células CD3+ e CD20+ (B) no modelo da BO.</i>	<i>79</i>
<i>Figura 12.</i>	<i>Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade das células T CD4+ e CD8+ (A), e CD68+ e neutrófilos (B) no modelo da BO.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 13.</i>	<i>Painel do protocolo na imunização preventiva. Histologia de pulmão de camundongo BALB/c. H&E, Picrosírius e IHQ (CD20+)</i>	<i>84</i>
<i>Figura 14.</i>	<i>Os gráficos em barras de erros mostram as correlações dos dados quantitativos do diâmetro em μm (A), e área total em μm^2 (B) nos BT no protocolo da tolerância preventiva</i>	<i>85</i>

Figura 15.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações de espessura de parede do BT (A) e a densidade de colágeno nos BT e AT (B) no protocolo da tolerância preventiva.	86
Figura 16.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de células total (A), e a densidade de células estratificadas nos compartimentos: BT, AT e BALT (B) no protocolo da tolerância preventiva.	87
Figura 17.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de células CD3+ e CD20+ (A), e CD4+ e CD8+ (B), no protocolo da tolerância preventiva.	88
Figura 18.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de CD68 e neutrófilos no protocolo da tolerância preventiva.	89
Figura 19.	Painel do protocolo no tratamento prednisona vs tolerância. Histologia de pulmão de camundongos BALB/c. H&E e Picrosirius e IHQ (CD3+), 400x.	93
Figura 20.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações do diâmetro em μm (A) e área total em μm^2 (B) do BT no protocolo prednisona vs tolerância.	94
Figura 21.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da espessura de parede no BT (A) e densidade de colágeno no BT e AT (B) no protocolo prednisona vs tolerância.	95
Figura 22.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade total de células (A) e estratificadas nos três compartimentos: BT, AT e BALT (B) no protocolo prednisona vs tolerância.	96
Figura 23.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de células CD3+ e CD20+ (A), CD4+ e CD8+ (B) no protocolo prednisona vs tolerância.	97
Figura 24.	Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade das células CD68+ e neutrófilos no protocolo do tratamento prednisona vs tolerância.	98

Lista de Tabelas

<i>Anexo A. Tabela 1</i>	<i>Análise quantitativa do diâmetro, área e espessamento de parede do eixo pré-acinar no modelo da BO</i>	<i>123</i>
<i>Anexo B. Tabela 2</i>	<i>Análise quantitativa da densidade de colágeno e infiltrado celular no eixo pré-acinar no modelo da BO</i>	<i>124</i>
<i>Anexo C. Tabela 3</i>	<i>Análise quantitativa do infiltrado celular no eixo pré-acinar no modelo da BO</i>	<i>125</i>
<i>Anexo D. Tabela 4</i>	<i>Análise quantitativa do diâmetro, área e espessamento de parede do eixo pré-acinar no protocolo da tolerância preventiva</i>	<i>126</i>
<i>Anexo E. Tabela 5</i>	<i>Análise quantitativa da densidade de colágeno e infiltrado celular no eixo pré-acinar no protocolo da tolerância preventiva</i>	<i>127</i>
<i>Anexo F. Tabela 6</i>	<i>Análise quantitativa da densidade do infiltrado celular no eixo pré-acinar no protocolo da tolerância preventiva</i>	<i>128</i>
<i>Anexo G. Tabela 7</i>	<i>Análise quantitativa do diâmetro, área e espessamento de parede do eixo pré-acinar no tratamento prednisona vs tolerância</i>	<i>129</i>
<i>Anexo H. Tabela 8</i>	<i>Análise quantitativa da densidade de colágeno e infiltrado celular nos bronquíolos terminais no tratamento prednisona vs tolerância</i>	<i>128</i>
<i>Anexo I. Tabela 9</i>	<i>Análise quantitativa da densidade do infiltrado celular no eixo pré-acinar no tratamento prednisona vs tolerância</i>	<i>130</i>

Lista de Apêndices

<i>Apêndice 1</i>	<i>Aprovação do Protocolo de Pesquisa no. 073/03. CAPpesq.</i>
<i>Apêndice 2.</i>	<i>Anatomia das pequenas vias aéreas</i>
<i>Apêndice 3.</i>	<i>Síndromes clínicas associadas à histologia do remodelamento bronquiolar com ou sem obliteração</i>
<i>Apêndice 4.</i>	<i>Descrição clínica e patológica associada a patologia bronquiolar</i>
<i>Apêndice 5.</i>	<i>Condições associadas com a bronquiolite obliterante com polipos intraluminal (padrão da pneumonia organizante)</i>
<i>Apêndice 6.</i>	<i>Doença pulmonar difusa com bronquiolite constrictiva</i>
<i>Apêndice 7.</i>	<i>Classificação histológica das lesões bronquiolar segundo o processo inflamatório e fibrótico encontrado nas bronquiolites</i>
<i>Apêndice 8.</i>	<i>Síndromes inclusas sob o termo bronquiolite</i>
<i>Apêndice 9.</i>	<i>Registro Anual da Sociedade Internacional de Transplantes de Coração e Pulmão – Dados 2005</i>
<i>Apêndice 10.</i>	<i>Causas morte após o transplante de pulmão em adultos (mortes de Janeiro 1992 a Junho de 2004)</i>
<i>Apêndice 11.</i>	<i>Agentes Responsáveis pela Bronquiolite Constrictiva Pós-Infecciosa</i>
<i>Apêndice 12.</i>	<i>“Immunobloting</i>
<i>Apêndice 13.</i>	<i>Trabalhos Publicados</i>

RESUMO

GARIPPO AL. Estudo morfométrico da imunidade celular e remodelamento no eixo pré-acinar na indução do colágeno tipo V em um modelo de bronquiolite obliterante [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006. 147p.

A minoria dos pacientes em processo de remodelamento pulmonar por bronquiolite obliterante (BO) responde a corticosteróides. Nos propusemos assim, a avaliar a importância da tolerância gerada pela imunização via nasal pelo colágeno tipo V (ctV) como uma opção no tratamento da BO. Através da análise morfométrica, mensuramos as dimensões, a densidade de colágeno e infiltrado celular no eixo pré-acinar visando o entendimento na patogênese da BO. Aplicamos essa metodologia a três protocolos: primeiro, o estabelecimento do modelo da BO em camundongos BALB/c. Segundo, a tolerância preventiva a BO. Terceiro, comparar os tratamentos prednisona vs tolerância após a BO já estabelecida. Oito semanas após uma única instilação de HNO₃-nasal, as mudanças pulmonares foram caracterizadas pela distorção do lúmen, perda da barreira epitelial, redução ou total obliteração do lúmen do bronquíolo terminal e aumento do espessamento da parede. *Modelo da BO:* A densidade do infiltrado celular total mostrou valores significantes quando comparados os pulmões BO vs salina e controle (P = 0,001 para ambos), com maior evidência a densidade macrófagos nos pulmões controle vs BO e salina (P = 0,01 e P = 0,04, respectivamente). *Tolerância preventiva:* A densidade de CD3+ mostrou diminuição significativa quando comparado ao estágio intermediário da doença nos pulmões BO vs BO+ctV e controle (P = 0,001 e P = 0,002, respectivamente). Houve também diminuição estatística da densidade de células CD20+ quando comparados os pulmões BO vs ctv+BO, BO+ctV, e controle (P = 0,008, P = 0,004 e P = 0,001). *Prednisona vs tolerância:* A densidade total de células diminuiu drasticamente quando comparados os pulmões BO vs BO+ctV e controle (P = 0,003 e P = 0,001, respectivamente). As células CD3+ mostraram diminuição quando comparados os pulmões BO vs BO+pr, BO+ctV e controle (P = 0,03, P = 0,03 e P = 0,05, respectivamente). Houve também diminuição das células CD20+ e CD4+ quando comparados os pulmões BO vs BO+ctV e controle (P = 0,006 e P = 0,004, respectivamente) e (P = 0,001 para ambos). A histoarquitetura e a densidade de células dos pulmões BO+ctV se assemelharam ao pulmões controle. A tolerância pelo ctV comparada com o prednisona, mostrou marcante diminuição da deposição de colágeno e infiltrado celular no eixo pré-acinar. Nossos resultados indicam que o ctV pode atuar como um supressor da resposta imune. Concluímos, portanto, que a morfometria foi um método apropriado para relatar o espectro de mudanças histológicas no modelo de BO proposto.

Descritores: 1.Bronquiolite Obliterante/imunologia. 2.Bronquiolite obliterante/induzido quimicamente 3. Imunização 4. Colágeno tipo V/imunologia 5.Imunosupressão.

SUMMARY

GARIPPO AL. Morphometric study of immune cellular and pre-acinar axis remodeling by type V collagen induction on bronchiolite obliterans model [Thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2006. 147p.

A minority of patients with remodeling process of lungs following bronchiolite obliterante (BO) responds to corticosteroids. So, we sought to validate the importance of type V collagen (tVc) tolerance from immunization as option in BO model treatment. Throught of morphometric analyses, we have mensured for the dimensions, the collagen and cell infiltration density on pre-acinar axis, target the understand of BO pathogenesis. We applied for tree protocols: First, the establishment of BO model on BALB/c mice. Second, preventive tolerance to BO. Third, prednisone treatment vs tolerance, after BO established. Eight weeks after a single HNO₃- nasal instillation, lung changes were characterized by lumen distortion, epithelial layer folding, reduction or total obliteration of terminal bronchiole lumen, and wall thickness increase. The morphological changes coincide with the measurement difference in the study for the tree protocols established. *BO model:* The total density of immune cells showed stasticaly significance when was compared BO vs saline and control lungs (P = 0.001 for both), more evidence to macrophage on control vs BO and saline lungs (P = 0.01 and P = 0.04, respectevly). *Preventive tolerance:* The CD3+ density showed a decreased stasticaly significance in lower BO vs BO+tVc and control lungs (P = 0.001 and P = 0.002, respectevly). Also the CD20+ density was decreased when was compared BO vs tVc+BO, BO+tVc and control (P = 0.008, P = 0.004 and P = 0.001). *Prednisone vs tolerance:* The total density of immune cells was decreased drastically when was compared BO vs BO+tVc and control lungs (P = 0.003 and P = 0.001, respetevely). These cells were CD3+ when was compared BO vs BO+pr, BO+tVc and control lungs (P = 0.03, P = 0.03 and P = 0.05, respectevly); Also CD20+ cells and CD4+ were decreased when was compared BO vs BO+tVc and conmtrol lungs (P = 0.006 and P = 0.004, respectevly) and (P = 0.001, for both). The histoarchitetur from BO+tVc and immune cells as simmilar to control lungs. The tolerance with tVc when was compared to prednisona, showed us a decreased of collagen and immune cell density in pre-acinar axis. Our results indicating that tVc may acts as a supressor in inflammatory process in bronchiolar remodeling. We concluded that method morphometric was effective for related us the spectrum of histologic changes in BO model propose. Ours results indicating that induction of tVc acts in suppression of the immune response. We conclude that morphometric analise was a apropriated for related the spectrum of histologic changes for propose BO model.

Keywords: 1. Bronchiolitis obliterans/immunology 2. Bronchiolitis obliterans/chemically induced 3. Immunization 4. Collagen Type V Collagen/immunology 5. Immunesuppression.

1. INTRODUÇÃO

Pela escassez de amostras, frequência e gravidade da entidade “bronquiolite obliterante” (BO) os modelos induzidos conferem orientações sobre a seqüência dos eventos relacionados à patologia, como o início e evolução da doença, possibilitando avaliação dos eventos e prognósticos, além da intervenção terapêutica ou interrupção do processo fibrótico e possível melhora na função pulmonar¹.

Segundo Talmadge E King Jr, em 2004 ², a BO é morfológicamente definida como uma lesão inflamatória não específica que primariamente afeta as pequenas vias aéreas, estendendo-se a seguir ao interstício axial e septal, e clinicamente pela heterogeneidade morfológica de lesões, que resultam na limitação das provas de função pulmonar. A BO tem se destacado na literatura pela abrangência dos aspectos morfológicos e as inúmeras entidades clínicas associadas ao remodelamento das pequenas vias aéreas ³.

A patogenia da bronquiolite é um dos mecanismos mais bem estabelecidos, e em termos gerais, os eventos são desencadeados pela agressão ao epitélio respiratório, gerando um processo inflamatório, seguido de reparação por proliferação do tecido de granulação. Dependendo da intensidade do processo reparativo, pode ocorrer estreitamento ou obliteração completa do lúmen bronquiolar. Frequentemente, os alvéolos imediatamente adjacentes às vias aéreas também estão envolvidos.

Diante destas evidências, projetamo-nos à hipótese de um modelo de BO por lesão química induzida via nasal em BALB/c, a fim de estudar a imunossupressão e remodelamento no eixo pré-acinar por imunização via nasal ^{4, 5} pelo colágeno tipo V ^{6, 7} e um possível tratamento comparativo a estratégia usual com prednisona ⁸. O mapeamento da resposta imune-celular, o remodelamento do eixo pré-acinar, e a comparação entre o tratamento convencional com prednisona e a tolerância num modelo de lesão química em camundongos não constam na literatura (Apêndice 1).

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais:

A presente investigação teve por objetivo primário estudar o efeito da imunização via nasal pelo colágeno tipo V sobre um modelo da bronquiolite obliterante induzida por lesão química via nasal avaliando o remodelamento no eixo pré-acinar e a resposta imunológica.

2.1.1 - Objetivos Específicos:

Avaliar a relação do infiltrado celular e do remodelamento no eixo pré-acinar na bronquiolite obliterante e o impacto da tolerância gerada pela imunização via nasal pelo colágeno tipo V e do tratamento com prednisona nos camundongos BALB/c através da abordagem dos seguintes aspectos:

- a) Estabelecer o modelo da bronquiolite obliterante por lesão química através do HNO_3 instilado via nasal em camundongos BALB/c.
- b) Quantificar por morfometria das dimensões, a densidade do infiltrado celular e a deposição de fibras colágenas no eixo pré-acinar em todos os grupos do estudo, comparando:
 - b1) Os pulmões controles aos que foram tolerados preventivamente à indução da bronquiolite obliterante.
 - b2) A tolerância e o tratamento com prednisona nos camundongos com a bronquiolite obliterante já estabelecida.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos da normalidade do pulmão

Nossos pulmões podem ser descritos como o sítio de trocas gasosas, composto por uma histoarquitetura delicada e grande especialização celular, o que permite interação entre os meios externo e interno ⁹.

3.1.1- Arquitetura do pulmão normal

A árvore traqueobrônquica é composta pela traquéia, brônquios primários, brônquios intrapulmonares, bronquíolos terminais e ácino pulmonar que compreende: bronquíolos respiratórios, ducto, saco e alvéolos (Apêndice 2).

As vias aéreas foram, portanto, anatomicamente e funcionalmente desenhadas para proteger a região alveolar contra substâncias inaladas, e o transporte mucociliar é um dos mecanismos mais importante desta proteção. O epitélio que reveste as vias aéreas superiores é descrito como pseudo-estrafítico cilíndrico ciliado, onde vários tipos de células podem ser identificados, como veremos a seguir ¹⁰.

3.1.2- Arquitetura bronquiolar

A circulação na via aérea é dividida em “zona condutiva”, “zona transitória e respiratória” ¹¹. Pertence a zona condutiva: traquéia, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais. Histologicamente, os brônquios tornam-se bronquíolos ao perderem a cartilagem e as glândulas mucosas da parede, sendo então chamados de bronquíolos membranosos. Bronquíolos são as partes distais das vias aéreas dos brônquios intrapulmonares: bronquíolo terminal, no começo da área de trocas gasosas e o bronquíolo respiratório que tem sua parede formada por elementos de troca gasosa. Os bronquíolos têm sua parede formada, respectivamente, da luz até a adventícia, por epitélio, membrana basal e uma fina lâmina própria, camada elástica, camada de músculo liso e tecido conjuntivo axial que se conecta aos alvéolos adjacentes e ao interstício perivascular. Em condições inflamatórias observa-se a presença de estruturas linfóides ao longo das pequenas vias aéreas conhecidas como tecido linfóide associado aos brônquios (BALT).

Na zona transitória e respiratória estão contidos os bronquíolos respiratórios, ducto alveolar e saco alveolar, onde são realizadas as trocas gasosas. O local onde alvéolos substituem completamente as células epiteliais bronquiolares recebe o nome de ducto alveolar, que após 2 a 5 divisões origina o saco alveolar, formado por 4 ou mais alvéolos (Figura 1). Esta estrutura é revestida por um epitélio cilíndrico ciliado pseudo-estratificado em sua maior porção, passando a um epitélio cilíndrico ciliado

na porção dos bronquíolos e a um epitélio simples, formado por dois tipos celulares, pneumócitos do tipo I e pneumócitos do tipo II ¹². Toda esta estrutura é mantida por uma rede de macromoléculas que integram a matriz extracelular (MEC).

Figura 1. Circulação do ar nas vias aéreas.

Fonte: Weibel ER. Morphometry of the Lung. ¹³

Os vasos pulmonares, por onde permanentemente passa toda a volemia, atuam como um filtro no nível de suas terminações menos calibrosas, onde impurezas ficam retidas, causando microembolias – sépticas, não sépticas ou neoplásicas, que podem levar a doenças ¹⁰. As artérias pulmonares acompanham as vias aéreas na periferia pulmonar, onde se dividem progressivamente em uma rede capilar ramificada até as paredes alveolares ¹⁴.

Ao nível dos bronquíolos a cartilagem desaparece e a camada muscular se faz fina, perdendo-se completamente ao nível dos alvéolos ^{15, 16}.

O interstício peribroncovascular é constituído por tecido conjuntivo que acompanha vias aéreas e vasos sanguíneos até a unidade respiratória terminal. O espaço intersticial é povoado por elementos celulares diversos, tais como células inflamatórias, fibroblastos, entre outras.

3.2. Aparelho respiratório do camundongo

Segundo Junqueira e Martins, em 1947 ¹⁷, na cavidade nasal distinguimos três regiões: região vestibular, região respiratória e região olfativa. A região vestibular é revestida por epitélio plano estratificado. Sua lâmina própria é formada por tecido conjuntivo frouxo. Anteriormente se faz continua com a pele e posteriormente com a região respiratória. Na região respiratória o epitélio se transforma em cilíndrico pseudo-estratificado ciliado, contendo células caliciformes. Sua lâmina própria é provida de numerosas fibras elásticas e glândulas túbulo-alveolares sero-mucosas onde predominam células do tipo serosa. Na região olfativa há um revestimento neuro-epitelial típico onde distinguimos duas classes de células: células de sustentação e células olfativas.

A epiglote é constituída por uma lâmina cartilaginosa revestida de mucosa. Na mucosa encontramos uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, vasos e nervos ¹⁷.

A laringe apresenta-se como um cilindro constituído por diversas peças cartilagosas revestidas internamente por uma mucosa. Essa mucosa apresenta lâmina própria mais espessa e constituída por tecido conjuntivo frouxo e grande quantidade de glândulas acinosas ramificadas do tipo sero-mucoso. O epitélio é cilíndrico pseudo-estratificado ciliado. A traquéia sob a forma de tubo cartilágíneo é constituída por anéis posteriormente incompletos, revestidos internamente por uma mucosa. Os

anéis são fechados posteriormente por uma faixa de tecido conjuntivo. A mucosa de revestimento apresenta uma lâmina própria constituída por tecido conjuntivo frouxo e glândulas acinosas pouco abundantes, do tipo seroso. O epitélio é cilíndrico pseudo-estratificado ciliado. São freqüentes as células caliciformes intercaladas entre as epiteliais ¹⁷.

Os brônquios principais têm origem na traquéia, possuem estrutura cartilaginosa que só está presente até os brônquios lobulares. Os ratos e camundongos apresentam um lobo à esquerda e quatro lobos à direita, designado cranial, médio caudal e pós-caval ¹⁷.

Os pulmões apresentam origem similar a do homem e à de todos os mamíferos: bronquíolo respiratório, ducto alveolar, átrio, sáculo alveolar e alvéolo pulmonar. O bronquíolo respiratório apresenta-se como um canal revestido por um epitélio cubóide sem cílios, exceto em pequenos alvéolos que aparecem como bolsas na sua parede e que estão revestidos por epitélio respiratório. Externamente a essa camada epitelial encontramos outra constituída por células musculares lisas e fibras elásticas. Esse bronquíolo respiratório termina ramificando-se nos canais ou ductos alveolares, rodeados por uma sucessão de alvéolos. A pleura apresenta-se como uma delgada camada conjuntivo-elástica, rica em capilares. A superfície voltada para a cavidade pleural apresenta-se revestida por epitélio simples ¹⁷.

3.3. O sistema imune da mucosa

O sistema imune pode ser dividido em uma série de compartimentos anatômicos funcionais, dos quais os dois mais importantes são o sistema linfóide periférico, composto pelo baço e pelos linfonodos, e o sistema linfóide de mucosa. As superfícies das mucosas são altamente vulneráveis à infecção e possuem uma gama complexa de mecanismos imunes inatos e adaptativos. Os antígenos solúveis ingeridos também podem induzir tolerância ou supressão ao antígeno específico. Por outro lado, os microrganismos patogênicos induzem uma forte resposta Th1 protetora ¹⁸.

A resposta imune adaptativa é iniciada nos tecidos linfóides periféricos: as células T que encontram o antígeno proliferam e se diferenciam em células efetoras antígeno-específicas, enquanto as células B proliferam e se diferenciam em células secretoras de anticorpos; o entendimento dessa resposta imune específica é um desafio ¹⁹.

O processamento e apresentação de antígenos inalados ocorrem principalmente no BALT, que é elemento fundamental na defesa dos pulmões contra infecções, estimulando células B e T a se tornarem células de memória e efetoras ²⁰. Os linfócitos representam 5 a 10% de todas as células do pulmão normal; a maioria são células T CD4 (40%) e o CD8 (30%). As células T no endotélio representam a etapa inicial do processo inflamatório, exercendo a função de defesa fisiológica das vias aéreas, e impedindo assim o acesso de agentes patológicos externos ao micro-

ambiente alveolar ^{18, 20}. Outros mecanismos de proteção importantes são: tosse; broncoconstrição; secreção de muco e outras substâncias citoprotetoras e transporte mucociliar. Os primeiros alvéolos caracterizam uma grande reserva funcional de defesa, interagem com o sangue e o ar através de uma barreira muito delgada – a barreira alvéolo capilar comporta pneumócitos do tipo I, pneumócitos do tipo II, macrófagos alveolares, e células endoteliais ¹⁰.

Os macrófagos alveolares derivam de monócitos circulantes ou são provenientes dos próprios pulmões. Diferentemente dos macrófagos de outras regiões, os macrófagos alveolares possuem metabolismo aeróbico bastante desenvolvido. Cada alvéolo possui dois ou três macrófagos residentes, que representam a primeira linha de defesa do compartimento alveolar.

Nesse sentido, os pulmões fogem um pouco dos padrões descritos na Patologia Geral, que prescrevem os neutrófilos como as primeiras células presentes nos focos inflamatórios. Nos pulmões, os macrófagos exercem esta função por já estarem no interior dos alvéolos. O espaço intersticial é povoado por elementos celulares diversos, tais como células inflamatórias, fibroblastos, células mioepiteliais, entre outros ¹⁰. Além dos componentes celulares, o interstício alveolar é composto por fibras colágenas e elásticas e proteoglicanos altamente hidrofílicos que possuem a capacidade de absorver o fluido a partir da luz alveolar ou dos capilares alveolares.

3.4. Lesão celular epitelial e endotelial

A lesão das células epiteliais nas vias aéreas distais leva a resposta celular e molecular incluindo: dano celular e morte, recrutando e ativando células inflamatórias como as células B e T, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células dentríticas. A perturbação das funções das células mesenquimais (fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais), interfere eventualmente na degradação MEC e a fibronogênese (Figura 2). Variações na etiologia, localização, intensidade da lesão e genética determinada pela resposta individual, contribuem para o remodelamento do microambiente bronquiolar com limitação eventual do fluxo de ar. Este cenário patogênico pode explicar a complexidade e como as peculiaridades morfológicas, base do diagnóstico e da classificação dessas doenças, podem ser confundidas na observação de diferentes tipos de bronquiolites.

A lesão celular pode ser causada por uma variedade de fatores etiológicos incluindo fatores irritantes, como: produtos virais, drogas e mediadores endógenos produzidos por células inflamatórias nas doenças auto-imunes e em pacientes transplantados (Apêndice 3). A lesão celular pode estar limitada às vias aéreas distais, ou pode também afetar espaços alveolares consideráveis. A regeneração epitelial seguida por morte celular pode ser compensatória, reconstituindo funções pulmonares, ou com a produção excessiva de células epiteliais, metaplasia e fibrose, ou de forma deficiente, com eventual perda bronquiolar. Além desses aspectos, as variações de produção de vários mediadores causam instabilidade endotelial

vascular, expondo o tecido vascular a diversos fatores de crescimento que futuramente podem gerar mudanças patológicas ¹⁹. O endotélio no pulmão normal é caracterizado por significativa heterogeneidade. As principais funções do endotélio pulmonar incluem manutenção do tônus vascular, homeostasia, tráfego de leucócitos, transdução de sinais do lúmen para o tecido vascular, produção de fatores de crescimento, e função de barreira.

A natureza do estímulo inicial que precede os eventos da vasoconstrição e vasoproliferação ainda é desconhecida. A diminuição do lúmen vascular aumenta a resistência pulmonar, conseqüentemente aumentando a pressão vascular pulmonar. O endotélio é sensível a pressão mecânica e responde com o aumento da produção de colágeno na parede dos vasos. A lesão endotelial pode também estimular a produção de mediadores como fator de crescimento para fibroblastos ²¹. Este fenômeno constitui o chamado remodelamento das artérias pulmonares. O resultado da perda da integridade de barreira funcional vascular pode promover proliferação de mediadores que em contato direto com o subendotélio, levam a proliferação de células nas camadas média e adventícia vascular. Assim também a ativação plaquetária, quando em contato com as estruturas sub-endoteliais pode resultar na liberação de vasomediadores e fatores de crescimento.

Figura 2. Processo do remodelamento nas vias aéreas

3.5. Alterações patológicas nos bronquíolos

Os padrões clínico-patológicos associados às alterações patológicas nos bronquíolos estão descritas no Apêndice 4. As condições patológicas dos bronquíolos são variadas e heterogêneas, necessitando de uma abordagem multidisciplinar (clínica/radiológica/patológica). As alterações patológicas nos bronquíolos observadas neste modelo por lesão química foram classificadas como uma bronquiolite celular, na qual foram observadas as presenças de polipo intraluminal, obstrução ao fluxo de ar por completa obstrução do lúmen e redução do tamanho do bronquíolo, assim como a presença de células gigantes, recebendo a denominação de bronquiolite obliterante (BO) ²².

Ryu et al, em 2006 ²³, definem que atualmente há um espectro de desordens mais amplo e heterogêneo do que o até então conhecido. A anormalidade bronquilar é um processo patológico dominante e serve de referência para distingui-la de outras desordens. Assim a lesão do bronquíolo é uma desordem primária, seguida pela lesão das vias aéreas de maior calibre e parênquima ²⁴.

O termo bronquiolite é confuso para os clínicos, assim como para os patologistas. Compreende grupos heterogêneos quanto à etiologia, clínica, e lesões patológicas ²⁴. Em um contexto puramente histológico, a diversidade das lesões dentro de um espectro morfológico está centrada em eventos inflamatórios que abrangem geralmente vias aéreas não cartilaginosas

menores que 2 mm de diâmetro ³.

A bronquiolite é um processo no qual as células inflamatórias e o tecido mesenquimal estão presentes, centrados e ao redor da membrana e/ou bronquíolos respiratórios. Este processo pode se expandir por considerável porção na estrutura do parênquima. Embora uma classificação etiológica seja útil para um especialista quando suspeitar da presença de bronquiolite, a classificação mais conveniente como padrão está baseada nas características histológicas. Geralmente há uma correlação entre as manifestações histológicas, a história natural e a resposta terapêutica ²⁵.

3.5.1- Classificação dos grupos histopatológicos bronquiolar

Asma

Bronquite crônica/enfisema

Bronquiolite Celular

Bronquiolite Folicular, Panbronquiolite Difusa

Bronquiolite Respiratória (fumantes)

*Bronquiolite obliterante com polipo intraluminal
(também chamada bronquiolite obliterante)*

*Bronquiolite Constrictiva (também chamada de
bronquiolite obliterativa e bronquiolite obliterante)*

Doenças das vias aéreas por poeira mineral

Fibrose Peribronquiolar e metaplasia bronquiolar

Nódulos Bronquiolocêntricos

FONTE: [http:// www.afip.org](http://www.afip.org). Atlas of Nontumor Pathology, Series I, Fascicle 2; 2002.

Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract ²².

Perante esta classificação adotada pela AFIP em 2002 ²² serão abordados resumidamente alguns aspectos importantes quanto à nomenclatura e histopatologia da bronquiolite.

3.5.1.1. *Bronquiolite Celular:*

Há a presença de inflamação aguda ou crônica (ou em ambas) e podem estar associadas a bronquiolite obliterante com polipo intraluminal ou a bronquiolite constritiva. Os dois tipos são distintos da bronquiolite celular e merecem especial atenção.

3.5.1.2. *Bronquiolite Folicular:*

Há a presença de folículos linfóides com centro reativo nas vias aéreas. A bronquiolite folicular é representada por hiperplasia do MALT e BALT na via aérea. A bronquiolite folicular coincide em parte com a hiperplasia linfóide difusa/pneumonia intersticial linfóide. A panbronquiolite difusa é um subtipo especial da bronquiolite celular.

3.5.1.3. *Bronquiolite Respiratória:*

É uma reação histológica relacionada a pacientes fumantes. A bronquiolite respiratória apresenta-se como uma reação inflamatória amena do bronquíolo respiratório e ao alvéolo imediatamente adjacente, consistindo

de uma fibrose leve, hipertrofia da musculatura lisa, com proeminente aumento de macrófagos.

O termo BO vem sendo usado para duas lesões histológicas: bronquiolite obliterante com polipo intraluminal e nas alterações presentes na bronquiolite constrictiva. Os dois termos serão discutidos separadamente porque há pouca relação nos padrões clínicos em que estão associadas. Bronquiolite obliterante com polipo intraluminal incluem tipicamente uma reação no parênquima distal chamado simplesmente de “pneumonia organizante” (OP) ou do termo bronquiolite obliterante com pneumonia organizante (BOOP). A classificação pela ATS/ERS das pneumonias intersticiais idiopáticas recomenda usar o termo “pneumonia organizante” para estas reações histológicas ²².

3.5.1.4. *Bronquiolite com polipos inflamatórios ou bronquiolite com polipos intraluminais:*

A pneumonia organizante (OP) ou Bronquiolite obliterante com pneumonia organizante (BOOP) pode ser classificada como criptogênica (idiopática) e secundária ^{22, 26, 27}, Apêndice 5. Não há parâmetros clínicos e radiológicos claros para distingui-las ²⁸. Sendo a forma criptogênica a de maior frequência, melhor prognóstico e resposta à terapia com corticosteróides, e a forma secundária, OP, de pior prognóstico e resistente a corticóides ²⁹. Caracterizada por excessiva proliferação de tecido de

granulação dentro das pequenas vias aéreas (bronquiolite proliferativa) e ductos alveolares associados à inflamação crônica alveolar. Pode ocorrer durante uma crise viral ou na pneumonia por micoplasma e nas doenças hematológicas malignas ²⁷. Polipos inflamatórios projetam-se para dentro do lúmen da membrana de bronquíolos respiratórios. Estes polipos são ricos em ácido mucopolissacarídeo formados por fibroblastos alongados. Os espaços adjacentes podem estar obliterados por estes “plugs” fibroblásticos. Ao redor da parede alveolar usualmente encontra-se um moderado infiltrado inflamatório crônico e macrófago intra-alveolar.

3.5.1.5. *Bronquiolite constrictiva ou cicatricial:*

O termo bronquiolite constrictiva foi usado primeiramente para descrever lesões caracterizadas por fibrose na submucosa e peribronquiolar ⁽³⁾. Há presença de infiltrado inflamatório bronquiolar. Alterações na bronquiolite constrictiva incluem alterações na submucosa e adventícia, redução do lúmen, inflamação crônica (bronquiolite celular crônica), presença de muco, metaplasia epitelial, hipertrofia da musculatura lisa, e completa/irreversível obliteração do lúmen com perda do bronquíolo ⁽²⁰⁾. Uma boa regra é comparar o diâmetro do lúmen bronquiolar ao diâmetro do lúmen da artéria que o acompanha. As alterações patológicas na bronquiolite constrictiva são consideradas irreversíveis. As alterações histológicas da bronquiolite constrictiva podem ser localizadas nos processos inflamatórios, condições essas representadas no Apêndice 6.

Talmadge E King Jr, em 2004 ², define morfologicamente a BO como

uma lesão inflamatória não específica que primariamente afeta as pequenas vias aéreas, estendendo-se a seguir ao interstício axial e septal. Caracterizada pela heterogeneidade morfológica de lesões por inflamação e obstrução dos bronquíolos resultam em progressiva, frequentemente fatal, falência respiratória ³⁰.

Reynaud em 1835, citado por Nicod em 2006 ³¹, foi o primeiro a descrever a BO, contudo Kurland e Michelson em 2005 ³² esclarecem que foi Lange em 1901, quem recebeu o mérito por descrever um caso clínico o qual incluiu um achado patológico, denominou: BO proliferativa com polipo intraluminal.

A dificuldade no diagnostico da BO está na variedade de desordens que correspondem a uma constelação de síndromes clínicas e anormalidades histopatológicas pouco definidas. Os casos são isolados em reduzido número de amostras e fragmentos pequenos, pelo difícil manejo ao biopsiar. Contudo, o aprimoramento das técnicas investigando os vários componentes do micro-ambiente pulmonar e das células inflamatórias tem permitido melhor definição dos padrões (Apêndice 6 e 7) e entidades clínicas associadas (Apêndice 8). Esses padrões estão esquematizados na Figura 3.

Figura 3. Classificação histopatológica no eixo pré-acinar

Fonte: ERS School Postgraduate Course. Bronchiolitis in adults, 2004

3.5.2- Bronquiolite Pós-Transplante -Síndrome da Bronquiolite Obliterante:

O transplante de pulmão potencialmente estende a sobrevida dos pacientes com insuficiência respiratória grave. Infecções e BO são as duas causas de morte seguidas ao transplante ³³. O tempo médio do diagnóstico é de 16 a 20 meses. Na síndrome da BO primeiramente há instalação de uma infecção aguda, secundariamente uma rejeição celular aguda, e em terceiro lugar problemas mecânicos incluindo estenose bronquial e em quarto lugar as circunstâncias dos problemas simples do transplante

pulmonar associados ao pulmão nativo, particularmente a hiperinflação do pulmão nativo no enfisema.

Na patogênese do transplante, o fator chave no desenvolvimento da BO está na lesão do epitélio bronquial e uma resposta fibroproliferativa desregulada. A lesão ao epitélio resulta de ambos mecanismos: aloimune e não-alloimune. Enquanto a rejeição aguda pode ser tratada e revertida, não há tratamento para restaurar a função pulmonar de pacientes que desenvolveram a síndrome da BO.

O Apêndice 9 mostra o registro anual com os números de transplantes de pulmão e pulmão/coração realizados entre 1985 a 2003 apresentado pela Sociedade Internacional de Transplantes de Coração e Pulmão. Dos órgãos sólidos, o pulmão, é o mais rejeitado chegando a menos de 31% de sobrevida em 7 anos como mostra o gráfico na Figura 4. As causas de morte associadas a esta rejeição estão representadas no Apêndice 10. Durante os processos de rejeição e inflamação, esses tecidos sofrem extenso remodelamento, mediados em parte por metaloproteases (MMP) capazes de clivarem as moléculas de colágeno. A lesão isquêmica está associada à expressão de MMP-9, processo pelo qual há exposição de sítios no colágeno tipo V ³⁴, com a ativação de células T e fatores de crescimento ³⁵.

Figura 4. Registro de sobrevida de pacientes transplantados em 2002.

Fonte: Sumpter and Wilkes, 2004 ³⁶

Este processo de rejeição têm origem diversa, mas a mais freqüente decorre delas é a por lesão aloimune, ou seja, do próprio órgão transplantado ou outros fatores agregados ao transplante.

3.5.2.1. Lesão Aloimune:

A rejeição celular aguda seguida do transplante pulmonar ou medula óssea é o fator de risco mais significativo para o desenvolvimento da BO ³⁰, ³⁷. A bronquiolite linfocítica está associada com o desenvolvimento da BO. A presença de anticorpos anti-HLA no início do transplante, resultam em aumento no risco de rejeição aguda e na síndrome da BO ³⁸.

3.5.2.2. Lesão não-aloiune:

A lesão a outras reações está associada com o desenvolvimento de bronquiolite seguida do transplante pulmonar, neste contexto as infecções são criticamente importantes. Quando comparados com outros órgãos sólidos transplantados, o pulmão a ser doado é o único que interage com o meio ambiente. Esta interação leva a uma vulnerabilidade particular para uma variedade de infecções endógenas ou exógenas. Muitos pacientes são colonizados com organismos gram-negativos no início do transplante. Isto os predispõem a uma infecção bacteriana no pulmão transplantado por citocinas pró-inflamatória similares ao perfil da rejeição vascular aguda. As formas virais pós-transplante (Apêndice 11) levam a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias reconhecidas pela importância no remodelamento das vias aéreas.

A infecção por Citomegalovírus (CMV) e comumente a infecção por herpes vírus resultam na infecção pulmonar e posteriormente uma possível perda do órgão transplantado. O CMV está associado com alterações na produção de citocinas e macrófagos alveolares. A infecção por CMV induz a produção precoce de IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 e o fator de crescimento de transformação (TGF- β), similar a rejeição aguda.

A segunda causa potencial de lesão não-aloiune é a disfunção por refluxo gastro-esofágico (RGE), que também esta associada à síndrome da BO no órgão transplantado por refluxo trazido pela tosse e função mucociliar. A lesão epitelial de parte do vago resulta em alteração no

esfíncter gastro-esofágico ³¹. Estes pacientes estão predispostos a recorrentes micro-aspirações. Os pacientes que apresentam refluxo esofágico no estágio final de doenças pulmonares são candidatos em potencial ao transplante pulmonar ³⁹.

Nos processos virais e por outra entidade que não o transplante, também ocorre lesão das células epiteliais, gerando um processo inflamatório agudo ou crônico com proliferação de tecido de granulação na tentativa de reparação, contudo algumas vezes este processo induz fibrose da parede e lúmen, obliterando o lúmen das vias aéreas (Figura 5).

Figura 5. Etiologia da síndrome da Bronquiolite Obliterante

3.5.3- A BO na infância:

Smyth e Openshaw, em 2006 ⁴⁰ mostram que perto de 2-3% de todas as crianças abaixo de 1 ano de vida são admitidas em hospitais com bronquiolite do tipo sazonal. A maioria delas são infectadas por vírus Respiratório Sincicial (RSV) ⁴¹ e Adenovírus (ADN) ⁴², todas com intensa resposta inflamatória nas vias aéreas. Em outros casos pode ocorrer um processo de reversão e cura por reparo. Na criança, a BO é uma condição incomum e tem patogênese pouco compreendida; ocorrendo freqüentemente após um episódio de infecção do trato respiratório inferior por ADN relacionado a bronquiolite aguda grave, e com alto grau de incidência de seqüelas, tais como doença pulmonar crônica, acometendo crianças menores de 2 anos de idade. Outros agentes são: RSV, *Mycoplasma pneumoniae*, *Parainfluenza*, *Bordetella pertussis*, vírus do Sarampo, *Pneumocystis carinii*, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marscecens* e *Legionella*. Algumas condições podem contribuir para a instalação e perpetuação da agressão, como o refluxo gastro-esofágico.

A BO por ADN parece ser mais freqüente em nosso continente que na América do Norte ou Europa ⁴³. Há um quadro com tosse, sibilância, estertores e anormalidades radiográficas (espessamento peribrônquico, bronquiectasia, hiperinsuflação e atelectasia) que permanecem por meses ou anos após infecção aguda das vias respiratórias. O tipo histológico mais freqüente encontrado na população é a BO do tipo constrictiva. A mortalidade e morbidade em crianças são maiores que em adultos acometidos pela BO.

Há poucos dados a respeito da evolução natural e tratamento desta entidade na criança, muito provável pela falta de critérios no diagnóstico. A compreensão e terapêutica da BO na infância podem se beneficiar com o estudo em modelos experimentais.

3.6. Colágenos no pulmão

Os colágenos pertencem à rede fibrilar da MEC e atualmente estão descritos 33 tipos, produtos de 23 genes ⁴⁴. Os colágenos fibrilares dos tipos I, II, III, V e XI são encontrados essencialmente em todos os tecidos conjuntivos da maioria dos organismos multicelulares, abundante particularmente nos ossos, cartilagem e pele. Uma das suas principais funções é manter a arquitetura dos tecidos e órgãos e conferir resistência mecânica através da interação com outros componentes da MEC, como os proteoglicanos e interações com outros tipos de colágenos.

O colágeno tipo I é o mais abundante e mais bem conhecido, de forma fibrilar e freqüentemente associado com o colágeno tipo V, um colágeno de menor quantidade, que ocupa o interior das fibras. A associação de colágenos tipos I e V formam fibrilas heterotípicas com diâmetros controlados, que são de considerável importância na influência da característica funcional dada ao tecido. Por exemplo, muitos estudos apontam o colágeno tipo V como controlador do diâmetro fibrilar da córnea, conferindo transparência ^{44, 45, 46}.

Os colágenos estão dispostos em fibrilas, filamentos, fibrilares de ancoragem ou em lâminas de acordo com o tipo. Quanto à função, são

elementos de estruturação, participam da diferenciação, adesão, migração, suporte, proliferação e em alguns encontramos o caráter antigênico, como nos colágenos tipos II, V, IX e XI ⁴⁷.

No pulmão estão descritos doze tipos de colágenos, que representam 15-20% do peso do órgão seco. Na via aérea inferior está presente o colágeno tipo I na proporção 3:1 e o colágeno tipo III na proporção 6:1 ⁴⁸, o colágeno tipo V, representa aproximadamente 7% do pulmão, quando pepsinizado, e o colágeno tipo IV (5%). Nas vias aéreas superior, além destes, encontramos os colágenos tipos II, VI, VII, VIII, IX e XI ⁽⁴⁷⁾. Os colágenos tipos V e XI são os menores e desempenham papel de suma importância na fibrilogênese e por possuírem caráter antigênico ^{49, 50, 51}.

Os colágenos são polipeptídeos dispostos em tripla hélice, possuem uma região central denominada “helicoidal” e nas extensões, duas porções livres denominadas “domínios antigênicos” (Figura 6). As extensões peptídicas terminais, NH₂ e COOH do pró-colágenos apresentam maior imunogenicidade do que o corpo da molécula. Estas porções nos colágenos fibrilares tipos I, II e III são liberadas durante o processo de lesão à membrana basal, onde ficam expostas. Contudo o colágeno tipo V mantém pelo o domínio NH₂, conferindo o caráter imunogênico.

Madri e Furthmayr, em 1980 ⁵⁰, localizaram por imunofluorescência os colágenos tipos I, III, IV e V no pulmão humano normal e fibrótico. Entretanto Crystal e Wets, em 1997 ⁴⁸, melhor definiram as localizações. Na matriz do septo alveolar, nos espaços aéreos e vasos sanguíneos, os principais colágenos presentes são os do tipo I e III, dispostos entrelaçados

dentro das fibras.

Os colágenos tipos V e VI são relativamente incomuns, mas estão presentes; o colágeno tipo V está interligado às fibras dos tipos I e III, e o colágeno tipo VI é independente no interstício. Pontua-se, mas não provado, que o colágeno tipo XII estaria “decorando” a superfície das fibras largas. A cartilagem presente nos espaços aéreos é composta de colágeno tipo II e alguns outros tipos em menor quantidade.

Figura 6. Estrutura do colágeno

Fonte: Mizuno K et al, 2001 ⁵².

A função específica de cada colágeno ainda é obscura. O colágeno tipo I é o maior em capacidade tensionar e provavelmente seja responsável pela manutenção da arquitetura contínua das fibras. O colágeno tipo IV representa 5% da massa total de colágeno no pulmão e têm função na membrana basal do alvéolo e do endotélio ^{6, 53}.

No pulmão normal o colágeno tipo I parece estar localizado no interstício do septo alveolar em padrão irregular. O colágeno tipo III parece ser mais proeminente, de localização irregular no septo e na região perivascular. Os colágenos tipos IV e V co-distribuem em padrão linear nos alvéolos e membrana basal dos capilares. O colágeno tipo V pode também estar presente no interstício alveolar, no tecido conjuntivo peribronquiolar e membrana basal do capilar. Mudanças dramáticas são notadas em processos fibróticos, com marcação intensa do colágeno tipo I em septos. O colágeno tipo V se expressa intensamente no interstício e em áreas onde células de músculo liso estão em proliferação ^{54, 55}.

Diferentes parâmetros atuam concomitantemente ou independentemente no controle do diâmetro do colágeno tipo V ⁵⁶. O colágeno tipo V, assim como o tipo XI, é diferenciado quando retém parte do domínio procolágeno N-terminal durante o processo extracelular, o que não foi observado em outros colágenos. Como resultado deste tamanho e flexibilidade, a permanência do pedaço N-terminal da molécula imatura do colágeno tipo V pode prevenir o crescimento de fibras heterotípicas. A estrutura do colágeno tipo V está intrinsecamente envolvida com o crescimento fibrilar. O colágeno tipo V é fundamental não somente pela

regulação do diâmetro fibrilar, mas pela integridade do tecido conjuntivo ^{44, 46}.

No pulmão o colágeno tipo V é considerado o menor colágeno localizado dentro do tecido conjuntivo perivascular e peribronquiolar, que são sítios de atividade para rejeição ⁵⁷⁻⁵⁹. No processo inflamatório, há lesão às células epiteliais e agressão à membrana basal, os domínios antigênicos ficam expostos e pela ação de MMP-2 e MMP-9, há fragmentação destes peptídios, potencialmente antigênicos, que perpetuam o processo autodestrutivo ^{34, 36, 59}.

3.7. Mucosas e tolerância

A imunização sensibiliza a mucosa, recebendo o nome do destino pretendido, MALT para a mucosa, NALT para mucosa nasal, BALT para o tecido linfóide associado ao brônquio, podendo gerar um estado de tolerância ao antígeno administrado.

A maioria do contato com materiais antigênicos externos ocorre nas superfícies da mucosa, que está constantemente e fisiologicamente exposta a uma grande variedade de materiais antigênicos. Muito desse material é degradado, contudo o que não sofre degradação ou são parcialmente degradados são absorvidos pelo sistema circulatório. A tolerância é sempre facilitada quando se propicia a permanência do antígeno no organismo, que pode ser induzida por altas doses ou por repetições em sua dose. Quanto a idade, o recém-nascido desenvolverá diretamente a imunização, em consequência da imaturidade imunológica do animal ⁶⁰⁻⁶², já o adulto, muitas

vezes antes de tornar-se tolerante, exibirá uma fase de resposta imune.

A imunização envolve eventos complexos e múltiplos fatores podem influenciar a habilidade da tolerância a um antígeno como representado na Figura 7 ^{61, 63}. Esses incluem o sítio de ligação do antígeno, sua natureza, e a dose, o processo na mucosa (ex. permeabilidade, inflamação) fatores genéticos e a idade do receptor ^{64, 65}.

Há clara diferença quanto a via da imunização: subcutânea, intramuscular, intravenosa, intestinal, oral ou nasal. Na via oral, o pH extremo, proteases gástricas e pancreáticas, sais biliares terão efeitos drásticos. Proteases do lúmen muito freqüentemente reduzem proteínas grandes em di ou tri-peptídeo não imunogênicos. Contudo, é estimado que aproximadamente 2% da proteína da dieta diária é absorvida intacta.

A tolerância é mediada por mais de um mecanismo imunológico, um deles é a dosagem da imunização que ativará uma via de resposta. Feita a apresentação, o antígeno atravessa a mucosa caindo no sistema circulatório como uma proteína intacta ou fragmento antigênico ^{60, 66, 67}. Quanto à dosagem, 0,5 mg é considerada pequena e 20 mg, grande dosagem. A apresentação de um antígeno em pequena dosagem ativam células T CD4+ que se diferenciam em células Th2, também chamado de CD4+ auxiliar, que secretam (IL-4/IL-10) e Th3 (TGF- β), que se desenvolve predominantemente, nas respostas imunes de mucosas. A produção de TGF- β , em particular, suprime a função das células Th1 inflamatórias ¹⁸. Há migração de população de células T regulatórias (T_{reg}) antígeno-específicas para órgãos linfóides, onde suprimem a resposta imune e bloqueiam a

geração de células efectoras. A apresentação em grande dosagem favorece a ativação de células T CD4+ que se diferenciam em células Th1 que secretam (IL-2/IL12, IFN- γ) e são conhecidas algumas vezes como células T inflamatórias por ativarem macrófagos. Pela apresentação sistêmica do antígeno há “deleção ou anergia”, circulação sem resposta celular. As citocinas das células Th2 também inibem a ativação dos macrófagos e as reações mediadas por Th1 ⁶⁸.

A idade é um dos fatores envolvidos na tolerância sistêmica. Em roedores jovens é difícil de tolerar por indução via oral, pois sua permeabilidade intestinal é maior, promovendo uma maior reatividade de proteases ao antígeno ⁶⁴.

Em modelos experimentais a imunização com antígeno, em determinadas condições, induz certa incapacidade ao sistema de desenvolver uma resposta imune a um antígeno em sua forma imunogênica habitual. Torna-se importante salientar que a tolerância é específica, o sistema imune continua capaz de responder normalmente a outros antígenos, mas a resposta humoral específica é abolida, pois os anticorpos produzidos reagem continuamente aos antígenos ⁶⁰.

Os fundamentos da imunização explorados em modelos animais são atualmente empregados no tratamento de doenças auto-imunes, como em pacientes com artrite reumatóide (AR) ^{4, 65, 69-72}, esclerose sistêmica ^{69, 73}, e glomerunonefrite ⁷⁴.

3.7.1- Imunização com colágenos

A imunização oral/nasal utilizando colágenos para o tratamento de doenças auto-imunes é aplicada como terapêutica em diversas patologias. A imunização pelo colágeno tipo I no tratamento de AR em modelos experimentais, reduz consideravelmente a severidade dessas artrites. Aplicado à clínica, os resultados mostram que apesar de ser bem tolerado, os resultados ainda são pequenos, porém significativos.

Garcia et al, em 1999 ⁴ e Higuchi et al, em 2000 ⁷⁵, descrevem a comparação pela imunização com colágeno tipo II pelas via oral e nasal em ratos com artrite. Relatam que houve supressão da resposta por células T. Concluem que a imunização pelo colágeno por qualquer uma dessas vias é uma intervenção imunoterápica efetiva, onde há a supressão da inflamação e proteção dos tecidos envolvidos na artrite.

Myers et al, em 2001 ⁶⁵, mostram a imunização via oral com o colágeno tipo II em nove pacientes (3-17 anos) com AR juvenil ⁶⁹ descrevem ainda que todos os pacientes apresentaram algum tipo de melhora clínica, encorajando a maiores investigações científicas. Mckwon et al, em 2000 ⁶⁹, através da imunização via oral com colágeno tipo I, em vinte pacientes adultos com esclerose sistêmica relatam que não houve retrocesso na doença, mas por outro lado, melhores resultados na prova de função pulmonar, deambulação e qualidade de vida desses pacientes. Houve também queda dos níveis de IFN e IL-10, indicando possível supressão da resposta imune. Outro aspecto, é que quando comparadas as vias oral e a

nasal, a nasal demonstra maior eficiência quanto ao tempo e dosagem ^{4, 74, 75}.

Atualmente, drogas imunossupressoras são empregadas para diminuir o episódio de rejeição aguda, apesar de causarem morbidade e mortalidade nesses pacientes. A imunização via oral pelo colágeno tipo V em modelos animais de transplantes de pulmão é empregada com a finalidade de compreender e minimizar o processo de rejeição do pulmão transplantado e BO ^{6, 7, 34, 36, 58}. A imunização pelo colágeno tipo V promove estímulo a produção sistêmica de TGF- β , mas não de IL-4 ou IL-10 ^{36, 58}. Contudo, os níveis de TGF- β aumentam significativamente em ratos imunizados pelo colágeno tipo V antes de serem transplantados; aqueles que foram somente imunizados, sem o transplante, não apresentaram aumento dos níveis de TGF- β . A atividade supressora do TGF- β é crucial para o processo de tolerância pelo colágeno tipo V. Haque et al, em 2002 ³⁴, demonstra que a rejeição de pulmão em animais de mesma espécie ocorre pela exposição de células T potencialmente contra os epítomos antigênicos no colágeno tipo V ^{6, 36}.

A imunização pelo colágeno tipo V reduz a rejeição aguda nesses modelos de transplantes, usada como modulador neste processo, prevenindo a BO. Esses estudos confirmam que as induções repetidas de colágeno não levam a lesões patogênicas ou alterações no diferencial de contagem de células nestes pulmões ⁶.

Sumpter e Wilkes, em 2004 ³⁶, sugerem que células T_{reg} possam ser a chave da imunização pelo colágeno tipo V pela ação de TGF- β suprimindo

ativamente a resposta por células T ⁷⁶.

Yoshida S et al, em 2006 ⁷, levantam a hipótese que o colágeno tipo V possa ter um final comum para o desenvolvimento tanto da aloimunidade quanto para as doenças autoimunes. Acrescentam que IL-17 e IL-23, recentemente descritas no envolvimento em doenças autoimunes não pulmonares, também estão inclusas na resposta mediada pelo colágeno tipo V nas doenças pulmonares. Isso explica uma possível rota comum para diferentes tipos de lesões no pulmão, como as infecções, agentes químicos e rejeições em transplantes, na qual o remodelamento induzido por um processo inflamatório resulta em uma exposição prolongada de epítomos de colágeno tipo V, perpetuando a resposta.

Pacientes que foram submetidos ao transplante de pulmão têm células T reativas ao colágeno tipo V ³⁸, detectadas em sangue periférico. Células T específicas para o colágeno tipo V produzem IL-10, que por sua vez suprime células Th1 auto-reativas, independente do contato celular direto; as células T_{reg} são o pivô desta supressão. Durante a BO pós-transplante, a perda de T_{reg} leva à falência deste circuito regulatório, resultando em expansão de células Th1 ³⁷.

3.7.2- Tolerância e o trato respiratório

Similar a mucosa intestinal, o trato respiratório é continuamente exposto a uma extensa variedade de antígenos. A mucosa bronquial assemelha-se a mucosa intestinal de várias maneiras. Além do que o BALT é bem desenvolvido no trato respiratório. Presumivelmente alguns antígenos que atingem o BALT são processados e apresentados localmente a células T CD4⁺ e CD8⁺ presentes no epitélio bronquial ⁶⁷. Possivelmente outras células possam apresentar antígenos, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B ⁷⁷ e células epiteliais ^{71, 64}. Igualmente, uma quantidade pequena do antígeno chega ao pulmão, mostrando uma provável rota para a penetração de antígenos no sangue periférico. O mecanismo preciso do estado de imunização atua no epitélio bronquial continua desconhecido ^{4, 54, 64, 75}.

As células B e T apresentam cinética diferente quanto ao aparecimento e desaparecimento durante a imunização. De modo geral células T ficam tolerantes precocemente, e por tempo maior que células B ^{57, 58, 60}. Células T CD4⁺ auxiliares são indutoras necessárias da resposta à proteína, tanto da imunidade celular quanto humoral. Ainda pouco se sabe sobre a manutenção do estado da imunização e células T CD8⁺, contudo participam do estado de manutenção da tolerância.

A tolerância pode ser induzida mesmo em linfócitos maduros e tem

por princípio três mecanismos básicos: 1) aborto clonal ou apoptose da célula reativa ao antígeno (tolerância central); 2) inativação funcional sem morte celular, chamada anergia clonal; 3) suspensão da ativação e das funções efetoras por células reguladoras, e edição do receptor, melhor documentado em células B ^{60, 68}.

A tolerância está classicamente associada à supressão específica da resposta celular a um antígeno. Considerando-se que antígenos estão naturalmente presentes no organismo (auto-antígenos), sendo que o sistema imune os ignora, ou mantém resposta em nível fisiológico. Quando há falhas neste sistema ocorre à doença auto-imune ^{61, 62, 68}.

Figura 7. Mecanismos que interferem no estado da tolerância

Fonte: Strobel S and Mowar AM ⁷⁸

3.8. Modelos experimentais

Há inúmeros trabalhos na literatura com interesse pelo remodelamento pulmonar, dentre os quais destacamos alguns pela relevância ao estudo dos colágenos neste processo em 25 anos de intensa pesquisa. Madri et al, em 1980 ⁵⁰, demonstra por imunofluorescência o aumento da densidade de colágeno tipo III neste processo. Teodoro et al, em 2004 ⁷⁹, induziram doenças do tecido conjuntivo (DDTC) em coelhos pela imunização com adjuvante e colágeno tipo V, onde descreve intenso remodelamento broncovascular nestes animais.

Pela dificuldade em se obter materiais para a melhor compreensão da atuação dos marcadores imunológicos, foram desenvolvidos os modelos animais em BO. Os principais modelos de BO são divididos em três grandes grupos virais, ácidos/tóxicos e transplantes: A indução viral é limitada na reprodução pela necessidade de biotérios e laboratórios equipados adequadamente. O procedimento de instilação de ácidos/tóxicos é geralmente pela via intratraqueal ⁸⁰; os animais são anestesiados e mantidos em respiradores, há perda de animais durante o procedimento ou algum tempo após, por exemplo: o HNO₃, potente oxidante capaz de causar grave lesão tecidual ^{81, 82, 83}. O grupo transplantes é subdividido em dois outros grupos: o transplante de traquéia em camundongo, e o transplante de pulmão em ratos. O transplante de traquéia em camundongo ^{38, 55} é de grande relevância no mapeamento de células inflamatórias e mediadores envolvidos na rejeição de medula óssea transplantadas em humanos. Os

transplantes de pulmão (normalmente o esquerdo) são realizados em ratos de linhagens diferentes, onde observaram intenso processo de remodelamento logo após o transplante do pulmão, Zheng et al, em 1997 ⁸⁴, mapearam os colágenos tipos I, III e V em pulmões humanos transplantados e verificaram o aumento do colágeno tipo III. A partir deste estudo, o grupo do Prof. Dr. David Wilkes da Universidade de Indianápolis, em consórcio com um grupo no Japão ^{6, 7 57, 58, 59}, iniciaram a imunização via oral pelos colágenos tipos I, II, III, V e XI em animais de linhagem diferentes anteriormente ao transplante. Observam que há supressão do processo de rejeição somente nos animais que recebiam o colágeno tipo V. Concluíram que a imunização via oral pelo colágeno tipo V reduziu a resposta imune, gerou tolerância, protegendo e regulando a síntese e degradação da MEC no processo inflamatório/fibrótico, e ainda que o colágeno tipo V induziu estímulo à produção sistêmica de fator de crescimento que neutraliza a resposta imune para o antígeno.

3.8.1 - A escolha do modelo

No presente estudo, o intuito foi o de observar as alterações histológicas no eixo pré-acinar, num modelo via indução química de BO, a partir dos seguintes protocolos: o modelo da BO no camundongo BALB/c via nasal por um agente químico, no caso o HNO₃; a tolerância preventiva a BO e possível interrupção do processo; a partir da BO já instalada comparar o tratamento convencional por prednisona e a tolerância gerada pela

imunização via nasal pelo colágeno tipo V.

Ao iniciarmos este estudo, buscamos modelos de BO existentes na literatura, os quais em sua maioria descreviam instilação intratraqueal pelo HNO_3 0,2% a 1% em modelos de ramster, cães e ratos. Procuramos um modelo de fácil manejo e melhor reprodutividade. Os modelos anteriores, um deles da nossa instituição, reproduziram a BO em crianças, onde foi utilizado o HNO_3 a 0,5% em ratos via intratraqueal, foram mapeados histologicamente nos dias 2, 7, 14, 30, onde foram observadas lesões proliferativas e constrictivas, estatisticamente significantes. Entretanto houve relevante perda de animais durante o procedimento. Assim, buscávamos uma outra rota de indução, na qual pudéssemos avaliar uma possível terapêutica supressora a lesão.

Desenvolvemos um protocolo piloto baseado nos seguintes aspectos: 1) desenvolver um modelo simples que não por via intratraqueal já existente na literatura; 2) um modelo que não fosse em ratos, coelhos ou cães; 3) mapear histologicamente as alterações morfológicas de acordo com a dosagem crescente de HNO_3 a 0,5%, 1.0% e 2%, para os períodos de 4, 6, 8, 10 e 13 semanas (curva dose-resposta), com o propósito de estabelecer um infiltrado inflamatório rico, consistente com a BO em humanos. A dosagem de 0,5% e 1% nasal de HNO_3 , não foram suficientes para instalar adequadamente a BO em camundongos, assim não foi testada a dosagem de 0,2% neste protocolo piloto. Padronizamos então uma única instilação de HNO_3 a 2% (pH 0,1 – 4.8 mmol/ml) por oito semanas por apresentar melhores resultados, padrões semelhantes ao que ocorre em humanos⁸⁵.

3.8.2 - Solução salina hipotônica

Degirmencioglu et al, em 2004 ⁵, notou que a administração de salina hipertônica funcionaria como um promovedor para teste de rinite alérgica. Embora, Krayenbuhl et al, em 1989 ⁸⁶, tenham documentado que altas concentrações, como 5.4% não promovem reatividade nasal e sugerem que as soluções possam ser usadas acima desta concentração. Igualmente Baraniuk et al, em 1999 ⁸⁷, brilhantemente documentam que a salina hipertônica pode induzir sensações de aflição, dor, bloquear e rinorréia no manejo dose-dependente. Estes efeitos adversos são evidentes quando as concentrações são maiores que 5.4% utilizadas na rotina ⁸⁸.

Os efeitos benéficos da irrigação nasal em pacientes com rinosinusites ou em períodos pós-operatórios de cirurgias nasosinusais, já são bem conhecidos e parecem justificar a freqüente indicação da irrigação intranasal. Para realizar o procedimento, são usadas diferentes soluções hidroeletrólíticas, em diversas concentrações e composições, sendo a solução salina a 0,9% a mais freqüentemente recomendada. Viertler et al, em 2003 ⁸⁹, avaliaram os efeitos na mucosa nasal devido ao uso desta solução, foram observados efeitos deletérios locais. O grupo que foi tratado solução salina a 0,9% apresentou maior proliferação de glândulas intraepiteliais, sendo a diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, independente do tempo de exposição.

Reação semelhante das células mucosas, tem sido relatada em ratos submetidos a tratamentos tópicos nasais com diferentes substâncias.

Quando se observa a composição do muco nasal, a solução salina a 0,9% deve ser considerada hipotônica, em relação ao do ser comparação ao ser humano.

Os resultados do presente estudo sugerem que a diferença de tonicidade entre a solução salina a 0,9% e o muco nasal poderia causar um efeito deletério às células, estimulando a proliferação glandular intraepitelial.

3.8.3 - Administração do prednisona

Os corticosteróides são potentes antiinflamatórios usados amplamente para suprimir os efeitos nocivos das respostas imunes de origem auto-imune ou alérgica, bem como aquelas induzidas pela rejeição do enxerto ¹⁸, como um agente antiinflamatório no tratamento das fibroses pulmonares e na BO ^{90, 91}.

Os corticóides são derivados farmacológicos dos membros da família de glicocorticóides de hormônios esteróides; um dos mais amplamente utilizados é a prednisona, que é um análogo sintético do cortisol, que atua por meio de receptores intracelulares que são expressos em quase todas as células do corpo. Ao efetuarem a ligação ao hormônio, esses receptores regulam a transcrição de genes específicos. Os corticosteróides regulam a expressão de muitos genes, com um efeito total antiinflamatório. Primeiro eles reduzem a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico. Segundo, eles inibem a migração de células inflamatórias aos locais de inflamação, impedindo a expressão das moléculas de adesão. Terceiro, os corticosteróides promovem a morte por

apoptose dos leucócitos e linfócitos. Somando a isto, há as propriedades inflamatórias, onde são conhecidos por inibirem a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno em cultura de tecidos pelos fibroblastos ^{92, 93}.

Nos pacientes que recebem os órgãos transplantados e não tiveram o desenvolvimento da síndrome de BO, Ward et al, em 2004 ⁹⁴, descreveram que não houve alteração no remodelamento desses pacientes que receberam terapia corticóide. Além disso, Kehrer et al, em 1983 ⁹⁵, observaram que cultura de células de fragmentos de pulmão de camundongos tratados com corticóide na síntese e degradação do colágeno era variável e dependente do tempo a partir do qual houve a lesão, quando os parâmetros foram analisados.

Mais recentemente, Rocco et al, em 2003 ⁹⁶, observaram que o metil-prednisolone leva a uma completa manutenção em 'in vivo' ou 'in vitro' dos mecanismos respiratórios quando em lesões pequenas.

A dose a ser administrada do prednisona ainda é controversa na literatura, alguns autores preconizam altas doses (30 a 80 mg/dia) por curtos períodos, 3 dias consecutivos, seguida de uma aplicação mensal da droga ⁴³ ou baixas doses 0,5 a 2,0 mg/kg/dia por longos períodos, por 1 a 2 meses, seguida de terapêutica com a mesma dose, em dias alternados, ou ainda mesma dosagem por 6 a 12 meses.

Na pneumonite por hipersensibilidade, o prednisona 0,5-1.0 mg/kg/dia, seguida de gradual diminuição. Essa dosagem impediria o agravamento progressivo da patologia, embora não as remissões totais da

doença, estando o paciente sujeito à infecção secundária ⁹⁷.

No transplante de medula após o tratamento com prednisona e ciclosporina; avarro et al (102) descrevem que oito pacientes não responderam ao tratamento, e cinco pacientes deles morrem de falência respiratória ⁹⁸. A administração sistêmica de glucocorticóides, por exemplo, o prednisona, não parece ter significativo efeito clínico no curso da bronquiolite viral aguda em bebês e crianças. O prednisona vem sendo usado por mais de 40 anos, é conhecida pelo efeito antiinflamatório em crianças com diagnóstico bronquiolite viral. Uma meta-análise envolvendo 13 centros de estudo, observou 1.198 crianças e demonstrou que não houve benefício em pacientes internados ou na administração clínica ⁸. Nesse nosso estudo administramos 40mg/kg/dia de prednisona por sete dias consecutivos, com o intuito de administrar uma alta dosagem por curto período.

Patel et al (xx), descrevem que na auto-imunidade e rejeição de aloenxertos, os corticosteróides comumente são combinados com drogas imunossupressoras citotóxicas, como a azatioprina e a ciclofosfamida. Ambas interferem com a síntese do DNA, e sua principal ação nos tecidos em divisão são acompanhadas de uma série de efeitos tóxicos. Assim como a ciclosporina A e tacrolimus, bloqueiam a proliferação de células T, afetam todas as respostas imunes indiscriminadamente. Sendo o único modo de controlar sua ação imunossupressora é variando a dose.

3.8.4 – Imunização via nasal pelo colágeno tipo V

A imunização temporal via nasal pelo colágeno tipo V foi palpada nos trabalhos já existente, com a terapêutica de colágenos I e II em doenças do tecido conjuntivo, inclusive em humanos, nos quais as administrações foi por longos períodos, onde nos resultados mostravam que não havia remissão da doença, mas melhor estado geral dos pacientes, com melhor deambulação e melhor resultados nos testes de função pulmonar.

A princípio não esperávamos que a tolerância respondesse de modo supressivo após a BO estar instalada. Foi um achado não descrito na literatura.

3.8.5- A escolha dos anticorpos

Os linfócitos são encontrados no sangue contribuindo para 20-30 % dos leucócitos. Esta porcentagem varia muito de acordo com o estado geral do paciente. Após o reconhecimento do antígeno no contexto da co-estimulação, células CD4⁺, são ativadas e proliferam, sugerindo que sejam os orquestradores da lesão nas vias aéreas ³⁸. A IL-12 produzida por monócitos ou macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, e células epiteliais na via aérea, induzem a transcrição de células T e a diferenciação da resposta do tipo Th1, com a produção de IFN- γ , IL-12, imunidade mediada por células (patógenos intracelular, hipersensibilidade do tipo tardia). E o

desenvolvimento de resposta do tipo Th2, com a produção de IL-4, IL-10, e IL-13, e imunidade extracelular (humoral, alérgica).

Células B e T são indiferenciadas pela microscopia, sendo, portanto, diferenciáveis pelas técnicas IHQ para detecção de receptores específicos de membrana.

CD3

O CD3 é expresso, em altos níveis, em células T periféricas e na maioria das neoplasias. Consiste de 4 componentes diferentes (α, β, γ, δ) de 20-28 kDa. O complexo CD3 está associado ao receptor de célula T na superfície da célula e suas cadeias participam do processo de transdução do sinal de ativação celular. O CD3 é o primeiro antígeno a ser detectado nas células do timo imaturas e isto é um indicador precoce do comprometimento da linhagem de células T. Nas células imaturas do timo, o CD3 se expressa apenas no citoplasma e se expressa precocemente na evolução de distúrbios crônicos linfoproliferativos. Normalmente expresso por células T no timo, medula óssea, tecido linfóide periférico e sangue; a única outra célula normal conhecida que marca o anticorpo CD3 são as células de Purkinje no cerebelo. Em conjunto com o CD20cy, são estudados para diferenciar entre células B e T em tecidos fixados.

O anticorpo policlonal anti-CD3 é um peptídeo sintético produzido à partir da cadeia α e humana de CD3 em junção com tireoglobulina bovina usada na imunização. Age como um marcador “pan” de células T para

detectar células normais e neoplásicas, reagindo com células T em muitas espécies de animais ⁹⁹.

CD4

Essas células T são normalmente denominadas células T auxiliares, ou células Th que podem ser divididos em dois subgrupos. O primeiro subgrupo, células Th1, desempenha um papel importante no controle de infecções bacterianas intracelulares, por ativarem macrófagos. O segundo subgrupo, Th2, elimina agente extracelular, mediante ativação de linfócitos B. Esses subtipos de Th secretam IL distintas, cada uma com uma função específica. A função da Th é reguladora, e participam resumidamente da estimulação do crescimento e proliferação de linfócitos T citotóxicos e supressores contra o antígeno; estimulação do crescimento e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos; ativação dos macrófagos; auto-estimulação (um Th pode estimular o crescimento da população de Th ⁹⁹.

CD8

O anticorpo CD8 é utilizado para marcar células T citotóxica/supressora. É uma glicoproteína, transmembrana de 68 kDa, expressa em cadeias 32-34 kDa α - e/ou 30-32 kDa β .

A resposta imune que se baseia na ativação e ataque das células T CD8 é denominada de resposta imune celular específica. O seu principal estimulador é a IL-2, que causa a expansão clonal de linfócitos T citotóxicos monoclonais. Células T supressoras são células que tem a função de

modular a resposta imune através da inativação das células T, citotóxicos e helpers, limitando sua ação no organismo, impedindo que sua atividade excessiva e/ou participando do processo de tolerância ⁹⁹.

CD20

As células B representam 5 a 15% dos linfócitos circulantes e se originam na medula óssea e se desenvolvem nos órgãos linfóides. São células de núcleo grande e que possuem o retículo endoplasmático rugoso, e o complexo de Golgi extremamente desenvolvidos em seu citoplasma, porém em repouso, estas organelas não estão desenvolvidas.

As células B possuem como principal marcador de superfície a IgM monomérica, que participa do complexo receptor de antígenos. Esta imunoglobulina entra em contato com o antígeno (análoga ao TCR das células T) quando lhe é apresentado diretamente ou indiretamente pelos macrófagos. A IgM se ligando ao epítipo, internaliza o complexo IgM-epítipo. Este complexo realiza diversas modificações na célula, que tem a finalidade de induzi-la a produção de imunoglobulinas.

As células B em repouso não produzem imunoglobulinas, mas quando estimulados, por exemplo, por IL-4 e a IL-1, sofrerão expansão clonal e se transformarão numa célula ativa denominada de plasmócito. Os plasmócitos possuem na sua ultra-estrutura, o REG e o complexo de Golgi desenvolvido, e o núcleo com aspecto de roda de carroça. Secretam

ativamente anticorpos específicos na resposta imune humoral. As células B expressam o MHC-II quando ela entra em contato com o antígeno. Este MHC é importante para a interação com as células T, pois o MHC-II reconhece o CD4 das células Th, secretando interleucinas.

O CD20 é uma proteína, não-glicosilada, transmembrana expressa em células B precursoras e maduras, mas a perde antes da diferenciação terminal de células B em plasmócitos. No restante das células B, o CD20 aparece na forma de uma proteína de 33 kDa não fosforilada. As porções terminais C e N da proteína estão localizadas na membrana citoplasmática e apenas sua menor porção é exposta na superfície da célula. Sugerindo que o CD20 está diretamente ligado na regulação da condução do fluxo de Ca²⁺ transmembrana da células B, o que indica uma possível função do CD20 como regulador de proliferação e diferenciação ⁹⁹.

CD68

São células de altíssimo poder fagocitário. O IFN- γ produzido por células Th estimula a fusão dos lisossomas com o fagossoma para que haja a digestão intracelular. Estes fagócitos possuem diversas enzimas hidrolíticas em seus lisossomas. Possui funções de extrema importância para o sistema imune, apresentador de antígenos.

Os macrófagos são células que chegam para fazer a limpeza de um tecido que necrosou, ou que inflamou. Eles fagocitam restos celulares, células mortas, proteínas estranhas, produtos da cicatrização, etc. Porém os seus epítomos são levados até a superfície e apresentado a células T ou B. Após esta limpeza, os fibroblastos ativos (no caso de uma necrose) vão ao local e preenchem o espaço com colágeno. O macrófago é o principal produtor de IL-1, citocina que estimula células Th até o local da infecção. A IL-1 estimula a expansão clonal das células Th e das células B específicas. Além disso, a IL-1 estimula a síntese de proteínas de adesão leucocitária nos endotélios (como a ICAM-1) e facilita a adesão dos leucócitos para realizar a diapedese. Outras funções da IL-1 se referem ao estímulo para maturação dos leucócitos.

Os macrófagos são responsáveis pelo sistema monocítico fagocitário, pois vem da maturação dos monócitos que chegam pelo sangue. Existem células que são morfologicamente diferentes dos macrófagos, mas tem a mesma função, e provém dos monócitos da mesma forma, por exemplo: - Macrófagos das serosas - peritônio, pericárdio e pleura. A obstrução aérea irreversível por fibroproliferação pode ocorrer antes e após a perda das células epiteliais. Os macrófagos são células predominantes nas vias aéreas distais e no espaço alveolar, secretando muitas citocinas IL-6, TGF- β , e fator de crescimento de insulina (IGF), e outros fatores de crescimento, como PDGF, EGF e IGF. O epitélio e miofibroblastos podem também ser relevantes como fatores profibróticos ³⁸.

O anticorpo monoclonal anti-CD68 marca monócitos e macrófagos, mas não células mielóides em tecidos normais e patológicos e em condições neoplásias ⁹⁹.

Neutrófilos

Compondo a resposta inata ao patógeno e a defesa pela secreção de produtos mieloperoxidase, elastase, proteases, e espécies reativas ao oxigênio, os neutrófilos podem exacerbar a inflamação dentro das vias aéreas distais na síndrome da BO, por um estímulo infeccioso assim como inflamatório. Baixas concentrações de inibidores de leucoproteases dentro das vias aéreas distais em pacientes com a síndrome de BO, e uma potencial deficiência de TGF- β , podem também contribuir para os processos inflamatórios e infecciosos ³⁸.

O anticorpo monoclonal anti-elastase neutrófilos, marca precursores de neutrófilos intensamente. Uma população menor de monócitos também é marcada, porém em menor intensidade. O anticorpo é útil para identificar e diferenciar leucemias mielóides agudas e células tumorais mielóide extracelular. A proteína sérica neutra elastase tem aproximadamente 30 kDa. Atua como um potente agente proteolítico capaz de degradar um amplo espectro de proteínas, incluindo proteínas da MEC. É um importante mediador no processo inflamatório proveniente da lesão tecidual.

Trabalhos recentes demonstram seu envolvimento em doenças pulmonares, como o enfisema, glomerulonefrite, AR e a síndrome do estresse respiratório no adulto, assim como no infiltrado tumoral pela ação de uma variedade de inibidores endógenos, incluindo α -1-antitripsina e inibidor da elastase humana entre outros ⁹⁹.

4. MÉTODOS

O presente estudo obteve aprovação do Protocolo de Pesquisa no. 073/03 da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12 de Março de 2003, conforme documentação apresentada no Apêndice 1.

4.1. Estudo

Trata-se de um estudo experimental controlado grupo-controle.

4.2. Protocolos dos animais

Todos os camundongos BALB/c receberam cuidados conforme o Guia de Proteção para a Utilização de Animais em Laboratório. Foram utilizados camundongos BALB/c de 4-6 semanas de idade e pesando entre 17-26 gramas para os seguintes protocolos:

4.2.1 - Primeiro Protocolo: – Modelo da BO via nasal

4.2.1.1. Experimento I. Estabelecer o modelo da BO via nasal

Fêmeas de camundongos BALB/c foram utilizadas para determinar as mudanças longitudinais associadas com o modelo. Neste contexto, após extensa revisão literária sobre os modelos de BO, nós estabelecemos um protocolo piloto baseado nos seguintes pontos: 1. Desenvolver um método simples e reprodutível de instilação por HNO_3 , que até então era introduzido pela via intratraqueal; 2. Optamos pelos camundongos ao invés de ratos, hamster ou cães como animal modelo ^{81, 82, 83}; 3. mapeamos as alterações histológicas de acordo com o aumento da concentração de HNO_3 (0,5%, 1% e 2%) ao longo de 4, 6, 8, 10 e 13 semanas (curva dose-resposta) com o propósito de estabelecer um infiltrado inflamatório rico consistente com a BO, e considerando que o estado de inflamação aguda pode ser resolvido até este ponto e apenas alterações no remodelamento estavam presentes. O modelo final da BO foi estabelecido por uma única instilação de 20 μl HNO_3 a 2%, pH 0,1 na concentração 4.8 mmol/ml via nasal por oito semanas.

4.2.1.2. Experimento II. Indução da BO

Trinta animais sadios foram divididos em três grupos. O grupo controle (normal, n=10) consistiu de animais normais. No grupo negativo para BO (salina, n=10), os animais receberam 20 µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%) diretamente instilada via rota nasal ¹⁰¹, ¹⁰² por uma pipeta volumétrica. No grupo BO (BO, n=10) recebeu uma única instilação de HNO₃

4.2.2 - Segundo Protocolo: Tolerância Preventiva

Quarenta animais sadios foram divididos em quatro grupos: O grupo preventivo (ctV+BO, n=10) recebeu 0,5 mg/ml/dia/animal imunização via nasal pelo colágeno tipo V por sete dias consecutivos, essa terapêutica foi interrompido por sete dias, e no 15º dia recebeu uma única a instilação de HNO₃. O grupo BO (BO, n=10) recebeu uma única instilação de HNO₃. O grupo tratado (BO+ctV, n=10) recebeu no 31º dia da única instilação de HNO₃, 0,5 mg/ml/dia/animal imunização via nasal pelo colágeno tipo V por sete dias consecutivos, seguidos de dias alternados da mesma terapêutica até o 60º dia. O grupo controle (normal, n=10) consistiu de animais normais. Este protocolo foi concluído em 10 semanas.

4.2.3 - Terceiro Protocolo: Tratamento prednisona vs tolerância

Quarenta animais sadios foram divididos em 4 grupos: O grupo BO (n=10) recebeu uma única instilação de HNO_3 . O grupo tratado (BO+pr, n=10), após 8 semanas da única instilação de HNO_3 , recebeu prednisona na concentração 0,02 mg/dia/animal, via nasal por sete dias consecutivos. O grupo tolerado (BO+ctV, n=10), após 8 semanas da única instilação de HNO_3 , recebeu 0,5 mg/ml/dia/animal de colágeno tipo V por sete dias consecutivos, seguidos de mais 30 dias alternados de mesma terapêutica. O grupo o controle (controle, n=10), são animais normais. Este protocolo foi concluído em 13 semanas.

4.3 - Protocolo de sedação

Após os períodos estabelecidos na imunização dos animais, estes foram sedados com solução aquosa de cloridrato de xilazina a 2% (2-2,6-xilidino 5,6-dihidro-4H 1,3-tiazina 1 M, (Rompum® - Bayer Do Brasil S/A - São Paulo) e com dose letal de cloridrato de ketamina (Ketalar, Park-Davis - Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A, São Paulo, SP, Brazil) 1 M, sendo: 0,25 µl de Roupum, 1.0 ml de Ketamina em 3.75 ml de solução fisiológica. Foram injetados 400 µl por camundongo via peritoneal. Imediatamente a sedação, os animais foram exsanguinados pelo plexo axial. O soro foi congelado a -20 °C e encaminhados à sorologia para pesquisa dos colágenos tipos I, III e V. No final dos experimentos, o tórax e a cavidade abdominal foram abertos e o coração-pulmão foram removidos em monobloco para estudo periódico de cada grupo.

Os pulmões foram seccionados perpendicularmente ao hilo em aproximadamente 5 fragmentos. Foram fixados em formol 10% e encaminhados à histologia. Os cortes histológicos a 3 µm de espessura foram corados pelas técnicas H&E e Picrosirius. Foram também cortadas lâminas em branco de cada grupo para a pesquisa dos marcadores imunohistoquímicos.

4.4. Preparação do colágeno tipo V

Foram utilizados restos de placenta humana normal provenientes do serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Uma fração da placenta foi seccionada em pequenos pedaços que foram lavados com solução de EDTA 50mM contendo inibidor de proteases (PMSF 5mM). O material foi homogeneizado em “politron”, centrifugado a 15000 rpm por 30 minutos e liofilizado à $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁵². O material liofilizado foi pesado e digerido com pepsina de estômago de porco (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) na proporção de 1:10 v/v por gramas de tecido, diluído em meio ácido (ácido acético 0,5M, pH 2,5) por 16 h a 4°C sob agitação¹⁰⁰. Após digestão o material foi centrifugado a 15000 rpm durante 1 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e posteriormente o sobrenadante submetido ao gradiente seqüencial salino seletivo com cloreto de sódio nas concentrações de 0,7 M, 1,2 M e 4,5 M. Na concentração de 0,7 M, obteve-se os colágenos dos tipos I e III, a 1,2 M o colágeno tipo V, e adiante a 4,5 M certificou-se de que já não havia mais precipitação destes tipos de colágenos. O precipitado de colágeno foi diluído em ácido acético 0,01 M, dialisado contra água destilada, com várias trocas para eliminar o sal, congelado e liofilizado durante a noite a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.1 Análise da pureza do antígeno

A pureza do antígeno do colágeno humano foi testada através da eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%. O colágeno tipo V extraído pela precipitação com cloreto de sódio a 1,2 M foi identificado pelo perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 7,5%. O colágeno tipo V purificado foi previamente diluído na proporção de 1 mg de proteína para 200 µl de ácido acético 10mM, o tampão de amostra (dodecil sulfato de sódio 'SDS' 10%, glicerina 10%, azul de bromofenol 20% e 2-mercaptoetanol) foi acrescentado às amostras para posterior aquecimento a 100°C, por 3 minutos. O gel de corrida consistiu de Tris 0,375 M, pH 8,8, SDS a 1%, acrilamida 7,5%, persulfato de amônio (APS) a 0,03% e N, N, N, N-tetrametiletilenodiamina (TEMED, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Em cada canaleta do gel de poliacrilamida, aplicou-se 40µg da fração de colágeno isolado, e para a corrida eletroforética, utilizou-se tampão tris glicina 0,19 M em pH 8,5 e SDS 0,1%, sob corrente elétrica constante de 50 volts por três horas. O gel foi corado com azul de Coomassie por 10 minutos sob agitação constante e descorado pela solução de metanol 50% e ácido acético 7,5%.

4.4.2 - Transferência de proteínas para filtro de nitrocelulose

(“Western - Blot”, Towbin 1979)

O gel foi eletroforeticamente transferido para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). A transferência foi feita em tampão tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10%, por uma hora a 100 volts. A eficiência da transferência foi confirmada pela coloração com solução de Ponceau S 0,5% em água (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA).

4.4.3 - “Immunoblot”

As membranas de nitrocelulose foram incubadas por uma hora e meia a temperatura ambiente, sob agitação constante, em solução de fosfato de sódio tamponado (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), a fim de bloquear sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose. Em seguida, a mesma foi cortada em tiras, as quais foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com anticorpos anti-colágeno dos tipos I e V policlonais de placenta humana produzidos em coelho, na diluição de 1:200 e 1:500, respectivamente e, anti-colágeno do tipo III monoclonal (Oncogene, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) na diluição de 1:80. Após este período as membranas foram lavadas três vezes com albumina bovina sérica com PBS com Tween₂₀. As membranas foram incubadas com anti-IgG conjugada com peroxidase anti-coelho ou anti-camundongo (1:1000)

durante uma hora. Após outro ciclo de lavagem a reação foi revelada com diaminobenzidina diluída em tampão fosfato de sódio (0,16mg/ml) contendo 30% de água oxigenada (Apêndice 12).

4.5 - Classificação do diagnóstico histológico

De posse das amostras histológicas, procedeu-se à classificação do diagnóstico patológico. Esta classificação foi feita de maneira cega pela pesquisadora e dois patologistas experientes (Prof^a. Dr^a. Vera Luiza Capelozzi e o Dr. Edwin Roger Parra) na área de patologia pulmonar conforme critérios padronizados pelo AFIP em 2002 ²², em lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina e analisadas ao microscópio de luz.

Em posse de todas as amostras dos grupos procedeu-se a pesquisa dos marcadores imunológicos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, macrófagos (CD68⁺) e neutrófilos pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). O estudo sorológico para os colágenos tipos I, III e V pela técnica ELISA, e estudo da densidade de colágeno total pela técnica histoquímica Picrosirius.

4.6 - Estudo imunohistoquímico (IHQ)

4.6.1 - Preparação das lâminas

A pesquisa do anticorpo em tecido pulmonar de camundongo foi realizada pela técnica IHQ/peroxidase. Os cortes histológicos a 3 µm de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-

silano- Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) e seguiu-se o protocolo abaixo descrito.

4.6.2 - Hidratação e bloqueios

As lâminas foram imersas em xilol pré-aquecido a 60 °C – 65 °C por 10 min., a seguir submetida a três banhos de xilol a temperatura ambiente e sucessivas lavagens com álcool etílico, em concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%). A seguir as hidratações, foram imersas em solução 1:1 de hidróxido de amônia / Álcool 95%, e a partir desta solução mãe, foi diluída 1:9 em álcool 95%. Os cortes foram expostos a esta solução por 10 min. em temperatura ambiente para remoção de pigmentos de formol e excesso de resíduos hemorrágicos. As lâminas foram lavadas posteriormente em água corrente abundante e água deionizada. O bloqueio da peroxidase endógena foi efetuado por banhos em 1:1 de metanol/H₂O₂ (10V, 3%) por dez min., seguidos de H₂O₂ por cinco vezes de cinco min., e posterior banhos em água corrente abundante, água deionizada e tampão fostato de sódio (PBS).

4.6.3 - Exposição e recuperação dos sítios antigênicos

A recuperação antigênica foi conseguida por alta temperatura pelo Citrato pH 6,0 50 min. à 95 – 100 °C para os marcadores (CD3, CD4, CD8, CD20 e CD68). Após as lâminas permaneceram imersas nesta solução para o resfriamento em temperatura ambiente por 20 min. A seguir foram lavadas em tampão PBS por três vezes de cinco minutos.

4.6.4 Incubação com os anticorpos

As lâminas foram imersas em solução 2% de leite desnatado (Molico Nestlé) por 10 min. em temperatura ambiente para bloqueio de imunoglobulinas não específicas. Após o bloqueio, os anticorpos primários CD3 (Leu-4, T₃, 1:600), CD4 (CD45RO, clone OPD4, 1:400); CD8 (Clone C8/144B, 1:100); Macrófago, CD68 (Clone KP1, 1:3200), Neutrófilo Elastase (Clone NP57, 1:800) de fabricação Dako A/S Denmark e o CD20y, células B (Clone L26, Dako Corporation Carpinteria, USA, 1:600), foram diluídos em BSA e incubados por 1 noite. Após a aplicação dos anticorpos primários, foram lavadas em PBS foi utilizado o Kit ABC Vectastain-Vector Elite (PK6104, Vector Technologies, Burlingame, CA) como secundário e complexo por streptoavidina-biotina por 30 min. a cada etapa. Para controle positivo, foram imunomarcados simultaneamente o timo e/ou linfonodos do camundongo. Para controle negativo da reação, as laminas foram incubadas com BSA no lugar do anticorpo primário. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram então lavadas abundantemente em água corrente, e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínula e resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram então rotuladas e encaminhadas à microscopia.

4.7 Determinação dos anticorpos anti-colágenos I, III e V por ELISA

Os anticorpos anti-colágenos tipos I, III e V nos soros dos camundongos foram avaliados através de métodos imunoenzimáticos (ELISA), sendo considerados positivos os valores acima do “cut-off”, calculado a partir da soma da média proporcional dos soros controles normais e três vezes o desvio padrão.

4.7.1-Sensibilização das placas e bloqueios

Placas de propileno (Costar Corp., Cambridge, MA) foram sensibilizadas com 50 µl dos colágenos tipos I, III e V (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) diluídos em tampão bicarbonato de sódio 15 mM (20 µg/ml) pH 9,6. Após 16 horas, os sítios livres dos orifícios foram bloqueados com 100 µl de albumina bovina 1% em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS com Tween₂₀ 0,05%.

4.7.2 -Diluição dos soros

Foi realizada uma diluição seriada dos soros (controle, doentes e tratados) para se verificar a positividade e o título. Após 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubadas com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase

(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) diluído 1:1000 BSA 1% em PBS com Tween₂₀ 0,05%.

4.7.3 - Revelação e leitura

A reação foi revelada com 50 µl de o-fenileno-diamino-dihidrocloreto (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) na proporção de 4 mg em 10 ml de tampão citrato 0,1 M fosfato de sódio 0,2 M pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 9 N. A leitura da densidade ótica foi feita a 492 nm, através de Titertek Multiskan MCC/340, de acordo com rotina do laboratório de imunologia da Disciplina de Reumatologia.

4.8 - Morfometria

4.8.1 - Descrição do analisador de imagens

O mensuramento dos BT e AT foram conseguidos usando um sistema de análise de imagens que consiste em uma câmera JVC TK-C1380 acoplada a um microscópio Leica, onde as imagens foram enviadas a um monitor (Trinitron Sony). Para o mensuramento, um sistema digital (Oculus TCX, Coreco inc; St Laurent, Quebec, Canadá) foi instalado a um computador (Pentium3 300Mhz), que processou as imagens por um software

(Image ProPlus). Também foi utilizado o software Leica Qwin Imaging Systems Ltd., Cambridge, England.

4.8.2 - Estudo qualitativo do remodelamento broncovascular

Para caracterizar um remodelamento ativo, foram avaliadas a densidade de colágeno, e a densidade do infiltrado imune celular, no eixo broncovascular ^{101, 102}. Foram mensurados o diâmetro e espessamento de parede em μm ; área μm^2 para bronquíolo terminal (BT) e artéria terminal (AT). A análise quantitativa por morfometria no analisador de imagens (Leica Qwin Imaging Systems Ltd, Cambridge, England) ¹⁰³, foram adquiridas no aumento de 100X para bronquíolos e 400X para artérias, foram excluídos àqueles que obtiveram relação menor que 0,6, pois há a possibilidade de estarem em sentido longitudinal.

$$\text{Diâmetro} = \frac{\text{Comprimento menor}}{\text{Comprimento maior}} > 0,6$$

4.8.3 - Deposição das fibras colágenas

A deposição das fibras colágenas no eixo broncovascular (BT e AT) foram analisadas pelo método Picrosirius/polarização. A solução de Sirius Red a 0,2% (Direct Red 80, C.I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI, 53233, USA) foi dissolvida em ácido pícrico saturado. A birefringência conseguida pela polarização do picrosirius é específica para estruturas colágenas de possível visualização ao microscópio óptico e no analisador de imagens ¹⁰³. O colágeno foi expresso como uma relação entre a quantidade de fibras colágenas da espécie na área ocupada e a área total do frame estabelecida ¹⁰⁴. Um ajuste para as fibras colágenas foi estabelecido para cada mensuramento, após se obter a birrefringência das bandas pelo uso de filtros especiais. O número de BT e AT analisados em cada caso foram cinco em média no aumento de 400x, expresso em %/ μm^2 .

4.8.4 Estudo quantitativo das células inflamatórias

A densidade de infiltrado imune celular no eixo broncovascular (bronquíolo terminal e artéria terminal) e BALT foram determinada pela técnica IHQ/peroxidase, para as células T (CD3+, CD4+ e CD8+), células B (CD20+), macrófagos (CD68+) e neutrófilos, foram mensuradas por densidade óptica no analisador de imagem ¹⁰³. A percentagem de células do infiltrado inflamatório foi expresso como uma relação entre a quantidade de células marcadas pela IHQ da espécie pela área ocupada e a área total do

frame estabelecida ($8.834,25 \mu\text{m}^2$). Um ajuste para cada marcador foi estabelecido para o mensuramento, após se obter a cor variando do castanho ao marrom escuro. Foram analisados 10 campos em cada caso no aumento de 400x, expressos em $\%/\mu\text{m}^2$. Comparações entre dois observadores foram realizadas em 10% das laminas ou por duas vezes pelo mesmo observador. O coeficiente de variação do erro entre os observadores para as contagens foi $< 5\%$.

4.9 - Análise Estatística

As diferenças entre os grupos foram analisadas: pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, a homogeneidade das variâncias por Levene, ANOVA e o “post-hoc” por Tukey-HSD ou Dunnett-T3 para comparações múltiplas. O valor de p aceito foi menor que 0,05 para ser considerado significativo. Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados pelo software SPSS versão 13 ¹⁰⁵.

5 - RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com os três protocolos estabelecidos: Modelo da BO, Tolerância preventiva e Tratamento comparativo: prednisona vs tolerância.

5.1 - Modelo da BO

5.1.1- Análise Qualitativa

No protocolo modelo da BO, o parênquima pulmonar dos grupos controle, salina e BO são mostrados na Figura 8. Após oito semanas da instilação do HNO_3 via nasal, houve alterações na histologia do grupo BO, caracterizada por distorções do lúmen, perda de células epiteliais, redução ou total obliteração do lúmen do BT, proeminente espessamento de parede, maior deposição de fibras colágenas, assim como maior infiltrado imune celular difusamente distribuído ou formando folículos linfóides. A extensão e distribuição dessas lesões ao longo dos compartimentos dos BT e AT diferiram de acordo com os grupos.

5.1.2 - Análise Quantitativa

O Anexo A. Tabela 1 mostra os resultados quantitativos para o protocolo modelo BO foram conseguidos por morfometria pelo mensuramento do diâmetro de BT e AT. As mudanças morfológicas no lúmen dos BT e AT coincidem com as diferenças em termos de mensuramento nos três grupos dos animais. O diâmetro dos BT (Figura 9A) mostrou significativa diminuição quando comparado os pulmões controle vs BO ($P = 0,05$). Em contra-partida, houve aumento dos espessamentos da parede para BT, com maior índice de significância para o espessamento da AT (Figura 9B) quando comparado os pulmões controle vs BO ($P = 0,001$, respectivamente).

O mensuramento da densidade de colágeno foram apresentadas na Figura 10A e Anexo B. Tabela 2. As mudanças morfológicas coincidem com as diferenças em termos de quantificação nos três grupos. Embora não significativa, os pulmões BO apresentaram maior densidade colágeno, seguido dos pulmões salina e controle. A densidade de colágeno mostrou maior aumento nas AT dos grupos BO quando comparado aos pulmões salina e controle; em ordem reversa a densidade de colágeno nos BT tiveram menor densidade de colágeno. O aumento da densidade de colágeno nos pulmões BO mostrou estar correlacionado ao compartimento perivascular.

A densidade total de células, referentes ao três compartimentos está

representada na Figura 10 B, mostrou valores significantes nos pulmões BO e salina quando comparadas ao controle ($P = 0,001$ para ambos). As alterações morfológicas quanto à densidade de células nos compartimentos BT, AT e BALT (Figura 11A e Anexo B. Tabela 2), também coincidem com as diferenças, em termos de quantificação nos três grupos do protocolo do modelo da BO.

O mensuramento do infiltrado celular: linfócitos, macrófagos e neutrófilos, e sua imunofenotipagem estão apresentadas no Anexo C. Tabela 3. Essas alterações coincidem com a diminuição do diâmetro e o aumento do espessamento de parede dos BT e AT.

Houve aumento significativo da densidade de células $CD3^+$ e neutrófilos no grupo salina quando comparadas ao controle ($P = 0,01$ e $P = 0,04$, respectivamente), Figuras 11B e 12B. Embora a densidade das células T, $CD4^+$ e $CD8^+$ foi maior nos pulmões BO, não houve diferença estatística quando comparadas ao grupo salina e controle, Figura 12A. O grupo BO apresentou aumento na densidade de todas as células aqui estudadas, com maior evidência a densidade macrófagos nos grupos BO e salina quando comparadas ao controle ($P = 0,01$ e $P = 0,04$, respectivamente), Figura 12B.

Figura 8. Modelo de BO. Paineis dos pulmões de camundongo BALB/c nos três grupos: controle, animais normais; salina, animais que foram instilados com salina, NaCl 0,9%; BO, os animais que receberam uma única instilação de HNO_3 , respectivamente. H & E, Picrosírius sob luz polarizada e IHQ para os marcadores: CD3, no aumento de 400x. Pulmões dos grupos controle e salina mostram a histoarquitetura do eixo pré-acinar preservada. Em contraste, o tecido pulmonar do grupo BO mostra distorção do BT e AT e aumento da densidade de colágeno nas AT, e de células inflamatórias; 400x.

A **B**

Figura 9. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações dos dados quantitativos do diâmetro de BT em µm (A), e a espessura de parede em (B) nas AT no modelo da BO para os grupos: controle, salina e BO. Cada barra representa a Média ± Desvio Padrão do mensuramento nos três grupos. O grupo BO apresenta diminuição dos valores do diâmetro e aumento do espessamento de parede do após 8 semanas da instilação do HNO_3 .

Figura 10. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de colágeno nos BT e AT (A), e a densidade do infiltrado celular (B) no modelo da BO. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os valores estão expressos em $\%/ \mu\text{m}^2$ estratificados nos grupos: controle, salina e BO. Houve aumento na densidade de colágeno no grupo BO, principalmente nas AT. Os grupo salina e grupo BO mostraram maior densidade de células inflamatórias no eixo pré-acinar.

Figura 11. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade do infiltrado celular estratificado nos três compartimentos BT, AT e BALT (A), e das células CD3+ e CD20+ (B) no modelo da BO. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os valores estão expressos em $\%/\mu\text{m}^2$ estratificados para os grupos: controle, salina e BO. Houve aumento de células inflamatórias nos grupos salina e BO.

Figura 12. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade das células T CD4+ e CD8+ (A), e CD68+ e neutrófilos (B) no modelo da BO. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os valores estão expressos em % / μm^2 estratificados para os grupos: controle, salina e BO. Houve aumento de células inflamatórias nos grupos salina e BO.

5.2 - Tolerância Preventiva

5.2.1 -Análise Qualitativa

Após 10 semanas da imunização via nasal pelo colágeno tipo V, as alterações usualmente presentes na BO, como diâmetro do BT, espessamento broncovascular proeminente com deposição de fibras colágenas foram drasticamente atenuadas, como mostra o parênquima pulmonar na Figura 13. Em contraste, o infiltrado celular por linfócitos difusamente distribuídos ou formando folículos linfóides, macrófagos e neutrófilos estão aumentados na BO. A extensão e distribuição das lesões ao longo dos compartimentos do eixo pré-acinar diferiram quantitativamente de acordo com os grupos de animais.

O diâmetro do BT e AT, a área e o espessamento de parede, assim como a densidade de colágeno e o infiltrado celular mostraram equivalência associadas às mudanças que ocorreram nos grupos BO, ctV+BO, BO+ctV e controle.

5.2.2 - Análise Quantitativa

Os resultados quantitativos da tolerância, quanto ao diâmetro (Figura 14A) e espessamento de parede do BT mostram uma tendência à restauração equivalente ao grupo controle, como representado no Anexo D. Tabela 4. A área total e a espessura de parede do BT (Figuras 14B e 15A) nos pulmões BO mostraram valores significantes quando comparada ao tratamento no estágio intermediário da BO e pulmões BO+ctV ($P = 0,001$ e $P = 0,01$, respectivamente).

A densidade de colágeno no eixo pré-acinar mostrou diminuição estatisticamente significante no total do eixo pré-acinar (BT e AT) e isoladamente, para os BT dos pulmões BO quando comparado ao tratamento preventivo, ctV+BO, e ao estágio intermediário da BO, pulmões BO+ctV ($P = 0,04$ e $P = 0,01$, e $P = 0,02$ e $P = 0,001$, respectivamente), Anexo E. Tabela 5 e Figura 15B.

As correlações dos índices de expressão dos marcadores entre si quanto aos compartimentos BT, AT e BALT foram descritas no Anexo E. Tabela 5. A densidade total de células no eixo pré-acinar mostra que quando BO foi comparado ao tratamento preventivo, ctV+BO, não mostrou significância estatística, contudo houve significante diminuição dos valores quando comparado ao estágio intermediário da BO, BO+ctV, e aos pulmões controles ($P = 0,002$ e $P = 0,001$, respectivamente), Figura 16A. A densidade de células estratificadas quanto aos compartimentos BT, AT e BALT, estão representadas na Figura 16 B.

Estas células foram principalmente CD3+, que mostrou diminuição significativa quando o grupo BO quando comparado ao estágio intermediário da BO, BO+ctV, e ao controle ($P = 0,001$ e $P = 0,002$, respectivamente), Figura 17A.

Houve também diminuição estatisticament signiicante da densidade de células CD20+ de BO quando comparada aos pulmões ctv+BO, BO+ctV, e controle ($P = 0,008$, $P = 0,004$ e $P = 0,001$), Figura 17A. A quantificação para os marcadores CD4+ e CD8+ (Figura 17B) e CD68 e neutrófilos (Figura 18) não mostraram significância estatística entre os grupos BO e ctV+BO e BO+ctV, como mostra o Anexo F. Tabela 6.

Figura 13. Tolerância preventiva. Painel dos pulmões de camundongos BALB/c nos grupos controle, animais normais; ctV+BO, àqueles que foram tolerados preventivamente à instilação de HNO_3 ; BO, àqueles que receberam a instilação de HNO_3 ; e BO+ctV, àqueles que foram tolerados no estágio intermediário da doença, respectivamente. Observar modificações na arquitetura broncovascular e no infiltrado celular, coincidindo com as quantificações. A densidade de colágeno no grupo BO foram mais expressas nas AT. Contudo, diminuem nos animais que foram tolerados preventivamente. H&E, Picrosírius e IHQ (CD20+), 400x.

Figura 14. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações dos dados quantitativos do diâmetro em μm (A), e área total em μm^2 (B) nos BT no protocolo da tolerância preventiva para os grupos: BO, ctV+BO, BO+ctV e controle. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Houve aumento no diâmetro e diminuição de área dos BT nos animais que foram tolerados, indicando um restabelecendo da histoarquiteura no eixo pré-acinar.

Figura 15. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações de espessura de parede do BT (A) e a densidade de colágeno nos BT e AT (B) no protocolo da tolerância preventiva. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em % / μm^2 estratificados para os grupos: BO, ctV+BO, BO+ctV e controle. Houve diminuição da espessura de parede nos BT e densidade de colágeno nos BT e AT dos animais que foram tolerados.

Figura 16. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de células total (A), e a densidade de células estratificadas nos compartimentos: BT, AT e BALT (B) no protocolo da tolerância preventiva. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em % / μm^2 estratificados para os quatro grupos: BO, ctV+BO, BO+ctV, e controle. Houve diminuição da densidade de células nos animais que foram tolerados.

Figura 17. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de células CD3+ e CD20+ (A), e CD4+ e CD8+ (B), no protocolo da tolerância preventiva. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em $\%/\mu\text{m}^2$ estratificados para os quatro grupos: BO, ctV+BO, BO+ctV, e controle. Houve diminuição da densidade de células nos animais que foram tolerados.

Figura 18. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de CD68 e neutrófilos no protocolo da tolerância preventiva. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em %/ μm^2 estratificados para os quatro grupos: BO, ctV+BO, BO+ctV e controle. Houve diminuição da densidade de células nos animais que foram tolerados.

5.3 - Tratamento comparativo: prednisona vs tolerância

5.3.1 -Análise Qualitativa

O eixo pré-acinar à partir dos pulmões BO, BO+pr, BO+ctv e controle estão representados na Figura 19. Após 13 semanas da instalação da BO, a histoarquitetura do eixo pré-acinar no grupo BO+ctv foi completamente restaurada para os parâmetros lúmen do BT, espessamento de parede dos BT e AT. Houve diminuição drástica da deposição de fibras colágenas, tanto quanto atenuação da densidade do infiltrado imune celular.

5.3.2 Análise Quantitativa

Os resultados da quantificação do tratamento prednisona vs tolerância (Anexo G. Tabela 7), mostram uma diminuição da área total do BT quando comparado a partir dos pulmões BO vs BO+pr, BO+ctV e controle ($P = 0,001$, $P = 0,02$ e $P = 0,003$, respectivamente), Figura 20B, e o espessamento da parede do BT quando comparado a partir dos pulmões BO vs BO+pr, BO+ctV e controle ($P = 0,07$, $P = 0,002$ e $P = 0,002$, respectivamente), Figura 21A.

A densidade total de fibras colágenos diminuiu no BT e AT para os tratamentos propostos, quando comparado a partir dos pulmões BO sem que houvesse significância estatística. Contudo, isoladamente a tolerância nasal apresentou valores significantes no BT ($P = 0,01$), como demonstrado

no Anexo H. Tabela 8 e Figura 21B.

A densidade total de células diminuiu drasticamente quando foram comparados os pulmões BO vs BO+ctV e controle ($P = 0,003$ e $P = 0,001$, respectivamente); não houve significância estatística para os pulmões BO+pr, como demonstrado no Anexo I. Tabela 9 e Figura 22A. A densidade de células estratificadas nos compartimentos BT, AT e BALT estão representadas na Figura 22 B. Estas células foram principalmente CD3+ quando comparado os pulmões BO vs BO+pr, BO+ctV e controle ($P = 0,03$, $P = 0,03$ e $P = 0,05$, respectivamente), Figura 23A. A densidade de células CD20+ diminuiu quando comparados os pulmões BO vs BO+ctV e controle ($P = 0,006$ e $P = 0,004$, respectivamente); não houve significância estatística quando comparado aos pulmões BO+pr. Células T CD4+ diminuíram drasticamente quando comparado os pulmões BO vs BO+ctV e controle ($P = 0,001$ para ambos); não houve significância estatística quando comparado aos pulmões BO+pr. Houve significativa diminuição da densidade de células T CD8+ quando comparados os pulmões BO+pr vs BO+ctV e controle ($P = 0,01$ e $P = 0,004$, respectivamente); não houve significância estatística quando comparado aos pulmões BO. Figura 23 B. A histoarquitetura dos pulmões BO+ctV se assemelharam ao pulmões controle, assim quando comparados quanto a densidade do infiltrado celular, o resultado foi um aumento da densidade de CD68+ e neutrófilos nos pulmões BO quando comparados ao controle, sem que houvesse significância estatística para os neutrófilos, Figura 24. Entretanto estes marcadores continuaram bastante ativos em ambos tratamentos propostos BO+pr e BO+ctV, conduzindo talvez

a resposta mais humoral que celular. O aumento de macrófagos possivelmente induziu o aumento de MMPs que participaram ativamente a degradação ou não deposição de colágeno no eixo pré-acinar, contribuindo para a diminuição de fibras colágenas como foram observados no Anexo H.

Tabela 8.

Figura 19. Tratamento prednisona vs tolerância. Histologia dos pulmões de camundongos BALB/c nos grupos: BO, animais tratados com prednisona (BO+pr), animais tolerados (BO+ctv), e controle normal, respectivamente. Observar as modificações no eixo pré-acinar e o infiltrado celular, estas alterações coincidem com a deposição de colágeno. H & E e Picrosirius e IHQ (CD3+), 400x.

Figura 20. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações do diâmetro em μm (A) e área total em μm^2 (B) do BT no protocolo prednisona vs tolerância. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento estratificados nos quatro grupos: BO, ctv+BO, BO+ctV e controle. Houve diminuição do diâmetro do BT no tratamento com a prednisona, e recuperação, equivalente grupo controle, para os animais que foram tolerados. Ambos tratamentos foram eficientes por resultarem em diminuição da área total do BT.

Figura 21. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da espessura de parede no BT (A) e densidade de colágeno no BT e AT (B) no protocolo prednisona vs tolerância. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em $\%/\mu\text{m}^2$ estratificados nos grupos: BO, ctV+BO, BO+ctV e controle. Ambos tratamentos mostraram diminuição da densidade de colágenos nos BT e AT.

Figura 22. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade total de células (A) e estratificadas nos três compartimentos: BT, AT e BALT (B) no protocolo prednisona vs tolerância. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento, os dados estão expressos em $\%/\mu\text{m}^2$. Houve diminuição da densidade de células em ambos os tratamentos, sendo de maior evidência nos animais que foram tolerados.

Figura 23. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade de células CD3+ e CD20+ (A), CD4+ e CD8+ (B) no protocolo prednisona vs tolerância. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em $\%/\mu\text{m}^2$ estratificados nos quatro grupos BO, BO+pr, BO+ctV e controle. Houve diminuição da densidade de células CD3/CD20 para ambos os tratamentos, e CD4/CD8 nos animais que foram tolerados.

Figura 24. Os gráficos em barras de erros mostram as correlações da densidade das células CD68+ e neutrófilos no protocolo do tratamento prednisona vs tolerância. Cada barra representa a Média $\pm$ Desvio Padrão do mensuramento. Os dados estão expressos em %/ μm^2 estratificados nos quatro grupos, BO, BO+pr, BO+ctV e controle. Houve diminuição da densidade de células CD68 e neutrófilos nos animais que foram tolerados.

6. DISCUSSÃO

A discussão será iniciada pela exposição das limitações deste estudo, prosseguindo pela implantação do modelo de BO, e finalizando com a discussão dos resultados, na seqüência que foram apresentados no capítulo Resultados.

6.1 - Limitações deste estudo

6.1.1 - Marcadores imunohistoquímicos

Com exceção do marcador CD3, de origem policlonal, os demais anticorpos utilizados foram monoclonais (CD4, CD8, CD20, CD68 e neutrófilos). De acordo com fabricante (DAKO), estes não foram testados em camundongos ou apresentariam baixa reatividade entre espécies. Contudo, após a titulação e testes nos tecidos linfóides do camundongo (linfonodos e timo), os pulmões dos grupos em estudo foram pareados aos controles teciduais de camundongo e tecido humano (amígdala). Esta conduta é empregada de modo rotineiro no laboratório. Além do que foram observados alguns passos cuidadosos quanto ao emprego de bloqueadores de biotinas não específicas e adequação do tempo para as reações, especialmente para os anticorpos secundários.

6.1.2 - Testes sorológicos

A sorologia por ELISA com a finalidade de se pesquisar a presença de colágenos tipos I-III e V circulantes, pois observamos alterações na densidade de colágenos no grupo BO e àqueles tolerados. Para melhor avaliação os efeitos da imunização via nasal pelo colágeno tipo V, possivelmente um acompanhamento temporal sorológico possa ser realizado com melhores resultados de padronização.

Entretanto, os testes sorológicos: anti-colágenos tipo I, III e V no teste por ELISA não mostrou significância estatística entre os grupos propostos, apesar dos longos períodos de administração nasal do colágeno tipo V. O que nos levou a pensar que a resposta imunológica foi iniciada logo de início na mucosa nasal, sendo então os peptídeos do colágeno tipo V eliminados do organismo sem causar um processo inflamatório, possivelmente por fagocitose, apoptose ou outro mecanismo de excreção natural.

6.1.3 - Lavado bronco-alveolar

As amostras teciduais “in vivo” são de difícil acesso ou de risco ao paciente, carecendo assim de melhor observação nos estudos experimentais. A observação histológica do infiltrado inflamatório condiz com as alterações no lavado bronco-alveolar descrito na literatura.

A coleta de lavado bronco-alveolar não foi realizada temporalmente,

talvez essa medida, em experimentos futuros, possa ser auxiliar no mapeamento do infiltrado inflamatório e no surgimento da cascata de citocinas e fatores de crescimento envolvidos na BO, assim como no processo da tolerância pela imunização via nasal pelo colágeno tipo V nesta patologia.

6.1.4. - Cultura de células

Ao final do experimento, seria possível a coleta de linfonodos pulmonares para o estudo de cultura de células e proliferação celular. Porém, desejávamos ter amostra suficiente para avaliação das pequenas vias aéreas. Outro aspecto foi o de otimizar ao máximo o número de animais envolvidos no estudo, focamos nossos objetivos na histologia e morfometria. Entretanto, a cultura de células não só de linfonodos, mas de BT dos pulmões tolerados possam ser foco de interesse em futuros estudos, por exemplo, na microscopia eletrônica, onde melhor avaliariamos a lesão no eixo pré-acinar.

6.1.5 - Teste de função pulmonar

Possivelmente o teste de função pulmonar durante o tratamento e no final do estudo poderia ter sido incluso, pois houve alterações no calibre dos bronquíolos e artérias no eixo pré-acinar, caracterizando diminuição da função pulmonar, ou ganho com a terapêutica induzida, como já descritos

em trabalhos com os colágenos tipos I e II.

6.1.6 - Biologia molecular

Um possível estudo molecular auxiliaria no mapeamento dos possíveis genes envolvidos no processo da BO e nos possíveis tratamentos. Foram retirados o baço e fígado no início da padronização dos grupos para observações de alterações histológicas quanto ao HNO₃ e o colágeno tipo V, os quais não demonstraram alterações patológicas. Amostras teciduais do baço e medula óssea talvez possam auxiliar num estudo molecular futuro. Algumas amostras das fossas nasais foram retiradas para observação de prováveis lesões na narina pela indução do ácido nítrico, mas não fizeram parte desse estudo.

6. 2 - Remodelamento pulmonar e colágenos

No pulmão estão descritos 12 tipos de colágenos que representam de 15-20% do peso seco do órgão. Os de maior volume estão dispostos na proporção de 3:1 para colágeno tipo I e 6:1 para o colágeno tipo III.

Estão presentes peribronquiolar e perivascular os colágenos tipos IV e V ¹³, e os tipos II, VI, VII, VIII, IX e XI, nas áreas cartilaginosas, como traquéia, brônquios e bronquíolos ⁴⁸. Os colágenos tipos V e XI são os menores, e tem como funções regular a fibrilogênese e a antigenicidade, um fator crítico ^{46, 47}.

O colágeno é um constituinte principal da MEC e talvez da molécula a mais importante na estabilização da estrutura, do crescimento, diferenciação, proliferação, adesão, migração, reparo tecidual e antigenicidade ¹⁰⁶.

O colágeno tipo V está localizado nas paredes de brônquios e bronquíolos, assim como nas estruturas pulmonares; estes achados são consistentes com os relatos da produção de colágeno tipo V por músculo liso e células endoteliais de artérias e capilares ¹⁰⁷.

O colágeno tipo V é o menor colágeno fibrilar e está distribuído nos tecidos como heterotrímero $1(V)_2 2(V)$. Em menor abundância a forma $1(V) 2(V) 3(V)$ foi isolada da placenta ⁴⁶; uma forma rara é o $1(V)_3$ homotrímero vem sendo descrita em numero limitado de células e tecidos ⁴⁴.

Enquanto os tipos *I*, *II*, e *III* sofrem um processo de redução da molécula dentro do domínio tripla-hélice, o tipo V retém uma grande parte do N- propeptideo da molécula madura, desta forma tem controle na fibrilogenese ^{52, 108, 109}.

Associações entre os colágenos tipos I e V levam a formação de fibrilas heterotípicas com os diâmetros de fibrilas controlados, as quais são consideradas importantes por influenciar as características funcionais dada aos tecidos. As alterações genéticas nas moléculas do colágeno tipo V são fundamentais na integridade da MEC, e estão envolvidas no processo de remodelamento, que culmina com a fibrose pulmonar em doenças do tecido conjuntivo humano. A proteína do colágeno tipo V é altamente conservada entre as espécies. O aumento do colágeno tipo V, a desorganização

morfológica na densidade e espessamento de suas fibras, e a indução do aumento do diâmetro das fibras do tipo I indicam o evento do remodelamento. As alterações genéticas da molécula do colágeno tipo V danificam o controle do conjunto da matriz, e são envolvidas no processo remodelamento, que culmina na fibrose pulmonar e nas doenças humanas do tecido conjuntivo ^{50, 51, 79}.

Evidências recentes sugerem que as mutações da cadeia $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ na síndrome de Ehlers-Danlos conduzem às mudanças morfológicas teciduais ^{110, 111} através das mudanças em estruturas da fibrila e do tecido. Estes resultados demonstram a lesão na membrana basal, levando a fragmentação do colágeno, que possui papel fundamental na fibrilogênese e integridade da MEC ^{44, 45, 51, 52}. Seus peptídeos expostos são potencialmente antigênicos e levariam a uma perpetuação do mecanismo auto-destrutivo ^{7, 36}, pois as extensões terminais NH₂ e COOH do procolágenos apresentam maior imunogenicidade do que o corpo da molécula ³⁷.

6.2.1 - Remodelamento vascular

Houve remodelamento vascular no eixo pré-acinar, correspondente às artérias terminais associadas aos bronquíolos terminais. Quantificamos morfológicamente a redução da área e o aumento na espessura da parede. Houve redução do lúmen vascular com o aumento contínuo no tecido conjuntivo sem neovascularização subsequente ¹¹².

Nossos achados indicam também que há obliteração substancial das artérias, gerando a hipoxemia e conduzindo o remodelamento a um processo de reparo por intenso infiltrado celular e deposição de fibras colágenas.

6.3 - Imunização e linfócitos

O tecido linfóide das mucosas participa da defesa do hospedeiro através de sua extensa superfície em contínuo contato com o ambiente externo. Este tecido contém estruturas linfóides especializadas que albergam células imunorreguladoras precursoras de células B e T, as quais determinarão a um estado de tolerância ou intensa resposta imunológica, após a administração oral/nasal de um antígeno. Estudos recentes sugerem que a resposta imunossupressora Th2 é gerada preferencialmente nas placas de Peyer, onde as células T se dividem em subtipos produtores de IL-5, IL-10 e, possivelmente, TGF- β ^{61, 64, 67}.

Embora a presença de um tecido linfóide associado a mucosa do trato gastrointestinal seja conhecida há muitas décadas, a idéia de um sistema

imunológico especializado próprio das mucosas é relativamente nova. Como a pele, o epitélio da mucosa representa uma barreira entre o meio externo e o interno e, por isso, constitui uma importante linha de defesa do organismo.

A resposta imunológica a antígenos administrados por via oral é fundamentalmente diferente da clássica resposta a antígenos encontrados em outros sítios. As duas principais diferenças estão nos altos níveis de produção de IgA pelos tecidos mucosos e no favorecimento à tolerância, sem ativação da células T.

São três os mecanismos básicos envolvidos na tolerância: deleção clonal, anergia clonal e supressão ativa. A deleção clonal, ou apoptose de células efectoras é o mecanismo pelo qual os clones de linfócitos são eliminados, por morte celular, ao entrarem em contato com o antígeno. A anergia clonal é um processo em que clones antígeno-específicos são funcionalmente inativados, mas não destruídos. Dentre os vários mecanismos de anergia, destaca-se aquele onde o linfócito deixa de expressar o receptor para o antígeno e aquele onde ocorre um bloqueio ao nível do receptor, não permitindo que o antígeno se ligue a este. Finalmente, a *supressão ativa* representa a circunstância em que os clones de linfócitos passam a não mais responder frente a uma estimulação antigênica, devido à secreção *in situ* de linfocinas inibidoras, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β , produzidas por outros linfócitos. O mecanismo de imunossupressão pode ainda variar com as características específicas do modelo estudado. Mayer et al, em 2000 ⁶⁷, apontam em seu estudo para a supressão pela célula T CD8. Baixas doses de um antígeno, ativa a regulação TGF- β (Th3),

enquanto altas doses induzem anergia ou deleção ^{61, 64, 113}. Proteínas solúveis não são eficientes para evocar células na mucosa ou serem absorvidas pelo epitélio, podendo resultar na apresentação a células T e seletivamente a células CD8 +, supressor de linfócitos T. Células T CD4+, e células T CD8+ podem assumir a imunoregulação durante a resposta imune ou diferenciadas quanto ao meio efetor e a função ¹¹⁴.

O estágio intermediário de diferenciação das células T é o caminho para sinalização da tolerância ⁽⁶²⁾. Células Th podem diminuir a regulação periférica da imunidade mediada por células, ao mesmo tempo em que haverá aumento do desenvolvimento de células T citotóxicas que seletivamente escolherão a mucosa intraepitelial como sítio. O gatilho dado por eventos inflamatórios, onde o epitélio alveolar sofre algum prejuízo e junto a outras células residentes, liberam mediadores inflamatórios que promovem o recrutamento de células inflamatórias.

6.4 - Discussão dos resultados

6.4.1 - Escolha das técnicas de marcações para quantificação

O estudo dos tecidos pulmonares foi realizado pelo método de marcações histológicas e IHQ para a densidade do infiltrado celular; técnica histoquímica pelo picrossírius para a quantificação da densidade de colágenos, e H&E para o mensuramento das dimensões dos BT e AT.

Para a contagem de células marcadas pelo primeiro método, em todas as baterias foram utilizados controles positivos das reações. A ausência de marcação à observação microscópica de tecidos submetidos à pesquisa por IHQ pode representar um entre dois fenômenos: ausência de expressão protéica ou falha de técnica.

O controle positivo realizado pela coloração de um tecido que sabidamente expressa a proteína, evita a leitura de lâminas inadequadas. Cada anticorpo utilizado no estudo, teve um tecido padrão para controle positivo. Os laboratórios que produzem os anticorpos discriminam na bula qual tecido deve ser o testado, e quais possíveis reatividades para a espécie. Neste estudo foram utilizados tecidos linfóides (timo e/ou linfonodos) de camundongos, pareados a amígdala humana, sabidamente positivas para a expressão de células B e T, macrófagos e neutrófilos. Esses marcadores foram encontrados em maior ou menor proporção de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório.

6.4.2 - Marcadores celulares na BO

Diversas entidades clínicas estão associadas com o desenvolvimento da BO, tais como: infecções, drogas inalatórias, doenças do tecido conjuntivo e reação a drogas ⁵⁰. Também como uma das mais importantes causas de disfunções de rejeição pós-transplante pulmonar seja a BO ⁽⁶⁾. Neste contexto, há pacientes que experimentam uma rápida piora na função pulmonar; há pacientes que respondem a terapia corticóide e atingem completa recuperação clínica e morfológica; e pacientes que desenvolvem uma persistente doença insidiosa que, apesar de qualquer tipo de tratamento, finalizaram numa falência pulmonar por fibrose pulmonar ^{33, 53, 115, 116}.

Desta forma, há um grande interesse nas vias de identificação de como a doença progride, e o encurtamento de vida dos pacientes, e para eficiência do tratamento, é necessária a identificação dos casos logo após o surto de dispnéia.

A patogênese dos diferentes mecanismos na BO ou da rejeição no transplante não é bem compreendida. O infiltrado de células imunes e alterações no remodelamento da arquitetura pulmonar são os maiores determinantes, mas estas causas e as vias patológicas continuam a serem determinadas. Neste sentido, muitos estudos do mecanismo patogênético da BO em modelos animais tentam descobrir quais os fatores envolvidos na progressão da doença. Nestes modelos animais, são identificados o tipo e

distribuição do infiltrado de células imune, como também a densidade de colágenos, fatores esses que são marcadores potenciais da atividade da doença. Em alguns estudos, a imunomarcação do infiltrado celular pode estar significativamente associada com a evolução da BO nas vias aéreas ^{28, 115}, mas há incertezas de qual a melhor via para se induzir um modelo de BO, e que possa expressar a quantificação celular.

De fato, há muitas maneiras de se estabelecer um modelo de BO e descrever o infiltrado celular nas vias aéreas. Alguns pesquisadores estudaram o colágeno para definir o remodelamento MEC, e outros estudaram o remodelamento vascular.

Claramente, a razão da falta de êxito nos tratamentos de cura para os pacientes com BO está na ativa progressão do remodelamento após a lesão. A questão de interesse está onde essas informações ou métodos adicionais, à partir da histopatologia de pulmões, possam garantir a identificação da BO.

O remodelamento pulmonar está comprometido com uma série de eventos mediados pelo sistema imune, que conduzem ao remodelamento da MEC, contudo certos aspectos da cascata dos eventos do remodelamento inflamatório continuam desconhecidos ¹¹⁷.

6.5 - Índice de expressão dos marcadores na BO

6.5.1 - Protocolo 1. Modelo da BO

Após oito semanas da instilação do HNO_3 via nasal, houve alterações na histologia do grupo BO, caracterizada por distorções do lúmen, perda de células epiteliais, redução ou total obliteração do lúmen do BT, proeminente espessamento de parede, maior deposição de fibras colágenas, assim como maior infiltrado imune celular difusamente distribuído ou formando folículos linfóides. Pulmões dos grupos controle e salina mostram a histoarquitetura do eixo broncovascular preservada. Em contraste, o tecido pulmonar do animal que recebeu HNO_3 via nasal, mostra distorção do BT e AT e aumento da densidade de colágenos nas AT. O diâmetro dos BT e AT foram menores nos pulmões do grupo BO quando comparado ao grupo salina e controle, e em consequência houve aumento do espessamento da parede. Embora não significativo, os pulmões BO apresentaram maior densidade de colágenos, principalmente no compartimento perivascular.

As alterações morfológicas nos compartimentos BT, AT e BALT, também coincidem com as diferenças, em termos de quantificação nos três grupos do protocolo do modelo da BO quanto ao mensuramento do infiltrado celular. Essas alterações coincidem com a diminuição do diâmetro e o aumento do espessamento de parede dos BT e AT.

O grupo BO apresentou aumento na densidade de todas as células

aqui estudadas, com maior evidência a densidade macrófagos nos grupos BO e salina. Houve aumento significativo da densidade de células CD3⁺ e neutrófilos no grupo salina. Embora a densidade das células T, CD4⁺ e CD8⁺ fosse maior nos pulmões BO, não houve diferença estatística quando comparadas aos outros grupos.

A nós também surpreendeu que na instilação da solução salina a 0,9% houvesse aumento de células inflamatórias. A instilação de salina sensibiliza a mucosa nasal, com o movimento do camundongo na gaiola há levantamento do pó da palha, gerando assim um processo irritativo. O modelo foi repetido várias vezes, e o fato se repetiu. A densidade total de células, referentes ao três compartimentos mostrou valores significantes nos grupos BO e salina.

6.5.2 - Protocolo 2. Tolerância Preventiva

Após 10 semanas da imunização via nasal pelo colágeno tipo V as alterações usualmente presentes na BO, como diâmetro do BT, espessamento broncovascular proeminente com deposição de fibras colágenas estão drasticamente atenuadas. Em contraste, o infiltrado celular por linfócitos difusamente distribuídos ou formando folículos linfóides, macrófagos e neutrófilos estão aumentados no preventivo (ctV + BO). A extensão e distribuição das lesões ao longo dos compartimentos do eixo broncovascular diferiram quantitativamente de acordo com os grupos de animais. A densidade de colágenos e infiltrado imune celular (linfócitos, macrófagos e neutrófilos) para o parâmetro de remodelamento de onde é possível associar o remodelamento nos pulmões dos grupos BO, ctV+BO, BO+ctV, e controle. Os resultados quantitativos da tolerância pelo colágeno tipo V, quanto ao diâmetro e espessamento de parede do BT mostraram uma tendência a restauração ao padrão do controle. A área total e a espessura de parede do BT do grupo BO mostraram valores significantes quando comparada ao tratamento no estágio intermediário da BO, grupo BO+ctV .

A densidade de colágenos no eixo broncovascular mostrou diminuição estatisticamente significante dos valores para BT do grupo BO quando comparado ao tratamento preventivo, grupo ctV+BO e ao estágio intermediário da BO, grupo BO+ctV.

O total de células imune no eixo broncovascular mostrou que quando BO foi comparado ao tratamento preventivo, grupo ctV+BO não houve significância estatística, contudo houve significativa diminuição dos valores quando comparado ao estágio intermediário da BO, grupo BO+ctV e ao controle. Estas células foram principalmente CD3+, CD20+, que mostraram diminuição significativa em relação ao grupo BO quando comparados ao grupo BO + ctV.

6.5.3 - Protocolo 3. Tratamento prednisona vs tolerância

Após 13 semanas da instalação da BO, a histoarquitetura do eixo broncovascular no grupo BO+ctV foi completamente restaurada para os parâmetros lúmen do BT, espessamento de parede dos BT e AT. Houve diminuição drástica da deposição de fibras colágenas, tanto quanto atenuação densidade do infiltrado imune celular.

Os resultados da quantificação mostram uma diminuição da área total e aumento do espessamento de parede do BT para o grupo BO, em relação ao tratamento com prednisona e pela tolerância.

A densidade de colágenos diminuem no BT e AT para os tratamentos propostos. Esses valores são significantes para os BT dos pulmões que foram imunizados.

A densidade total de células diminui drasticamente dos pulmões do grupo BO quando comparados aos pulmões BO+ctV e grupo controle. Estas células foram principalmente CD3+, CD4+, CD8+ e CD20+ do grupo BO, não houve significância estatística quando comparado ao grupo BO+pr.

A histoarquitetura dos pulmões BO+ctV se assemelhavam ao pulmões controle, assim quando comparados quanto a densidade do infiltrado celular, o resultado foi um aumento de CD68+ e neutrófilos no grupo BO quando comparados ao controle, sem que houvesse significância estatística para os neutrófilos. Entretanto estes marcadores continuaram bastante ativos em ambos tratamentos propostos BO+pr e BO+ctV. Além do que, o aumento de macrófagos induz um aumento de MMPs que

possivelmente estejam participando a degradação da matriz, contribuindo para a diminuição de fibras colágenas como foram observados em resultados.

6.6. – A BO e a tolerância

Presumivelmente houve resposta imune aos peptídeos do colágeno tipo V na mucosa nasal, onde foram processados e apresentados a células T ^{7, 36}. Embora o preciso mecanismo em que a imunização diária de um mesmo antígeno não esteja clara, a tolerância nasal pode ser uma perspectiva para esta patologia. As células B e T apresentam cinética diferente quanto ao aparecimento e desaparecimento no estado tolerante. De modo geral as células T ficam tolerantes precocemente, e por tempo maior que nas células B.

Há bem pouco tempo, a literatura vem esclarecendo sobre a capacidade das células T suprimirem ativamente a resposta imune, através em parte pela manutenção do estado de tolerância. Apesar dos grandes avanços, há certos pontos completamente desconhecidos. Embora alguns autores sugiram, que a imunoregulação de citocinas como a IL-10 ou TGF- β sejam cruciais para os efeitos de supressão dessas células, isto é ainda controverso e desconhecido quando o propósito for diagnóstico e terapêutico ¹¹⁸.

Em outras varias situações a imunização via oral/nasal por colágenos estão estabelecidas: em modelos experimentais ^{4, 119, 120}, em AR humana ⁶⁰,

^{81, 121-123} e esclerose sistêmica ⁽⁶⁷⁾. E em modelos de BO por rejeição ao transplante de pulmão em ratos ^{6, 34, 57, 58}.

Assim, por todas estas razões, não nos surpreendemos que a tolerância promoveu importantes dados sobre o remodelamento tecidual no estágio pulmonar, e nossos resultados confirmam o prognóstico da importância do colágeno tipo V durante o processo da BO.

À partir das pesquisas do grupo de pesquisa do Prof. Dr. David Wilkes, demonstrando a significativa relação entre a síndrome da BO e a tolerância/oral, preventiva ao transplante, em diferentes linhagens de ratos e a regulação de células T específicas ao colágeno tipo V ^{37, 38, 55}.

Nós também encontramos uma relação entre a tolerância e um remodelamento broncovascular ativo em pulmões com BO. Por exemplo, encontramos que o espessamento da parede nos BT e AT, e a densidade de colágenos estão significativamente relacionadas ao estágio de remodelamento. As células imune estão também significativamente relacionadas ao colágeno tipo V e o remodelamento broncovascular. Houve aumento da densidade de células nos pulmões BO e ctV+BO, em relação aos animais que receberam tratamento após a BO estar instalada ao se comparar ao grupo controle.

Sumpter e Wilkes, em 2004 ³⁶, descrevem diferentes regiões antigênicas dentro do colágeno tipo V. De acordo com estes estudos prévios em modelos de transplantes ou via tóxica ^{118, 119} e em nosso modelo por lesão química, hipotetizamos que a tolerância nasal pelo colágeno tipo V

também possa levar a supressão de células T CD4⁺, CD8⁺ e células B CD20⁺. Houve uma maior associação entre o extenso infiltrado imune celular e aumento do lúmen dos vasos no eixo pré-acinar nos pulmões ctV+BO. Existe um estreito mecanismo pode envolver o bronquíolo correspondente, levando a perda de elasticidade e ruptura da membrana basal com lesão às células epiteliais, e provavelmente refletindo numa perda de função pulmonar. Assim, o infiltrado celular e a densidade de colágenos promovem importantes informações morfológicas na BO experimental sob condições de tolerância.

Os efeitos dos tratamentos na inflamação ou processo de reparo que ocorrem na BO, indubitavelmente comprometem uma série complexa de eventos, em várias etapas, entre elas, as alterações imunes parecem ser de maior relevância quanto à interação como remodelamento da MEC ^{90, 91, 124}. Na microscopia de luz, o colágeno tipo V está freqüentemente localizado nos sítios pericelulares, como na membrana basal e interstício peribroncovascular, ao lado de fibroblastos e células do músculo liso, parece ter importante função nas interações entre moléculas.

O colágeno tipo V é susceptível a ação de proteinases neutras, como tripsina, quimiotripsina, elastase e trombina, como as collagenases específicas.

Independente de ser o menor colágeno quantitativamente, o colágeno tipo V é fundamental, não apenas para controlar o diâmetro das fibrilas de

outros tipos de colágenos, mas também por manter a integridade do tecido conjuntivo ^{13, 36}. Geneticamente as alterações nas moléculas do colágeno tipo V são fundamentais para o controle da MEC e isto envolve o processo de remodelamento. Embora o preciso mecanismo da tolerância não seja claro, pode vir a ser uma alternativa ao tratamento atualmente empregado.

Yoshida S et al, em 2006 ⁷, levantam a hipótese que o colágeno tipo V pode ter um fim comum tanto para o desenvolvimento da aloimunidade quanto para as doenças autoimunes. Acrescentam que as IL-17 e IL-23 recentemente descritas no envolvimento a doenças autoimunes não pulmonares, também estão expressas na resposta mediada pelo colágeno tipo V nas doenças pulmonares. Haque et al, em 2002 ³⁴, demonstram que as células T específicas para o colágeno tipo V estão presentes nos processos de remodelamento induzido pela exposição de peptídeos nos espaços peribronquiolar e perivascular, sugerindo auto-imunidade ³⁸. Explicando assim uma possível rota comum para diferentes tipos de lesões no pulmão, como as infecções e rejeições em transplantes, na qual o remodelamento induzido por um processo inflamatório pode resultar em uma exposição prolongada de epítomos do colágeno, perpetuando a resposta.

Por todas estas razões, não nos surpreendeu que os animais tolerados proporcionaram relevantes informações sobre os estágios do remodelamento pulmonar, e nossos resultados confirmam que a via nasal foi efetiva e de fácil reprodutividade, possibilitando uma terapêutica funcional.

Observamos que tanto o tratamento pelo prednisona quanto a tolerância nasal foram procedimentos efetivos na supressão do infiltrado

celular no eixo pré-acinar, assim como a deposição de fibras de colágenos. Contudo, a tolerância promoveu melhores benefícios em termos de remodelamento broncovascular, e supressão do infiltrado celular, com menor impacto na síntese e degradação da MEC, podendo ser utilizada como uma estratégia de prevenção e possível terapêutica no remodelamento pulmonar da doença já estabelecida.

Nossos resultados sugerem que a tolerância nasal poderá ser utilizada no processo do remodelamento bronquiolar, promovendo melhores informações prognósticas sobre os estágios evolutivos da doença, e resultados tão favoráveis quanto ao utilizados na rotina atual, a saber: broncodilatadores, epinefrina ⁹¹, beta (2) agonistas, antibióticos e mucolíticos ⁹⁰.

Acreditamos também que o estudo morfométrico e a análise estatística foram importantes para validar a indução da tolerância nasal pelo colágeno V e validaram as alterações histoarquitetônicas observadas na microscopia. Para finalizar esta conclusão serão necessários estudos prospectivos, possivelmente possa abranger outros modelos experimentais (ex. animais de maior porte), se estender a outras patologias pulmonares e futuramente a pacientes.

6.7 – Tolerância e a sorologia para colágenos

Com o intuito de avaliar a dosagem de colágenos, no sangue periférico dos animais, foram feitos os testes anti-colágenos (I, III e V) por ELISA. Todos os grupos foram avaliados, mas não mostraram resultados significantes. Indicando uma possível eliminação dos peptídeos por fagocitose, apoptose ou qualquer outra via de excreção normal do organismo, já quando da sensibilização da mucosa nasal, ainda na via aérea superior.

6. CONCLUSÕES

- i. A instilação do HNO_3 via nasal em camundongos BALB/c foi um modelo simples, de baixa mortalidade e de baixo custo para estudo da BO.
- ii. A análise morfométrica demonstrou ser um método adequado, e confirmou o papel da infiltrado celular e do remodelamento no eixo pré-acinar no processo da BO;
- iii. Concluímos que o remodelamento broncovascular esteve relacionado com o espectro histológico no modelo da BO por lesão química via nasal, assim como a imunização via nasal pelo colágeno tipo V foi capaz de gerar um estado de tolerância, e assim protegeu e regulou a síntese e degradação da MEC no eixo pré-acinar, restabelecendo à histoarquitetura ao do padrão normal.
- iv. Tanto o tratamento com prednisona quanto ao da tolerância foram efetivos na supressão do infiltrado celular e remodelamento no eixo pré-acinar no estudo propostos. Contudo, a tolerância nasal pelo colágeno tipo V promoveu melhores benefícios quanto aos padrões histopatológicos bronquiolar.

8. ANEXOS

Anexo A. Tabela 1. Análise quantitativa do diâmetro, área e espessamento de parede do eixo pré-acinar no modelo da BO.

Compartimento	controle	salina	BO
Diâmetro BT	0,83 ± 0,05 #	0,81 ± 0,05	0,76 ± 0,05 #
Área BT	36,72 ± 11,04	39,12 ± 5,34	35,97 ± 8,90
Lúmen BT	18,37 ± 7,49	18,18 ± 5,59	12,29 ± 3,78
Parede BT	18,35 ± 4,90	20,94 ± 6,95	23,69 ± 5,71
Diâmetro AT	0,86 ± 6,0	0,82 ± 4,4	0,81 ± 7,3
Area AT	3,81 ± 0,89 #	4,44 ± 0,49	5,50 ± 1,08 #
Lúmen AT	0,60 ± 0,22	0,39 ± 0,31	0,85 ± 0,71
Parede AT	3,20 ± 0,75 *	4,05 ± 0,65	4,65 ± 0,94 *

O diâmetro está expresso em μm , a área total e o espessamento da parede estão expressas em μm^2 (valor 10^{-3}), no aumento de 100x, para os compartimentos BT e AT. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (total n=30), ANOVA one-way, testes para múltiplas comparações, Tukey HSD. * P = 0,001 e # P < 0,05 em comparação ao controle.

Anexo B. Tabela 2. Análise quantitativa da densidade de colágeno e infiltrado celular no eixo pré-acinar no modelo da BO.

Variáveis	controle	salina	BO
Colágeno BT	4,66 ± 0,80	4,33 ± 0,53	3,65 ± 1,07
Colágeno AT	25,61 ± 6,51	25,92 ± 4,97	26,78 ± 7,78
Células BT	6,59 ± 1,97 *	13,34 ± 3,20	17,69 ± 5,24 *
Células AT	8,14 ± 1,65 #	14,51 ± 2,23 #	12,52 ± 3,99
Células BALT	6,23 ± 3,64 #	21,34 ± 5,45	18,28 ± 9,47 #

A densidade de colágeno nos compartimentos BT e AT e o infiltrado celular nos compartimentos BT, AT e BALT, expressos em %/ μm^2 no aumento de 400x. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (total n=30), ANOVA one-way, múltiplas comparações. * P = 0,001 e # P < 0,05 em comparação ao controle.

Anexo C. Tabela 3. Análise quantitativa do infiltrado celular no eixo pré-acinar no modelo da BO.

Variáveis	controle	salina	BO
CD3+	16,40 ± 4,38 #	33,01 ± 9,23 #	27,72 ± 9,03
CD4+	1,23 ± 1,05	0,42 ± 0,78	2,91 ± 5,29
CD8+	1,11 ± 1,07	1,88 ± 1,00	2,70 ± 1,54
CD20+	1,46 ± 1,89	2,93 ± 1,43	3,04 ± 1,69
CD68+	0,24 ± 0,28 #	5,54 ± 2,06	6,91 ± 4,77 #
Neutrófilos	0,52 ± 0,84 #	5,41 ± 3,94 #	5,21 ± 2,92
Total de Células	20,97 ± 2,91 *	49,19 ± 10,69	48,49 ± 6,24 *

A densidade do infiltrado celular nos compartimentos: BT, AT e BALT, estão expressas em %/ μm^2 , no aumento de 400x. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (total n=30), ANOVA one-way, múltiplas comparações. * P = 0,001 e # P < 0,05 em comparação ao controle.

Anexo D. Tabela 4. Análise quantitativa do diâmetro, área e espessamento de parede do eixo pré-acinar no protocolo da tolerância preventiva.

Compartimento	BO	ctV+BO	BO+ctV	Controle
Diâmetro BT	0,81 ± 0,06	0,83 ± 0,04	0,83 ± 0,05	0,83 ± 0,05
Área BT	43,34 ± 13,72 *	39,27 ± 4,69	20,95 ± 2,38 *	36,72 ± 11,04
Lúmen BT	17,46 ± 2,77	16,32 ± 4,66	9,45 ± 1,20	18,37 ± 7,49
Parede BT	25,88 ± 13,56 #	22,95 ± 4,44	11,51 ± 1,33 #	18,35 ± 4,90
Diâmetro AT	0,85 ± 0,06	0,81 ± 0,10	0,77 ± 0,05	0,86 ± 0,06
Área AT	4,44 ± 0,40 *	6,68 ± 0,76 *	5,32 ± 0,74	3,99 ± 0,92
Lúmen AT	0,79 ± 0,41	1,09 ± 0,25	0,98 ± 0,18	0,60 ± 0,20
Parede AT	3,65 ± 0,62 #	5,59 ± 0,72 #	4,33 ± 0,61	3,39 ± 0,82

O diâmetro está expresso em μm , a área total (valor 10^{-3}) e o espessamento da parede estão expressas em μm^2 , no aumento de 100x, para os compartimentos BT e AT. Os resultados estão expressos como media $\pm$ desvio padrão (total n=40), ANOVA one-way, múltiplas comparações.

* P = 0,001 e # P < 0,05, em comparação ao BO.

Anexo E. Tabela 5. Análise quantitativa da densidade de colágeno e infiltrado celular no eixo pré-acinar no protocolo da tolerância preventiva.

Variáveis	BO	ctV+BO	BO+ctV	Controle
Colágeno BT	5,85 ± 2,54 * #	2,98 ± 0,77 #	1,33 ± 0,34 *	4,61 ± 0,73
Colágeno AT	24,55 ± 5,27	17,73 ± 1,71	16,61 ± 2,06	24,09 ± 6,91
Células BT	17,11 ± 8,23 #	16,71 ± 5,79	5,97 ± 3,83 #	6,60 ± 1,97 #
Células AT	21,89 ± 10,86 #	18,79 ± 6,21	6,15 ± 3,81 #	8,14 ± 1,65 #
Células BALT	36,81 ± 2,09 * #	26,03 ± 5,36	20,16 ± 11,01 #	6,23 ± 3,64 *

A área total e espessamento da parede (valor 10^{-3}), no aumento de 100x. A densidade de colágeno para os compartimentos BT e AT, e a densidade das células inflamatórias para os compartimentos BT, AT e BALT, estão expressas em $\%/\mu\text{m}^2$ no aumento de 400x. Os resultados estão expressos como media ± desvio padrão (total n=40), ANOVA one-way, múltiplas comparações. * P = 0.001 e # P < 0,05 em comparação ao BO.

Anexo F. Tabela 6. Análise quantitativa da densidade do infiltrado celular no eixo pré-acinar no protocolo da tolerância preventiva.

Variáveis	BO	ctV+BO	BO+ctV	Controle
CD3+	38,02 ± 12,38 * #	37,12 ± 2,89	13,99 ± 6,87 *	16,40 ± 4,38 #
CD4+	4,12 ± 3,11	2,95 ± 1,55	5,01 ± 2,53	1,23 ± 1,05
CD8+	11,80 ± 7,68 #	3,68 ± 3,09	7,23 ± 5,22	1,11 ± 1,07 #
CD20+	9,21 ± 3,63 * #	3,19 ± 1,99	2,32 ± 1,77 #	1,46 ± 1,89 *
CD68+	9,69 ± 5,20 #	11,55 ± 5,15	3,69 ± 2,35	0,24 ± 0,28 #
Neutrófilos	2,95 ± 3,15	3,05 ± 2,43	-	0,52 ± 0,84
Total células	75,80 ± 17,91 *	61,54 ± 13,10	32,29 ± 18,0 *	20,97 ± 2,92 *

A densidade de células inflamatórias estão expressas em %/ μm^2 no aumento de 400x , para os compartimentos BT, AT e BALT. Os resultados estão expressos como media $\pm$ desvio padrão (total n=40), ANOVA one-way, múltiplas comparações. * P = 0,001 e # P < 0,05 em comparação ao BO.

Anexo G. Tabela 7. Análise quantitativa do diâmetro, área e espessamento de parede do eixo pré-acinar no protocolo do tratamento prednisona vs tolerância.

Compartimento	BO	BO+pr	BO+ctV	Controle
Diâmetro BT	0,79±0,07	0,77±0,06	0,83 ±0,06	0,83±0,05
Área BT	51,68±8,66 * #	33,74±8,64 *	40,29±4,78 *	36,72±1,10 #
Lúmen BT	24,62±4,49 *	11,98±6,03 *	21,19±3,16	18,37±7,49
Parede BT	27,06±6,39 #	21,76±3,68	19,09±2,75 #	18,35±4,90 #
Diâmetro AT	0,84±0,06	0,80±0,03	0,83±0,08	0,86±0,05
Area AT	4,87±0,80	7,34±4,17	4,06±1,33	3,99±0,92
Lúmen AT	0,96±0,17	0,47±0,20	0,90±0,17	0,60±0,20
Parede AT	3,90±0,97	6,87±4,29	3,16±1,18	3,39±0,82

O diâmetro está expresso em μm , a área total (valor 10^{-3}) e o espessamento da parede estão expressas em μm^2 , no aumento de 100x, para os compartimentos BT e AT. Os resultados estão expressos como media $\pm$ desvio padrão (total n=40), ANOVA one-way, múltiplas comparações.

* P = 0,001 e # P < 0,05 em comparação ao BO.

Anexo H. Tabela 8. Análise quantitativa da densidade de colágeno e infiltrado celular nos bronquíolos terminais no protocolo do tratamento prednisona vs tolerância.

Variáveis	BO	BO+pr	BO+ctV	Controle
Colágeno BT	7,28±4,25 #	4,54±1,83	2,05±1,31 #	4,61±0,73
Colágeno AT	23,11±9,08	18,39±7,16	12,57±4,57	24,09±6,91
Células BT	25,30±7,04 *#	22,58±9,53	7,50±3,92 #	6,60±1,97 *
Células AT	30,72±11,89 #	32,89±13,64	9,93±4,15 #	8,14±1,65 #
Células BALT	34,65±4,41 *#	27,32±16,18	15,24±7,54 #	6,23±3,64 *

A densidade de colágeno nos compartimentos BT e AT, e a densidade do infiltrado celular nos compartimentos BT, AT e BALT estão expressas em %/ μm^2 no aumento de 400x. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (total n=40), ANOVA one-way, múltiplas comparações.

* P = 0,001 e # p<0,05 em comparação ao BO.

Anexo I. Tabela 9. Análise quantitativa da densidade do infiltrado celular no eixo pré-acinar no protocolo do tratamento prednisona vs tolerância.

Variáveis	BO	BO+pr	BO+ctV	Controle
CD3+	31,37±10,91 #	14,55±4,70 #	14,52±11,13 #	16,40±4,38
CD4+	15,87±6,89 *	20,74±6,70	0,44±0,48 *	1,23±1,05 *
CD8+	9,01±5,97	14,39±7,37 #	3,15±3,68 #	1,11±1,07 #
CD20+	16,17±5,35 #	15,36±9,74	1,98±1,87 #	1,46±1,89 #
CD68+	15,80±4,33 #	11,70±13,52	9,05±5,96	0,24±0,28 #
Neutrófilos	2,46±1,32	6,06±4,26	3,54±2,33	0,52±0,84
Total células	90,68±20,24 *	82,80±34,49	32,68±13,55	20,97±2,92 *

A densidade de células inflamatórias nos compartimentos BT, AT e BALT estão expressas em %/ μm^2 no aumento de 400x. Os resultados estão expressos como media $\pm$ desvio padrão (total n=40), ANOVA one-way, múltiplas comparações. *P = 0,001 e # P < 0,05 em comparação ao BO.

9. REFERÊNCIAS *

1. Canciani M. Is lung function reduced in bronchiolitis? *Eur Respir J*. 2003; Top 9:1, ISSN; 355-493X.
2. King Jr TE. Cryptogenic bronchiolitis obliterans. Bronchiolitis in adults. ERS School Postgraduate Course, 14:00-17:30, Hall 1, SECC-Glasgow, Escócia. 2004 September 4; 55:73.
3. Visscher DW and Jeffrey L. Myers JL. Bronchiolitis. The Pathologist's Perspective The Proceedings of the American Thoracic Society. 2006; 3:41-47.
4. Garcia G, Komagata K, Slavin AJ, Maron Ruth, Weiner, HL. Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. *J Autoimmun*. 1999; 13:315-24.
5. Degirmencioglu H, Karadag A, Avci Z, Kurtaran H, Catal F. Is hypertonic saline better than normal saline for allergic rhinitis in children? *Pediatr Allergy Immunol*. 2004; 15: 190.
6. Mares DC, Heidler KM, Smith Jr GN, Cummings OW, Harris ER, Foresman BH, Wilkes DS. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 23:62-70.
7. Yoshida S, Haque A, Mizobuchi T, Iwata T, Chiyo M, Webb TJ, Baldrige LA, Heidler KM, Cummings OW, Fujisawa T, Blum JS, Brand DD, Wilkes DS. Anti-type V collagen lymphocytes that express IL-17 and IL-23 induce rejection pathology in fresh and well-healed

- lung transplants. *Am J Transplant*. 2006 Apr; 6(4):724-35.
8. Patel H, Platt R, Lozano JM, Wang EE. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. In: *Cochrane Database Syst Rev*. 2004; (3):CD004878 and In: *Cochrane Database Syst Rev* 2006; Issue 2.
 9. Cotran RS, Kumar V and Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
 10. Moreira JS e Moreira ALS. Mecanismos de Defesa. In: Bruno Carlos Palombini. (Org.). *Doenças das Vias Aéreas - uma visão clínica integradora (viaerologia)*. 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001; v. 1:52-61.
 11. Capelozzi VL. Patologia Bronquiolar, Artigo de Revisão, *J Pneumologia*. 1999;25(4):232-239.
 12. Haefeli-Bleuer B and Weibel ER. Morphometry of the human pulmonary acinus. *Anat Rec*. 1988 Apr; 220(4):401-14.
 13. Weibel ER. *Morphometry of the Lung*. Berlin: Springer-Verlag 1963. p. 111.
 14. Fishman AP. Etiology and pathogenesis of primary pulmonary hypertension: a perspective. *Chest*. 1998 Sep;114(3 Suppl):242S-247S. Review.
 15. Crapo RO, Crapo JD, Morris AH. Lung tissue and capillary blood volumes by rebreathing and morphometric techniques. *Respir Physiol*. 1982 Aug;49(2):175-86.
 16. Simionescu M. Ultrastructural organization of the alveolar-capillary

- unit. Ciba Found Symp. 1980;78:11-36.
17. Junqueira LCU e Martins EO. Atlas anatomia microscopia do rato. São Paulo: Rossolillo, 1947.
18. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shomchik M. Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença. 5º. ed – Porto Alegre: Artmed, 2002.
19. Hoyne GF. Immunological tolerance to inhaled antigen. .Am J Respir Crit Care Med. 2000; Oct; 162(4 Pt 2): S169-74. Review.
20. Novak N, Allam JP, Betten H, Haberstock J, Bieber T. The role of antigen presenting cells at distinct anatomic sites: they accelerate and they slow down allergies. Allergy 2004; 59: 5–14 Review.
21. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. Circulation. 2004; 109:159-165.
22. Atlas of Nontumor Pathology (on line)— Series I, Fascicle 2; 2002. Travis WD, Colby TV, Koss MN, Christenson MR, Muller NL, Kin TE. In: Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract. Disponível em [http:// www.afip.org](http://www.afip.org).
23. Ryu JH. Classification and approach to bronchiolar diseases. Curr Opin Pulm Med. 2006;12(2):145-151.
24. Ryu JH, Myers JL, Swensen SJ. Bronchiolar disorders. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:1277–1292.
25. Chilosi M. Bronchiolitis in adults. ERS PG Course 14, Glasgow, Scotland. 2004 Sep 4; 1:85.
26. Lohr RH, Boland BJ, Douglas WW, Dockrell DH, Colby TV, Swensen

- SJ, Wollan PC, Silverstein MD. Organizing pneumonia. Features and prognosis of cryptogenic, secondary, and focal variants. *Arch Intern Med.* 1997 Jun 23;157(12):1323-9.
27. Daniels CE, Myers JL, Utz JP, Markovic SN, Ryu JH. Organizing pneumonia in patients with hematologic malignancies: A steroid-responsive lesion. *Respir Med.* In press. 2006 May 14.
28. Oymak FS, Demirbas HM, Mavili E, Akgun H, Gulmez I, Demir R, Ozesmi M. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. Clinical and roentgenological features in 26 cases. *Respiration.* 2005 May-Jun;72(3):254-62.
29. Schlesinger C and Koss MN. The organizing pneumonias : a critical review of current concepts and treatment. *Treat Respir Med.* 2006;5(3):193-206.
30. Mobeireek A, Al-Mohareb F, Al-Dayel F, Al-Gazlan S, Alabdely H, Khalid M. Obliterative bronchiolitis in a patient with myelodysplastic syndrome before bone marrow transplantation. *Respir Med.* In press 2006 Jun 7.
31. Nicod LP. Mechanisms of airway obliteration after lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jul;3(5):444-9.
32. Kurland G and Michelson P. Bronchiolitis in children. *Pediatr Pulmonol.* 2005; 39:193-208.
33. Egan JJG. Pós-transplant bronchiolitis. Bronchiolitis in adults PG-14; European Respiratory Society Congress, Study with the experts: ERS School Postgraduate Course 14:00-17:30 Hall 1, SECC- Glasgow,

- Escócia. 2004 September 4; 43:52.
34. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz R, Zheng Y, Woods K, Smith GN, Cummings OW, Heidler KM, Blum JS & Wilkes DS. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol.* 2002;169:1542-9.
 35. Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W, Hathwar V, Neuringer IP. Growth Factor Upregulation during Obliterative Bronchiolitis in the Mouse Model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002, 166b (3): 417-422.
 36. Sumpter TL and Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection. A focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L1129-L1139.
 37. Bharat A, Fields RC, Steward N, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. CD4+25+ regulatory T cells limit Th1-autoimmunity by inducing IL-10 producing T cells following human lung transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Aug;6(8):1799-808.
 38. Neuringer I, Chalermkulrat W, Aris R. Obliterative bronchiolitis or chronic lung allograft rejection: A basic science review. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Jan;24(1):3-19
 39. D'Ovido F, Singer LG, Hadjiliadis D, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Hutcheon M, Miller L, Darling G, Keshavjee S. Prevalence of gastroesophageal reflux in end-stage lung disease candidates for lung transplant. *Ann Thorac Surg.* 2005 Oct;80(4):1254-60.

40. Smyth RL and Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet*. 2006 Jul 22;368(9532):312-22.
41. You D, Becnel D, Wang K, Ripple M, Daly M, Cormier SA. Exposure of neonates to Respiratory Syncytial Virus is critical in determining subsequent airway response in adults. *Respir Res*. In press 2006 Aug 7;7(1):107.
42. Castro-Rodriguez JA, Daszenies C, Garcia M, Meyer R, Gonzales R. Adenovirus pneumonia in infants and factors for developing bronchiolitis obliterans: A 5-year follow-up. *Pediatr Pulmonol*. In press 2006 Jul 26.
43. Cabral ALB, Serson S, Mauad T. Bronquiolite Obliterante Pós-Infecciosa. IN: Fernandes ALG, Mendes ESPS, Terra Filho M. *Pneumologia - Atualização e Reciclagem Volume III*. São Paulo: Atheneu; 2000; 275-282.
44. Chanut-Delalande H, Fichard A, Bernocco S, Garrone R, Hulmes DJS, Ruggiero F. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. *J Biol Chem* 2001;276 (26):24352-9.
45. Unsöld C, Pappano WN, Imamura Y, Steiglitz BM, Greenspan DS. Biosynthetic processing of the pro-1 (V)₂ pro-2(V) collagen heterotrimer by bone morphogenetic protein-1 and furin-like proprotein convertases. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5596-602.
46. Fichard A, Kleman JP, Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol*. 1995 Jul;14(7):515-31. Review.

47. Day ED. Cell Biology of Extracellular Matrix. New York : Plenum. 1991
48. Weibel ER and Crystal EG. Structural organization of Pulmonary Interstitium. In: Crystal RG e West JB. The Lung. Scientific Foundations, 2o. ed. Philadelphia Lippincott – Raven Publishers. 1997. v1, Cap. 47, p. 691-695.
49. Kelley J. Collagen. Lung Cell Biology. New York : Marcel Dekker Inc. 1991. Cap 17, p.821-858.
50. Madri J A and Furthmayr H. Collagen Polymorphism in the Lung – An Immunochemical Study of Pulmonary Fibrosis. Hum Pathol. 1980; 11(4):353-366.
51. Fichard A, Tillet E, Delacoux F, Garrone R, Ruggiero F. Human recombinant alpha1(V) collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing. J Biol Chem 1997;272(48):30083-7.
52. Mizuno K, Adachi E, Imamura Y, Katsumata O, Hayashi T. The fibril structure of type V collagen triple-helical domain. Micron. 2001;32:317-323.
53. Chung A, Myers J, Suarez T, Gaxiola M, Estrada A, Meija M, Selman M. Airway-centered interstitial fibrosis: a distinct form of aggressive diffuse lung diseases. Am J Surg Pathol. 2004;28? 62-68.
54. All-Dossari GA, Jessurun J, Bolman III M, Kshetry VR, King MB, Murray JJ, Hertz MI. Pathogenesis of Obliterative Bronchiolitis. Possible Roles of Platelet-Derived Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor. Transplantation. 1995;59:143-145.

55. Neuringer IP, Mannon RB, Coffman TM, Parsons M, Burns K, Yankaskas JR, Aris RM. Immune cells in a mouse airway model of obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:379-386.
56. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervonevai I, Birk DE. Type V collagen control the initiation collagen fibril assembly. *J Biol Chem*. 2004;279 (51):53331-7.
57. Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, Smith Jr GN, Cummings OW, Foresman BH, Fujisawa T, Wilkes DS. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25(1):26-34.
58. Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, Smith Jr GN, Cummings OW, Fujisawa T, Wilkes DS. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allograft by type V collagen-induced oral tolerance. *Transplantation*. 2002;73(4):500-505.
59. Wilkes DS. Autoimmune responses to grafted lungs: immune responses to a native collagen-type V collagen. *Graft*. 2003;6(1):42-9.
60. Calich, VL, Vaz, CAC. *Imunologia Básica*. Porto Alegre : Artes Médicas. 1989; p. 178:188.
61. Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol*. 1999;73:153-264.
62. Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky AS, Liu M, Keshavjee S. Lymphocytic Airway Infiltration as a Precursor to Fibrous Obliteration in a Rat Model of Bronchiolitis Obliterans, Transplantation. 1997;64(2):311-317.

63. Boots AM, Verhaert PD, Poele RJ, Evers S, Coenen-de-Roo C, Cleven J, Bos ES. Antigens up the nose? identification of putative biomarkers for nasal tolerance induction functional studies combined with proteomics. *J Proteome Res.* 2004;3: 1056-62.
64. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:232-59.
65. Myers LK, Higgins GC, Findel TH, Reed AM, Thompson JW, Walton RC, Hendrickson J, Kerr NC, Pandya-Lipman RK, Shlopov BV, Stastny P, Postlethwaite AE, Kang AH. Juvenil arthritis and autoimmunity to type II collagen. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1775-81.
66. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease – *N Engl J Med.* 2000;350:1358.
67. Mayer L. Short Analytical Review Oral Tolerance : New Approaches, New Problems – *Clinical Immunolog.* 2000;94 (1):1-8.
68. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular.* 4o. ed. Rio de Janeiro : Revinter;. 2003.
69. Mckown KM, Carbone LD, Bustillo J, Seyer JM, Kang AH & Postlethwaite AE. Induction of immune tolerance to human type I collagen in patients with systemic sclerosis by oral administration of bovine type I collagen. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(5):1054-61.
70. Nagler-Anderson, C.; Bober, L.A.; Robinson, M.E.; Siskind, G.W.; Thorbecke, G.L. Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad*

- Sci USA. 1986; v. 83:7443-7446.
71. Trentham DE. Oral tolerization as a treatment of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 1998 Aug;24(3):525-36. Review.
72. Toussiot EA. Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2002 Mar;1(1):45-52.
73. Weiner HL, Mackin GA, Matsui M, Orav EJ, Khoury SJ, Dawson DM, Hafler DA. Double blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. Science. 1993;v. 259:1321-1323.
74. Reynolds J, Prodromidi EI, Juggapah JK, Abbott DS, Holthaus KA, Kalluri R, Pusey CD. Nasal administration of recombinant rat alpha3(IV)NC1 prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis in the WKY rat. J Am Soc Nephrol. 2005 May;16(5):1350-9.
75. Higuchi K, Kweon MN, Fujihashi K, Mcghee JR & Kiyono H. Comparison of nasal and oral tolerance for the prevention of collagen induced murine arthritis. Q J Med. 2000;27(4):1039-44.
76. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. Extracellular Matrix Deposition by Primary Human Lung Fibroblasts in Response to TGF- β 1 and TGF- β 3.- Am J Physiol. 1999;276(5): 814-824.
77. Goodnow CC, Adelstein S, Basten A. The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. Science. Jun 15 1990;248(4961):1373-9.
78. Strobel S and Mowar AM. Immunol Today 1998: 19:173-81

79. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodeling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*. 2004;200:681-91.
80. Svetlecic J, Molteni A and Herndon B. Bronchiolitis Obliterans Induced by Intratracheal Papaverine: A Novel Animal Model. *Lung*. 2004;182:119-134.
81. Mink SN, Coalson JJ, Whitley L, Greville H, Jadue C. Pulmonary function tests in the detection of small airway obstruction in a canine model of bronchiolitis obliterans. *Am Rev Respir Dis*. 1984;130(6):1125-33.
82. Coalson JJ, Collins JF. Nitric acid-induced injury in the hamster lung. *Br J Exp Pathol*. 1985;66(2):205-15.
83. Costa CL, Spilborghs GM, Martins MA, Saldiva PH. Nitric Acid-Induced Bronchiolitis in Rats Mimics Childhood Bronchiolitis obliterans. *Respiration*. 2005;72(6):642-9.
84. Zheng L, Ward C, Snell GI, Orsida BE, Li X, Wilson JW, Williams TJ, Walters EH. Scar collagen deposition in the airways of allograft of lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jun;155(6):2072-2077.
85. Garippo AL, Parra ER, Teodoro WR, Velosa AP, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Immune cell infiltration and broncovascular remodeling after nitric acid nasal instillation in a mouse bronchiolitis obliterans

- model. *Lung* 2006; 184:229-238.
86. Krayenbuhl MC, Hudspeth BN, Brosto J, Scadding GK, Guesdon JL, Latchman Y. Nasal histamine release following hyperosmolar and allergen challenge. *Allergy*. 1989;44(1):25-29.
 87. Baraniuk JN, Ali M, Yuta A. Hypersaline nasal provocation stimulates nociceptive nerves, substance P release, and glandular mucous exocytosis in normal humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:655-62.
 88. Garavento W, Marco Romagnoli M, Gaini RM. Hypertonic or isotonic saline for allergic rhinitis in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:91-92.
 89. Viertler EYC, Testa JRG, Morgado PF, Ferreira RG. Irrigação intranasal: avaliação dos efeitos do uso de soluções hidroeletrólíticas na mucosa de ratos *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003 jul./ago;v.69(4):491-495.
 90. Halna M, Leblond P, Aissi E, Dumonceaux A, Delepouille F, El Kohen R, Hue V, Martinot A. Impact of the consensus conference on the ambulatory treatment of bronchiolitis in infants. *Presse Med*. 2005;34(4):277-81.
 91. Scarfone RJ. Controversies in the treatment of bronchiolitis. *Curr Opin Pediatr*. 2005;17(1):62-6.
 92. Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B, van der Saag PT. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol*. 1998 Mar;12(3):355-63.

93. Jantz MA, Sahn SA. Corticosteroids in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Oct;160(4):1079-100. Review.
94. Ward C, De Soyza A, Fisher AJ, Pritchard G, Forrest IA, Corris PA. Reticular basement membrane thickening in airways of lung transplant recipients is not affected by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy*. 2004 Dec;34(12):1905-9.
95. Kehrer JP, Pearlman R, Smith MA. Direct effects of corticosteroids on in vitro collagen production by normal and damaged lung tissue. *Toxicology*. 1983;28(3):235-46.
96. Rocco PR, Souza AB, Faffe DS, Pássaro CP, Santos FB, Negri EM, Lima JG, Contador RS, Capelozzi VL, Zin WA. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at early phase of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168(6):677-84.
97. Navarro C. Hypersensitivity pneumonitis: a broader perspective. *Treat Respir Med*. 2006;5(3):167-79.
98. Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Damniani D, Gerno M, Geromin A, Zaja F, Stocchi R, Prosdócimo S, Fili C, Fanin R. Incidence, outcome, and risk factors of late-onset noninfectious pulmonary complications after unrelated donor stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Apr;33(7):751-758.
99. The Dako data sheet (on line). Available from: Disponível em <http://www.dakousa.com/index>.
100. Miller EJ, Furuto DK, Narkates AJ. Quantitation of type I, III, and V collagens in human tissue samples by high-performance liquid

- chromatography of selected cyanogen bromide peptides. *Anal Biochem.* 1991 Jul;196(1):54-60.
101. Ellis R, Leigh R, Southam D, O' Byrne PM, Inman MD. Morphometric analysis of mouse airways after chronic allergen challenge. *Lab Invest.* 2003;83(9):1285-1291.
 102. Shinagawa K e Kojima M. Mouse model of airway remodeling-strain differences. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:959–67
 103. Negri EM, Lima JG, Contador RS, Capelozzi VL, Zin WA. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at early phase of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(6):677-84.
 104. Egito EST, Aiello VD, Bosivio IBJ, Lichtenfels AJ, Horta ALM, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Vascular remodeling process in reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease. *Pathol Res Prac.* 2003; 199:521-532.
 105. SPSS Statistical software. Chicago : SPSS Inc. 2003; version 13.0.
 106. Linsenmayer TF, Fitch JM, Gordon MK, Cai CX, Ignotz F, Marchant JK, Birk DE. Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1998 Apr;17(2):231-65.
 107. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol.* 1984;116(3):417-26.
 108. Chernousov MA, Stahl RC, Carey DJ. Schwann cell type V

- collagen inhibits axonal outgrowth and promotes Schwann cell migration via distinct adhesive activities of the collagen and noncollagen domains. *J Neurosci.* 2001; 21(16):6125-35.
109. Chernousov MA, Rothblum K, Tyler WA, Stahl RC, Carey DJ. J. Schwann. cells synthesize type V collagen that contains a novel 4 chain-molecular cloning, biochemical characterization, and high affinity heparin binding of 4(V) collagen. *Biol Chem.* 2002;277(7):5596-602.
 110. Burrows NP, Nicholls AC, Yates JRW, Gatward G, Sarathachandra P, Richards A, Pope FM. The gene encoding collagen 1(V) (COL5A1) is linked to mixed Ehlers-Danlos syndrome type I/II. *J Invest Dermatol.* 1996;106:1273–1276.
 111. Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM. An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome. *J Med Genet* 1996;33:940–946.
 112. Cutaia M and Rounds S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiologic significance, mechanism, and clinical relevance. *Chest.* 1990;97:706–718.
 113. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:207-14
 114. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991 Oct

- 11;254(5029):279-82.
115. King TE Jr. Miscellaneous causes of bronchiolitis: inhalational, infectious, drug-induced, and idiopathic. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003 Oct;24(5):567-76.
 116. Clelland C, Higenbottam T, Stewart S, Otulana B, Wreghitt T, Gray J, Scott J, Wallwork J. Bronchocaveolar lavage and trans-bronchial lung biopsy during acute rejection and infection in heart-lung transplant patients. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:1386-92.
 117. Razzaque MS and Takashi Taguchi T. Review Article Pulmonary fibrosis; Cellular and molecular events. *Pathol Int*. 2003;53:133-145.
 118. Frey O, Brauer R. Regulatory T cells: magic bullets for immunotherapy? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006 Jan-Feb;54(1):33-43. Epub 2006 Feb 13.
 119. Svetlecic J, Molteni A, Chen Y, Al-Hamed M, Quinn T, Herndon B. Transplant-related bronchiolitis obliterans (BOS) demonstrates unique cytokine profiles compared to toxicant-induced BOS. *Exp Mol Pathol*. 2005 Dec;79(3):198-205
 120. Stancikova M, Stancik R, Gubzova Z, Rovinsky J. Collagen in the treatment of rheumatic diseases-oral tolerance. *Bratisl Lek Listy*. 1999;100(10):567-71.
 121. Meyer O. Oral immunomodulation therapy in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2000;67(5):384-92.
 122. Choy EH, Scott DL, Kingsley GH, Thomas S, Murphy AG, Staines N, Panayi GS. Control of rheumatoid arthritis by oral tolerance.

Arthritis Rheum. 2001 Sep;44(9):1993-7.

123. Postlethwaite AE. Can we induce tolerance in rheumatoid arthritis?

Curr Rheumatol Rep. 2001;3(1):64-9.

124. All-Dossari GA, Jessurun J, Bolman III M, Kshetry VR, King MB, Murray JJ, Hertz MI. Pathogenesis of Obliterative Bronchiolitis. Possible Roles of Platelet-Derived Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor. Transplantation. 1995;59:143-145.

* De acordo com:

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 da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A L. Fredi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. 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*.

10. Apêndice

Apêndice 1. Aprovação do Protocolo de Pesquisa no. 073/03. CAPpesq.

Recibo

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

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.03.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 073/03, intitulado: "Tolerância imunológica induzida pelo colágeno tipo (v) em camundongos na bronquite obstrutiva" apresentada pela ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL.

Pesquisador(a) Responsável: **PROFA. DRA. VERA LUIZA CAPELOZZI**
Pesquisador(a) Executante: **SRA. ANA LUCIA GARIPPO**

CAPPesq, 12 de Março de 2003.

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

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

Encaminhe-se à CPG-FMUSP para as devidas providências.
 SP, 20.03.03

 Prof.ª Dra. Maria Magalhães
 Coordenadora do Conselho
 de Pesquisa e Pós-graduação
 da Faculdade de Medicina

RECEBIDO SP: 20.3.03
 -SS-

Apêndice 2. Anatomia das pequenas vias aéreas.

Fonte: Netter HF. Atlas of human anatomy.
New Jersey: Ciba-Geigy Corp., 1990:Plate 192.

Apêndice 3. Síndromes clínicas associadas à histologia do remodelamento bronquiolar com ou sem obliteração.

Lesão por inalação

Agentes voláteis
Cigarros, Cocaína
Gases irritantes (NH₃, fumaça ou líquida, cloro)
Inalação de fumo tóxico (NO₂)
Partículas minerais (exposição a pó mineral e fogo)
Partículas orgânicas

Pós-Infecciosos

Adenovirus 1, 3, 7 e 21
Aspergillus
Bordetella pertussis
Citomegalovirus
Cryptococcus neoformans
Haemophilus influenzae
Legionella pneumophila
Herpes simple
Klebsiella
Mycoplasma pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae
Norcardia asteroides
Parainfluenza (tipo 3)
Pneumocystis carinii
Serratia marcescens
Streptococcus grupos B, β hemolítico
Vírus da Imunodeficiência Humana
Vírus Respiratório Sincicial, parainfluenza (tipos 1, 2 e 3)

Reações induzidas por drogas

Medicamentos (ex. penicilina, bleomicina, interferon, paraquate, cefalosporina, busulfan, acetobutanol, L-triptofano, sulfasalazina...)
Idiopática

Sem doenças associadas

Bronquiolite criptogênica
Bronquiolite respiratória associada a doenças intersticiais pulmonares
Hiperplasia de células neuroendócrinas
Panbronquiolites difusas
Pneumonitis por hipersensibilidade

Associação com outras doenças

Associação com doenças do tecido conjuntivo

Doenças colagenosas (Artrite Reumatóide, Esclerodermia, Crôhn, SJS).

Cirrose biliar primaria

Fibrose idiopática pulmonar

Histiocitose maligna

Pemfigus paraneoplásico

Pneumonia eosinofílica crônica

Pneumonite por Aspiração

Tireodite crônica

Vasculite, especialmente granulomatose de Wegener

Associação com transplante de órgãos

Doenças seguidas pós-transplante de medula óssea, dos quais 15-20% são acometidos pela BO.

Rejeição crônica pós-transplante de pulmão, atinge 35-60% dos pacientes.

Refluxo gastro-esofágico

Fonte: Talmadge E King Jr. European Respiratory Monograph, 2000.

Revisado no European Respiratory Society , 2004.

Apêndice 4. Descrição clínica e patológica associada a patologia

bronquiolar

Asma
Infecções / pós-infecções
Reações alérgicas (pneumonia eosinofílica, pneumonite por hipersensibilidade)
Doença pulmonar crônica obstrutiva
Bronquiolite Respiratória (fumante)
Bronquiolite Respiratória – associada com doença intersticial pulmonar.
Displasia Bronco-pulmonar
Bronquiectasia (independente da causa)
Doença vascular colagenosa
Gases / exposição tóxica
Reações a drogas
Associada a transplantes
Rejeição de transplante pulmonar
Doador do enxerto vs hospedeiro seguido de transplante de medula óssea
Condições associadas a pneumonia organizante criptogênica
Aspiração
Panbronquiolite difusa
Doença inflamatória intestinal
Exposição ao pó mineral / pulmões de operários expostos a cobalto / flocos de nylon
Vasculite (Granulomatose de Wegener)
Hiperplasia celular neuroendócrina idiopática pulmonar difusa (múltiplos tumores carcinóides)
Bronquiolite Idiopática (incluindo bronquiolite constritiva)
Vários: Síndrome de Stevens-Johnson, neoplasia, tiroidite, cirrose biliar primária

FONTE: Atlas of Nontumor Pathology (on line)— Series I, Fascicle 2; 2002. Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract. Disponível em [http:// www.afip.org](http://www.afip.org).

Apêndice 5 Condições associadas com a bronquiolite obliterante
com polipos intraluminais (padrão da pneumonia organizante)

Dano alveolar difuso organizante
Pneumonias organizante infecciosas
Obstrução organizante distal
Pneumonia organizante por aspiração
Reações organizante por fumaça ou exposição a tóxicos
Doenças do tecido conjuntivo
Alveolite alérgica extrínseca
Pneumonia Eosinofílica
Doador do enxerto vs hospedeiro seguido de transplante pulmonar
Reação secundária distal por bronquiolite crônica ou bronquiectasia
Como um processo idiopático, nele incluso (pneumonia organizante focal) ou mais disseminado (pneumonia organizante criptogênica)

FONTE: Atlas of Nontumor Pathology (on line)— Series I, Fascicle 2; 2002. Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract. Disponível em <http://www.afip.org>.

Apêndice 6. Doença pulmonar difusa com bronquiolite constritiva

Infecciosas (especialmente adenovírus)

Lesões por gases ou exposição tóxica (inalada ou ingerida: ex., *Sauropus androgynus*)

Doenças do tecido conjuntivo, especialmente artrite reumatóide

Associadas a transplantes (medula óssea, pulmão, coração/pulmão)

Reações a drogas (ex., penicilina)

Doenças inflamatórias associadas intestinais

Hiperplasia celular neuroendócrina pulmonar idiopática difusa

Complicações na asma

Alveolite alérgica extrínseca (rara na histologia)

Idiopática (bronquiolite obliterante idiopática / bronquiolite obliterante criptogênica)

FONTE: Atlas of Nontumor Pathology (on line)— Series I, Fascicle 2; 2002. Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract. Disponível em [http:// www.afip.org](http://www.afip.org).

Apêndice 7. Classificação histológica das lesões bronquiolares
segundo o processo inflamatório e fibrótico encontrado nas
bronquiolites

Bronquiolite celular

Bronquiolite folicular

Bronquiolite respiratória

Panbronquiolite difusa

Granulomatosa

Bronquiolite com polipos inflamatórios

BOOP/COP

Bronquiolite constrictiva / Obliterativa

Fonte: Chilosi M. *Bronchiolitis in adults*.ERS, 2004

Apêndice 8. Síndromes incluídas sob o termo 'bronquiolite'

<i>Histologia ou Síndrome</i>	<i>Sinônimos</i>	<i>Correlação Clínica</i>
Bronquiolite Aguda	Pós-viral, bronquiolite infecciosa	Limitação ao fluxo de ar, doença inflamatória intestinal
Doença primária das pequenas vias aéreas	Bronquiolite do adulto	Limitação ao fluxo de ar
Bronquiolite Respiratória	Bronquiolite Respiratória do fumante associado com a doença pulmonar intersticial	Doença Restritiva ("Intersticial")
Doença da via aérea por pó mineral	Pneumoconiose precoce	? Limitação ao fluxo de ar em pacientes expostos (pó variados)
Bronquiolite Folicular	Hiperplasia linfóide	? Limitação ao fluxo de ar, doença intersticial, ou ambas. Imunodeficiências, doenças vasculares, doenças colagenosas, reação por hipersensibilidade.
Bronquiolite Constrictiva	Bronquiolite Obliterativa, bronquiolite do adulto, doenças das pequenas vias aéreas	Limitação ao fluxo de ar
Pneumonia organizante criptogênica	Bronquiolite obliterante idiopática com pneumonia organizante (BOOP) Pneumonia organizante intraluminal idiopática Bronquiolite obliterante proliferativa	Doença restritiva ("Intersticial")
Panbronquiolite difusa	Panbronquiolite Difusa	Limitação ao fluxo de ar

Fonte: Daniel W. Visscher and Jeffrey L. Myers.
Bronchiolitis The Pathologist's Perspective.
The Proceedings of the American Thoracic Society. 2006; 3:41-47.

Apêndice 9. Registro Anual da Sociedade Internacional de Transplantes de
Coração e Pulmão – Dados 2005

Fonte: Trulock EP et al.
The Journal of Heart and Lung Transplantation.
2005;24(8)-957

Apêndice 10. Causas morte após o transplante de pulmão em
adultos(mortes de Janeiro 1992 a Junho de 2004)

Table 3. Causes of Death After Lung Transplantation in Adult Lung Transplant Recipients (Deaths: January 1992 to June 2004)

Cause of death	0-30 days (N = 1146)	31 days to 1 year (N = 1,717)	>1 year to 3 years (N = 1,428)	>3 years to 5 years (N = 800)	>5 years (N = 829)
Bronchiolitis	5 (0.4%)	82 (4.8%)	378 (26.5%)	231 (28.9%)	225 (27.1%)
Acute rejection	63 (5.5%)	35 (2.0%)	25 (1.8%)	4 (0.5%)	5 (0.6%)
Lymphoma	1 (0.1%)	47 (2.7%)	32 (2.2%)	11 (1.4%)	27 (3.3%)
Malignancy, other	1 (0.1%)	44 (2.6%)	78 (5.5%)	60 (7.5%)	70 (8.4%)
CMV	0	65 (3.8%)	20 (1.4%)	4 (0.5%)	3 (0.4%)
Infection, non-CMV	245 (21.4%)	639 (37.2%)	352 (24.6%)	162 (20.3%)	150 (18.1%)
Graft failure	331 (28.9%)	307 (17.9%)	244 (17.1%)	137 (17.1%)	127 (15.3%)
Cardiovascular	121 (10.6%)	72 (4.2%)	50 (3.5%)	36 (4.5%)	46 (5.5%)
Technical	96 (8.4%)	44 (2.6%)	11 (0.8%)	2 (0.3%)	3 (0.4%)
Other	283 (24.7%)	382 (22.2%)	238 (16.7%)	153 (19.1%)	173 (20.9%)

CMV, cytomegalovirus.

Fonte: Trulock et al. The Journal of Heart and Lung transplantation 2005; 24:956-967.

Apêndice 11. Agentes Responsáveis pela Bronquiolite Constrictiva

Pós-Infecciosa

Frequente

RSV

Adenovírus

Miconlasma

Pouco Frequente

Corona

Rubéola

Caxumba

FONTE: Atlas of Nontumor Pathology (on line)— Series I, Fascicle 2; 2002. Non-Neoplastic Disorders of the Lower Respiratory Tract. Disponível em <http://www.afip.org>.

Apêndice 12. “Immunoblot” - Anti colágenos I – III e V

Apêndice 13. Trabalhos publicados e submetidos

a publicação produtos desta tese

Garippo AL, Parra ER, Teodoro WR, Veloza AP, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Immune cells infiltration and bronchovascular remodeling after nitric acid-nasal in a mouse bronchiolitis obliterans model. Lung 2006; 184:229-238.

Garippo AL, Parra ER, Teodoro WR, Rivero DHRF, Souza F, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Nasal tolerance with collagen V protein reverts bronchovascular axis remodeling in experimental bronchiolitis obliterans (re-submetido à publicação em outubro/06).

Garippo AL, Teodoro WR, Parra ER, as Dilva APM, Souza W, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Nasal collagen therapy for bronchiolitis obliterans model (em processo de re-submissão).

Outros trabalhos:

Balbany APS, Ito FY, Saldiva PHN, **Garippo AL**, Marone SAM, Butugan O. Pesquisa de Receptores para Estrógeno e Progesterona na Mucosa Nasal Humana – Revista da Sociedade de Otorrinolaringologia do Rio de Janeiro. 2002;2(4):119-126.

Pinto CA, Carvalho PEO, Antonângelo L, **Garippo AL**, Silva A GP, Soares F, Younes R, Beyruti R, Takagaki T, Saldiva PHN, Vollmer RT, Capelozzi VL. Morphometric Evalution of Tumor Matrix Metallopreoteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. Clinical Cancer Research Philadelphia. 2003;9(8):3098-3104.

Teodoro WR, Velosa AP, Witzer SS, **Garippo AL**, Farhat C, Parras ER, Sonohara S, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract*. 2004;200(10):681-691.

Yamagishi N, Lichtenfels AJ, Demarchi LMMF, Silva AGP, **Garippo AL**, Alves VAF, Takagaki TY, Saldiva PHN, Vollmer RT, Capelozzi VL. COX-2, MMP-9, and Noguchi classification provide additional prognostic. A study of 117 patients from Brazil. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(1):78-86.

Andrade, ZRDM, **Garippo AL**, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Immunohistochemical and in situ detection of Cytomegalovirus in Lung Autopsies of Children Immunocompromised by Secondary Interstitial Pneumonia. *Pathol Res Pract Stuttgart*. 2004(200):25-32.

Mauad T, Schadeewijk A Van, Schrumpt J, Hack EC, **Garippo AL**, Eizenberg B, Hiemstra PS, Rabe KF, Dolhnikoff M. Lymphocytic inflammation in childhood bronchiolitis obliterans. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38(3):233-239.

Pereira JC, Silva AG, Ab'Saber AM, Schmidt Jr A, Rodrigues OR, **Garippo AL**, Takagaki TY, Jatene F, Martins S, Capelozzi VL. Nuclear and Environment morphometric profile in tumor size and nodal metastasis of resected typical pulmonary carcinoid. Pathol Res Pract.2004;200(6):459-467.

Simões S M, Santos MA, Oliveira MS, Fontes ES, Castro I, **Garippo AL**, Martins MA, Saldiva PHN, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. Clin Exp Allergy. 2005;35:602-611.

Curriculum

Nome ANA LUCIA GARIPPO

Filiação Vitantonio Garippo e Maria José Garippo

Local de Nascimento São Paulo

Residência Rua Ivo Borsari, 131

Poá – São Paulo – SP- CEP. 08550-440

Celular: 9729.5408; e.mail: garippo@usp.br

FORMAÇÃO EDUCACIONAL

SUPERIOR - Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas

- Universidade de Mogi das Cruzes
- 1990 – 1993

Pós- Graduação

- **Especialização** - Área de Microbiologia
- Faculdade Oswaldo Cruz – Instituto de Pesquisa Oswaldo Quirino
 - 11/03/1997 - 22/09/1998 / 360 h

Ocupação

Especialista em Laboratório

– Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

- 1988-2006 - Departamento de Patologia
- 2006 ao atual - Departamento de Medicina Preventiva

Microscopia Confocal - Rede de Multiusuários HC – FMUSP/LIMs