ANGELA BATISTA GOMES DOS SANTOS

**Perfil celular do tecido pulmonar em crianças
de até dois anos: um estudo em autópsias**

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

Programa Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Angela Batista Gomes dos

Perfil celular do tecido pulmonar em crianças de até dois anos : um estudo em autópsia / Angela Batista Gomes dos Santos. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Thaís Mauad.

Descritores: 1.Autópsia 2.Células dendríticas 3.Lactante 4.Linfócitos
5.Mastócitos 6.Pulmão

USP/FM/DBD-272/10

*Dedico este trabalho com todo meu coração aos meus pais
Nelson e Maria do Carmo, que me ensinaram que o amor, esforço e persistência são
ferramentas indispensáveis para realização dos sonhos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus Excelso Criador, por direcionar meu caminho.

Ao meu querido marido Paulo e às minhas filhas Ana Beatriz e Bianca Caroline pelo apoio e paciência nas minhas ausências.

Aos meus queridos irmãos Rosângela, Giovanni, Jeová e Daniel que são verdadeiros exemplos de união e amor.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Thais Mauad por disponibilizar seu tempo, sempre sobrecarregado, na orientação deste trabalho e na difícil arte de ensinar “o caminho das pedras”.

À querida Dra. Elia Caldini, que de uma forma sutil e carinhosa me ajudou a realizar este trabalho plenamente.

Ao Luís Fernando (Burns) pela disposição em ajudar mesmo nos momentos em que estava visivelmente ocupado.

Às queridas Cecília, Cristina, Weluma, Keila, Ana Garippo, Esmeralda, Sandra e ao querido Sérgio meus amigos do coração, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis e através dos risos me ajudaram superar o “stress” tão característico dos que estão finalizando uma tese.

À querida Ana Lucia, nossa “boa samaritana”, que sempre disse “sim” nos momentos que dela precisei, disponibilizando seu tempo e atenção com muito carinho.

À querida Valéria que me ajudou na formatação deste trabalho com todo o carinho e paciência que lhe é tão peculiar!

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMUSP, especialmente aos dos laboratórios de Histologia e Imunohistoquímica, onde as lâminas com extrema competência foram confeccionadas.

Aos Laboratórios de Biologia Celular - LIM 59 e de Emergências Clínicas – LIM 51, por disponibilizarem o uso do analisador de imagens.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Gráficos	iv
Resumo	v
Summary	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Sistema Imunológico – Definição	01
1.2. Principais células do sistema imunológico	02
1.2.1. Linfócitos B	02
1.2.2. Linfócitos T	02
1.2.3. Macrófagos	03
1.2.4. Células dendríticas	04
1.2.5. Células <i>natural killer</i>	05
1.2.6. Mastócitos	06
1.2.7. Perfil imunológico das mucosas e do pulmão na infância	06
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivos gerais	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Estudo da população	12
3.2. Imunohistoquímica	13
3.2.1. Preparação das lâminas	14
3.2.2. Hidratação	14
3.2.3. Recuperação dos sítios antigênicos	14
3.2.4. Bloqueio da peroxidase endógena	14
3.2.5. Bloqueio de proteínas inespecíficas	15
3.2.6. Incubação com os anticorpos	15
3.3. Morfometria	16
3.3.1. Analisador de imagem	16
3.3.2. Estudo quantitativo de células	16
3.4. Análise estatística	18

4. RESULTADOS	20
4.1. Estudo da população	20
4.1.2. Análise do tecido pulmonar	21
4.1.3. Análise quantitativa	21
4.1.3.1. Composição celular dentro de cada compartimento pulmonar estudado	21
4.1.3.2. Distribuição celular dos compartimentos das vias aéreas e parênquima alveolar	26
4.1.4. Correlações	36
5. DISCUSSÃO	39
5.1. Limitações do estudo	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ANEXO A

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mM	mili molar
v	volume
HRP	Horseradish peroxidase
mm	milímetro
MB	membrana basal
IQR	interquatile ranger
µm	micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados no trabalho	13
Tabela 2 - Idade em meses, sexo e <i>causa-mortis</i> das crianças	21
Tabela 3 - Densidade celular nos quatros compartimentos estudados ...	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia mostrando como as células foram quantificadas nos diferentes compartimentos 18
- Figura 2** - Fotomicrografia mostrando a expressão celular de linfócitos T de CD3+ e B CD20+ na via aérea e parênquima alveolar 29
- Figura 3** - Fotomicrografia mostrando a expressão celular de linfócitos T CD4+ e CD8+ na via aérea e parênquima alveolar..... 31
- Figura 4** - Fotomicrografia mostrando a expressão de células *natural killer* CD56+ e Granzima B+ na via aérea e parênquima alveolar..... 33
- Figura 5** - Fotomicrografia mostrando a expressão de células CD1a+ na via aérea e parênquima alveolar 35
- Figura 6** - Fotomicrografia mostrando a expressão de mastócitos e macrófagos CD68+ na via aérea e parênquima alveolar 37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada epitelia.....	23
Gráfico 2 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada interna	24
Gráfico 3 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada externa	25
Gráfico 4 - Densidade dos diferentes tipos celulares nos septos alveolares ..	26
Gráfico 5 - Densidade das células CD3+ e CD20+ em todas as camadas	28
Gráfico 6 - Densidade das células CD4+ e CD8+ em todas as camadas	30
Gráfico 7 - Densidade das células Granzima B+ e CD56+ em todas as camadas	32
Gráfico 8 - Densidade das células CD1a+ em todas as camadas	34
Gráfico 9 - Densidade de mastócitos e macrófagos CD68+ em todas as camadas	36

Resumo

Introdução: Doenças pulmonares ou infecções que ocorrem no início da vida podem ter permanente impacto na vida adulta. Pouco se sabe sobre o perfil de células do sistema imunológico em pulmões de crianças lactentes.

Objetivo: Descrever o perfil de células do sistema imunológico no pulmão de lactentes sem doença pulmonar.

Métodos: Amostras de pulmões histologicamente normais, obtidas através de autópsia de dez crianças que morreram de causas acidentais ou de doenças não pulmonares, foram marcadas por anticorpos contra linfócitos B e T, macrófagos, células *NK* (*natural Killer*), células citotóxicas, células dendríticas e mastócitos. As células foram quantificadas no epitélio, na camada interna, na camada externa das vias aéreas e nos septos alveolares. Membrana basal e septos alveolares foram medidos através de análise de imagem. Resultados expressos em células/mm de membrana basal epitelial brônquica ou alveolar.

Resultados: A mediana das idades foi 2,5 meses (1-730 dias). Os resultados mostraram que a camada interna apresentou pequena densidade celular. No epitélio da via aérea e no parênquima houve predominância de células que estão relacionadas com a imunidade inata, tais como: CD56+, Granzyme + e CD68+. A camada externa e o parênquima alveolar apresentaram a maior densidade celular. Poucas células T CD4+ e células dendríticas foram encontradas na maioria dos compartimentos do pulmão.

Conclusão: Há uma compartimentalização de células relacionadas com o sistema imunológico ao longo da via aérea e parênquima dos pulmões das crianças estudadas. Esta configuração pode estar relacionada com o desenvolvimento dos mecanismos de defesa da imunidade inata e da imunidade adquirida. Este conhecimento é importante para entender os mecanismos da imunocompetência pós-natal dos pulmões.

Descritores: 1.Autópsia 2.Células dendríticas 3.Lactante 4.Linfócitos 5.Mastócitos 6.Pulmão

Summary

Introduction: Pulmonary diseases or infections occurring early in life may have a permanent impact in adulthood. Little is known about the normal immune cell profile in the lungs of infants. **Objective:** To describe the immune cell profile of infants without lung disease. **Methods:** Histologically normal lung samples obtained at autopsy of ten infants that died either due to incidental or inflicted causes or non-pulmonary diseases were stained for antibodies against B and T lymphocytes, macrophages, NK cells, cytotoxic cells, dendritic cells and mast cells. Cells were quantified in the airway epithelial layer, inner layer, outer layer and alveolar septa. Basement membrane or alveolar septa lengths were assessed by image analysis. Results are expressed as cells/mm. **Results:** The median age of patients was 2.5 months and ranged from 1- 730 days. The inner layer of the airways was the region with the smallest density of cells. There was a predominance of cells related to the innate immunity such as CD56+, Granzyme B+ and CD68+ cells in the epithelial layer and alveolar parenchyma. The outer layer and the lung parenchyma presented the highest cellular density. There were very few CD4+ T cells or dendritic cells in most of the lung compartments. **Conclusions:** There was a compartmentalization of immune cells along airways and parenchyma in infants, which may be related to the development of innate and acquired lung defense mechanisms. This knowledge is important to understand mechanisms of postnatal immune competence of the lungs.

Descriptors: 1. Autopsy 2. Dendritic cells 3. Infants, 4. Lung 5. Lymphocytes
6. Mast cells

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 . Sistema Imunológico – Definição

Imunidade é a capacidade de proteção que o organismo possui contra agentes infecciosos. As moléculas e células responsáveis pela imunidade constituem o sistema imunológico. É chamada de resposta imune toda resposta coordenada e coletiva que ocorre quando há introdução de um antígeno no organismo. (1)

O sistema imunológico pode ser dividido em compartimentos, entre os quais, dois são mais importantes: o linfóide periférico e os das mucosas. O primeiro compreende o baço e os linfonodos. O sistema imunológico das mucosas humanas compreende as estruturas nasais, brônquicas, gastrointestinal, trato urogenital e também glândulas salivares, lacrimais e glândulas mamárias das lactantes. (2)

O sistema imunológico pode ser dividido para fins de estudo também em: imunidade inata que é a primeira resposta do organismo na apresentação do antígeno e a imunidade adaptativa cuja resposta é dada pelo estímulo das exposições a agentes infecciosos e que tende a aumentar em magnitude e capacidade de defesa a cada vez que um organismo estranho é apresentado. (1)

Os macrófagos, os neutrófilos, as células *NK* (do inglês, “*natural killer*”), os mastócitos são as principais células presentes na imunidade inata

e não possuem capacidade antigênica. Os linfócitos T, CD4+ e CD8+, e B são as células mais importantes na imunidade adaptativa e possuem a função de reconhecimento dos antígenos de maneira específica. É de proteínas de membrana especializadas a tarefa de fazer com que as partículas dos microorganismos sejam reconhecidas pelos linfócitos T. Estas são codificadas por genes em um *locus* designado complexo de histocompatibilidade ou MHC. (1)

1.2. Principais células do sistema imunológico

1.2.1. Linfócitos B

São as únicas capazes de produzir anticorpos contra um determinado agressor. Possuem em sua superfície a IgM monomérica que participa no reconhecimento de antígenos extracelulares. Funcionam como mediadores de resposta humoral, ou seja, ao reconhecerem os antígenos podem neutralizar seu poder de infecção. Em torno de 8% dos linfócitos alveolares são células B. (3)

1.2.2. Linfócitos T

Produzidos no timo os linfócitos T são mediadores da imunidade celular, eles orquestram a resposta do sistema imune aos estímulos

antigênicos. São consideradas as células-chave do funcionamento imunológico do pulmão e funcionalmente podem ser divididas em:

- Auxiliares que são aquelas estimuladas pelas células apresentadoras de antígenos. Possuem receptor CD4+ em suas superfícies e reconhecem os macrófagos ativados. Além disto, liberam citocinas que regulam a maturação das células CD8+ precursoras e na reativação das células CD8+ de memória. (4)
- Citotóxicas que são consideradas as mais importantes, pois têm a função de destruir diretamente a membrana celular do antígeno. As células T CD8+ ativadas expressam em sua superfície grânulos de Granzima B. No processo inflamatório as células T citotóxicas liberam moléculas de perforina que possuem função de formar um poro na membrana das células dos antígenos e por este caminho a granzima penetra causando apoptose ou morte celular. A presença deste marcador indica que a célula T está ativada. (5)
- Supressoras que são as responsáveis pelo mecanismo de tolerância imunológica, impedindo assim que os leucócitos ataquem as próprias células do organismo. (1)

1.2.3. Macrófagos

Estas células também respondem pela captura e apresentação dos antígenos às células T. São encontrados em todos os órgãos e tecidos conectivos e possuem nomes específicos de acordo com o local onde estão

localizados. No pulmão eles são chamados de macrófagos alveolares e são encontrados no parênquima, no epitélio alveolar como também no interstício.

(3)

Os macrófagos alveolares fazem parte da primeira linha de defesa contra materiais particulados que quando inalados atingem os alvéolos. Suas funções no mecanismo de defesa alveolar incluem: ingestão e degradação dos antígenos no pulmão, veículo no transporte destas partículas para fora do pulmão, desintoxicação dos materiais ingeridos e inalados e reforça a ativação imunológica dos linfócitos. (3)

1.2.4. Células dendríticas

As células dendríticas possuem a função de sentinela e reconhecem qualquer patógeno ou substância alérgica ao longo dos tecidos periféricos através da expressão de receptores de reconhecimento, tais como, *Toll like*, *NOD-like* e receptores de lecitina C. (6)

Quando localizadas nos epitélios da pele, gastrointestinal e no sistema respiratório ainda são imaturas e chamadas de células de Langerhans; para diferenciar as células de Langerhans de outros subtipos das células dendríticas usa-se o marcador CD1a.

Após a captura dos antígenos, as células dendríticas secundariamente amadurecem, migrando para as zonas dos linfócitos T nos órgãos linfóides, onde é feita a apresentação dos patógenos iniciando-se a resposta imune adaptativa.(7)

Tanto a maturação quanto a migração das células dendríticas para os tecidos linfóides são orquestradas por moléculas de adesão que estão expressas em sua superfície. Recentemente descobriu-se que células dendríticas específicas, *DC-Sign*, expressam moléculas de lecitina do tipo C e possuem a função de sinalizar e mediar a interação das células dendríticas com as células T em repouso. O anticorpo específico para identificar estas células é o anti-human *DC Sign* ou CD209. (7)

1.2.5. Células *Natural Killer*

Estas células são caracterizadas por serem mediadoras da primeira resposta protetora a antígenos e vírus. Esta resposta imunológica não requer nenhuma sensibilização anterior como acontece com as células T e B, por isto são extremamente importantes no controle de infecções virais. Estudos preliminares em células mononucleares provenientes de cordão umbilical e sangue periférico mostram que a densidade de células *natural killer* CD56 é maior ao nascer e tende a decrescer aos dois anos de idade.(8)

As células CD 56 são um subtipo dentro das células *natural killer* e tem como principal função regular os efeitos de algumas citocinas, tais como, Interferon gama, Fator de necrose tumoral alfa, Interleucinas 10 e 13.(9)

1.2.6. Mastócitos

Os mastócitos têm papel importante nos eventos associados à resposta alérgica, por possuírem alta concentração de receptores para imunoglobulinas E (IgE) na sua superfície. Os grânulos presentes nestas células possuem alta quantidade de histamina (mediadora inflamatória) que quando liberada dá início aos eventos em cascata da resposta celular que compõe o processo alérgico, (10) além disto as citocinas produzidas por estas células parecem contribuir na resposta a infecções na imunidade inata.(1)

Os mastócitos triptase podem ainda contribuir para o remodelamento tecidual em doenças inflamatórias, como a asma. (10)

1.2.7 Perfil imunológico das mucosas e do pulmão na infância

Ao nascer, as superfícies das mucosas são estimuladas pela rápida colonização bacteriana e no pulmão culmina com o aparecimento de células inflamatórias nas vias aéreas. Neste momento duas importantes ações acontecem: 1) o fechamento da membrana epitelial da mucosa impedindo a exposição sistêmica à antígenos e à uma possível infecção generalizada; 2) o aparecimento de células secretoras de anticorpos, que é um pré-requisito para desenvolvimento dos mecanismos de defesa da mucosa. Durante os primeiros 12 meses de vida, a maturação das mucosas do sistema imunológico é dependente do tempo e do tipo de exposições antigênicas,

como também de fatores ambientais. Porém ao nascer, apesar de não ter existido ainda um estímulo antigênico, sabe-se que mesmo os prematuros com 28 semanas de gestação podem montar uma resposta efetiva através do sistema das mucosas imune pelo mecanismo de defesa inata. Esta proteção não pode ser específica, visto que não houve ainda desenvolvimento da resposta adaptativa, desta forma a exposição a antígenos no período pós-natal é de extrema importância para eficiência da rápida resposta e maturação do sistema imune. (2)

Acredita-se, que a susceptibilidade das crianças recém-nascidas para adquirir infecções bacterianas e fúngicas, esteja relacionada à deficiência imunológica, principalmente à falha na maturação das células T. (11)

Especificamente no pulmão, as informações que temos sobre o perfil imunológico celular de crianças saudáveis são provenientes de lavado broncoalveolar (LBA) em estudos que foram realizados em crianças de diferentes períodos de vida comparados com adultos. Nos resultados destes estudos observou-se que a relação de células CD4/CD8 é menor que o observado em adultos não fumantes e que a distribuição das células B, pan T e *natural killer* nas crianças foi semelhante a dos adultos. (12 e 13)

Pouco se sabe da distribuição celular da resposta imune celular no tecido pulmonar de lactentes. Utilizar casos de autópsias é uma das poucas formas de se tentar compreender o perfil celular do pulmão de crianças sem doença pulmonar.

Com o objetivo de detectar o perfil de algumas células do sistema imunológico presentes no pulmão de lactentes que vieram a óbito sem

doença pulmonar, este estudo poderá ajudar na melhor interpretação da análise do lavado broncoalveolar (LBA) em crianças pequenas e poderá também ajudar na comparação com os estudos de tecidos que são realizadas em crianças pequenas, especialmente crianças com asma. (13)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Através de uma análise retrospectiva, utilizar pulmões de lactentes que vieram a óbito por causas naturais ou violentas , mas sem doença pulmonar, obter um melhor conhecimento do perfil tecidual de algumas células do sistema imunológico.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os principais tipos celulares do sistema imunológico em lactentes que vieram a óbito sem doença pulmonar utilizando marcadores para células T: CD4+, CD8+ e CD3+; células B: CD20+; macrófagos: CD68+; mastócito triptase; células dendríticas: CD1a e DC Sign; células *natural killer* CD56+ e células Granzima B+.
 - Obter o perfil destas células em diferentes compartimentos da via aérea e parênquima pulmonar.
 - Correlacionar as densidades de células com a idade.
 - Correlacionar os diferentes tipos celulares entre si.
-

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo comitê 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, sob o número 0638/07 e da Universidade de Medicina de Hannover, na Alemanha.

3.1. Estudo da população

Tecido pulmonar obtido a partir de autópsias realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) em São Paulo e no Instituto Médico Legal da Universidade de Hannover, Alemanha entre os anos de 1995 e 2004.

Sete crianças morreram de causas naturais. Os pulmões ao exame macroscópico e histológico eram normais. Duas crianças foram autopsiadas em Hannover e tiveram mortes violentas, porém seus pulmões também possuíam aspecto histológico normal.

3.2. Imunohistoquímica

Os anticorpos contra linfócitos T: CD4+, CD8+ e CD3+; linfócitos B: CD20+; macrófagos: CD68+; mastócito triptase+; células dendríticas: CD1a+ e DC Sign+ e *natural killer*: Granzima B+ e CD56+ utilizados para este estudo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Anticorpos primários utilizados no trabalho

Anticorpo	Recuperação	Espécie	Diluição	Clone	Fabricante
CD 1a	Citrato	camundongo	1:20	010	Dako, Glostrup, Denmark
CD3	Citrato	coelho	1:600	Policlonal	Dako, Glostrup, Denmark
CD4	Citrato	camundongo	1: 400	UCHL1	Dako, Glostrup, Denmark
CD8	Citrato	camundongo	1:100	C8/144B	Dako, Glostrup, Denmark
CD20	Citrato	camundongo	1:600	L26	Dako, Glostrup, Denmark
CD68	Citrato	camundongo	1:3200	KP1	Dako, Glostrup, Denmark
GRANZIMA B	Citrato	camundongo	1:50	GR-B-7	Monosan, Uden, Netherlands
CD56	Citrato	camundongo	1:200	NK-1	Dako, Glostrup, Denmark
MASTÓCITO TRIPTASE	Citrato	camundongo	1:1200	AA1	Dako, Glostrup, Denmark
DC- SIGN	Citrato	camundongo	1:10	19F7	HBT, UDen, Netherlands

3.2.1. Preparação das lâminas

Cortes de tecido de 3 μm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas em suporte adequado. O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 10 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio.

3.2.2. Hidratação

Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95°, um banho de álcool 70°. Foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4.

3.2.3. Recuperação dos sítios antigênicos

A recuperação dos sítios antigênicos foi feita por alta temperatura em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 em panela de pressão por 1 minuto.

3.2.4. Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10v (3%), logo após lava-se muito bem em água corrente, água destilada e PBS.

3.2.5. Bloqueio de proteínas inespecíficas

O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com imersão das lâminas em tampão fosfato pH 7,4 com 2% de leite desnatado por 10 minutos.

3.2.6. Incubação com os anticorpos

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por 24 horas e posteriormente incubados com um anticorpo secundário. A imunomarcação com anticorpos DC-Sign e Granzima B foi realizada em Leiden, na Holanda, e o anticorpo secundário utilizado foi o kit Envision-HRP (Dakocytomation, Glostrup, Denmark) e, neste caso especificamente, para coloração do material foi utilizado o cromógeno Vector Nova RED (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para os demais anticorpos primários, cujas reações foram realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foi utilizado como secundário um complexo estreptovidina-biotina HRP (LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical, Saint Louis, Missouri, EUA).

Posteriormente ocorreu a contra-coloração com Hematoxilina de Harris para todos os casos.

3.3. Morfometria

3.3.1. Analisador de imagem

As imagens foram analisadas através do software Image-Pro® Plus 4.1 for Windows® (Media Cybernetics–Silver Spring, MD, USA). O microcomputador é conectado a uma câmera de vídeo, este captura as imagens de um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany), permitindo que as medidas sejam realizadas.

3.3.2. Estudo quantitativo de células

A densidade de população celular foi determinada pela técnica de peroxidase para células T (CD3+, CD4+, CD8+), B (CD20+), macrófagos (CD 68+), mastócitos (mastócito triptase +), células *natural Killer* (CD 56 +), células citotóxicas (Granzima B+), células dendríticas (CD1a+ e DC-SIGN+) e contadas interativamente delineando a área de interesse com a ajuda do sistema de análise de imagens. Os resultados são expressos como células positivas para determinado antígeno e normalizadas pela medida de membrana basal/alveolar.

Para cada caso foram analisadas todas as pequenas vias aéreas cortadas transversalmente, classificadas pelo perímetro da membrana basal, sendo consideradas aptas aquelas em que a relação do perímetro foi menor ou igual a 0,6 mm. (14)

Usando um aumento de 400X, o perímetro da via aérea foi medido em toda sua circunferência. As células positivas para cada marcador foram quantificadas nas seguintes camadas: epitelial (EP) está localizada no epitélio da via aérea, interna (CI) está localizada entre a membrana basal do epitélio e a borda externa do músculo liso presente na via aérea, incluindo lamina própria e membrana basal (MB), camada externa (CE) está delimitada entre a camada externa do músculo até o limite externo da via aérea ou parênquima alveolar e nos septos alveolares (SA). Fotomicrografia representativa destas informações estão apresentadas na figura 1.

Figura 1. A fotomicrografia mostra como as células foram quantificadas nos diferentes compartimentos. Depois de delinear as áreas de interesse com a ajuda do sistema de análise de imagem, as células foram contadas interativamente. Resultados estão expressos como células normalizadas pela medida da membrana basal /alveolar. EP= camada epitelial, CI= camada interna, CE= camada externa, SA= septos alveolares

Em cada caso, 20 septos alveolares foram analisados com um aumento de 200X. Através do analisador de imagens foi contado o número de células no parênquima alveolar quantificando o comprimento dos septos alveolares delineados. Todos os resultados foram expressos como células/mm de MB ou por septos alveolares.

3.4. Análise estatística

Para análise estatística utilizamos mediana/IQR ou media/desvio padrão.

Para comparação entre as células utilizamos o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para o “*pos-hoc*”. Para as correlações utilizamos o teste de Spearman.

Foram considerados como significantes valores de p menores que 5%.

O programa estatístico utilizado foi o software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) 15.0 (Chicago, Illinois) e o Graphpad Prism 5 (Chicago, USA)

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da população

A mediana da idade da população estudada foi de 2,5 meses com valores que vão de 1 a 730 dias.

Os dados demográficos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Idade em meses, sexo e *causa-mortis* das crianças.

Casos	Idade	Sexo	<i>Causa mortis</i>
1 ^a	0,03 (1 dia)	f	Cardiopatia congênita
2 ^a	0,17 (5 dias)	m	Doença metabólica
3 ^b	1	f	Desnutrição
4 ^b	1	f	Septcemia
5 ^a	2	f	Gastrosquise
6 ^b	3	m	Afogamento
7 ^b	3	m	Asfixia
8 ^b	14	m	Transtorno metabólico
9 ^b	14	f	Septicemia
10 ^a	24	f	Insuficiência hepática

^a = casos autopsiados em São Paulo, Brasil

^b = casos autopsiados em Hannover, Alemanha

f = feminino

m = masculino

4.1.2. Análise do tecido pulmonar

A média entre a hora da morte e a realização da autópsia foi de 18 horas variando entre 4-48 horas.

Foi analisada uma média de cinco vias aéreas por caso (3 - 6). A média do perímetro das vias aéreas foi 892,8 μm (702,7 – 1101,5 μm). Foi analisada uma média de 39 (29 – 51) vias aéreas por anticorpo estudado. A média do comprimento dos septos alveolares foi de 3,3mm (1,8 – 6,6mm) por marcador e por caso.

Tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) foi encontrado em dois casos (números 6 e 8 da tabela 2).

4.1.3. Análise quantitativa

A composição celular foi diferente nos diversos compartimentos pulmonares estudados.

4.1.3.1. Composição celular dentro de cada compartimento pulmonar estudado

Na camada interna (CI) foi observada a menor densidade celular, com uma média de 0,5 célula/mm de perímetro de BM. A camada externa (CE) e o parênquima alveolar (PA) tiveram a maior densidade celular dentre os compartimentos analisados.

Em cada camada observou-se o seguinte perfil celular:

- Camada epitelial (EP) mostrou predominância das seguintes células: *natural killer* CD56+ (NK), linfócitos T CD8+, células citotóxicas Granzima B+ e macrófagos CD68+. Não foram encontradas nesta camada células T CD4+ e células dendríticas CD1a+. A densidade de células CD56+ foi estatisticamente maior que a de células T CD3+, células T CD4+, CD1a+ e de mastócitos ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis).

Gráfico 1 – Densidade dos diferentes tipos celulares na camada epitelial.

- Camada interna (CI): poucas células estavam presentes nesta camada e não havia células T CD4+. Havia mais células B CD20+ do que células T CD4+ e CD1a+ ($p < 0,005$; Kruskal-Wallis).

Gráfico 2 – Densidade dos diferentes tipos celulares na camada interna.

- Camada externa (CE): nesta camada foi encontrada a maior densidade celular dentre os compartimentos da via aérea. Os linfócitos B CD20+ e T CD3+ apresentaram-se em maior densidade do que as células citotóxicas (Granzima B+ e CD56+). A densidade de células T CD3+ foi significativamente maior que as células T CD4+, células citotóxicas CD56+ e Granzima B+. Além disso, houve mais significância para células CD8+ e CD20+ do que Granzima B+ ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis).

Gráfico 3 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada externa.

- Septo alveolar: neste compartimento houve a maior densidade de todas as células estudadas. A densidade de macrófagos CD68+ foi significativamente maior que as células CD1a+, CD56+ e mastócitos. Por outro lado, as células dendríticas CD1a+ foram menos frequentes que os linfócitos T CD3+, linfócitos B CD20+ e Granzima B+ neste compartimento ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis). Dados estão apresentados no gráfico 4.

Gráfico 4 - Densidade dos diferentes tipos celulares nos septos alveolares.

4.1.3.2. Distribuição celular dos compartimentos das vias aéreas e parênquima alveolar

- *Linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD20+:*

Houve uma densidade celular similar entre células T CD3+ e células B CD20+ em todas as camadas estudadas. Ambas predominaram na camada externa e parênquima quando comparadas estatisticamente com as camadas epitelial e interna ($p < 0,001$; Kruskal-Willis).

Quando comparadas entre si, não houve diferença estatisticamente significativa entre os linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD20+.

Gráfico 5 – Densidade celular de linfócitos T CD3+ / B CD20+ em todas as camadas estudadas.
EP= epitelial CI= camada interna CE= camada externa SA= septo alveolar.

Figura 2- Fotomicrografia mostrando a densidade de linfócitos T CD3+ e B CD20+ na via aérea e parênquima alveolar. Coloração por imunohistoquímica em tecido pulmonar. A= via aérea e B= parênquima. Barra de escala = 10 μ m

- *Linfócitos T CD4+ e CD8+*

A densidade celular de linfócitos T CD4+ foi muito pequena nos pulmões dos lactentes.

Os linfócitos T CD8+ foram encontrados com maior densidade na camada externa brônquica e no parênquima alveolar, havendo diferença estatisticamente significativa quando comparado com as camadas externa e epitelial brônquicas. ($p < 0,001$; Kruskal-Willis).

Os linfócitos T CD8+ estavam significativamente aumentados em relação às células T CD4+ em todas as camadas ($p= 0,018$; Kruskal-Willis), exceto na camada epitelial.

Gráfico 6 – Densidade das células CD4+ e CD8+ em todas as camadas.
EP= epitelial CI= camada interna CE= camada externa
SA= septo alveolar.

Figura 3 - Fotomicrografia mostrando a expressão celular de linfócitos T CD4+ e CD8+ na via aérea e parênquima alveolar. Coloração por imunohistoquímica em tecido pulmonar. A= via aérea e B= parênquima. Barra de escala = 10 μ m

- *Natural killer CD56+* (células citotóxicas)

A maior densidade de células NK CD56+ foi na camada epitelial. As camadas interna e epitelial mostraram maior densidade de células CD56+ em relação as camada interna e parênquima ($p < 0,003$ Kruskal-Willis)

- *Granzima B+* (células citotóxicas)

Houve maior densidade de células Granzima B+ no parênquima e na camada epitelial. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas com parênquima e todas as outras camadas ($p= 0,0001$, Kruskal-Wallis).

Gráfico 7 - Densidade de células Granzima B+ e CD56+ em todas as camadas analisadas.
EP= epitelial CI= camada interna CE= camada externa
SA= septo alveolar.

Figura 4 – Fotomicrografia mostrando a expressão de células NK CD56+ e Granzima B na via aérea e parênquima alveolar. Coloração por imunohistoquímica em tecido pulmonar.
A= via aérea e B= parênquima
Barra de escala = 10 μ m

- *CD1a+ (células dendríticas)*

As células CD1a+ predominaram na camada externa da via aérea e não foram encontradas nas camadas epitelial e interna das vias aéreas. Estatisticamente havia maior expressão destas células na camada externa em comparação com todas as outras camadas ($p < 0,008$; Kruskal-Wallis).

Gráfico 8 - Densidade de células CD1a+ nas camadas estudadas.
EP= epitelial CI= camada interna CE= camada externa
SA= septo alveolar.

Figura 5 - Fotomicrografia mostrando a expressão celular de linfócitos CD1a+ na via aérea e parênquima alveolar. Coloração por imunohistoquímica em tecido pulmonar. A= via aérea e B= parênquima. Barra de escala = 10 μ m

- *DC-SIGN (células dendríticas)*

Havia raras células dendríticas DC-SIGN nos pulmões e por isto não foram quantificadas. Interessantemente, quando presentes, elas se posicionaram na região perivascular das artérias pulmonares e em nenhuma amostra havia expressão nas vias aéreas ou no parênquima alveolar.

- *Mastócitos triptase+ (mastócitos)*

Houve predominância de mastócitos na camada externa das vias aéreas, havendo maior densidade celular nesta camada quando comparado com a camada epitelial ($p = 0,0017$, Kruskal-Wallis).

- *Macrófagos CD68+*

Os macrófagos CD68+ predominaram no parênquima alveolar em relação às outras camadas da via aérea ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis)

Gráfico 9 - Densidade celular de mastócitos (mast) e macrófagos (CD68) em todas as camadas.
EP= epitelial CI= camada interna CE= camada externa
SA= septo alveolar.

Figura 6 - Fotomicrografia mostrando a expressão celular de mastócitos e macrófagos CD68+ na via aérea e parênquima alveolar. Coloração por imunohistoquímica em tecido pulmonar. A= via aérea e B= parênquima
Barra de escala = 10 μ m

Dados numéricos para todos estes resultados estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 - Densidade celular nos quatro compartimentos estudados.

Densidade celular (cel/mm)	Camada epitelial da via aérea	Camada interna da via aérea	Camada externa da via aérea	Parênquima alveolar
CD1a	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	1,44 (0,00-3,51) ^a	0,00 (0,00-0,00)
CD3	0,00 (0,00-0,09)	0,00 (0,00-0,39)	6,17 (2,68-9,99) ^b	3,73 (1,97-5,91) ^b
CD20	0,00 (0,00-0,48)	0,19 (0,00-0,38)	1,74 (0,45-3,35) ^b	4,49 (1,38-5,20) ^b
CD56	0,71 (0,44-1,98)	0,00 (0,00-0,00) ^c	0,29 (0,00-0,67)	1,77 (0,49-3,70)
CD4	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,07 (0,00-0,28)	0,00 (0,00-1,71)
CD8	0,35 (0,00-0,83)	0,00 (0,00-0,31) ^d	3,26 (0,49-7,38)	2,67 (1,85-3,46)
Mastócito	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,09)	0,83 (0,00-2,42) ^e	0,00 (0,00-2,38)
Granzima B	0,00 (0,00-2,58)	0,00 (0,00-0,28)	0,00 (0,00-0,21)	3,78 (1,83-6,27) ^a
CD68	0,00 (0,00-0,87)	0,00 (0,00-0,00)	0,50 (0,00-1,82)	25,1 (9,37-32,04) ^a

Dados são expressos como medianas (variação interquartil)

^a Diferente de todas as outras camadas $p < 0,01$

^b Diferente das camadas epitelial e camada interna $p < 0,0001$

^c Diferente da camada epitelial e do parênquima alveolar $p = 0,0003$

^d Diferente da camada externa e do parênquima alveolar $p < 0,001$

^e Diferente da camada epitelial $p = 0,0017$

4.1.4. Correlações

- Houve correlação positiva entre a idade e o número de células Granzima B+ na camada epitelial brônquica ($r = 0,65$; $p = 0,042$) e no parênquima alveolar ($r = 0,77$; $p = 0,009$).
- Houve correlação negativa entre a idade e as células CD56+ na camada epitelial brônquica ($r = -0,75$; $p = 0,012$).

- Houve correlação negativa entre os linfócitos B CD20+ e as células CD56+ na camada epitelial brônquica ($r = -0,068$; $p = 0,03$) e na região do parênquima alveolar ($r = 0,087$; $p = 0,01$).
- Os linfócitos B CD20+ e as células Granzima B+ correlacionaram-se positivamente ($r = 0,81$; $p = 0,004$).
- As células NK CD56+ e as células Granzima B+ correlacionaram-se negativamente na camada epitelial brônquica ($r = -0,73$; $p = 0,016$).

O pequeno número de casos não permitiu correlacionarmos de maneira confiável sexo ou origem dos lactentes e o fenótipo das células imunológicas nos pulmões.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, nós apresentamos o fenótipo das diferentes células do sistema imune (CD1a, CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, CD56, mastócitos, granzima B e *DC-Sign*) em lactentes autopsiados sem doença pulmonar. Há poucos estudos sobre este assunto e os dados que temos são provenientes de análises de lavado broncoalveolar (LBA). (13)

Evidências indicam que o pulmão não consegue montar uma resposta inflamatória no estágio intra-uterino. (15) Células imunes não são visualizadas histologicamente nas vias aéreas de natimortos (idade gestacional de 20-40 semanas) ou no fluido de lavado broncoalveolar de crianças bem prematuras. No entanto, há evidências de que a “colonização” por células inflamatórias ocorra rapidamente após o nascimento. (16) Grigg et al. relataram que nos lactentes os macrófagos são as células mais numerosas do sistema imune no lavado alveolar quando comparados a crianças com mais de dois anos. (17) Estudos mostram que parece haver um aumento no número de linfócitos no lavado broncoalveolar até os dois anos de idade, mas que não há mudança deste número depois dos três anos. (16)

Os macrófagos alveolares estão ausentes ao nascer, mas são rapidamente recrutados para os espaços alveolares e podem ser observados histologicamente nas primeiras 48 horas de vida. (18). A proporção de macrófagos nos lactentes é bem maior quando comparados com fluido de LBA de crianças mais velhas. Contudo, Grigg et al. mostraram que os macrófagos alveolares de lactentes não são totalmente funcionais,

pois foram menos eficazes na capacidade de reduzir “*nitro blue tetrazolium*” e liberaram menos citocinas em cultura celular quando estimulados com lipopolissacarídeos. (16)

Os recém-nascidos têm menor produção de interferons ou de outras citocinas pró-inflamatórias, uma resposta inadequada de macrófagos quando estes são estimulados com interferon-gama e respostas inadequadas de monócitos e macrófagos neonatais para vários ligantes de receptores tipo-*toll* (19) Contudo já foi sugerido que fetos humanos estão aptos a montar uma resposta com células T CD8+ semelhantes aos adultos. (20) Células T CD8+ provenientes de recém-nascidos podem exibir resposta citotóxica contra citomegalovírus humano (CMV) (21) e também contra vírus sincicial respiratório (VSR). (22) Por outro lado lactentes tem menor capacidade de memória imunológica para gerar resposta contra antígenos através das células T CD4+. As células T CD4+ existentes ao nascer são deficientes na sinalização celular, pois esta requer altos níveis de co-estimulação para atingir uma máxima ativação. Sabe-se que as células T CD4+ desempenham um papel essencial na ativação e diferenciação terminal das células T CD8+ e na reativação de células CD8+ de memória. (23) Da mesma forma, ainda não ficou claro se a imaturidade funcional das células B em lactentes é uma propriedade intrínseca destas células ou se é uma imaturidade secundária devido à deficiência das células T-Helper ou se ambos. (11) Traços genéticos, ambientais e/ou insultos infecciosos que alterariam o balanço CD8/CD4 na fase inicial da vida, provavelmente estão relacionados com o desenvolvimento de asma na infância.

Nosso grupo mostrou anteriormente, que no pulmão de crianças com mais de 2 anos (mediana da idade 5,3 anos) e que morreram por causas não relacionadas ao pulmão, as células T CD8+ predominaram em relação às células T CD4+ nas vias aéreas, corroborando os que vimos neste estudo. (24)

Observamos neste estudo que na camada epitelial (e na região dos alvéolos para a Granzima B+), houve uma forte correlação positiva entre densidade de células Granzima B+ e idade, como também, interessante, uma correlação negativa com células CD56+. Estes resultados sugerem que há uma mudança nas células efetoras *natural killer* na imunidade inata para células efetoras CD8/ Granzima B+ na imunidade adaptativa. Esta relação parece envolver as células B, pois foi encontrada uma correlação similar entre Granzima B+ e CD56+ e células B CD20+. Há pouca informação sobre o fenótipo das células CD56+ no pulmão de lactentes. Estudos em cordão umbilical sugerem que existe um padrão fenotípico heterogêneo das células *natural killer*, porque há algumas populações de linfócitos T que expressam em sua superfície baixos níveis de células como as Granzima B+ e perforinas, o que poderia explicar a susceptibilidade de alguns recém-nascidos contraírem infecções. (8)

Smith-Norowitz et al compararam o fenótipo de linfócitos no sangue de duas crianças ao nascer e depois com 7 meses de idade e que possuíam histórico familiar de alergia. Eles mostraram que os níveis de CD4 aumentaram e os de CD56 decresceram nas crianças quando atingiram 7 meses de idade. (25)

Um estudo em ratos mostrou que tanto na mucosa quanto no tecido conjuntivo os níveis de mastócitos estão aumentados no período perinatal atingindo níveis similares aos adultos na época do desmame. (26) Dada a importância destas células nas doenças alérgicas respiratórias e também seu papel de defesa na imunidade inata, os estudos sobre o recrutamento de mastócitos e a sua diferenciação na criança parecem ser de vital importância para entender o desenvolvimento da asma.

Há poucos dados sobre a distribuição de células dendríticas no pulmão de crianças. A lectina tipo C *DC-SIGN* desempenha um importante papel na indução das respostas imunes contra patógenos, através da modulação induzida pela ativação de Toll-like. (27) Nós encontramos poucas células *DC-SIGN* no pulmão dos lactentes e as raras células presentes estavam localizadas no espaço perivascular e não na via aérea, reforçando a idéia de que o espaço perivascular pode ser o sítio para reações imunológicas nos pulmões. (28) Células de Langerhans são uma subclasse das células dendríticas (DC), que expressam CD1a, tem grânulos Birbeck e são importantes acessórios celulares na apresentação de antígenos e maturação das células T. Nos pulmões dos adultos elas são associadas ao epitélio das vias aéreas. (29) As células CD1a foram encontradas com mais frequência que as *DC-SIGN+* nos pulmões das crianças deste estudo, porém com muito mais frequência na camada externa da via aérea e não no epitélio.

Nossos dados são similares aos observados em traquéia de recém-nascidos, onde Tschernig et al já haviam mostrado que as células

dendríticas são quase ausentes na mucosa da traquéia de crianças menores de 1 ano. (30) Nelson et al. também mostraram que ratos jovens apresentaram números muito baixos de células dendríticas, atingindo no desmame valores equivalentes aos dos adultos. Além disso, estas células apresentaram deficiências de maturação pós-natal quando comparado com a função das células B e T. (31) É possível que a baixa densidade de células dendríticas no epitélio também contribua para o aumento da susceptibilidade às infecções nos lactentes.

Heier et al. usando biópsias brônquicas em crianças com menos de 2 anos e com sintomas de doença crônica nas vias aéreas, mostraram que há uma ótima rede de células apresentadoras de antígenos HLA-DR+ (complexo principal de histocompatibilidade) nas vias aéreas. Isto demonstra que as crianças conseguem ter resposta imunológica recrutando células dendríticas e macrófagos no começo da vida. (32) No entanto, estudos funcionais são necessários para compreender melhor a maturação e o tráfico de células dendríticas nas crianças lactentes.

Nossos dados mostram que há uma compartimentalização das células do sistema imunológico ao longo da via aérea e do parênquima que pode estar relacionada com o desenvolvimento da imunidade inata e adquirida nos mecanismos da defesa imunológica. Nosso estudo pode contribuir para entender os mecanismos da imunocompetência dos pulmões no período pós-natal, mecanismos estes tão complexos e ainda muito pouco desvendados.

5.1. Limitações do estudo

Este estudo possui algumas importantes limitações:

- Nós analisamos um número pequeno de casos, que limitou as análises de variáveis como a influência do sexo e o meio-ambiente, nas células do sistema imunológico.
 - Apesar dos pulmões analisados serem histologicamente normais, algumas das crianças estudadas tinham patologias de base e não se sabe o quanto isto poderia influenciar nos nossos resultados.
 - Não temos a história do passado destas crianças, a fim de conhecermos as exposições ao meio-ambiente e a infecções virais, que certamente podem influenciar o fenótipo inflamatório.
 - Material de autópsia tem limitações bem conhecidas, porém esta é uma das poucas possibilidades de se conseguir quantidade significativa de tecido pulmonar de crianças. Por motivos eticamente conhecidos, é difícil de se conseguir tecido pulmonar histologicamente normal de crianças. Propositamente não inserimos neste trabalho casos de crianças com Síndrome da Morte Súbita no Berço, porque alterações imunológicas podem estar relacionadas com a patogênese desta síndrome.
 - É possível que a distribuição das células variasse de acordo com o tamanho/gerações da via aérea. Todas as quantificações foram realizadas em vias aéreas menores de 2 mm de diâmetro, mesmo assim não pudemos estimar as gerações da via aérea (proximal
-

versus distal) em cada caso estudado, pois este estudo tem natureza retrospectiva. Até onde sabemos, ao contrário dos adultos, o mapeamento de tamanho das vias aéreas não foi realizado em as crianças. (33)

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- Há uma distribuição desigual das diferentes células nos compartimentos pulmonares. Os lactentes apresentaram escassas células T CD4+ nos pulmões. As células T CD8+ predominaram em relação às células T CD4+ na maioria dos compartimentos pulmonares estudados. A camada externa da via aérea e o parênquima alveolar foram os compartimentos que tiveram maior densidade celular de todas as células estudadas.
 - A distribuição de células T CD3+ e B CD20+ foi maior na camada externa e parênquima e a densidade de ambas foi similar nas camadas estudadas.
 - As células CD56+ e Granzima B+, que possuem capacidade citotóxica, predominaram em pontos estratégicos do epitélio da via aérea e ao longo da parede do parênquima alveolar.
 - Não foram encontradas células dendríticas CD1a+ no epitélio brônquico dos lactentes quando presentes elas estavam localizadas principalmente na camada externa.
 - Como esperado, os macrófagos alveolares (CD68+) foram as células do sistema imune que apresentaram maior densidade na região do parênquima alveolar.
-

- Os mastócitos tiveram maior densidade na camada externa da via aérea.
 - Houve uma correlação positiva entre Granzima B e a idade dos lactentes.
 - Houve uma correlação negativa entre Granzima B e CD 56.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK e Lichtman HA. *Cellular and Molecular Immunology*. 5rd Ed., updated. Philadelphia, USA: Elsevier. 2005; p.10-40.
 2. Gleeson M, Cripps AW. Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004; 42: 21-33.
 3. Murphy S e Florman AL. Lung defenses against infection: a clinical correlation. *Pediatrics*. 1983; 72: 1-15.
 4. Holt PG. Functionally mature virus-specific CD8+T memory cells in congenitally infected newborns: proof of principle for neonatal vaccination? *J Clin Invest*. 2003; 111: 1645-7.
 5. Nowacki TM, Kuerten S, Zhang W, Shive CL, Kreher CR, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Granzyme B production distinguishes recently activated CD8+ memory cells from resting memory cells. *Cellular Immunology*. 2007; 247: 36-48.
 6. Bart N, Lambrecht and Hamida Hammad. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*. 2009; 31: 412-24.
 7. Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, Gerard C. F. van Duijnhoven GCF, Adema GJ, Kooyk Y, and Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000; 100: 575-85.
 8. Sundstrom Y, Nilsson C, Lilja G, Karre K, Troye-Blomberg M and Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; 66: 335-44.
 9. Fan YY, Yang BY, Wu CY. Phenotypic and functional heterogeneity of natural killer cells from umbilical cord blood mononuclear cells. *Immunol Invest*. 2008; 37: 79-96.
 10. Warner JA e Kroegel C. Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. *Eur Respir J*. 1994; 7: 1326-41.
 11. Holt PG. Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood. *Pediatr Allergy and Immunol*. 1995; 6: 59-70.
-

12. Ratjen F, Bredendiek M, Zheng L, et al. Lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152: 174-8.
 13. Midulla F, Villani A, Merolla R, et al. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol*. 1995; 20: 112-8.
 14. Saetta M, Stefano di A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp EC, Maestrelli P, Ciaccia A and Fabbri LM. CD8 T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 822-26.
 15. Kallapur S, Ikegami M. Physiological consequences of intrauterine insults. *Paediatr Respir Rev*. 2006; 7: 110-6.
 16. Grigg J, Riedler J. Developmental airway cell biology. The normal young child. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: S52-5.
 17. Grigg J, Riedler J, Robertson CF, et al. Alveolar macrophage immaturity in infants and young children. *Eur Respir J*. 1999; 14: 1198-205.
 18. Alenghat E, Esterly JR. Alveolar macrophages in perinatal infants. *Pediatrics*. 1984; 74: 221-3.
 19. Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol*. 2006; 118: 137-44.
 20. Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, et al. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood*. 2002; 100: 2153-8.
 21. Marchant A, Appay V, Van Der Sande M, et al. Mature CD8+T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1747-55.
 22. Mbawuike IN, Wells J, Byrd R, et al. HLA-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte, interferon-gamma, and interleukin-4 responses to respiratory syncytial virus infection in infants and children. *J Infect Dis*. 2001; 183: 687-96.
 23. Holt PG. Functionally mature virus-specific CD8+Tmemory cells in congenitally infected newborns: proof of principle for neonatal vaccination? *J. Clin. Invest*. 2003; 111: 1645-47.
-

24. Mauad T, van Schadewijk A, Schrumpf J, et al. Lymphocytic inflammation in childhood bronchiolitis obliterans. *Pediatr Pulmonol*. 2004; 38: 233-39.
 25. Smith-Norowitz TA, Norowitz KB, Silverberg JI, et al. CD8+CD60+ T cells, cells expressing epsilon specific mRNA and Th1/Th2 cytokines in cord blood and at 7 months of age. *Scand J Immunol*. 2008; 68: 526-33.
 26. Wilkes LK, Mcmenamin C, Holt PG. Postnatal maturation of mast cell subpopulations in the rat respiratory tract. *Immunology*. 1992; 75: 535-41.
 27. den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling by the C-type lectin DC-Sign dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58: 1149-57.
 28. Tschernig T, Janardhan KS, Pabst R, Singh B. Lipopolysaccharide induced inflammation in the perivascular space in lungs. *J Occup Med Toxicol*. 2008; 3:17.
 29. Hance AJ. Pulmonary immune cells in health and disease: dendritic cells and Langerhans' cells. *Eur Respir J*. 1993; 6: 1213-20.
 30. T Tschernig, V C de Vries, A S Debertin, A Braun, T Walles, F Traub and R Pabst. Density of dendritic cells in the human tracheal mucosa is age dependent and site specific. *Thorax* 2006; 61: 986-91.
 31. DJ Nelson and PG Holt. Defective regional immunity in the respiratory tract of neonates is attributable to hyporesponsiveness of local dendritic cells to activation signals. *J. Immunol*. 1995;155: 3517-24
 32. Heier I, Malmström K, Pelkonen AS, et al. Bronchial response pattern of antigen presenting cells and regulatory T cells in children less than 2 years of age. *Thorax*. 2008; 63: 703-9.
 33. Weibel ER, Taylor CR. Functional design of the human lung for gas exchange. In: Fishman AP, Elias JA, Grippi MA, et al. Fishman's *Pulmonary diseases and disorders*. 3rd Ed. New York, USA: McGraw-Hill. 1998; 21-61.
-

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 4 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada interna.
Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (cel/mm MB)

Caso	Idade (meses)	CD3	CD20	CD4	CD8	Granz B	CD56	Mast	CD68	CD1a
1 ^a	0,03 (1 day)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2 ^a	0,17 (5 days)	0,00	0,37	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3 ^b	1	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	0,26	0,68	0,00	0,00
4 ^b	1	0,13	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5 ^a	2	0,00	0,42	0,00	0,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6 ^b	3	0,00	0,15	0,00	0,16	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00
7 ^b	3	0,61	0,54	0,00	0,75	0,34	0,00	0,00	0,03	0,00
8 ^b	14	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9 ^b	14	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00
10 ^a	24	0,32	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00

^a Lactentes autopsiados em São Paulo, Brasil

^b Lactentes autopsiados em Hannover, Alemanha

Tabela 5 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada epitelial.
Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (cel/mm MB)

Caso	Idade (meses)	CD3	CD20	CD4	CD8	Granz B	CD56	Mast	CD68	CD1a
1 ^a	0,03 (1 day)	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	2,48	0,00	0,00	0,00
2 ^a	0,17 (5 days)	0,00	0,35	0,00	0,16	0,00	1,81	0,00	0,00	0,00
3 ^b	1	0,00	0,00	0,00	1,14	0,00	0,75	0,00	1,73	0,00
4 ^b	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,95	0,00	0,86	0,00
5 ^a	2	1,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00	0,00	0,00
6 ^b	3	0,37	0,00	0,00	4,80	1,10	1,58	0,00	0,00	0,00
7 ^b	3	0,00	3,72	0,00	0,48	5,44	0,26	0,00	0,58	0,00
8 ^b	14	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00
9 ^b	14	0,00	0,84	0,00	0,00	3,94	0,00	0,00	0,91	0,00
10 ^a	24	0,00	0,37	0,00	0,73	2,58	0,51	0,00	0,00	0,00

^a Lactentes autopsiados em São Paulo, Brasil

^b Lactentes autopsiados em Hannover, Alemanha

Tabela 6 - Densidade dos diferentes tipos celulares na camada externa.
Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (cel/mm MB)

Caso	Idade (meses)	CD3	CD20	CD4	CD8	Granz B	CD56	Mast	CD68	CD1a
1 ^a	0,03 (1 day)	2,31	2,12	0,40	5,41	0,00	0,66	0,58	2,05	1,24
2 ^a	0,17 (5 days)	2,81	0,35	0,18	1,08	0,00	0,00	0,37	1,34	0,00
3 ^b	1	7,77	0,48	0,00	8,33	0,00	0,00	1,36	0,00	7,44
4 ^b	1	6,34	3,00	0,00	0,28	0,00	0,41	1,09	0,19	7,97
5 ^a	2	0,26	1,37	0,00	9,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6 ^b	3	6,00	3,23	0,14	0,54	0,28	0,26	4,89	0,00	2,01
7 ^b	3	9,65	3,72	0,24	6,06	0,34	0,33	1,60	1,75	2,20
8 ^b	14	2,81	17,71	2,20	7,06	0,00	4,78	0,00	0,00	1,65
9 ^b	14	11,02	0,84	0,00	1,12	0,00	0,00	7,62	2,72	0,00
10 ^a	24	16,48	0,37	0,00	0,35	0,52	0,72	0,00	0,80	1,04

^a Lactentes autopsiados em São Paulo, Brasil

^b Lactentes autopsiados em Hannover, Alemanha

Tabela 7 - Densidade dos diferentes tipos celulares nos septos alveolares.
Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (cel/mm MB)

Caso	Idade (meses)	CD3	CD20	CD4	CD8	Granz B	CD56	Mast	CD68	CD1a
1 ^a	0,03 (1 day)	9,13	16,92	3,47	2,67	3,27	0,00	0,00	30,26	0,00
2 ^a	0,17 (5 days)	1,21	4,95	0,00	4,11	1,83	0,16	0,00	12,40	0,00
3 ^b	1	4,75	0,31	0,00	0,47	1,34	2,09	0,00	1,51	0,00
4 ^b	1	2,22	4,36	0,00	5,78	3,03	1,34	2,65	4,94	0,00
5 ^a	2	2,26	5,94	0,00	1,36	0,41	0,60	5,54	37,36	1,10
6 ^b	3	0,78	1,21	1,12	2,23	5,36	4,99	0,00	10,85	0,00
7 ^b	3	5,38	4,62	0,00	2,95	4,29	1,89	0,00	27,71	0,00
8 ^b	14	7,51	1,44	6,27	3,24	10,24	14,12	0,00	37,36	0,00
9 ^b	14	3,58	4,83	0,00	2,01	15,59	1,66	2,29	22,46	0,00
10 ^a	24	3,89	1,59	0,00	2,67	6,27	3,26	0,00	27,70	0,00

^a Lactentes autopsiados em São Paulo, Brasil

^b Lactentes autopsiados em Hannover, Alemanha