UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

WAGNER MONEDA TELINI

Perfil das células dendríticas pulmonares como potencial biomarcador de pneumonite de hipersensibilidade

ESTUDO TRANSLACIONAL E MULTIDISCIPLINAR

Ribeirão Preto 2021

WAGNER MONEDA TELINI

Perfil das células dendríticas pulmonares como potencial biomarcador de pneumonite de hipersensibilidade

ESTUDO TRANSLACIONAL E MULTIDISCIPLINAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientador: Prof Dr Alexandre Todorovic

Fabro

Ribeirão Preto 2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Telini, Wagner Moneda

Perfil das células dendríticas pulmonares como potencial biomarcador de pneumonite de hipersensibilidade: Estudo Translacional e Multidisciplinar. Ribeirão Preto, 2021.

86 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia. Orientador: Fabro, Alexandre Todorovic.

1. pneumonite de hipersensibilidade; 2. célula dendrítica; 3. doença pulmonar intersticial; 4. fibrose. 5. imuno-histoquímica; 6. tomografia computadorizada do tórax; 7. função pulmonar; 8. biopsia pulmonar cirúrgica; 9. sobrevida.

Nome: TELINI, Wagner Moneda

Título: Perfil das células dendríticas pulmonares como potencial biomarcador de pneumonite de hipersensibilidade: Estudo Translacional e Multidisciplinar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:
Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:
Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Pulmonar do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Auxilio Pesquisa N°2019/01517-3); e da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Proc. N°1988/2019).

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos pacientes com pneumonite de hipersensibilidade, doença cujo tratamento ainda é limitado por lacunas de conhecimento sobre a sua evolução natural, da genética à epidemiologia, curiosamente, com fatores de risco e vulnerabilidade que não se restringem a qualquer classe social. Espero que os resultados desta pesquisa sejam substrato para melhoramento do plano terapêutico para este agravo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Helena e Renato, pelo alicerce familiar, sólido, sempre suprido de bons exemplos, sem os quais não seria possível construir caráter e desenvolvimento profissional.

À minha esposa, Lidiane, pela motivação que me encorajou a perseverar na carreira docente e retomar as atividades de pós-graduação.

Às minhas filhas, Isadora e Heloísa, por tanto afago e, também, abnegação, nos momentos em que emprestaram os braços do pai para a carreira profissional dele que exige, muitas vezes, madrugadas afora.

A toda minha família, em especial, aos afilhados, na hierarquia cronológica, Leandra, Alice, Gabriel e Augusto, presentes da vida.

Aos colegas de pesquisa que o Departamento de Patologia me apresentou, Jamile, Caio, Maira, Matheus e, especialmente, Sabrina Batah, pois, sem a sua ajuda com as técnicas de pesquisa, além da sua tutoria, com admirável didática e altruísmo, eu não teria avançado em minhas questões de aprendizagem e pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Fabro. Querido amigo, muito obrigado pela parceria que vem desde os bancos da faculdade, pois fomos, inicialmente, colegas de turma! Hoje, eu tenho imensa sorte de poder chamá-lo mentor e contar com seus ensinamentos participando da sua exitosa linha de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, que prontamente aceitaram o convite de participar da defesa da minha tese de doutorado.

À USP, principalmente aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP, com especial menção à secretaria da seção de pós-graduação, Camila, pelo suporte, sempre tão rápido e resolutivo.

Aos Professores da FMRP/USP, especialmente Prof. Dr. Marcel Santos, Prof. Dr. Marcelo Menezes e Prof.^a Dra. Andrea Cetlin, pela incondicional partilha de conhecimento e a oportunidade de consultoria durante a elaboração do protocolo de coleta de dados, metodologia e análise dos resultados de pesquisa.

Aos participantes da pesquisa, sem os quais a ciência não teria sentido e jamais seria factível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

EPÍGRAFE

"O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano."

Isaac Newton

RESUMO

RESUMO

TELINI, WM. "Perfil das células dendríticas pulmonares como potencial biomarcador de pneumonite de hipersensibilidade: Estudo Translacional e Multidisciplinar." Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2021.

A pneumonite de hipersensibilidade é prevalente entre as doenças pulmonares intersticiais sendo desencadeada por reações de hipersensibilidade dos tipos III e IV em resposta à inalação de agentes ambientais diversos, com a formação de granulomas e, por vezes, fibrose pulmonar. Padrões específicos de resposta linfocitária estão relacionados às formas crônicas da doença e acredita-se haver relação da sua evolução com o perfil de imunoexpressão das células dendríticas do tecido respiratório, sua interação com outras células apresentadoras de antígenos e, por fim, sua influência na diferenciação e expressão das linhagens linfocitárias envolvidas com as reações de hipersensibilidade. Através de imunohistoquímica e técnicas translacionais, esta pesquisa evidenciou fenótipos de expressão imunológica das células dendríticas epiteliais e intersticiais pulmonares na pneumonite de hipersensibilidade correlacionando-os com o microambiente inflamatório desta doença pulmonar intersticial, seus padrões histopatológicos, radiológicos, funcionais e formas clínicas. Por fim, padrões de expressão imunofenotípica das células dendríticas foram correlacionados com a sobrevida dos participantes da pesquisa com pneumonite de hipersensibilidade e controles.

Palavras chave: pneumonite de hipersensibilidade, célula dendrítica, doença pulmonar intersticial, fibrose, imunohistoquímica, tomografia computadorizada do tórax, função pulmonar, biopsia pulmonar cirúrgica, sobrevida.

ABSTRACT

TELINI, WM. "Lung Dendritic Cell Profile as a Potential Biomarker of Hypersensitivity Pneumonitis: Translational and Multidisciplinary Study". Ribeirão Preto: Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; 2021.

Hypersensitivity pneumonitis is prevalent among interstitial lung diseases and is triggered by type III and IV hypersensitivity reactions in response to the inhalation of various environmental agents, with the formation of granulomas and, sometimes, pulmonary fibrosis. Specific patterns of lymphocyte response are related to chronic forms of the disease and its evolution is believed to be related to the immunoexpression profile of dendritic cells of the respiratory tissue, its interaction with other antigen-presenting cells and, finally, its influence on differentiation and expression of lymphocytic lineages involved hypersensitivity reactions. Through immunohistochemistry and translational techniques, this research proposes immunological expression phenotypes of epithelial and interstitial lung dendritic cells in hypersensitivity pneumonitis, correlating them with the inflammatory microenvironment of this interstitial lung disease, its histopathological, radiological, functional patterns and clinical presentations. Finally, immunophenotypic expression patterns of dendritic cells are correlated with the survival of research participants with hypersensitivity pneumonitis and controls.

Keywords: hypersensitivity pneumonitis, dendritic cell, interstitial lung disease, fibrosis, immunohistochemistry, chest computed tomography, lung function, surgical lung biopsy, survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 A reação de hipersensibilidade Tipo I.
- Figura 2 APC e linfócitos T como ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa.
- Figura 3 As reações de hipersensibilidade dos tipos III e IV.
- Figura 4 Maturação, migração e diferenciação das DC do aparelho respiratório.
- Figura 5 Biopsia da forma fibrosante da PH.
- Figura 6 Respostas linfocitárias adaptativas à apresentação antigênica.
- Figura 7 Resumo esquemático do desenho do projeto.
- Figura 8 Histomorfometria com reconstrução por técnica digital.
- Figura 9 Heatmaps dos achados clínicos, radiológicos e histomorfológicos relacionados à DPIs.
- Figura 10 Painel de IHC confirmando a identificação das linhagens de DC em meio ao microambiente inflamatório da PH.
- Figura 11 Perfil de expressão imunofenotípica das células dendríticas.
- Figura 12 Heatmaps dos achados imunohistoquímicos e histomorfológicos relacionados à DPIs.
- Figura 13 Sobrevida correlacionada à intensidade de expressão das linhagens de DC.
- Figura 14 Sobrevida correlacionada à intensidade de expressão das linhagens de DC dependente da etiologia.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Critérios diagnósticos tomográficos para PH fibrosante.
- Tabela 2 Valores preditos de DLCO.
- Tabela 3 Padronização dos anticorpos para a IHC.
- Tabela 4 Dados demográficos dos participantes do estudo e correlação estatística entre os grupos.
- Tabela 5 Dados clínicos conforme o diagnóstico da DPI.
- Tabela 6 Evolução da prova de função pulmonar.
- Tabela 7 Padrões de fibrose identificáveis à tomografia de tórax e achados radiológicos.
- Tabela 8 Achados histomorfológicos encontrados em DPI com fibrose centrada nas vias aéreas.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Faixas etárias dos pacientes com DPI.
- Gráfico 2 Idade dos pacientes com DPI conforme Etiologia.
- Gráfico 3 IMC dos pacientes conforme DPI
- Gráfico 4 Perfil de exposição a poeiras orgânicas ambientais por grupo de DPI.
- Gráfico 5 Visão detalhada do hábito tabágico dentre os participantes do estudo separados por grupos e correlação estatística.
- Gráfico 6 Variáveis atribuídas à investigação da dispepsia em cada grupo.
- Gráfico 7 Celularidade do LBA em cada grupo.
- Gráfico 8 Padrões de fibrose à análise histopatológica da DPI.
- Quadro 1 Preparo das lâminas histológicas para a técnica de IHC.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALAT: Latin American Thoracic Society;

AREG: anfiregulina semelhante a EGF;

ASP: pneumonite intersticial secundária à aspiração crônica de conteúdo gástrico;

ASP: Pneumonite secundária a aspiração crônica de conteúdo gastrico;

ATP: trifosfato de adenosina;

ATS: American Thoracic Society;

BDCA: células dendríticas residentes;

C3: complemento tipo 3;

C3a: complemento tipo 3 ativado;

C3aR: recepetor de complemento tipo 3 ativado;

CCL: quimiocinas ou eotaxinas;

CCLR: receptores de quimiocinas ou eotaxinas;

CD: integrinas de membrana celular;

cDC: células dendríticas convencionais ou clássicas;

CLR: receptores tipo C de lecitina;

COL: doença pulmonar intersticial relacionada a colagenoses;

CPT: Capacidade pulmonar total;

DAD: Dano alveolar difuso;

DAMP: padrões moleculares associados ao dano tecidual;

DC: células dendríticas;

DLCO: Difusão pulmonar para o monóxido de carbono;

DPI: doença pulmonar intersticial;

DPI: Doença pulmonar intersticial;

DRGE: doença do refluxo gastroesofágico;

EGF: fator estimulante do crescimento;

ERS: European Respiratory Society;

FEPP - Fibroelastose pleuroparenquimatosa;

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;

FPI: Fibrose pulmonar idiopática;

Hb: nível de hemoglobina;

HCFMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;

IFN-γ: interferon-gama;

IHC: imuno-histoquímica;

IL: interleucinas;

ILC-2: células linfóides inatas do grupo 2;

IMC: índice de massa corporal;

JRS: Japanese Respiratory Society;

LBA: lavado Broncoalveolar;

LT: leucotrienos;

LTCD17+: linfócitos linhagem T com fenótipo CD8;

LTCD4+: linfócitos linhagem T com fenótipo CD4;

LTCD8+: linfócitos linhagem T com fenótipo CD8;

MHC: Complexo de histocompatibilidade;

MoDC: células dendríticas derivadas de monócitos;

PAMP: padrões moleculares específicos associados a patógenos;

pDC: células dendríticas plasmocitóides;

PH: pneumonite de hipersensibilidade;

PH: Pneumonite de hipersensibilidade;

PIB: Pneumonite interstitial bronquiolocêntrica;

PID: Pneumonia intersticial descamativa;

PIL: Pneumonia intersticial linfocítica;

PINE: Pneumonia intersticial não específica;

PIU: Pneumonia intersticial usual;

PO: Pneumonia em organização criptogênica;

PO: pneumonia organizante;

PSMB: processadores do complexo ubiquitina-proteossoma;

SERPAT: Serviço de Patologia

TAP: proteínas transportadoras de antígenos;

TCAR: Tomografia computadorizada de alta resolução;

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

TGF-β: Fator de transformação do crescimento beta;

Th: perfil de diferenciação ou estimulação de LTCD4+;

TLR: receptores do tipo toll-like;

TNFα/iNOS: células dendríticas inflamatórias;

TNFα: fator alfa de necrose tumoral;

USP: Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1. As reações de hipersensibilidade determinantes das doenças respiratórias	20
1.2. As células dendríticas e a hipersensibilidade	24
1.3. Pneumonite de hipersensibilidade, uma doença pulmonar parenquimatosa difusa	27
1.4. A forma fibrosante da pneumonite de hipersensibilidade	31
1.5. O papel das células dendríticas nas formas fibrosantes da pneumonite de hipersensibilidade	33
1.6 A questão de pesquisa	34
2. Hipótese de Trabalho	34
3. Objetivos	
3.1. Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. Pacientes e Métodos	
4.1 Apreciação ética	37
4.2 Participantes e desenho de estudo	37
4.2.1 Revisão de dados clínicos e radiológicos	38
4.2.2 Revisão de exames de função pulmonar	39
4.2.3 Revisão de dados do lavado broncoalveolar	41
4.2.4 Análise imunohistoquímica	42
4.2.5 Análise histomorfométrica	46
4.3 Análise estatística	46
5. Resultados	
5.1. Características demográficas e dados clínicos	
5.1.1. Idade	48
5.1.2. Sexo e etnia	49
5.1.3. Evolução clínica	50
5.1.4. Exposição à poeira orgânica	52
5.1.5. Tabagismo	53
5.1.6. Dispepsia	54
5.1.7. Função pulmonar	55
5.2. Lavado broncoalveolar	56
5.3. Tomografia computadorizada	57
5.4. Histopatologia	58
5.5. Imunohistoquímica	62
5.6. Análise de sobrevida	67
6. Discussão	71
7. Conclusão	79
8. Perspectivas futuras	80
9. Bibliografia	81
10. Anexo	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. As reações de hipersensibilidade determinantes das doenças respiratórias

Os modelos propostos para as reações de hipersensibilidade têm sido revisitados desde a sua apresentação, em 1963, por Gell e Coombs(1). Com o reconhecimento de novas células e vias de sinalização, as reações de hipersensibilidade mostram-se cada vez mais complexas e relevantes para a composição do microambiente inflamatório determinante de muitas das doenças, com especial atenção, nesta revisão, para aquelas que afetam o aparelho respiratório.

O conhecimento acerca das doenças respiratórias provocadas pela hipersensibilidade desenvolveu-se inicialmente pela asma, doenca das vias aéreas inferiores. Tanto a evolução crônica quanto as exacerbações desta doença dependem da reação de hipersensibilidade Tipo I de Gell e Coombs desencadeada contra partículas ambientais(2). Epítopos de antígenos inalados fazem ligação cruzada com moléculas de imunoglobulina IgE aderidas a receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos presentes na mucosa respiratório(3, 4). Em modelos de resposta sistêmica de do trato hipersensibilidade deste tipo, a ativação mastocitária mediada por IgE mostrouse capaz de liberar rapidamente histamina; fator de necrose tumoral (TNFα); fator ativador plaguetário; leucotrienos (LTC4, LTD4, LTE4); prostaglandinas e proteases (triptase, quimase). Estes mediadores provocam alteração endotelial com aumento da permeabilidade vascular e edema da mucosa. Também ocorre atividade secretora glandular e espasmo da musculatura lisa(5). Na asma, doença centrada na mucosa e musculatura das vias aéreas, estes fenômenos resultam em inflamação crônica dos brônquios e obstrução da sua luz que oferece resistência ao fluxo aéreo.

Esta via clássica da reação Tipo I depende da síntese prévia de IgE por linfócitos B, além do recrutamento dos mastócitos para o tecido exposto ao antígeno indutor da hipersensibilidade. A rede de interação celular faz parte da resposta imune adaptativa mediada por interleucinas (IL) diversas. Uma delas é

a IL-4 secretada por linfócitos T CD4+ quando respondem com padrão de diferenciação Th2(6). Também vale destacar a secreção de IL-5 capaz de promover reação inflamatória eosinofílica como pano de fundo, algo comum à grande parte dos pacientes com asma. Para que os linfócitos T CD4+ manifestem o imunofenótipo Th2, eles devem ser sensibilizados, anteriormente, por células apresentadoras de antígenos no epitélio das vias aéreas inferiores(7). Ao entrarem em contato com o epítopo proveniente do antígeno inalatório, estas células são capazes de processá-lo e apresentá-lo aos linfocitos T CD4+ através do complexo MHC II promovendo aquele perfil de diferenciação(8) conforme demonstrado na Figura 1.

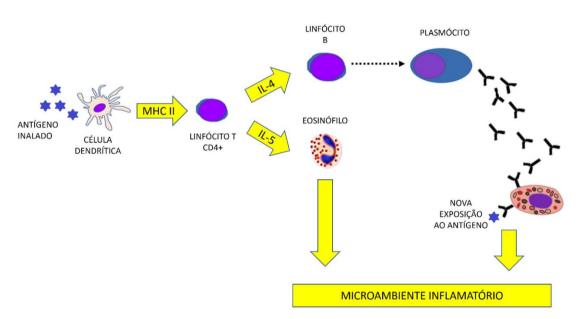


Figura 1 – A reação de hipersensibilidade Tipo I. DC reconhecem antígenos e apresentam através de MHC II para LTCD+ cuja diferenciação no perfil Th2 estimula a ação inflamatória de eosinófilos, assim como a diferenciação linfoplasmocitária que resultará na ativação de mastócitos frente a novas exposições antigênicas futuras.

Dentre as células apresentadoras de antígenos, destacam-se as células dendríticas (DC). Elas reconhecem os epítopos através de padrões moleculares específicos associados a patógenos (PAMP) utilizando receptores *toll-like* (TLR) e *C-type lectin* (CLR) presentes em suas membranas.

Células epiteliais também são importantes nesta ação de reconhecimento, pois, assim como as DC, elas possuem TLR reconhecedores de diversos

antígenos presentes no ar inspirado em contato com a mucosa das vias aéreas(9). Estes alérgenos ligam-se a receptores TLR4 presentes na membrana das células epiteliais provocando a secreção de quimiocinas (CCL17 e CCL22) e eotaxinas (CCL24,CCL26) que recrutam as DC da cadeia linfática para o epitélio respiratório(10). As células epiteliais também secretam IL-1α, IL-33, IL-25 e linfopoetina estromal tímica (TSLP) que são responsáveis pela ativação das DC e a diferenciação dos linfócitos TCD4+ no fenótipo Th2(11-13). A figura 2 abaixo demonstra a interação destas linhagens de células apresentadoras de antígenos.

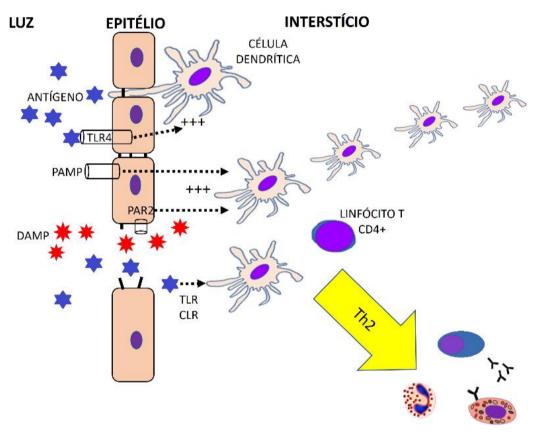


Figura 2 – APC e linfócitos T como ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa. O reconhecimento antigênico pela DC é facilitado quanto TLR4 das células epiteliais é estimulado. PAMP e DAMP oferecem via alternativa de apresentação antigênica e diferenciação linfocitária, perfil Th2.

As células epiteliais também são capazes de identificar padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMP), como as proteases, importantes no mecanismo de lesão celular e são reconhecidas através de

receptores específicos na membrana das células epiteliais, os receptores ativados por protease do tipo 2 (PAR2)(14). Os DAMP também resultam da lesão epitelial que libera ATP e ácido úrico.

Além da importância da expressão imunológica das células epiteliais para a maturação das DCs e ativação da via clássica da reação de hipersensibilidade Tipo I, os padrões de reconhecimento antigênico são capazes de deflagrar. também, via alternativa da reação de Gell e Coombs. Esta via, moderna ao conhecimento científico sobre as reações de hipersensibilidade, tem se tornado extremamente relevante conforme o conhecimento avança acerca das funções imunológicas das células epiteliais e, também, a descoberta de certas linhagens de células linfóides inatas do grupo 2, as ILC-2(15, 16). Estimuladas pelas células epiteliais mediante PAMP e DAMP, as ILC-2 são capazes de produzir imediatamente IL-5 desencadeando reação inflamatória eosinofílica. As ILC-2 IL-9. de recrutar е também secretam capaz ativar mastócitos independentemente das DC. A via patológica para as alterações endoteliais e hiperatividade glandular e muscular lisa fica, assim, instalada. Portanto, as ILC-2 oferecem, com auxílio direto das células epiteliais, mecanismo imune inato de hipersensibilidade capaz de precipitar reação alérgica rápida contra antígenos irritantes e sensibilizantes do epitélio respiratório, independentemente da existência, ou não, de memória adaptativa IgE-mediada(17).

As duas vias apresentadas para a reação de hipersensibilidade tipo I, uma mediada pelas DC, a outra resultante da ação direta das ILC-2, exercem função complementar. As ILC-2 ativadas secretam IL-13 que, dentre outras funções, permitem a migração das DC do tecido linfático até o epitélio respiratório e facilitam a ativação do seu fenótipo de reconhecimento antigênico e a estimulação linfocitária(18, 19). Por outro lado, a ativação das DC por TGF-β1 secretado por células epiteliais(20) sob estímulo antigênico e a secreção de EGF-like cytokine amphiregulin (AREG) pelas ILC2(21, 22) garantem ativação duradoura de Linfócitos B e níveis de IgE elevados, de forma sustentada, algo muito relevante para a manutenção do estado alérgico das vias aéreas(23) .

As DC também são abundantes no epitélio e interstício dos alvéolos(24) sendo determinantes na patogênese das doenças pulmonares intersticiais. As

DC alveolares processam antígenos e induzem reações de hipersensibilidade dos Tipos III e IV de Gell e Coombs (Figura 3) capazes de provocar alveolite de repetição, além de resposta inflamatória crônica e até fibrose resultando na doença do parênquima pulmonar conhecida como pneumonite de hipersensibilidade (PH)(25), foco desta revisão, a partir de agora.

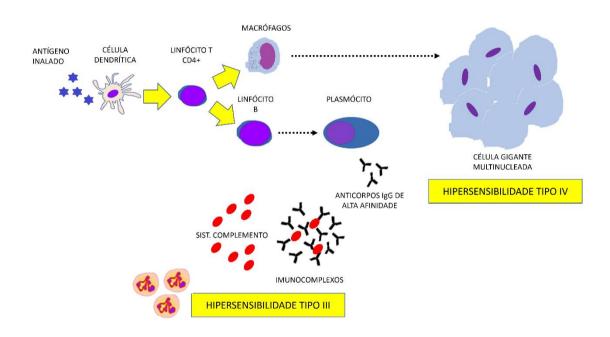


Figura 3 – As reações de hipersensibilidade dos tipos III e IV. Nota. Ao manifestaram padrão Th1, LTCD4+ estimulam Linfócitos B resultando na produção de anticorpos da classe IgG de alta afinidade e imunocomplexos que resultarão em processo reparativo crônico tecidual e fibrose. Como via alternativa, o perfil de diferenciação Th1 dos LTCD4+ induz à reação inflamatória granulomatosa. **Fonte:** Adaptado de Gell e Coombs(1)

1.2. As células dendríticas e a pneumonite de hipersensibilidade

As DC envolvidas com o estado inflamatório reconhecem e apresentam antígenos inalados sendo fundamentais tanto para as reações de hipersensibilidade como ponte entre a resposta imune inata e os sistemas imunológicos adaptativos(26-28). Por outro lado, modelos experimentais sugerem que a ativação do TLR9 e a expressão da integrina CD34+ facilitam a

passagem de DC do epitélio para o interstício do parênquima alveolar e cadeia linfática(29, 30) onde são capazes de promover a apresentação antigênica ativando linfócitos indutores das reações de hipersensibilidade dos Tipos III e IV resultando em doença pulmonar intersticial.

Em modelos experimentais, as DC são classificadas em subgrupos de acordo com a sua expressão imunofenotípica. Aquelas denominadas convencionais (cDC) encontram-se no epitélio respiratório e expressam, em suas membranas, as integrinas CD11c, CD103 e CD141. Elas apresentam antígenos através das moléculas MHC II ativando os linfócitos TCD4+(31). Com seus processos membranosos insinuando-se entre as junções intercelulares das pequenas vias aéreas até o espaço alveolar, essas cDC epiteliais criam microambiente favorável ao desenvolvimento de resposta inflamatória crônica(31). Outro subgrupo de cDC situa-se no interstício alveolar, abaixo da membrana basal epitelial. As cDC intersticiais também expressam CD11c, mas são capazes de se diferenciar do subgrupo anterior pela expressão aditiva das integrinas CD1a e CD1c(24). Na mesma topografia tecidual, encontram-se as DC plasmocitóides, com seu imunofenótipo caracterizado pela expressão de CD14 e CD16 em suas membranas celulares.

Nos seres humanos, as linhagens de DC também são capazes de expressar certas combinações de integrinas em suas membranas identificando-as como o pivô do estado pró-inflamatório, em microambiente propício à maturação celular linfocitária e a ativação da resposta imune adaptativa que culmina na inflamação crônica(32). DC isoladas por Demedts (32) em tecido pulmonar saudável (Figura 4) expressam marcadores relevantes para a ativação linfocitária e o desenvolvimento de resposta imune adaptativa, como CD141+, para as DC convencionais epiteliais, denominadas BDCA3; CD1a+ e CD1c+, para as DC convencionais intersticiais, denominadas BDCA1; CD14+, para as DC plasmocitárias, denominadas BDCA2 e BDCA4, conforme a expressão de CD303+ ou CD304+, respectivamente; além de CD4+, CD40+, CD80+ e CD86+ que são marcadores de maturação das DC envolvidas com a ativação da resposta inflamatória e reações de hipersensibilidade.

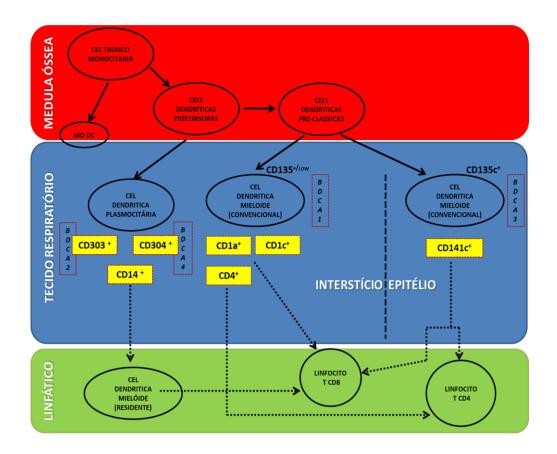


Figura 4 – Maturação, migração e diferenciação das DC do aparelho respiratório. Nota. A partir de clone hematopoetico comum, cDC e pDC residem no aparelho respiratório tanto no estado de repouso quanto inflamatório. Através da expressão de integrinas CD1a, CD1c e CD4, cDC intersticiais (BDCA1) estimulam LTCD8+ e, também LTCD4+. BDCA3+ também é capaz de estimular as duas linhagens de linfócitos T, a partir da expressão de CD135 e CD141. **Fonte.** Adaptado de Demedts(32)

Há poucos estudos de mapeamento das DC inflamatórias nos tecidos do aparelho respiratório em seres humanos com PH. Faltam informações sobre quais linhagens e subtipos de DC humanas predominam na doença e suas formas de atuação na resposta apresentadora antigênica. Esta pesquisa busca o entendimento da atuação das DC humanas nas reações de hipersensibilidade a partir da identificação das linhagens e subtipos predominantemente envolvidos em cada forma clínica de PH, utilizando os seus marcadores imunofenotípicos diferenciais.

Dois padrões de microambiente inflamatório decorrentes das reações de hipersensibilidade foram apresentados até aqui. No primeiro deles, determinante da asma, doença de topografia brônquica, há resposta linfocitária Th2 de forma sustentada, como resultado da apresentação de antígenos pelo complexo de

histocompatibilidade MHCII. É sabido que DC que expressam integrinas CD11b são propensas a induzir a expressão linfocitária Th2(33, 34), mediado especialmente pela IL33(35, 36). No segundo padrão, determinante da pneumonite de hipersensibilidade, doença da topografia parenquimatosa alveolar, a resposta adaptativa é predominantemente celular. As DC compõem o pivô da reação que culmina na estimulação e amadurecimento dos linfocitos pró-inflamatórios(37). DC que expressam CD8α e CD103 são propensas a induzirem este perfil de ativação linfocitária mediado por IL-12(38).

1.3. Pneumonite de hipersensibilidade, uma doença pulmonar parenquimatosa difusa

As doenças pulmonares parenquimatosas difusas compreendem diversas formas de bronquiolite, doenças de preenchimento alveolar, vasculites, além das doenças pulmonares intersticiais (DPI)(39). A PH está inserida neste último grupo e corresponde à maioria dos casos de DPI juntamente com a fibrose pulmonar idiopática, a pneumonia intersticial relacionada às doenças autoimunes do tecido conjuntivo, a sarcoidose e as pneumoconioses (40, 41). Dentre elas, a PH e a sarcoidose são classificadas como DPI granulomatosas não infecciosas considerando achados comuns nos espécimes de biopsia e características radiológicas(39, 42, 43). A reação granulomatosa na PH está intimamente relacionada com a exposição ambiental e a inalação de antígenos potencialmente indutores de reações de hipersensibilidade. Estes antígenos são, na sua maioria, agentes orgânicos provenientes de proteínas animais e microorganismos como micobactérias, protozoários e fungos. A prevalência de cada um varia de acordo com a região do mundo, suas características geográficas ecossistemas. Admitem-se. também. reações hipersensibilidade e alveolite precipitadas pela inalação de substâncias químicas de baixo peso molecular, como o isocianato(44). No Brasil, apesar da relação crescente de antígenos envolvidos com a PH, aqueles provenientes do mofo e dos pássaros permanecem os mais prevalentes (45). A doença pode evoluir com manifestações agudas pulmonares, tais como dispneia e tosse, além de queixas sistêmicas, como febre e mialgia. Há recidiva a cada exposição. Entretanto, a

maior parte dos casos de PH evolui de forma crônica em decorrência da exposição de longo prazo a pequenas cargas de antígeno, ou então, do efeito cumulativo de múltiplos episódios de exposição que raramente são perceptíveis(39, 45-47). Os sintomas pulmonares costumam ser insidiosos e acabam por limitar progressivamente as atividades de vida diária.

Na PH, as DC processam antígenos e os apresentam a linfócitos. Inicialmente, anticorpos são produzidos e acumulados provocando resposta inflamatória por imunocomplexos, a reação do Tipo III de Gell e Coombs. A intensidade desta reação depende de fatores como a carga e a duração da exposição aos antígenos inalatórios potencialmente indutores de sensibilização. Exposições maciças a antígenos de hipersensibilidade podem resultar em doença intersticial aguda(47). Por outro lado, se a exposição é gradativa e prolongada, a doença evolui de forma crônica. Neste caso, os imunocomplexos ligam-se a receptores Fc de superfície dos linfócitos estimulando a produção de fator-alfa de necrose tumoral (TNF-α), IL-1 e interferon-gama (IFN-γ)(46, 48).

A forma crônica de pneumonite de hipersensibilidade também pode resultar de reação do Tipo IV de Gell e Coombs, quando as DC alveolares apresentam antígenos inalados aos linfócitos T CD4+ induzindo a sua diferenciação e o perfil de resposta imune Th1(25, 49-51). A agressão repetitiva às células epiteliais alveolares em decorrência da hipersensibilidade aos antígenos constantemente inalados e apresentados pelas DC resulta em estímulo linfocitário à secreção de IL-12 e interferon gama (IFN-γ) que são potentes indutores da inflamação crônica e a formação de granulomas(52).

Com a alveolite linfocitária presente em todas as suas formas evolutivas, a PH é marcada pelo predomínio de linfócitos T CD8+ nas suas formas agudas e subagudas. Este perfil foi associado ao melhor prognóstico incluindo casos com resposta clínica satisfatória e remissão da doença, após tratamento com corticoide sistêmico e afastamento da exposição. Por outro lado, pacientes com doença subaguda em que a terapia com corticoide não foi bem sucedida apresentavam elevada relação TCD4+/TCD8+ no exame endoscópico de lavado broncoalveolar realizado pouco antes do tratamento. O mesmo ocorreu nas formas crônicas da doença, pouco responsivas a corticoide, aparentemente

relacionadas com o acúmulo de linhagens pró-inflamatórias de linfócitos TCD4+(53).

A diminuição da tolerância antigênica envolvida com essas reações de hipersensibilidade envolve suscetibilidade genética. Encontrou-se relação do desenvolvimento de PH com alterações no *locus* relacionado às moléculas apresentadoras de antígenos de histocompatibilidade (MHC) classe II, além de polimorfismos em genes relacionados às proteínas transportadoras de antígenos (TAP) e processadores do complexo ubiquitina-proteossoma (PSMB)(44, 54, 55).

Acredita-se que a patogênese da PH esteja ligada à hiperativação de uma ou mais das linhagens de DC inflamatórias presentes em toda a extensão do aparelho respiratório, como ponte entre a resposta imune inata e os sistemas imunológicos adaptativos(56). Em ratos, as DC presentes no tecido linfoide associado ao aparelho respiratório expressam o fenótipo CD8α+ e são especializadas no reconhecimento e apresentação de antígenos através das moléculas MHC classe I para ativação de linfócitos T CD8+ naive. Cabe aqui reiterar o papel das cDC CD11c+ CD141+, localizadas no epitélio, capazes de apresentar antígenos através das moléculas MHC II ativando linfócitos T CD4⁺⁽³¹⁾. Com seus processos membranosos insinuando-se entre as junções intercelulares das pequenas vias aéreas até o espaço alveolar, em modelos experimentais, as cDC CD11c+ CD141+ criam microambiente inflamatório favorável ao desenvolvimento de resposta "Th1" e reação granulomatosa(57). Elas também podem estimular a ação de linfócitos TCD8+ participando, assim, da resposta imune celular contra invasores, como partículas virais. Isso explica, ao menos em parte, a relação de certos sorotipos virais com tropismo pelo epitélio respiratório, na patogênese da PH. Por outro lado, as cDC CD11c+ CD11b+ CD1a+ CD1c+, situadas no interstício abaixo da membrana basal epitelial, têm habilidade de apresentação de antígenos glicolipídicos como aqueles presentes em micobactérias(24, 58) e já é conhecido o papel desses antígenos na indução da PH. As cDC CD11c+ CD11b+ CD1a+ CD1c+ também são capazes de migrar do interstício alveolar para os linfonodos pulmonares ativando as DC linfáticas CD8α⁺, já descritas, capazes de intermediar a ativação linfocitária e a resposta imune adaptativa. De forma semelhante, atuam as DC

plasmocitóides, caracterizadas pelo fenótipo CD14⁺ CD16⁺. Também vale destacar que as linhagens de DC aqui descritas expressam, em diferentes níveis, langerina e receptores de lecitina com fenótipo Ly6C⁺ envolvidos com a habilidade de reconhecimento de antígenos presentes em fungos(59) tão relacionados à exposição inalatória desencadeante da PH, especialmente no Brasil. Estas linhagens de DC participam do estado inflamatório em resposta a insultos antigênicos estranhos e todos os fenômenos apresentados indicam a sua importância na patogênese da alveolite de hipersensibilidade.

Além da limitação progressiva das atividades de vida diária, as alterações respiratórias da PH resultam em padrão restritivo nos testes diagnósticos da função pulmonar. Estes exames demonstram redução da capacidade vital funcional (CVF) e capacidade pulmonar total (CPT). São comuns as alterações nos testes de difusão do monóxido de carbono (DLCO) especialmente nas formas crônicas fibrosantes da doença(45, 60).

O diagnóstico requer trabalho multidisciplinar que inclui o inquérito em busca de fatores de exposição ambiental; a análise laboratorial para pesquisa de precipitinas contra antígenos específicos; a correlação com os escores de probabilidade a partir dos achados de tomografia; a discussão das alterações citológicas do lavado broncoalveolar (LBA); a análise anatomopatológica das amostras de biopsia pulmonar. As diretrizes médicas atuais estabelecem de forma coesa os critérios radiológicos e histológicos necessários para que seja estabelecido o diagnóstico de PH, seja ele provável, ou definitivo(61). Recomenda-se a categorização da doença, com base em achados radiológicos e histológicos, em PH fibrosante ou PH não fibrosante, devido à utilidade clínica desta forma de classificação para escolha terapêutica. A resposta clínica e laboratorial ao afastamento da exposição e à terapia com corticosteroides varia bastante entre esses dois grupos e a PH fibrosante está relacionada ao pior prognóstico(61).

1.4. A forma fibrosante da PH

Em sua evolução crônica, a PH frequentemente manifesta-se com o padrão fibrosante. Assume cada vez mais relevância o fato de que, nestes casos, a resposta inflamatória reparativa é marcadamente bronquiolocêntrica (Figura 5). Além do infiltrado linfocitário centrado nas vias áereas, há agregados de fibroblastos formando verdadeiras "pontes fibróticas" entre áreas de remodelamento da camada muscular bronquiolar e o parênquima alveolar subpleural, com retração do espaço alveolar, além do acúmulo de tecido colágeno em organização preenchendo a luz alveolar(62).

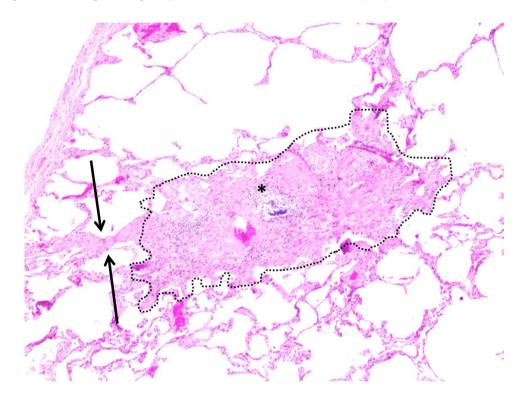


Figura 5 – Biopsia Pulmonar Cirúrgica de uma PH fibrosante. Note o processo inflamatório linfocitário centrado nas vias aéreas (*) e processo reparativo fibrótico - proliferação fibroblástica peribronquiolar (linha tracejada) e pontes fibróticas (setas) partindo do feixe broncovascular até a região subpleural.

Quando a PH é desencadeada por reação do tipo III de Gell e Coombs, induzida pela exposição prolongada a antígenos inalados, o acúmulo de imunocomplexos circulantes estimula a produção de fator-beta de transformação do crescimento (TGF-β) que é responsável pela atração de fibroblastos e estímulo à produção excessiva de colágeno e remodelamento intersticial(63, 64).

Nos casos em que predomina a reação de hipersensibilidade do tipo IV, também pode ocorrer fibrose. Postula-se que a diferenciação alternativa dos linfócitos TCD4+ com o perfil Th17 resulta na liberação de IL-17 e IL-22, sabidamente relacionadas à resposta inflamatória crônica fibrogenica(65, 66). A presença de TGF-β também é capaz de suprimir a via de diferenciação Th1 estimulando, em contrapartida, a expressão do perfil Th17(67, 68). A presença de IL-17 e IL-22 decorrente da ativação deste perfil de diferenciação linfocitária resulta na amplificação do mecanismo de agressão, reparo e, por fim, fibrose por estímulo pró-fibroblástico excessivo. A simples presença de IL-17 resulta em alça de retroalimentação positiva para a resposta Th17 sustentada. Neste contexto, deve-se destacar o papel das linhagens γδ de linfócitos T. Capazes de reconhecer tanto antígenos processados quanto DAMP, estas linhagens de linfócitos T são capazes de produzir grande quantidade de IL-17 reforçando o microambiente fibrogênico na pneumonite de hipersensibilidade(69).

Também há a hipótese de que parte das formas crônicas fibrosantes da doença decorrem de perfil de resposta linfocitária Th2(70). As interleucinas secretadas por linfócitos TCD4+ neste perfil imunofenotípico têm sido relacionadas à ativação pró-fibloblástica e deposição de matriz colágena em diversos tecidos, incluindo o epitélio respiratório, em modelos de doença pulmonar fibrosante. A IL-4 é capaz de estimular receptores específicos presentes na membrana de fibroblastos e já foi documentada in vitro a ação fibrogênica desta via(71, 72). Outros modelos experimentais apontam a IL-13 como a interleucina Th2 mais fibrogênica para o tecido respiratório, mediante a sensibilização por antígenos fúngicos(73), conhecidos como os mais clássicos agentes etiológicos da pneumonite de hipersensibilidade. Em modelos experimentais de fibrose, a IL-13 é capaz de estimular diretamente receptores fibroblásticos(74-76). Estes mesmos receptores estão presentes na superfície de macrófagos que armazenam TGFβ. Quando ativados, estimulam a clivagem e a liberação das formas ativas deste importante indutor pró-fibroblástico(77, 78) criando microambiente favorável à formação de pontes fibróticas do eixo peribroncovascular até o espaço pleural, região povoada por fibroblastos e miofibroblastos.

1.5. O papel das Células Dendríticas nas formas fibrosantes da PH

Conforme demonstrado nos itens anteriores desta revisão, as cDC, quando expostas ao estímulo antigênico, expressam integrinas que ativam a resposta apresentadora via MHC II (Figura 6) tornando-se capazes de estimular os perfis de resposta linfocitária Th2 e Th17. As formas fibrosantes da pneumonite de hipersensibilidade poderiam, então, advir de vias de retroalimentação positiva destes eixos pró-inflamatórios que têm as DC inflamatórias como pivô. Uma destas vias foi recentemente documentada. A presença de IL-17 mostrou-se capaz de ativar a cascata de complemento e moléculas ativadas de C3 (C3a) encontram receptores específicos (C3aR) na membrana das DC pró-inflamatórias. A ligação C3a-C3aR potencializa a atividade apresentadora antigênica das células dendríticas convencionais(79).

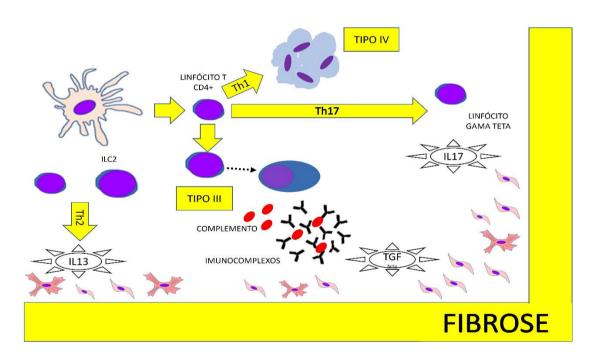


Figura 6 – Respostas linfocitárias adaptativas à apresentação antigênica. As respostas adaptativas alternativas ao perfil Th1 culminam em processo reparativo fibrogênico. O mais comum deles é mediado pela IL17. Este perfil Th17 de diferenciação resulta na fibrose mediada pela ação de IL17 e interação com linhagens gama teta de linfócitos. O microambiente inflamatório fibrogênico também pode ser deflagrado pela reação de hipersensibilidade tipo III e o acúmulo de imunocomplexos com deposição tecidual, ativação de C3 e estímulo à liberação de TGF-β. Postula-se que a resposta fibrogenica mediada pelo perfil Th2 merece relevância nos mecanismos de agressão e reparo do epitélio alveolar, considerando o potencial estimulador de fibroblastos e miofibroblastos mediado pela IL13.

Durante o estado inflamatório, outra linhagem de DC, denominada TNFα/iNOS, derivada de monócitos, pode ser encontrada no tecido alveolar(80). Seu papel na interação com a resposta linfocitária Th17 e Th2 não é totalmente conhecido. Nosso grupo de pesquisa tem atuado na determinação do microambiente inflamatório nos casos de PH em que predomina este subgrupo de células dendríticas em busca de biomarcadores preditores de inflamação crônica, fibrose e baixa resposta terapêutica.

1.6. A questão de pesquisa

Muitos dos casos de PH fibrosante evoluem de forma progressiva a despeito de identificação e controle da exposição antigênica ambiental. Este desfecho tem prognóstico desfavorável, pois está relacionado com a refratariedade ao uso de corticosteroides de ação sistêmica, única terapia medicamentosa efetiva disponível(61).

À luz dos novos conhecimentos sobre a resposta fibrogênica centrada nas vias aéreas, bem como os avanços moleculares na imunopatogênese das reações de hipersensibilidade, busca-se por novos modelos patológicos preditores de casos desfavoráveis de PH fibrosante, substrato para potenciais alvos terapêuticos futuros.

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

O processo fisiopatológico de desenvolvimento de todas as expressões clínico-radiológicas da pneumonite de hipersensibilidade envolve a apresentação de antígenos a células dendríticas epiteliais e intersticiais para posterior desencadeamento de reação de hipersensibilidade tipo III e/ou IV. Nossa hipótese de trabalho baseia-se nos diversos fenótipos de imunoexpressão das células dendríticas epiteliais e intersticiais pulmonares que podem coparticipar ativamente na determinação do microambiente das vias aéreas

relacionadas ao tipo e intensidade das reações de hipersensibilidade. Desta forma, a determinação do perfil de células dendríticas pode ser um importante translacional biomarcador patológico em biopsias pulmonares para diagnóstico e prognóstico das expressões clínico-radiológicas da pneumonite de hipersensibilidade fibrosante ou não.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial biomarcador do perfil de células dendríticas em biopsias pulmonares cirúrgicas de pacientes com diagnóstico de PH confirmado após discussão multidisciplinar.

3.2 Objetivos Específicos

- Definir o quadro clínico-radiológico dos pacientes;
- Avaliar o padrão fibrosante da pneumonite de hipersensibilidade nas biopsias pulmonares;
- Caracterizar o perfil de células dendríticas epiteliais e intersticiais;
- Determinar as correlações clínico-patológicas como biomarcador diagnóstico e prognóstico.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Apreciação ética

O projeto tem o registro na Plataforma Brasil com o CAAE número 41736821.8.0000.5440 e foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Instituição, CEP HCRP-FMRP-USP, com Parecer Consubstanciado Aprovado em 09 de fevereiro de 2021 aceitando a solicitação de dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foi justificada pela indisponibilidade de meios de contato de parte dos pacientes e o óbito de outros.

4.2. Participantes e desenho de estudo

Foram analisados fragmentos de tecido pulmonar fixados em formalina e incluídos em parafina obtidos pela técnica de biopsia pulmonar cirúrgica entre os anos de 2016 e 2020 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Vale ressaltar que este procedimento fez parte da rotina de diagnóstico etiológico de doenças pulmonares intersticiais em pacientes assistidos no serviço de pneumologia dessa instituição. Foram selecionados fragmentos de tecido pulmonar provenientes de 23 pacientes com DPI fibrosante. Todos eles tiveram o diagnóstico confirmado em discussão multidisciplinar.

Dentre os 23 selecionados, onze casos foram confirmados com PH em fase crônica. Dos demais, seis receberam o diagnóstico de pneumonite intersticial secundária à aspiração crônica de conteúdo gástrico (ASP) e, outros seis, doença pulmonar intersticial relacionada a colagenoses (COL). Estes últimos dois grupos foram correlacionados com os casos de PH, como forma de controle. O desenho do estudo é mostrado na Figura 7. Ele foi dividido em 3 passos: 1º) estudo imunohistoquímico (IHC) das células dendríticas no tecido pulmonar de pacientes com PH e controles; 2º) análise do microambiente inflamatório pulmonar por morfometria; 3º) revisão de dados clínicos de

prontuário para definição do quadro clínico-radiológico e correlação com potenciais biomarcadores.

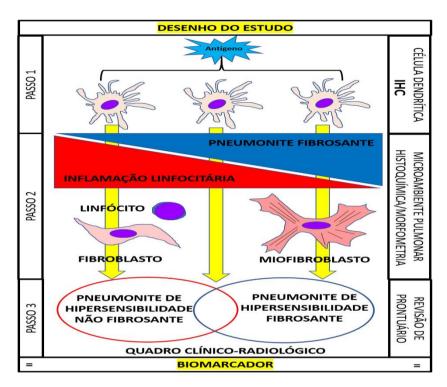


Figura 7 – Resumo esquemático do desenho do projeto. No terceiro passo, após definição do quadro clínico-radiológico, os casos serão definidos em dois padrões de PH, "fibrosante" e "não fibrosante". Em seguida, estes resultados serão correlacionados com a análise feita do perfil imunofenotípico de expressão das células dendríticas e características histopatológicas do microambiente tecidual para identificação de biomarcador.

4.2.1. Revisão de dados clínicos e radiológicos

Como fonte de dados, foram utilizados os prontuários médicos eletrônicos do HCFMRP/USP. Registraram-se, em protocolo padronizado, dados demográficos e informações clínicas obtidas à época do diagnóstico de DPI de cada participante da pesquisa, tais como: escore antropométrico, sintomas respiratórios; recordatório sobre exposição antigênica; hábito tabágico; índice de limitação funcional por dispneia; comorbidades respiratórias e outras doenças crônicas potencialmente relacionadas à pneumopatia intersticial e seu prognóstico fibrosante.

Com apoio de equipe multiprofissional, analisou-se o laudo e a imagem da tomografia de tórax de alta resolução de cada paciente com DPI fibrosante selecionado. Assim, foi possível estabelecer o padrão evolutivo da intersticiopatia em cada caso, especialmente a presença de sinais radiológicos de fibrose, seja ela de distribuição bronquiolocêntrica, ou outras formas, como a pneumonia intersticial usual e a pneumonia intersticial não específica. Para os casos de fibrose centrada nas vias aéreas, o diagnóstico de PH obedeceu às diretrizes internacionais atuais, conforme apresentado na tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Critérios diagnósticos tomográficos para PH fibrosante.

Típico de PH	Compatível com PH	Indeterminado
 ✓ Infiltração septal sem faveolamento ✓ Predomínio das lesões nos campos médios e superiores ✓ Distribuição difusa da região axial até a periferia ✓ Acometimento das pequenas vias aéreas – nódulos centrolobulares ✓ Padrão de 3 densidades em vários segmentos broncopulmonares 	 ✓ Faveolamento e/ou bronquioloectasias ✓ Lesões presentes nos campos superiores ✓ Distribuição peribroncovascular e/ou subpleural ✓ Vidro fosco sobreposto aos septos intralobulares ✓ Acometimento das pequenas vias aéreas – nódulos centrolobulares ✓ Padrão de 3 densidades ocasional 	✔ Padrão PINE

As Diretrizes Internacionais para diagnóstico e tratamento da PH foram revistas em 2020. Propõe-se a classificação da PH em formas fibrosantes e não fibrosantes. Cada uma delas tem algoritmos e critérios próprios de diagnóstico, tanto radiológico, quanto histopatológico. **Fonte:** traduzida e adaptada da ATS/JRS/ALAT 2020(61).

4.2.2 Revisão de exames de função pulmonar

Obteve-se registro histórico dos valores de capacidade pulmonar total (CPT) de cada participante da pesquisa, do início do seu acompanhamento clínico até a última consulta no serviço de pneumologia do HCFMRP/USP. A análise da CPT se deu pela técnica de diluição do gás Helio, exame de rotina no

serviço, durante o seguimento dos pacientes com DPI. Utilizou-se o valor da CPT em porcentagem do predito para sexo e idade, calculados a partir de equações padronizadas pela Seção de Pneumologia - Laboratório de Função Pulmonar.

A função pulmonar também foi investigada através dos valores de capacidade de difusão do monóxido de carbono (DLCO) obtidos em momentos oportunos ao longo do seguimento da DPI de cada participante da pesquisa pela equipe de pneumologia. Através do registro histórico de todos os valores de DLCO de cada participante da pesquisa, foi produzida curva evolutiva da sua capacidade de troca gasosa alveolar. Foram considerados os valores preditos de DLCO conforme sexo e idade. Não foi realizada a correção pelo nível de hemoglobina (Hb) sérica, pois estudos prévios não observaram diferença significativa entre os valores preditos de DLCO corrigidos, ou não, por esta variável(81).

Conforme destacado nas Diretrizes para Testes de Função Pulmonar, da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, a "DLCO é o teste de função pulmonar mais sensível para as doenças intersticiais difusas (...) freqüentemente é o primeiro e, às vezes, o único teste anormal em pacientes com doença intersticial precoce"(82). Estudos recentes reiteram esta sensibilidade da DLCO em relação a outros testes, superior até aos valores preditos de CPT(83).

Na tabela 2 são apresentadas as faixas de valores preditos da DLCO conforme sexo, idade e etnia, extraídos da Diretriz Brasileira para Testes de Função Pulmonar, baseados em equações de referência para a população brasileira(84).

Tabela 2 - Valores preditos de DLCO

DLCO	Interpretação
Acima de 140%	Elevada
75 – 140%	Normal
61 – 75%	Redução leve
41 – 60%	Redução moderada
≤ 40%	Redução acentuada

O valor predito deriva da relação entre o valor real de DLCO mL/min/mmHg do paciente examinado e a faixa de valores normais calculada a partir de equações baseadas nas características demográficas populacionais. **Fonte:** Extraída da Diretriz Brasileira para Testes de Função Pulmonar

4.2.3. Revisão de dados do Lavado Broncoalveolar

Segundo as Diretrizes de Doenças Pulmonares Intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia o "LBA é mais importante nas doenças que se expressam por padrão de vidro fosco/consolidação, de importância intermediária nas doenças nodulares e ocasionalmente relevante nas doenças intersticiais fibrosantes. De qualquer forma, na vigência de achados clínicos e radiológicos preditores de etiologia específica para certo caso de DPI, achados de celularidade do LBA podem ser relevantes para a conclusão diagnóstica(85). Em alguns dos participantes da pesquisa, a broncoscopia com LBA foi realizada, em momento oportuno, ao longo do seguimento clínico da DPI. Estes dados foram recuperados e a celularidade foi analisada, considerando o diferencial, em porcentagem, da contagem de leucócitos, obtida através de técnica laboratorial de citometria, na época da realização do exame, na Seção de Pneumologia do HCFMRP/USP.

4.2.4. Análise imunohistoquímica

As lâminas histológicas processadas em 3-4 µm foram submetidas à análise imunohistoquímica utilizando anticorpos primários para marcação de receptores e integrinas de superfície expressos pelas DC residentes dos tecidos periféricos não linfáticos. Foram escolhidos anticorpos mono ou policlonais, compatíveis com o uso em espécimes de tecido pulmonar humano, marcadores das linhagens de DC relacionadas ao longo da fundamentação teórica desta pesquisa, envolvidas com a apresentação antigênica e o padrão pró-inflamatório de estimulação linfocitária.

Para identificação das DC convencionais BDCA-3+, foi escolhido o anticorpo primário para ligação com Clec9A (Anti-CLEC9A antibody [EPR22324] ab223188 da empresa Abcam, Cambridge, Reino Unido). Este peptídeo sintético monoclonal é indicado, conforme orientações do fabricante, à identificação das células linfomononucleares através da Clec9a. Conforme revisão e trabalho de Yan et al., a Clec9A é expressa seletivamente em subconjuntos de DC CD8a+ e DC CD103+ de camundongo, que são funcionalmente semelhantes às DC BDCA3+ humanas(86) mostrando-se como marcador efetivo na diferenciação imunohistoquímica desta linhagem. Também foi utilizado anticorpo primário recombinante para ligação com a langerina (Anti-Langerin antibody [EPR15863] ab192026, Abcam, Cambridge, UK) visando a identificação diferencial de células de Langerhans que podem ser coradas, eventualmente, com os anticorpos anti-CLEC9A, destinados à identificação das BDCA-3+.

Para identificação das DC convencionais BDCA-1+, foi escolhido o anticorpo primário para a ligação com CD1c (Anti-CD1c antibody [EPR23189-196] ab246520, Abcam, Cambridge, UK), fragmento recombinante monoclonal destinado à identificação de células apresentadoras de antídenos CD1c+, conforme orientação do fabricante.

Para identificação das DC plasmocitóides BDCA-2+ e BDCA-4+, foi escolhido o anticorpo primário para a ligação com TLR9 (Anti-TLR9 antibody – N-terminal ab226004, Abcam, Cambridge, UK). Este peptídeo sintético policional é indicado, conforme orientações do fabricante, à identificação de células apresentadoras de antígenos com elevada expressão de TLR-9. Este receptor

já foi reconhecido em outras condições de expressão imunofenotípica de DC plasmocitóides em seres humanos(86).

Para identificação das DC TNF-α/iNOS derivadas de monócitos, foi escolhido o anticorpo primário para a ligação com receptor de manose (Anti-Mannose Receptor antibody ab64693, Abcam, Cambridge, UK). Este peptídeo sintético policlonal, conforme orientações do fabricante, foi destinado à identificação dos receptores fagocíticos de manose, presentes em macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos.

Para a padronização, os anticorpos primários foram diluídos em reagente Tris, Green (ScyTek, Utah, USA) conforme orientações do fabricante. Diversos títulos de solução foram obtidos para cada tipo de anticorpo primário. As diluições foram testadas em lâminas histológicas de controles, conforme apresentado na tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Padronização dos anticorpos para a IHC

Anticorpo	Titulação ótima para visualização	Controles
Anti-Clec9A	1:2000	Timoma (humano)
Anti-Langerina	1:250	Pele (humano)
Anti-CD1c	1:100	Baço (humano)
Anti-TLR9	1:250	Adenocarcinoma acinar do pulmão (humano)
Anti-Manose	1:4000	Pulmão normal (humano)

Os tecidos recomendados como controles pelo fabricante (Abcam) foram escolhidos para a padronização da diluição dos anticorpos a serem utilizados na IHC de pulmão com DPI para a pesquisa.

Quadro 1 – Preparo das lâminas histológicas para a técnica de IHC

Etapa 1 Preparo das lâminas para desparafinização	Acomodação das lâminas em estufa a 60°C por 1 hora				
Etapa 2 Desparafinização e reidratação das lâminas	Bateria: I. Xilol PA (2 banhos de 5 minutos cada, em temp. ambiente) II. Álcool Etílico 95 - 98% (2 banhos de 3 minutos cada) III. Álcool Etílico 70% (2 banhos de 3 minutos cada) IV. Álcool Etílico 50% (2 banhos de 3 minutos cada) V. Água Destilada ou Deionizada (2 banhos de 1 minuto cada)				
Etapa 3 Pré-tratamento dos tecidos e recuperação antigênica	 I. Preparação de solução tampão pré-aquecida na panela elétrica a 96°C por 15 minutos. II. Colocação das lâminas, desparafinizadas e reidratadas, na solução tampão pré-aquecida, programando a panela para aquecimento, por 20 minutos, sob alta pressão e temperatura de 140°C. Tampão de Recuperação indicado na bula Ac primário: CITRATO pH 6,0 (ScyTek - Cód. CBB999, Utah, USA) para anticorpos primários: Anti-CD1c, AntiTLR9 e Anti-manose. TRIS/EDTA pH 9,0 (ScyTek - Cód. TES999) para os anticorpos primários: Anti-Clec9a e Anti-Langerina 				

	Após período de aquecimento em solução tampão, a pressão é retirada e as lâminas são removidas da panela, repousando por 10 minutos em bancada para, a seguir, serem submetidas à lavagem, por duas vezes, com agua destilada.
Etapa 4 Bloqueio da peroxidase endógena	Secagem ao redor dos cortes seguida pela demarcação circular com caneta hidrofóbica Pap Pen (Kiyota – Cód. K-600) sem deixar os cortes secarem totalmente durante o procedimento. Aplicação do Bloqueador de Peroxidase (Bloqueador de Peroxidase Scytek – Cód. ACA125, Utah, USA) sobre os cortes de tecido. Repouso, em temperatura ambiente, por 15 minutos, seguido por lavagem das lâminas em tampão - 01 Banho de 5 minutos em cuba com Tampão de Lavagem TBST (Scytek – Cód. TBT999) ou PBS (ScyTek – Cód. PBS999) ambos da ScyTek, Utah, USA.

O processo de IHC de tecidos previamente fixados requer diversas etapas para recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase garante viabilidade tecidual após a desparafinização. Fonte: ScyTek, Utah, USA. **Fonte:** ScyTek, Utah, USA

Cada anticorpo primário foi diluído e aplicado nas lâminas histológicas dos casos de PH selecionados, submetidas previamente ao protocolo de desparafinização e recuperação antigênica. Este processo está descrito no Quadro 1.

Após esta etapa de recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase, foram aplicados os anticorpos primários previamente diluídos. Cada um dos cinco anticorpos primários foi aplicado em lâminas histológicas de controle, pulmão normal e, também, aquelas provenientes das biopsias dos pacientes selecionados. Após período de incubação dos anticorpos primários por 1 hora, todas as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS para remoção do anticorpo excedente. A seguir, foi aplicado, em cada lâmina histológica, polímero

reagente secundário. Por fim, substrato cromógeno também foi aplicado para otimização da leitura.

Para análise do resultado da coloração imunohistoquímica, foi seguido o protocolo do Laboratório de Patologia do HCFMRP/USP, utilizando método estereológico conforme recomendação internacional da *American Thoracic Socienty and European Respiratory Society* (ATS/ERS) para análise quantitativa dos espécimes pulmonares(87).

4.2.5. Análise histomorfométrica

Todas as biopsias cirúrgicas foram revisadas por três patologistas independentes de acordo com *checklist* padronizado, incluindo descrição do aspecto das áreas de fibrose; presença de focos fibroblásticos; estado inflamatório; remodelamento bronquiolar e metaplasia peribronquiolar; pontes fibróticas entre pleura e bronquíolos; metaplasia escamosa, faveolamento; pneumonia em organização. Cerca de 10 fotos randômicas de cada lâmina histológica, obtidas pelo microscópio no maior aumento, foram analisadas no programa Image Pro Plus 7. Conforme os padrões morfométricos estabelecidos pela ATS/ERS(87), foi realizada a quantificação das estruturas realçadas por essas colorações. A área das lâminas histológicas (Figura 8) serviu de parâmetro corretor para a quantificação dos achados patológicos do *checklist* padronizado, assim como indexador da contagem de DC identificadas à imunohistoquímica, por mu².

4.3 Análise estatística

Variáveis categóricas foram analisadas a partir de tabelas de frequência. Por tratar-se de análise retrospectiva, optou-se pelo registro da prevalência das variáveis de tal natureza. Para as variáveis paramétricas, a média e o desvio padrão foram calculados. Para as variáveis não paramétricas, optou-se pela estatística descritiva a partir da mediana e demais quartis.

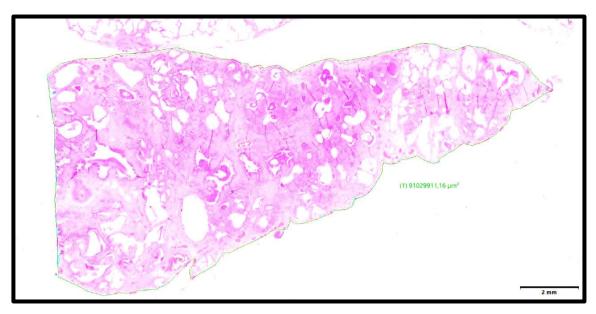


Figura 8 – Histomorfometria com reconstrução por técnica digital. Nota. A análise integrada das imagens em menor aumento permite a reconstrução total da área de tecido na lâmina. A seguir, os segmentos histológicos viáveis são contornados para a aferição de área, em $m\mu^2$.

A análise inferencial demandou apoio de softwares estatísticos. Foram utilizados tanto o SPSS v.13.0 (IBM, Chicago, IL) quanto o Prism – GraphPad v.8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os testes de inferência utilizados para análise das variáveis categóricas foram: qui-quadrado (X²) de Pearson e teste exato de Fisher, para grupos compostos por poucos integrantes. Teste T e ANOVA foram aplicados para variáveis paramétricas. As variáveis com distribuições contínuas não paramétricas foram analisadas através dos testes de Mann Whitney e Kruskal Wallis. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Também foram produzidas curvas Kaplan-Meier para análise de sobrevida. Para a identificação de *clusters* de biomarcadores translacionais, gráficos de *heatmap* foram elaborados.

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas e aspectos clínicos relevantes

5.1.1. Idade

A média de idade dos 23 participantes da pesquisa foi 63 anos, com desvio padrão calculado em 9 anos, para mais, ou para menos. Por tratar-se de variável de distribuição não paramétrica, optou-se pela apresentação da idade dos participantes em intervalos de frequência. Valor mínimo: 38 anos. Primeiro quartil: 59,5 anos. Mediana: 66 anos. Terceiro quartil: 69 anos. Valor máximo: 75 anos.

Para melhor entendimento da distribuição etária dessa amostra, foi construído o histograma que é apresentado no gráfico 1, a seguir, com as idades representadas em anos completos de vida contabilizados para todos os participantes da pesquisa, agrupados por faixa etária.

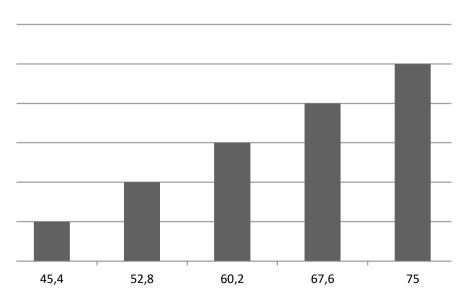


Gráfico 1 – Faixas etárias dos pacientes com DPI.

As classes de valor foram definidas em função do tamanho da amostra. Os indivíduos concentram-se nos extremos de idade próximos do valor máximo da amostra.

A mediana da idade também foi calculada para o rol de indivíduos de cada grupo de DPI de interesse e os valores são apresentados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Idade dos pacientes com DPI conforme Etiologia.

Grupos representados por colunas, com medianas e intervalos de confiança. Valores de P indicam a significância estatística conforme testes de inferência pertinentes.

5.1.2. Sexo e etnia

Conforme registros apresentados na tabela 4, nota-se o predomínio do sexo masculino nos participantes do grupo ASP. Nos demais grupos (PH e COL), o sexo feminino é o prevalente. ASP, PH e COL também diferem quanto à etnia, especialmente os participantes com DPI secundária a colagenose (COL) com menos indivíduos da raça branca.

Tabela 4 – Dados demográficos dos participantes do estudo e correlação estatística entre os grupos

	Total	PH	ASP	COL	Р
Sexo (prevalência % masc)	39%	38%	67%	33%	<0,0001
Etnia (prevalência % brancos)	78%	82%	83%	67%	0,0102

Dados descritos para o total de participantes e, separadamente, por grupo de DPI de interesse.

5.1.3. Evolução clínica

Dados relacionados à evolução natural da doença pulmonar intersticial foram revisados no prontuário de cada participante da pesquisa. De forma retrospectiva, buscou-se pela ocorrência de cada uma das variáveis que são expressas, a seguir, na tabela 5 correlacionadas entre os grupos de DPI de interesse.

Tabela 5 - Dados clínicos conforme o diagnóstico da DPI.

	ASP	PH	COL	Р
SINTOMAS RESPIRATÓRIOS				
Dispnéia (média MRC <u>+</u> DP)	2,33 <u>+</u> 0,82	1,63 <u>+</u> 1,03	2,00 <u>+</u> 0,90	0,3694
Evolução dispnéia* (média <u>+</u> DP)	1,29 <u>+</u> 0,49	1,46 <u>+</u> 0,52	1,43 <u>+</u> 0,79	0,7452
Ortopnéia (%)	27,27	16,67	33,33	0,0196
Dispnéia paroxística noturna (%)	9,09	16,67	0	0,0002
Tosse (%)	100	83,33	66,67	< 0,0001
OUTROS SINTOMAS E SINAIS				
Baqueteamento digital (%)	45,45	16,67	16,67	< 0,0001
Artrite (%)	27,27	0	50,00	< 0,0001
MEDICAMENTOS EM USO CONTÍNUO				
Corticóide sistêmico (%)	66,67	54,55	83,33	<0,0001
Fármacos pneumotóxicos (%)	0	27,27	16,67	<0,0001
COMORBIDADES				
Hipertensão sistêmica (%)	33,33	54,55	16,67	<0,0001
Diabetes mellitus (%)	16,67	54,55	0	<0,0001
ANTECEDENTE FAMILIAR				
Parentes 1º grau com DPI† (%)	16,67	18,20	33,33	0,0068

^{*} Evolução da dispnéia: 0-melhora; 1-estável; 2-piora

Além da comparação dos resultados entre os grupos, todas estas variáveis foram correlacionadas entre si, na forma de *heatmap*, apresentado na Figura 9 juntamente com os conglomerados de outros dados, radiológicos e histomorfométricos, para uma visão global dos prognosticadores evolutivos disponíveis como marcadores de prognóstico até o momento atual. Cada participante de pesquisa foi representado pelo diagnóstico de DPI e seus dados clínicos. O algoritmo de bioinformática permitiu a combinação destes dados com o perfil das células dendríticas obtido pela IHC das biópsias pulmonares.

[†] prevalência (%) de familiares (1º grau) diagnosticados c/ doença pulmonar intersticial

Dentre os dados clínicos relevantes para correlação entre os grupos de DPI de interesse, o índice de massa corporal (IMC) foi analisado detalhadamente, como representante das características antropométricas dos participantes da pesquisa. Esta variável foi obtida à época da biópsia e a conclusão do diagnóstico da intersticiopatia para cada um dos indivíduos integrantes da amostra. O gráfico 3 apresenta, a seguir, os valores de IMC para cada grupo de DPI de interesse, em mediana, devido distribuição não paramétrica desta variável. Não houve diferença estatística entre os grupos.

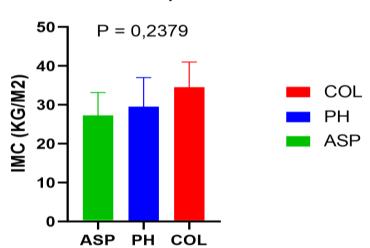


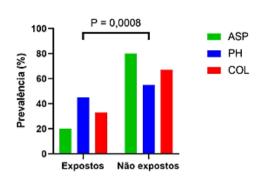
Gráfico 3 - IMC dos pacientes conforme DPI

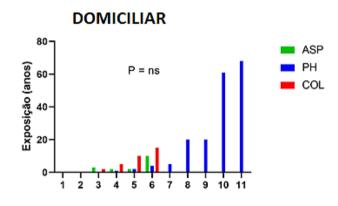
5.1.4. Exposição ambiental a poeiras orgânicas

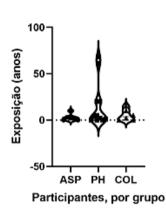
A exposição ambiental a partículas potencialmente alergênicas também foi verificada, tanto aquela com nexo ocupacional, quanto o contato inalatório com mofo e pássaros no ambiente domiciliar. O gráfico 4 demonstra a ocorrência destes elementos em cada grupo de DPI analisado.

Gráfico 4 – Perfil de exposição a poeiras orgânicas ambientais por grupo de DPI.

OCUPACIONAL







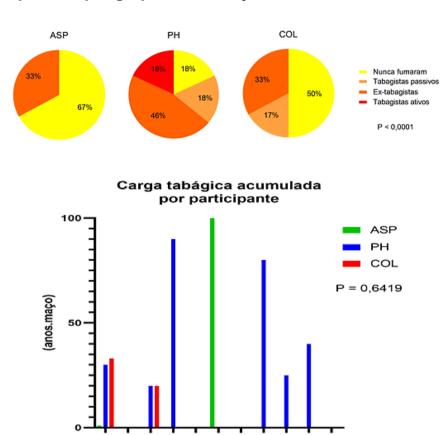
A exposição ocupacional foi quantificada em anos resultando em variável quantitativa discreta. A mediana e o intervalo interquartil, em cada grupo, respectivamente: ASP = 2,00 e 4,76 anos; PH = 4,00 e 20,00 anos ; COL = 3,5 e 11,25 anos. Para a exposição domiciliar, *Violin Plot* demonstra que a carga de exposição alcança maior patamar grupo PH, apesar dos testes mais clássicos terem falhado em identificar significância estatística da diferença da quantidade de exposição nos casos.

5.1.5. Tabagismo

O antecedente tabágico também foi detalhado para todos os casos. Considerada à época do diagnóstico da DPI, a prevalência do tabagismo nos três grupos de interesse segue representada pelo gráfico 5. Participantes com antecedente de cessação perdurando mais de 1 ano foram considerados extabagistas. Entretanto, quando da quantificação da carga tabágica, eles foram

computados como indivíduos expostos à corrente ativa do cigarro, considerando o seu efeito de dano acumulativo sobre o aparelho respiratório.

Gráfico 5 – Visão detalhada do hábito tabágico dentre os participantes do estudo separados por grupos e correlação estatística.



Para análise de inferência quanto à prevalência do hábito tabágico na amostra, foi considerada a exposição à corrente ativa do cigarro, sem cessação - tabagistas ativos

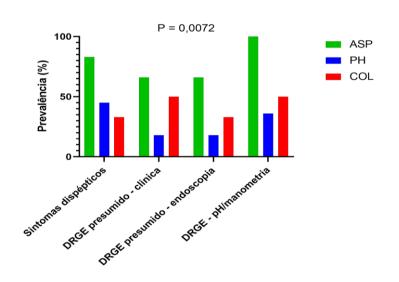
5.1.6. Dispepsia

Outra condição clínica prevalente entre os grupos foi a dispepsia. Foram analisados os registros de todas as variáveis relacionadas a este agravo, classificadas de forma categórica, pela prevalência.

Uma das variáveis consideradas como indicativo da ocorrência de dispepsia foi a presença de sintomas, tanto à época do diagnóstico, quanto ao

longo do segmento de cada participante por grupo de DPI de interesse. Foram valorizada, para o cálculo da prevalência de sintomas dispépticos, a presença de um, ou mais, dos quatro: disfagia; engasgos; regurgitação e pirose. O diagnóstico presumido de DRGE foi considerado para análise de prevalência quando obtido através de escore preditor clínico ou achados de endoscopia digestiva alta, como hérnia de hiato e/ou esofagite. Entretanto, diagnóstico confirmado de DRGE só foi valorizado na presença de achados preditivos no exame padrão-ouro, a pH/manometria do esfincer esofágico inferior. Os resultados estão apresentados no GRAFICO 6, a seguir.

Gráfico 6 – Variáveis atribuídas à investigação da dispepsia em cada grupo



5.1.7. Função pulmonar

Dez participantes da pesquisa fizeram, ao menos, três provas de função pulmonar ao longo do seguimento clínico da DPI com a equipe de pneumologia, desde o momento da biopsia. Estes valores foram selecionados e, para cada um destes participantes, foi elaborado ângulo de regressão linear, conforme resumido na tabela 6, a seguir.

Dentre eles, cinco eram casos de PH. Dentre os demais, dois indivíduos faziam parte do grupo ASP e, os outros cinco, estavam agrupados como COL conforme resultado da biopsia pulmonar e diagnóstico definido por equipe multiprofissional.

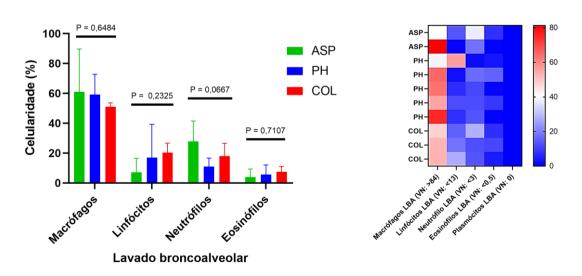
Tabela 6 - Evolução da prova de função pulmonar

Grau de Variação	ASP	ASP	PH	PH	PH	PH	COL	COL	COL	COL
DLCO	0,03	-1,08	-1,23	-0,15	-0,40	-0,56	-0,94	-0,58	-0,18	-0,13
CPT	0,47	0,40	-1,17	1,60	-0,73	0,15	0,39	0,38	0,35	2,06

5.2. Lavado broncoalveolar

Dados sobre a celularidade do lavado broncoalveolar (LBA) obtido através de broncoscopia flexível foram recuperados para dois indivíduos do grupo ASP, cinco do grupo PH e três do grupo COL. O gráfico 7 detalha a análise da celularidade do LBA para os três grupos de DPI de interesse.

Gráfico 7 – Celularidade do LBA em cada grupo



Média da celularidade e contagem diferencial (%) para grupos. O heatmap combina alterações celulares sugestivas de um ou mais diagnósticos etiológicos de intersticiopatia.

5.3 Tomografia computadorizada do tórax

Com o auxílio de radiologista especializado na investigação de doenças pulmonares intersticiais, a tomografia do tórax de cada participante da pesquisa foi interpretada utilizando-se checklist padronizado para doenças pulmonares intersticiais. Primeiramente, foi verificada a qualidade técnica do exame e o padrão radiológico da fibrose pulmonar. A seguir, achados tomográficos preditores de fibrose foram quantificados, de forma metódica. Os resultados estão apresentados na tabela 7, a seguir.

Tabela 7 – Padrões de fibrose identificáveis à tomografia de tórax e achados radiológicos compatíveis com doença fibrosante em evolução

	701		001	
PADRÃO DE FIBROSE				
PIU	0	0	0	0,5796
Provável ou indeterminado	0	0	0	
Diagnóstico alternativo	6	11	6	
PADRÃO ALTERNATIVO				
PINE	0	0	4	0,0005
PO	0	0	1	•
Incaracterístico	6	10	1	
DIP	0	1	0	
ATENUAÇÃO EM MOSAICO				
Ausente	2	2	4	0,3377
Presente em até 2 lobos	0	3	0	-,
Presente em 3 ou + lobos	4	6	2	
RETENÇÃO AÉREA				
Ausente	1	5	5	0,4024
Presente em até 2 lobos	1	2	Ö	-,
Presente em 3 ou + lobos	2	4	1	
PADRÃO EM 3 DENSIDADES			-	0,4897
Ausente	3	7	5	0, .00.
Presente	3	4	1	
MOSAICOvsRETICULAÇÕES*				
Mosaico é mais importante	2	3	0	0,9150
Iqualmente importante	0	4	2	-,
Menos importante	2	4	1	
NÓD. CENTROLOBULARES			-	
Ausente	4	11	6	0,0517
Presente em até 2 lobos	1	0	0	-,
Presente em 3 ou + lobos	1	0	0	
OPACIDADES VIDRO FOSCO				
Ausente	2	0	0	0,0514
Presente em até 2 lobos	0	0	0	-,
Presente em 3 ou + lobos	4	11	6	
RETICULAÇÕES				
Ausente	1	0	0	0,6378
Presente em até 2 lobos	0	1	0	0,0010
Presente em 3 ou + lobos	5	10	6	
CONSOLIDAÇÕES				
Ausente	3	10	2	0.0671
Presente em até 2 lobos	2		2	-,
Presente em 3 ou + lobos	1	1	2	
	•	•	_	

	ASP	PH	COL	Р
ÁRVORE EM BROTAMENTO				
Ausente	4	11	6	0,0517
Presente em até 2 lobos	1			
Presente em 3 ou + lobos	1			
IMPACTAÇÕES BRÔNQUICAS				
Ausente	6	10	6	0,5796
Presente em até 2 lobos		1		
Presente em 3 ou + lobos				
FAVEOLAMENTO				
Ausente	5	9	6	0,5595
Presente em até 2 lobos	0	2	0	
Presente em 3 ou + lobos	1	0	0	
CISTOS SEM FAVEOLAMENTO				
Ausente	3	7	4	0,9357
Presente em até 2 lobos	3	3	1	
Presente em 3 ou + lobos	0	1	1	
BRONQUIECTASIAS TRAÇÃO				
Ausente	1	0	0	0,8852
Presente em até 2 lobos	0	3	1	
Presente em 3 ou + lobos	5	8	5	
SINAL BRÔNQ. ALONGADO†				0,0379
Ausente	1	8	5	
Presente	5	3	1	
DISTRIBUIÇÃO PELOS LOBOS				
Predomínio lobos inferiores	1	4	5	0,0918
Pred. lobos superiores	1	0	0	
Difusa	4	7	1	
DISTRIBUIÇÃO INTRALOBAR				
Predomínio periférico	1	2	5	0,0246
Central / peribrônquico	1	0	0	
Central e periférico	4	9	1	
DISTRIBUIÇÃO PULMONAR*				
Simétrica nos dois lados	2	10	5	0,1285
Pouco assimétrica	2	1	1	
Muito assimétrica	1	0	0	
GRADIENTE APICOBASAL				
Ausente	6	11	5	0,0514
Presente	0	0	2	

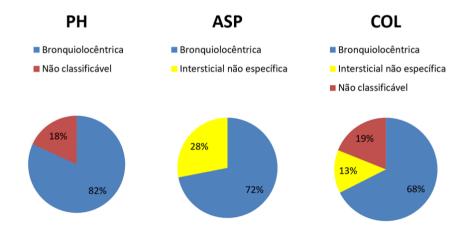
PINE – pneumonia intersticial não específica; PO – pneumonia em organização; DAD – dano alveolar difuso, ou pneumonia intersticial aguda; PIL – pneumonia intersticial linfóide; FEPP – fibroelastoses pleuroparenquimatosa; BR-DIP – bronquiolite respiratoria; PID – pneumonia intersticial descamativa.

Os dados tomográficos preditores de evolução fibrosante da DPI também foram analisados de forma combinada, através de *heatmap* da figura 9 que será apresentada, mais adiante.

5.4 Histopatologia

Dos onze casos selecionados com aspecto tomográfico típico ou, ao menos, compatível com PH fibrosante, nove apresentaram padrão histopatológico condizente com fibrose bronquiolocêntrica. Os dois casos restantes foram considerados com doença fibrosante não classificável. Dos seis controles do grupo ASP, cinco apresentavam fibrose bronquiolocêntrica e somente um deles foi classificado como pneumonia intersticial não específica. No grupo COL, três participantes mostraram-se com fibrose bronquiolocêntrica; um com padrão fibrosante compatível com pneumonia intersticial não específica; por fim, dois casos em que não foi possível enquadrar as áreas de fibrose em qualquer padrão classificável, conforme demonstrado no GRAFICO 8 através de análise de prevalência.

Gráfico 8 – Padrões de fibrose à análise histopatológica da DPI.



^{*} variáveis em que não foi possível a quantificação em alguns dos participantes da pesquisa

[†] sinal do brônguio alongado: ramo brônguico visível, dilatado até periferia

Patologistas experientes analisaram as lâminas das biópsias dos 23 participantes da pesquisa, independentemente do grupo de DPI de interesse que só foi revelado ao final da checagem.

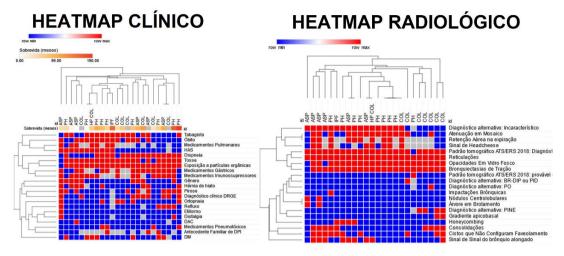
Foi aplicado *checklist* padronizado para leitura da lâmina histológica de cada participante em busca de padrões histopatológicos preditores de fibrose, buscando correlacioná-los com os grupos de DPI em que cada indivíduo foi alocado, posteriormente.

Os resultados encontrados para cada um desses preditores estão descritos na tabela 8, conforme grupo de DPI de interesse. Também foi construído o *heatmap* da da Figura 9 e, também, o *heatmap* da Figura 11, apresentada mais adiante, correlacionando esses dados com o perfil das células dendríticas obtido pela IHC das biópsias pulmonares de cada participante.

Tabela 8 – Achados histomorfológicos encontrados em DPI com fibrose centrada nas vias aéreas.

ACHADO HISTOMORFOLÓGICO	ASP	PH	COL	Р
Area lobular normal (média <u>+</u> DP)*	24,2 <u>+</u> 16,9	16,8 <u>+</u> 15,2	14,2 <u>+</u> 6,7	0,4470
Remodelamento difuso (média +DP)*	51,7 + 23,2	28,2 <u>+</u> 32,3	45 + 20,7	0,2178
Bronquiolocentrico (média + DP)*	20 <u>+</u> 8,9	52,7 <u>+</u> 26,9	38,3 <u>+</u> 17,2	0,0226
PINE-simile (média <u>+</u> erro padrão)*	0,8 <u>+</u> 0,8	2,3 <u>+</u> 1,0	2,5 <u>+</u> 2,5	0,6428
Honeycombing (%)	33	18	33	0,0242
Colapso alveolar subpleural (%)	100	100	100	0,99
Sinal do punho fechado (%)	80	45	67	<0,0001
Ponte em delta (%)	17	64	17	<0,0001
Ponte reta (%)	0	64	50	<0,0001
Dilatações cisticas subpleurais bronquiolar (%)	83	55	100	<0,0001
Dilatação cistica subpleural do saco alveolar (%)	100	100	100	>0,99
Necrose péptica (%)	100	27	83	<0,0001
Fenda de colesterol (%)	83	40	83	<0,0001
Padrão ponta (%)	50	30	33	0,007
Exulceração bronquiolar (%)	83	18	67	<0,0001
Material mucóide eosinofílico (%)	83	73	50	<0,0001
Acúmulo de macrófagos na luz alveolar (%)	17	27	17	0,1277
Neutrófilos na luz (%)	83	18	25	<0,0001
Spillover (%)	67	18	67	<0,0001
Bronquiolização (%)	50	100	67	<0,0001
Muscularização (%)	50	80	50	<0,0001
Agregado linfóide peribronquiolar (%)	100	100	100	0,99
Agregado linfóide subpleural (%)	17	55	83	<0,0001
Eosinófilo (%)	0	21	0	<0,0001
Remodelamento peribronquiolar (%)	99	91	99	0,0024
Metaplasia escamosa imatura (%)	83	55	33	<0,0001
Bronquioloectasia (%)	83	100	100	<0,0001
Tecido mixóide/hialino peribronquiolar (%)	17	18	40	0,0001
Racanalização bronquiolar (%)	0	18	17	0,0002
Obstrução bronquiolar (%)	33	64	50	<0,0001
Tecido Granulação Subepitelial bronquiolar (%)	83	82	50	<0,0001
Hialinizaçao região subepitelial bronquiolar (%)	83	82	100	0,0002
Inflamação região subepitelial bronquiolar (%)	33	73	100	<0,0001
Hialinização perivascular (%)	33	27	100	0,0029
Concreções hialinas irregulares intra alveolares (%)	83	9	33	<0,0001
Concreções hialinas redondas intra alveolares (%)	33	9	17	<0,0001
Células gigantes intra alveolares (%)	75	20	0	<0,0001
Pneumonia organizante topografia bronquiolar (%)	0	0	0	0,99
Pneumonia organizante topografia intra alveolar (%)	0	0	0	0,99
Granuloma frouxo (%)	0	18	0	<0,0001
Granuloma compacto (%)	17	9	0	0,0004
Foco fibroblástico peribronquiolar (%)	75	50	100	<0,0001
Foco fibroblástico sob colapso (%)	50	73	50	0,0007
Ossificação dendriforme peribronquiolar (%)	0	9	14	0,0029
Ossificação dendriforme subpleural (%)	17	27	33	0,0326
Antracose intersticial (%)	67	27	33	<0,0001
Material rendilhado eosinofílico (%)	67	18	67	<0,0001
Estrutura de célula vegetal lentiliforme (%)	33	9	0	<0,0001
Nódulo meningoepitelial (%)	17	18	0	0,0002
Distância de pleura a bronquíolo 1 (média ±DP)**	326 <u>+</u> 140	690 <u>+</u> 434	468 <u>+</u> 185	0,1022
Distância de pleura a bronquíolo 2 (média <u>+</u> DP)**	355 <u>+</u> 89	657 <u>+</u> 121	483 <u>+</u> 97	0,1429
Distância entre os bronquíolos (média <u>+</u> DP)**	1385 <u>+</u> 488	1548 <u>+</u> 850	1094 <u>+</u> 284	0,4195

^(%) prevalência do achado morfológico nos indivíduos de cada grupo * área aferida em m μ^2 ** distância aferida em m μ



HEATMAP PATOLÓGICO

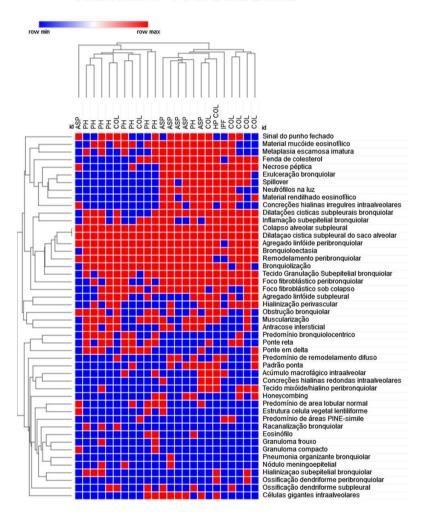


Figura 9 – Heatmaps dos achados clínicos, radiológicos e histomorfológicos relacionados à DPIs. Achados clínicos como dispneia e tosse mostram-se prevalentes agrupando-se no heatmap clínico, entretanto, não formam cluster com PH ou outro grupo de DPI. O mesmo se observa, no heatmap radiológico com headcheese, bronquiectasia de tração e retculações com vidro fosco em mosaico. Algumas áreas de concentração começaram a serem delineadas no heatmap patológico.

5.5 Imunohistoquímica

Minuciosa pesquisa de células dendríticas marcadas pelos imunoreagentes foi realizada em todas as lâminas de biópsia dos participantes da pesquisa após preparação da reação imunohistoquímica e fixação conforme metodologia já descrita neste trabalho.

Vale ressaltar que foi escolhido imunoreagente exclusivo para cada DC de interesse nesta pesquisa e só foram contabilizados os elementos celulares marcados que apresentavam morfologia citoplasmática dendriforme e/ou núcleo grande, ovalado, com nucléolo bem delimitado, conforme o padrão histológico esperado para as DC teciduais. Também foi considerado o contexto histológico em que cada célula foi identificada. DC visualizadas em meio a ambiente necrótico ou áreas de descamação não foram contabilizadas nos resultados. A Figura 10 exemplifica, mais adiante, os resultados obtidos através desta leitura padronizada das lâminas histológicas marcadas pela reação de IHC.

A marcação positiva dos imunoreagentes nos tecidos utilizados como controle por serem ricos em DC confirma a eficácia dos anticorpos escolhidos.

A validação em tecido pulmonar normal (pulmão não neo) demonstra a capacidade dos imunoreagentes escolhidos em identificar linhagens de DC no epitélio e interstício alveolares relacionando-as, também, às estruturas teciduais.

As DC marcadas pelos seus imunoreagentes exclusivos foram agrupadas em 4 tipos: 1º.DC convencional epitelial, BDCA-3+, identificada pela positividade de CLEC9A corrigida pela Langerina; 2º. DC convencional intersticial, BDCA-1+, identificada pela positividade de CD1c; 3º.DC plasmocitárias, BDCA-2+ e BDCA-4+, ambas identificadas pela positividade do TLR9; 4º. DC inflamatórias TNF/iNOS, todas marcadas pela positividade da Manose.

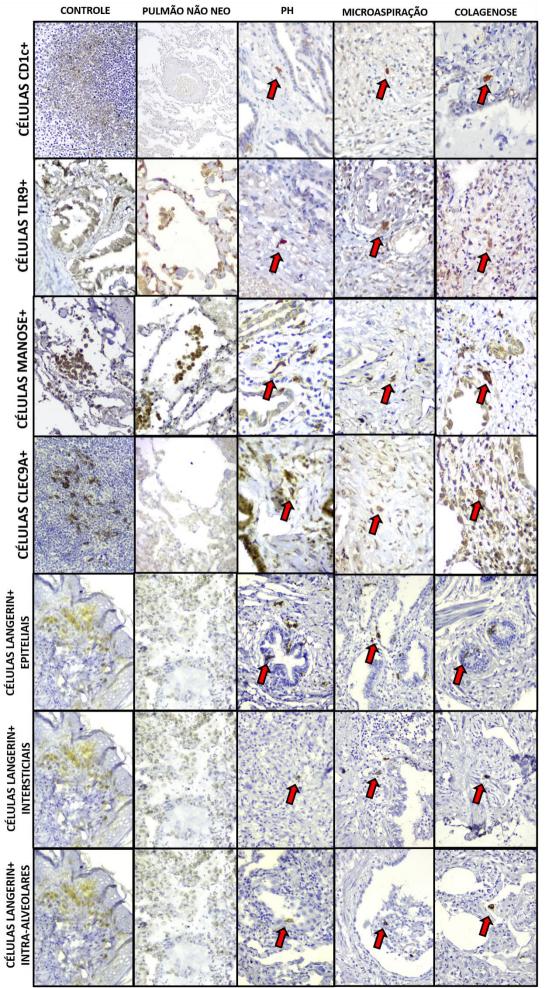


Figura 10 – Painel de IHC confirmando a identificação das linhagens de DC em meio ao microambiente inflamatório da PH. Setas vermelhas apontam elementos celulares com morfologia condizente com DC marcada por anticorpos exclusivos em meio a achados histológicos de resposta inflamatória reparativa e fibrose.

A quantidade de DC encontradas em cada lâmina histológica foi corrigida pela área de tecido amostrado. Para os participantes com mais de uma lâmina por biopsia, foi calculada a média da celularidade corrigida. A partir daí, os participantes foram alocados nos grupos de DPI de interesse e nova média de celularidade foi calculada, para este valor ser representativo, por fim, de cada grupo. A Figura 11 prossegue com a descrição detalhada destes resultados. Além da identificação de cada uma das linhagens de DC como biomarcador individual do grupo PH, optou-se por elaborar, nesta figura, *heatmap* combinando todos os tipos de DC e os casos representantes dos três grupos de DPI de interesse averiguando, assim, potencial aproximação entre marcadores exclusivos de DC e PH.

A Figura 12 combina todos os tipos de DC quantificados para cada um dos integrantes dos três grupos de DPI, como no *heatmap* da figura anterior, acrescentando os achados histopatológicos padronizados.

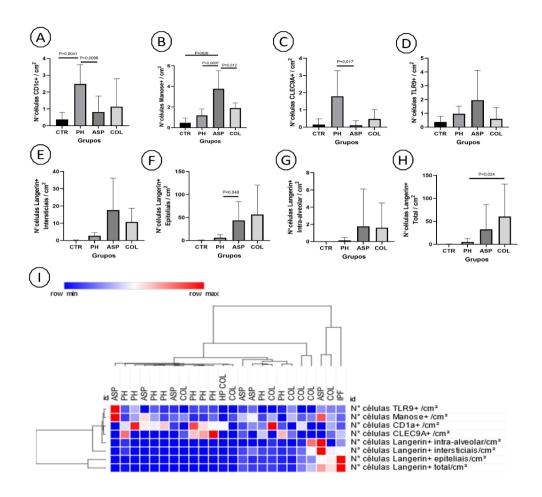


Figura 11 – Perfil de expressão imunofenotípica das células dendríticas. A maior concentração de células ocorre com as linhagens CD1c+ e CLEC9A+ e isto se concentra no *cluster* PH.

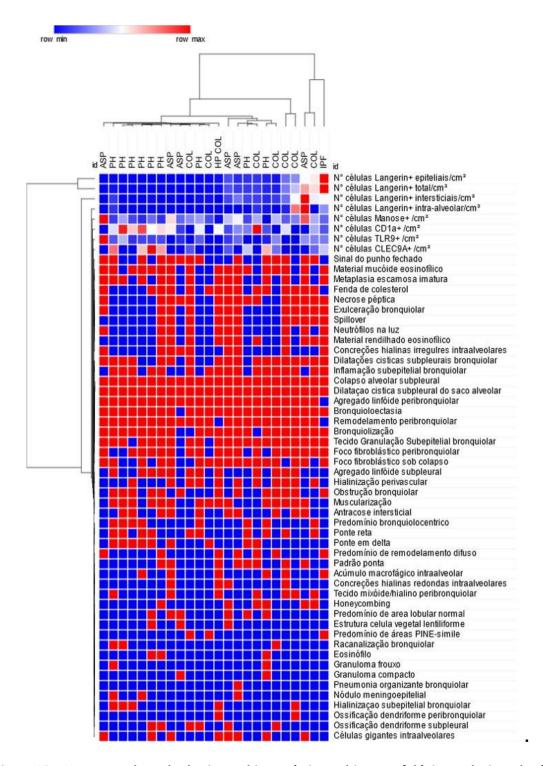


Figura 12 – Heatmaps dos achados imunohistoquímicos e histomorfológicos relacionados à DPIs. As áreas de concentração do *heatmap* patológico formaram *cluster* com a contagem celular das DC, especialmente as linhagens isso predominou no grupo PH, haja vista a maior concentração destes participantes na linha superior.

5.6 Análise de sobrevida

Além de verificar o potencial biomarcador da imunofenotipagem das linhagens de DC para o diagnóstico das formas fibrosantes de PH, também foi analisada a relação entre cada um destes perfis imunofenotípicos de DC e a sobrevida dos três grupos de DPI, com especial atenção à PH. As curvas de sobrevida estão, por fim, representadas, na Figura 13 e 14.

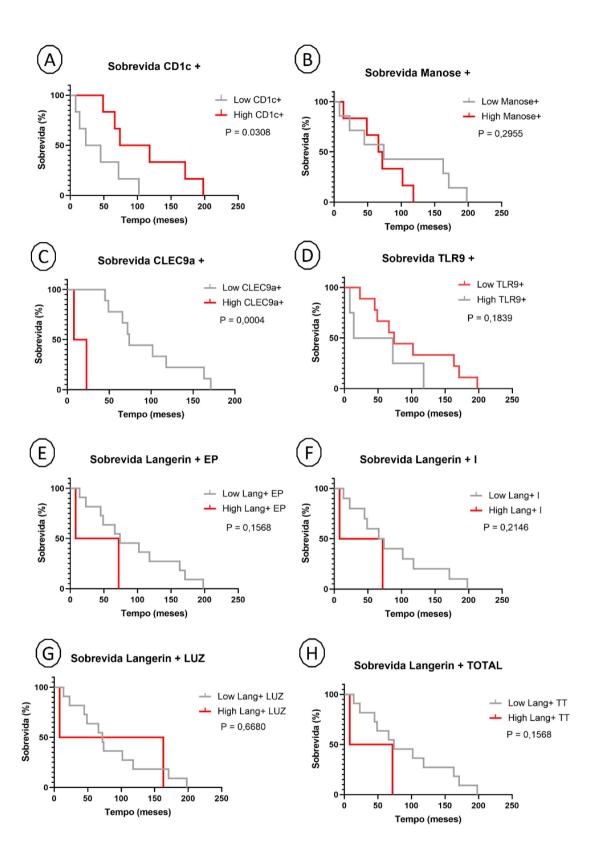


Figura 13 – Sobrevida correlacionada à intensidade de expressão das linhagens de DC. Após IHC, foi possível a contagem do número de células marcadas de cada linhagem de DC, nas lâminas histológicas de todos os participantes da pesquisa. Pelos intervalos dos quartis desta

contagem, foram definidos dois grupos, denominados "DC high e "DC low", para análise de sobrevida. Houve diferença estatisticamente significante na sobrevida entre esses dois grupos na análise da linhagem de DC CD1c+, com aparente fator protetor na presença de alta concentração celular deste tipo de DC. Também houve diferença estatisticamente significante na sobrevida entre esses dois grupos na análise da linhagem de DC CLEC9+ indicando aparente fator risco na presença de alta concentração celular deste tipo de DC, haja vista o encurtamento da sobrevida no grupo.

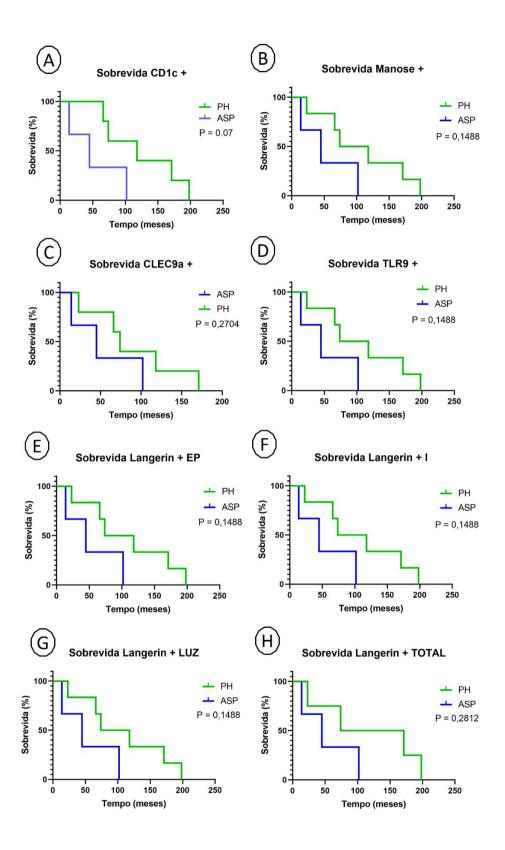


Figura 14 — Sobrevida correlacionada à intensidade de expressão das linhagens de DC dependente da etiologia. Sobrevida entre os grupos PH e ASP. Só houve distanciamento das curvas de sobrevida entre PH e ASP na IHC para a linhagem de DC CD1c+, embora não tenha sido estatisticamente significante.

6. DISCUSSÃO

As DPIs formam grupo heterogêneo de doenças pulmonares que desencadeiam o processo fibrosante no interstício pulmonar. A PH fibrosante, antigamente chamada de crônica, uma das etiologias da DPI, causa o remodelamento do eixo broncovascular e do interstício pulmonar devido a processos fisiopatológicos desencadeados pela interação de antígenos orgânicos inalados e apresentados pelas células dendríticas epiteliais e intersticiais. De forma geral, a rápida definição do diagnóstico etiológico pelos dados clínicos e tomográficos, juntamente com a identificação e eliminação do agente responsável por essa reação, aliado a tratamentos farmacológicos são suficientes para cessar o processo inflamatório característico da PH não fibrosante. Contudo, alguns casos evoluem de forma insidiosa tornando difícil a identificação etiológica da causa, já que os dados clínicos e radiológicos podem se apresentar de maneira inespecífica. Nessas situações, se faz necessária a BPC para tentar auxiliar na busca pelo diagnóstico definitivo. Nela, a avaliação histológica na coloração H&E proporciona a identificação de um padrão de lesão e presença de atributos mais característicos de determinada etiologia. Porém, muitas vezes, todos esses esforços são insuficientes para um diagnóstico preciso, mesmo quando discutidos em reunião multidisciplinar pneumologistas, radiologistas torácicos e patologistas pulmonares, conforme recomenda o guideline da ATS/ERS 2018(88). Dessa forma, este estudo propôs a determinação do perfil imunofenotípico das diferentes DC como um potencial e translacional biomarcador patológico em biopsias pulmonares para diagnóstico prognóstico das expressões clínico-radiológicas da pneumonite de hipersensibilidade.

A nossa população de pacientes estudados foi selecionada dentre todas as nossas biópsias cirúrgicas no período proposto após discussão multidisciplinar e diagnóstico consensual definitivo para as etiologias elencadas. Assim, quanto a análise de dados demográficos e variáveis clínicas, entende-se que a amostra selecionada trouxe para a pesquisa pacientes de idade mais avançada, haja vista que o primeiro quartil é aproximado em 60 anos. Os grupos ASP e PH são os que mais se enquadram nesta observação. Estes dados são concordantes com a casuística do estudo recentemente publicado por Gomes e

colaboradores(89) demonstrando que a prevalência da PH, em sua forma fibrosante, concentra-se nas faixas etárias mais maduras. Concluindo o perfil demográfico da amostra, nota-se no grupo PH, elevadas prevalências de pacientes do sexo feminino e da etnia caucasiana. Estudo com amostra de tamanho semelhante, realizado por Teixeira et al(90), em 2002, encontrou resultado inverso quanto ao sexo dos indivíduos com PH crônica. Entretanto, a publicação de Gomes(89), mais recente, com amostra superior, mostrou prevalência de 73%, assemelhada aos dados desta pesquisa.

Quanto a evolução clínica desses pacientes, foi possível inferir que os participantes dos três grupos da pesquisa apresentavam DPI em fase mais avançada, com intensa limitação funcional, dispnéia progressiva, apesar do uso de corticosteróides de ação sistêmica, em mais da metade dos indivíduos, em todos os grupos. Pacientes com PH relataram a ocorrência de tosse e dispnéia paroxística noturna com maior frequência que os demais grupos. A partir destes fatos, é possível conjecturar que a doença fibrosante dos casos de PH evolui de tal monta que resultou em distorção arquitetural pulmonar relevante, das pequenas vias aéreas até a circulação pulmonar. Recentemente, Dybowska(91) demostrou que valores elevados de pressão sistólica da artéria pulmonar, nos pacientes com PH recém diagnosticada, correlacionavam-se com menores taxas de DLCO(91), exame que se altera precocemente nas pneumopatias intersticiais fibrosantes e mostrou-se com valores decrescentes nos pacientes com PH da tese. Previamente, Koschel já havia constatado, em pacientes com PH, a correlação de sinais ecocardiográficos indicativos de hipertensão pulmonar e redução da função pulmonar e sobrevida(92). Todos estes achados permitem propor que a PH, em sua forma fibrosante, revela-se doença pulmonar crônica, progressiva, refratária a tratamento com corticosteróides, em muitos dos casos, com elevada taxa de complicações respiratórias, até doença da circulação pulmonar.

Outros achados clínicos são frequentemente correlacionados com a evolução natural e a gravidade das DPI fibrosantes bronquiolocêntricas, tais como: baqueteamento digital, uso de fármacos pneumotóxicos e dispepsia. Na amostra deste estudo, estes dados mostraram-se mais prevalentes em certos grupos. Apesar destes resultados serem estatisticamente significantes aos

métodos clássicos de inferência, tais diferenças entre os grupos não se mostraram relevantes quando as variáveis foram combinadas em algoritmo translacional. No *heatmap* clínico, não houve *clusterização* suficiente para considerar uma ou mais delas como marcadores para diagnóstico da causa da DPI, dentre os três grupos comparados no estudo. Também não foi possível relacionar estes achados com o prognóstico em nenhum dos grupos. Os dados clínicos pesquisados, em suma, não foram relevantes para o diagnóstico. Devese contar com a importância desta constatação, uma vez que dados clínicos, juntamente com certos marcadores laboratoriais, compõe um dos alicerces indispensáveis para o diagnóstico etiológico das DPI fibrosantes.

Dentre os exames laboratoriais para diagnóstico da causa da DPI fibrosante, a citologia do LBA por broncoscopia é uma alternativa e está indicada, especialmente nas situações em que o padrão de fibrose é centrado nas vias aéreas, em busca de marcadores laboratoriais com elevado valor preditivo em doenças como a PH. A presença de elevada contagem diferencial de linfócitos tem sido considerada altamente indicativa de PH, conforme reiterou Kouranos, em seu artigo de revisão(93). Na mesma época, em revisão de artigos sobre o perfil linfocítico do LBA de pacientes com PH, Limongi e Fallahi também apontaram que a alta prevalência de linfócitos e suas quimiocinas atrativas têm forte relação com a resposta imune Th1(94) tão relevante na imunopatologia da doença. À análise da celularidade do LBA dos integrantes da amostra deste estudo, um fato chama atenção. A proporção de linfócitos no LBA dos 3 grupos de DPI é bem mais baixa que o esperado e a população linfocitica não foi preponderante nos casos de PH da tese. Houve, por outro lado, elevada proporção de macrófagos fazendo suspeitar que os casos de PH da amostra podem ter mecanismos imunopatológicos alternativos para a fibrogênese, como a reação de hipersensibilidade tipo III.

Além dos dados clínicos e laboratoriais, outro elemento fundamental para o diagnóstico definitivo de toda DPI fibrosante é a avaliação radiológica dirigida aos achados prevalentes em cada causa, iniciando pelos descritores do padrão fibrogênico, capazes de agrupar as intersticiopatias, assim: 1) PIU, pela combinação de achados de tomografia compatíveis com esta patologia, ou outros critérios, insuficientes para conclusão diagnóstica, porém, ao menos,

suportam a PIU como causa mais provável; 2) Fibrose com padrão indeterminado para PIU, entretanto, sem achados tomográficos suficientes para identificação de outra patologia; 3) Fibrose intersticial associada a outros achados tomográficos que são preditores de diagnóstico alternativo, mais provável que a PIU. Neste estudo, os achados tomográficos mostraram-se válidos para afastar o diagnóstico de PIU para as DPI fibrosantes da amostra, condizente com o observado por Salisbury e colaboradores, em pesquisa recente(95). Diante do fato que a amostra foi classificada com padrão tomográfico alternativo à PIU, a pesquisa prosseguiu com a investigação de achados radiológicos sugestivos de fibrose centrada nas vias aéreas, por ser o padrão patológico mais comum na PH, além de um dos seus controles, o grupo ASP. Dentre os achados tomográficos encontrados nas DPI com fibrose centrada nas vias aéreas, alguns como o padrão de três densidades (headcheese sign), o faveolamento, as bronquiectasias de tração e os nódulos centrolobulares fazem parte dos critérios preconizados pelas diretrizes internacionais para diagnóstico da PH fibrosante. Entretanto, na amostra desta pesquisa, tais achados não diferiram entre os grupos. Então, em nosso meio, é possível que a aplicação de tal padronização tenha certa limitação, considerando que nenhum daqueles achados mostrou diferença estatisticamente significante nas análises de correlação entre os grupos que embasaram a tese. Por outro lado, deve-se considerar que a ocorrência da distribuição intralobar axial das lesões prevaleceu no grupo PH mostrando significância estatística. As diretrizes internacionais não destacam este achado, mas a sua relevância para o diagnóstico de doença fibrosante intersticial centrada nas vias aéreas já havia sido relatada em trabalhos como o de Kuranishi e colaboradores(96), assim como aquele desenvolvido por Torres(97). Na amostra desta pesquisa, tal achado radiológico não só se fez presente como, também, mostrou-se mais prevalente nos casos de PH. Outro sinal tomográfico, denominado no checklist como "brônquio alongado" mostrou-se relevante, com resultado promissor na estatística inferencial a favor da sua predominância na PH, porém, ele não se consolidou como marcador radiológico preditivo desta etiologia quando analisado em heatmap juntamente com os demais achados radiológicos. Desta forma, em nosso meio, os achados tomográficos, sozinhos, apesar de selecionarem, de forma confiável, as DPI com padrão de fibrose centrado nas

vias aéreas, mostram-se insuficientes para avançar no diagnóstico definitivo de sua causa.

A análise histopatológica, por sua vez, despontou entre os marcadores convencionais de DPI mostrando diferença estatisticamente significante entre os três grupos, em muitas das variáveis analisadas. Obedecendo aos critérios, valor de P inferior a 0.05, com diferenca marcante para só um dos grupos, os potenciais marcadores morfológicos teciduais foram identificados para cada um. No grupo PH, foram destacados: 1) área de fibrose de padrão bronquiolocêntrico, superior a 50%; 2) ponte em delta; 3) ponte reta; 4) bronquiolização; 5) muscularização; 6) ocorrência de eosinófilos subepiteliais; 7) granuloma frouxo; 8) foco fibroblástico sob colapso, na região subepitelial bronquiolar. Esses achados reforçam uma lesão predominantemente bronquiolocêntrica, o que é considerada por alguns autores como fator determinante para PH fibrosante(98). Ademais, fibrose em ponte foi identificada em 60% dos pacientes diagnosticados com PH no trabalho de Wright e colaboradores (99) assim como 69% dos pacientes de Chiba e colaboradores(100). Já no grupo ASP, outros achados histológicos foram predominantes, como: 1) sinal do punho fechado; 2) material intraluminal basofílico (necrose péptica); 3) fenda de colesterol; 4) exulceração bronquiolar; 5) material mucóide eosinofílico; 6) spillover, 7) metaplasia escamosa imatura; 8) concreções hialinas irregulares intra alveolares; 9) concreções hialinas redondas intra alveolares; 10) material rendilhado eosinofílico; e 11) estrutura de célula vegetal lentiforme. Tais achados são condizentes ao processo de lesão inicial causado pelo conteúdo aspirado alimentar em contato com as células epiteliais bronquiolares. Similarmente, de Carvalho e colaboradores (101) relataram a presença de conteúdo basofílico intraluminal bronquiolar em pacientes com fibrose centrilobular. E por último, os pacientes do grupo COL apresentaram achados únicos em coerência com o seu processo imunopatológico de lesão, como: 1) agregado linfoide subpleural; 2) tecido mixóide/hialino peribronquiolar; 3) hialinização da região subepitelial bronquiolar; inflamação da região subepitelial bronquiolar; 4) hialinização perivascular; 5) foco fibroblástico peribronquiolar; 6) ossificações dendriformes, tanto peribronquiolar quanto subpleural. Da mesma forma, agregado linfoide, considerado um atributo típico em doença pulmonar intersticial relacionada a

colagenoses(102), foi descrito em 41.7% dos pacientes no estudo de Lim et al(103).

Estes três grupamentos de achados começam a delimitar focos de concentração no *heatmap* patológico, mas sem coesão suficiente, *per se*. Quando os perfis imunofenotípicos e a quantificação das linhagens respiratórias de DC são acrescidos ao *heatmap* patológico, finalmente, forma-se o *cluster* de PH concentrando achados histomorfológicos, como bronquiolização, foco fibroblástico sob colapso, muscularização, ponte reta, ponte delta, acrescidos das linhagens de DC CLEC9A+, TLR9+, CD1c+ e Manose+, validando, assim, biomarcador relacionado com a PH nas suas formas crônicas com fibrose centrada nas vias aéreas. Este conjunto de achados pode somar-se a outros já compilados por Smith(104) ampliando o rol de biomarcadores úteis ao diagnóstico de fibrose intersticial centrada nas vias aéreas, especialmente a PH, como causa provável.

O perfil imunofenotípico dos pacientes deste trabalho demostrou que a linhagem de DC predominante na PH foi a BDCA-1, identificada pela positividade do marcador CD1c à IHC, com diferença estatisticamente significante em relação aos demais grupos. No heatmap, esta foi a linhagem de DC que mais se destacou na clusterização sendo apontada, então, como um dos melhores elementos celulares com potencial biomarcador de diagnóstico de PH em amostra de doenças pulmonares intersticiais com fibrose centrada nas vias aéreas. Marchal-Sommé(105) e colaboradores comprovaram, previamente, a migração desta linhagem de DC de locais de reparação epitelial alveolar para o interstício junto a focos fibroblásticos e áreas de hiperplasia alveolar, em modelos de fibrose intersticial com os padrões PIU e PINE, inferindo que estas células, sob regulação de quimiocinas, tanto epiteliais quanto fibroblásticas, são atraídas para o microambiente inflamatório reparativo tecidual e, neste local, expressam mediadores implicados no estímulo fibrogênico persistente. Ao identificar a mesma linhagem de DC, CD1c+, no interstício peribroncovascular inflamado dos participantes com PH, em contagens significantemente maiores que nos demais grupos, esta tese propõe que tal linhagem de DC tem, assim como na PIU, importante papel na progressão da fibrose.

Adicionalmente, a análise de sobrevida propõe a linhagem BDCA-3, marcada pela imunoexpressão de CLEC9A, como principal biomarcador de prognóstico para a PH. A elevada contagem de DC CLEC9A+ relacionou-se à redução da sobrevida nesses pacientes, com valor de P estatisticamente significante. Paradoxalmente, a sobrevida é maior quando a contagem da linhagem BDCA-1/CD1c+ é elevada.

O grupo ASP também mostrou padrão fenotípico diferencial, com biomarcadores de potencial relevância, tanto ao diagnóstico, quanto ao prognóstico. A imunoexpressão da Langerina, à semelhança do ocorrido com TLR9+ e Manose+, mostrou tendência de ser mais prevalente na ASP do que na PH. Este padrão de expressão fenotípica das DC, portanto, apresenta-se como potencial biomarcador para a ASP. Analisando, então, a sobrevida, as elevadas contagens de DC Manose+, TLR9+ e Langerina+ mostraram tendência de associação com menor sobrevida dos integrantes da amostra. Na análise de PH *versus* ASP, este último grupo, sabidamente identificado pelo trio de reagentes em questão, aparenta ser aquele cuja sobrevida sofre maior impacto negativo.

Dentre os marcadores pesquisados, a Langerina foi aquele com maior poder de marcação de DC na IHC. De tal sorte, foi possível a identificação de supgrupos desta linhagem Langerina+. Surpreendentemente, encontramos a imunoexpressão de células dendríticas intra-alveolares Langerina+ com morfologia dendrítica e aspecto não necrótico e não apoptótico, especialmente no grupo de ASP e COL. Ao nosso saber, essa é a primeira descrição de DC viável intra-alveolar, e seu papel fisiopatológico e seu impacto clínico ainda são completamente desconhecidos.

Desta forma, os resultados apresentados revelaram que, apesar de uma detalhada avaliação dos dados clínicos e radiológicos nos pacientes com DPIs, esses achados apresentam-se majoritariamente de maneira homogênea entre os pacientes. Entretanto, a detalhada avaliação histopatológica das BPC apresentou melhor distinção dos atributos entre os grupos, mas ainda com fatores em comum que podem confundir na busca de um diagnóstico preciso. Porém, a avaliação histomorfológica e histomorfométrica da marcação de células dendríticas mostrou-se fundamental para diferenciar os pacientes entre as

etiologias. Dessa forma, perfil imunofenotípico das células dendríticas específicas de cada etiologia tem papel incremental aos parâmetros tradicionalmente aplicados à discussão multiprofissional podendo, então, aumentar o seu poder de determinação de diagnóstico etiológico preciso.

7. CONCLUSÃO

A nosso saber, esse foi o primeiro estudo a caracterizar a imunoexpressão de diversos imunofenótipos de células dendríticas, como inflamatórias, plasmocitárias e hematopóeticas, a qual mostrou-se patente nas DPIs, em especial nas PHs, apesar de sua conhecida focal imunoexpressão pulmonar. As células dendríticas CD1c+, CLEC9A+ e Manose+ foram diferencialmente imunoexpressas entre os grupos PH e ASP, tendo relação impactante com a sobrevida dos pacientes. Além disso, identificamos pela primeira vez, pelo nosso conhecimento, a célula dendrítica intra-alveolar em ASP e COL, de impacto fisiopatológico e clínico ainda desconhecido. Desta forma, a imunoexpressão de células dendríticas mostra-se como promissor biomarcador diagnóstico para diferenciar as etiologias de DPIs bronquiolocêntricas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo do papel das DC, especialmente as linhagens BDCA1+/CD1c+ e BDCA3+/CLEC9A+, no microambiente inflamatório envolvido com a hipersensibilidade e a resposta reparadora fibrosante na PH poderá ser ampliado a partir do transcriptoma e da proteômica para composição de atlas celular e análise de expressão de cada linhagem celular, entendendo melhor o seu papel regulatório/inflamatório nas doenças pulmonares com fibrose intersticial, especialmente centrada nas vias aéreas. Desta forma, nosso grupo continuará com as análises moleculares para fins diagnósticos e prognósticos das DPIs.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1. Gell P, Coombs R. The Clinical Aspects of Immunology. 1963.
- 2. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. Allergy and asthma proceedings. 2019;40(6):470-3.
- 3. Modena BD, Dazy K, White AA. Emerging concepts: mast cell involvement in allergic diseases. Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine. 2016;174:98-121.
- 4. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. Methods in molecular biology. 2006;315:13-34.
- 5. Ebo DG, Clarke RC, Mertes PM, Platt PR, Sabato V, Sadleir PHM. Molecular mechanisms and pathophysiology of perioperative hypersensitivity and anaphylaxis: a narrative review. British journal of anaesthesia. 2019;123(1):e38-e49.
- 6. Gurram RK, Zhu J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. Cellular & molecular immunology. 2019;16(3):225-35.
- 7. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma & Clinical Immunology. 2018;14(2):1-10.
- 8. Drake JR. The immunobiology of ubiquitin-dependent B cell receptor functions. Molecular immunology. 2018;101:146-54.
- 9. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. Nature medicine. 2009;15(4):410-6.
- 10. Liu YJ. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. Advances in immunology. 2009;101:1-25.
- 11. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. European journal of immunology. 2011;41(6):1675-86.
- 12. von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. Nature. 2016;529(7585):221-5.

- 13. Willart MA, Deswarte K, Pouliot P, Braun H, Beyaert R, Lambrecht BN, et al. Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. The Journal of experimental medicine. 2012;209(8):1505-17.
- 14. Kouzaki H, O'Grady SM, Lawrence CB, Kita H. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. Journal of immunology. 2009;183(2):1427-34.
- 15. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. Nature. 2010;464(7293):1367-70.
- 16. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(25):11489-94.
- 17. Zook EC, Kee BL. Development of innate lymphoid cells. Nature immunology. 2016;17(7):775-82.
- 18. Halim TY, Steer CA, Matha L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. Immunity. 2014;40(3):425-35.
- 19. Halim TY, Hwang YY, Scanlon ST, Zaghouani H, Garbi N, Fallon PG, et al. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. Nature immunology. 2016;17(1):57-64.
- 20. Denney L, Byrne AJ, Shea TJ, Buckley JS, Pease JE, Herledan GM, et al. Pulmonary Epithelial Cell-Derived Cytokine TGF-beta1 Is a Critical Cofactor for Enhanced Innate Lymphoid Cell Function. Immunity. 2015;43(5):945-58.
- 21. Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. Immunity. 2015;42(2):216-26.
- 22. Cook PC, MacDonald AS, editors. Dendritic cells in lung immunopathology. Seminars in immunopathology; 2016: Springer.
- 23. Eckl-Dorna J, Villazala-Merino S, Campion NJ, Byazrova M, Filatov A, Kudlay D, et al. Tracing IgE-producing cells in allergic patients. Cells. 2019;8(9):994.

- 24. Solano-Galvez SG, Tovar-Torres SM, Tron-Gomez MS, Weiser-Smeke AE, Alvarez-Hernandez DA, Franyuti-Kelly GA, et al. Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease. Medical sciences. 2018;6(4).
- 25. Sforza GGR, Marinou A. Hypersensitivity pneumonitis: a complex lung disease. Clinical and Molecular Allergy. 2017;15(1):1-8.
- 26. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. The Journal of experimental medicine. 1974;139(6):1431-45.
- 27. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. The Journal of experimental medicine. 1974;139(2):380-97.
- 28. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. The Journal of experimental medicine. 1973;137(5):1142-62.
- 29. Agache IO, Rogozea L. Management of hypersensivity pneumonitis. Clinical and translational allergy. 2013;3(1):5.
- 30. Blanchet MR, Bennett JL, Gold MJ, Levantini E, Tenen DG, Girard M, et al. CD34 is required for dendritic cell trafficking and pathology in murine hypersensitivity pneumonitis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184(6):687-98.
- 31. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. Science. 2007;315(5808):107-11.
- 32. Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2005;32(3):177-84.
- 33. Persson EK, Uronen-Hansson H, Semmrich M, Rivollier A, Hagerbrand K, Marsal J, et al. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. Immunity. 2013;38(5):958-69.
- 34. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. Immunity. 2013;38(5):970-83.
- 35. Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, et al. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. Nature communications. 2013;4:2990.

- 36. Gao Y, Nish SA, Jiang R, Hou L, Licona-Limon P, Weinstein JS, et al. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. Immunity. 2013;39(4):722-32.
- 37. Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by Toxoplasma gondii tachyzoites. Immunity. 2011;35(2):249-59.
- 38. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science. 1993;260(5107):547-9.
- 39. Baldi BG, Pereira CAdC, Rubin AS, Santana ANdC, Costa AN, Carvalho CRR, et al. Destaques das diretrizes de doenças pulmonares intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2012;38:282-91.
- 40. Soares MR, Pereira CAC, Botelho A, Gimenez A, Beraldo B, Ferraz C, et al. Multicenter Registry of Interstitial Lung Diseases in Brazil. Eur Respiratory Soc; 2019.
- 41. Thomeer MJ, Costabe U, Rizzato G, Poletti V, Demedts M. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. The European respiratory journal Supplement. 2001;32:114s-8s.
- 42. Elicker B, Pereira CAdC, Webb R, Leslie KO. Padrões tomográficos das doenças intersticiais pulmonares difusas com correlação clínica e patológica. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2008;34(9):715-44.
- 43. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(6):733-48.
- 44. Selman M, Pardo A, King TE, Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(4):314-24.
- 45. Dias OM, Baldi BG, Costa AN. Pneumonite de Hipersensibilidade Crônica. Pulmão RJ. 2013;22(1):20-5.

- 46. Wang P, Xu Z-j, Xu W-b, Shi J-h, Tian X-l, Feng R-e, et al. Clinical features and prognosis in 21 patients with extrinsic allergic alveolitis. Chinese Medical Sciences Journal. 2009;24(4):202-7.
- 47. Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. Chest. 2012;142(1):208-17.
- 48. Araiza MT, Aguilar Leon DE, Retana VN, Martinez-Cordero E. IgM, IgG, and IgA rheumatoid factors in pigeon hypersensitivity pneumonitis. Journal of clinical laboratory analysis. 2007;21(5):315-21.
- 49. Yamasaki H, Ando M, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. Journal of immunology. 1999;163(6):3516-23.
- 50. Hunninghake GW, Garrett KC, Richerson HB, Fantone JC, Ward PA, Rennard SI, et al. Pathogenesis of the granulomatous lung diseases. The American review of respiratory disease. 1984;130(3):476-96.
- 51. Fink JN, Moore VL, Barboriak JJ. Cell-mediated hypersensitivity in pigeon breeders. International Archives of Allergy and Immunology. 1975;49(6):831-6.
- 52. Sharma OP, Fujimura N. Hypersensitivity pneumonitis: a noninfectious granulomatosis. Seminars in respiratory infections. 1995;10(2):96-106.
- 53. Barrera L, Mendoza F, Zuniga J, Estrada A, Zamora AC, Melendro EI, et al. Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177(1):44-55.
- 54. Aquino-Galvez A, Camarena A, Montano M, Juarez A, Zamora AC, Gonzalez-Avila G, et al. Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis. Experimental and molecular pathology. 2008;84(2):173-7.
- 55. Camarena A, Aquino-Galvez A, Falfan-Valencia R, Sanchez G, Montano M, Ramos C, et al. PSMB8 (LMP7) but not PSMB9 (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. Respir Med. 2010;104(6):889-94.
- 56. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. Annual review of immunology. 2013;31:563-604.
- 57. GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. Mucosal immunology. 2008;1(6):442-50.

- 58. Van Rhijn I, Ly D, Moody DB. CD1a, CD1b, and CD1c in immunity against mycobacteria. Advances in experimental medicine and biology. 2013;783:181-97.
- 59. Mittag D, Proietto AI, Loudovaris T, Mannering SI, Vremec D, Shortman K, et al. Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. Journal of immunology. 2011;186(11):6207-17.
- 60. Ribeiro LSdC, Santana TJA, Reis AN, Silveira GHCF, Côrrea RdA, Mancuzo EV. Características clínicas, funcionais e sobrevida dos pacientes com pneumonia de hipersensibilidade do Ambulatório de Doenças Pulmonares Intersticiais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). 2018.
- 61. Raghu G, Remy-Jardin M, Ryerson CJ, Myers JL, Kreuter M, Vasakova M, et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2020;202(3):e36-e69.
- 62. Berezowska S. [Fibrotic hypersensitivity pneumonia: focus on pathology-relevant aspects of the new ATS/JRS/ALAT clinical guideline for the diagnosis of hypersensitivity pneumonia in adults]. Der Pathologe. 2021;42(1):48-54.
- 63. Denis M, Ghadirian E. Transforming growth factor-beta is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen synthesis. American journal of respiratory cell and molecular biology. 1992;7(2):156-60.
- 64. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. The Journal of pathology. 2008;214(2):199-210.
- 65. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AK, Diaz del Valle F, Born WK, et al. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. Journal of immunology. 2009;182(1):657-65.
- 66. Kolb M, Vasakova M. The natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases. Respir Res. 2019;20(1):57.
- 67. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity. 2006;24(2):179-89.

- 68. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441(7090):235-8.
- 69. Simonian PL, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. Gammadelta T cells and Th17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine. 2009;154(5):222-7.
- 70. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nature reviews Immunology. 2004;4(8):583-94.
- 71. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. Journal of hepatology. 1995;23(3):307-17.
- 72. Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, Phipps RP. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. Journal of immunology. 1994;152(7):3606-14.
- 73. Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. Journal of immunology. 2001;166(8):5219-24.
- 74. Jakubzick C, Choi ES, Kunkel SL, Joshi BH, Puri RK, Hogaboam CM. Impact of interleukin-13 responsiveness on the synthetic and proliferative properties of Th1- and Th2-type pulmonary granuloma fibroblasts. Am J Pathol. 2003;162(5):1475-86.
- 75. Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Chen Q, Homer RJ, et al. Cytokine regulation of IL-13Ralpha2 and IL-13Ralpha1 in vivo and in vitro. The Journal of allergy and clinical immunology. 2003;111(4):720-8.
- 76. Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad ME, et al. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. The Journal of experimental medicine. 2003;197(6):687-701.
- 77. Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, et al. Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and-12 in IL-13—

- induced inflammation and remodeling. The Journal of clinical investigation. 2002;110(4):463-74.
- 78. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). The Journal of experimental medicine. 2001;194(6):809-21.
- 79. Vroman H, van den Blink B, Kool M. Mode of dendritic cell activation: the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? Immunobiology. 2015;220(2):254-61.
- 80. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. Immunity. 2003;19(1):59-70.
- 81. Stanojevic S, Graham BL, Cooper BG, Thompson BR, Carter KW, Francis RW, et al. Official ERS technical standards: Global Lung Function Initiative reference values for the carbon monoxide transfer factor for Caucasians. Eur Respir J. 2017;50(3).
- 82. Pereira C, Viegas C, Alves R. Capacidade de difusão do monóxido de carbono. J Pneumol. 2002;28(Supl 3):S122-S38.
- 83. Arcadu A, Byrne SC, Pirina P, Hartman TE, Bartholmai BJ, Moua T. Correlation of pulmonary function and usual interstitial pneumonia computed tomography patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Med. 2017;129:152-7.
- 84. Neder JA, Andreoni S, Lerario MC, Nery LE. Reference values for lung function tests: II. Maximal respiratory pressures and voluntary ventilation. Brazilian journal of medical and biological research. 1999;32:719-27.
- 85. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? Eur Respir J. 2011;38(4):761-9.
- 86. Yan Z, Wu Y, Du J, Li G, Wang S, Cao W, et al. A novel peptide targeting Clec9a on dendritic cell for cancer immunotherapy. Oncotarget. 2016;7(26):40437-50.
- 87. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, Structure AEJTFoQAoL. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181(4):394-418.

- 88. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med. 2018;198(5):e44-e68.
- 89. Gomes PS, Soares MR, Marchenta MFML, Meirelles GdSP, Ferreira RG, Botelho AB, et al. Carbohydrate antigen 15-3 as a marker of disease severity in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2021;47.
- 90. TEIXEIRA MDF, AMPARO D, ASSIS PGD, LAZZARINI-DE-OLIVEIRA LC. Pneumonia de hipersensibilidade crônica: análise de oito casos e revisão da literatura. Jornal de Pneumologia. 2002;28:167-.
- 91. Dybowska M, Baranska I, Franczuk M, Skoczylas A, Szturmowicz M. Echocardiographic signs of pulmonary hypertension in patients with newly recognized hypersensitivity pneumonitis, prevalence and clinical predictors. Journal of thoracic disease. 2021;13(7):3988-97.
- 92. Koschel DS, Cardoso C, Wiedemann B, Hoffken G, Halank M. Pulmonary hypertension in chronic hypersensitivity pneumonitis. Lung. 2012;190(3):295-302.
- 93. Kouranos V, Jacob J, Nicholson A, Renzoni E. Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis: Key Issues in Diagnosis and Management. Journal of clinical medicine. 2017;6(6).
- 94. Limongi F, Fallahi P. Hypersensitivity pneumonitis and alpha-chemokines. La Clinica terapeutica. 2017;168(2):e140-e5.
- 95. Salisbury ML, Gu T, Murray S, Gross BH, Chughtai A, Sayyouh M, et al. Hypersensitivity Pneumonitis: Radiologic Phenotypes Are Associated With Distinct Survival Time and Pulmonary Function Trajectory. Chest. 2019;155(4):699-711.
- 96. Kuranishi LT, Leslie KO, Ferreira RG, Coletta EA, Storrer KM, Soares MR, et al. Airway-centered interstitial fibrosis: etiology, clinical findings and prognosis. Respir Res. 2015;16:55.
- 97. Torres PPT, Rabahi MF, Moreira MAdC, Escuissato DL, Meirelles GdSP, Marchiori E. Importância da TCAR de tórax na avaliação de pneumopatias intersticiais fibrosantes. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2021;47.
- 98. Churg A, Ryerson CJ, Wright JL. Fibroblast Foci and Patchy Fibrosis Do Not Separate Usual Interstitial Pneumonia From Fibrotic Hypersensitivity

- Pneumonitis in Transbronchial Cryobiopsies. Archives of pathology & laboratory medicine. 2021;145(11):1325-6.
- 99. Wright JL, Churg A, Hague CJ, Wong A, Ryerson CJ. Pathologic separation of idiopathic pulmonary fibrosis from fibrotic hypersensitivity pneumonitis. Modern Pathology. 2020;33(4):616-25.
- 100. Chiba S, Tsuchiya K, Akashi T, Ishizuka M, Okamoto T, Furusawa H, et al. Chronic Hypersensitivity Pneumonitis With a Usual Interstitial Pneumonia-Like Pattern: Correlation Between Histopathologic and Clinical Findings. Chest. 2016;149(6):1473-81.
- 101. de Carvalho ME, Kairalla RA, Capelozzi VL, Deheinzelin D, do Nascimento Saldiva PH, de Carvalho CR. Centrilobular fibrosis: a novel histological pattern of idiopathic interstitial pneumonia. Pathol Res Pract. 2002;198(9):577-83.
- 102. Fischer A, Antoniou KM, Brown KK, Cadranel J, Corte TJ, du Bois RM, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. Eur Respir J. 2015;46(4):976-87.
- 103. Lim JU, Gil BM, Kang HS, Oh J, Kim YH, Kwon SS. Interstitial pneumonia with autoimmune features show better survival and less exacerbations compared to idiopathic pulmonary fibrosis. BMC pulmonary medicine. 2019;19(1):120.
- 104. Smith ML. Update on Pulmonary Fibrosis: Not All Fibrosis Is Created Equally. Archives of pathology & laboratory medicine. 2016;140(3):221-9.
- 105. Marchal-Somme J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Kambouchner M, Valeyre D, Crestani B, et al. Dendritic cells accumulate in human fibrotic interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176(10):1007-14.

10. ANEXO

Registro na Plataforma Brasil com o CAAE número 41736821.8.0000.5440 e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Instituição, CEP HCRP-FMRP-USP



USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Perfii das Células Dendriticas Pulmonares como Polencial Biomarcador de Pneumonite

de Hipersensibilidade: Um Estudo Translacional e Multidisciplinar

Peaguisador: ALEXANDRE TODOROVIC FABRO

Area Temática: Versão: 1

CAAE: 41736821.8.0000.5440

instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4,531,364

Apresentação do Projeto:

A preumonite de hipersensibilidade é prevalente entre as doenças pulmonares intensiciais sendo desencadeada por reações de hipersensibilidade dos tipos III e IV em resposta à inalação de agentes ambientais diversos, com a formação de granulomas e, por vezes, fibrose pulmonar. Padrões específicos de resposta linfocitária estão relacionados às formas crônicas da doença e acredita-se haver relação da sua evolução com o perfil de imunoexpressão das células dendiríticas do epitélio respiratório

Objetivo da Pesquisa:

Determinar o potencial biomarcador do perfil de células dendriticas em biópsias pulmonares cirúrgicas de pacientes com diagnóstico de PH confirmado após discussão multidisciplinar.

Avallação dos Riscos e Beneficios:

Beneficios: Com este protejo, espera-se obter DC com elevados índices de expressão de fenótipos relacionados às reações de hipersensibilidade e perfis de resposta Th1 e Th17; e maiores indices de expressão fenotipica das DC nos casos de PH com pior prognóstico radiológico e/ou funcional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pretende-se analisar fragmentos de tecido pulmonar fixados em formalina e incluídos em parafina de 60 biópsias pulmonares cirórgicas entre os

anos de 2016 e 2020 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Barro: MONTE ALEGRE CEI*: 14.048-900

UF: SP Municipio: RIBEIRAD PRETO

Talefone: [15]2802-2225 Fax: [15]2823-1144 E-mail: cep@hcrp.uap.br

Pártina O1 de O5



USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4,531,384

Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP) daqueles

pacientes com diagnóstico de PH confirmado após discussão multidisciplinar. O projeto será submetido à apreciação do comitê de ética em pesquisa

envolvendo seres humanos da Instituição. Será solicitada a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esciarecido pela

indisponibilidade de meios de contato de parte dos pacientes e o óbito de outros.O desenho do estudo será dividido em 3 passos: 1) estudo

imunohistoquímico (IHC) das células dendifiticas no tecido pulmonar de pacientes com PH; 2) análise do microambiente inflamatório pulmonar por histoquímica e morfometria; 3) revisão de dados clínicos de prontuário para definição do quadro clínico-radiológico e correlação com potenciais biomarcadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Realizaremos um estudo retrospectivo no qual serão utilizadas amostras pulmonares obtidas através da biópsia pulmonar cirúrgica de rotina sob responsabilidade do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (SERPAT-HCFMRP/USP). A obtenção atual do consentimento dos pacientes para utilização dessas amostras será inviável, pois não houve prévio relacionamento entre o proponente do presente projeto de pesquisa e os pacientes e/ou familiares.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a soicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE CEI": 14.048-900

UF: SP Municipio: RIZEIRAD PRETO



USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE « MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Paracar: 4,531,284

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
imormações Basicas do Projeto	PB_INFORMAÇOES_BASICAS_DO_PT ROJETO_1669288.pdf	05/01/2021 23:45:44		Aceito
Declaração de concordância	2021_01_05_UPC.pdf	05/01/2021 23:44:56	ALEXANDRE TODOROVIC	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO1_ASSINADO.pdf	05/D1/2021 23:44:12	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Folha de Rosto	2020_11_27_FolhaDeRosto.pdf	05/01/2021 23:43:41	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2021_01_05_Project_Dendritic_Cell.pdf	05/D1/2021 23:43:30	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 09 de Fevereiro de 2021

Assinado por: MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA (Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE
Uh: SP Municipio: RISEIRAD PRETO CEI*: 14.048-900

Telefone: [16]2802-2228 Pax: [15]2533-1144 b-mail: ceg@horg.usg.br

Página 03 de 05