

Lígia Pelosi Mendonça

**Alterações morfológicas das pequenas vias aéreas
associadas ao comprometimento funcional na
linfangioleiomiomatose**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Dolhnikoff

**São Paulo
2023**

Lígia Pelosi Mendonça

**Alterações morfológicas das pequenas vias aéreas
associadas ao comprometimento funcional na
linfangioleiomiomatose**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Dolhnikoff

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mendonça, Lígia Pelosi

Alterações morfológicas das pequenas vias aéreas associadas ao comprometimento funcional na linfangioleiomiomatose / Lígia Pelosi Mendonça. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Patologia.

Orientadora: Marisa Dolhnikoff.

Descritores: 1.Linfangioleiomiomatose
2.Remodelamento da vias aéreas 3.Testes de função respiratória 4.Escore histológico de LAM

USP/FM/DBD-225/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A **Deus**, pelo dom da vida e por não me julgar como exigem as minhas faltas. Por me fazer sentir escolhida e protegida, colocando-me no lugar certo, na hora certa. Ao que muitos chamam de sorte, eu prefiro acreditar no cuidado de Deus comigo.

Ao meu marido **Arthur**, esteio ao qual fei anseios e angústias. Sem seu amparo a realização deste trabalho não seria possível. Obrigada por todo o suporte emocional nestes tempos de notáveis mudanças. Meu confidente e fiel escudeiro, o melhor presente que Deus poderia me conceder. Te amo!

À minha mãe **Vânia Pelosi**, por me enxergar com olhos de bondade, melhor do que eu realmente sou. Fonte inesgotável de amor, à qual eu recorro nos momentos mais difíceis. Você foi minha primeira e melhor professora, é a maior fonte de inspiração que eu pude ter até hoje.

À minha irmã **Loren**, sempre leal nas tribulações. Dedico este trabalho a você especialmente por estar constantemente presente, sobretudo nos meus momentos de ausência da família, cuidando de minha casa e meus filhos caninos.

Agradecimientos

À **Deus**, autor e consumidor de minha vida, por me permitir viver, aprender e amadurecer com essa grande experiência, dando-me tudo o que foi necessário para prosseguir e colocando em meu caminho pessoas de extremo valor.

À **professora Marisa Dolhnikoff**, minha orientadora e exemplo de profissional que, notoriamente, entrega seu melhor em benefício da ciência. Grande entusiasta e idealizadora de projetos como este, com o objetivo de plantar mudanças na vida de pessoas afetadas pela doença. Obrigada por confiar em mim e pela oportunidade ímpar de aprender com a senhora.

Aos amigos **Leonardo Liberti** e **professor Edson Liberti**, por quem cultivo profunda admiração. Estiveram presentes em momentos decisivos de minha caminhada e acreditaram em mim desde o início, tudo começou através deles. Muito obrigada!

À **Universidade de São Paulo**, especialmente à **Faculdade de Medicina**, pela grandeza e imensurável contribuição para o avanço da pesquisa científica no Brasil e no mundo, e pelo generoso acolhimento.

À **Natália Xavier**, gentil, solícita e competente auxiliadora em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, sem sua ajuda a caminhada, com certeza, seria mais árdua.

À **Drª. Ellen Nascimento. e Dr. Bruno Baldi**, pela generosa contribuição dada para a concretização desta tese, e gentileza com que sempre me ajudaram.

À **Drª Thais Mauad, Dr. Luiz Fernando, Bruna, Kátia, Sônia** e todos que sempre me receberam tão bem e trataram com cordialidade e confiança dentro do laboratório.

Às funcionárias da FMUSP **Ângela, Kely e toda equipe** dos laboratórios de imunohistoquímica e histopatologia do departamento de Patologia da FMUSP, pela ajuda e presteza no processamento dos materiais.

Aos professores examinadores na banca de qualificação: **Dr. Luiz Fernando Ferraz, Dra. Elnara Márcia Negri e Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci** pelas sugestões para o aprimoramento da tese.

Aos funcionários da FMUSP, especialmente ao **Thiago Rezende**, pelo empenho e solicitude em me auxiliar desde o início.

Ao **Centro Universitário de Formiga – UNIFOR-MG**, instituição que tenho extremo apreço, pela constante formação pessoal e profissional, me deu condições de sonhar com voos mais altos. E especialmente ao Coordenador **Wellerson Costa Faria** pela compreensão e apoio durante esta caminhada.

À **Prefeitura Municipal de Pains-MG**, por fornecer a dispensa necessária de minhas atividades profissionais para que fosse possível a concretização da pós-graduação.

À coordenação de pós-graduação do programa de Patologia da FMUSP, principalmente à **Prof^a. Dr^a Thais Mauad**, e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do processo 88882.376527/2019-01, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) através do processo 401825/2020-5, pelo suporte técnico e financeiro.

Aos **examinadores** da banca de defesa desta tese por prontamente aceitarem o convite, se disponibilizarem e estarem presentes neste momento tão importante.

Epígrafe

"As palavras dos sábios são como agulhões, a coleção dos seus ditos como pregos bem fixados, provenientes do único Pastor. Cuidado, meu filho; nada acrescente a eles.

Não há limite para a produção de livros, e estudar demais deixa exausto o corpo.

Agora que já se ouviu tudo, aqui está a conclusão:

Tema a Deus e obedeça aos seus mandamentos, porque isso é o essencial para o homem. Pois Deus trará a julgamento tudo o que foi feito, inclusive tudo o que está escondido, seja bom, seja mau."

Eclesiastes 12:11-14 NVI

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

	Lista de abreviaturas e siglas	
	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	6
2.1	Objetivo primário.....	6
2.2	Objetivos secundários.....	6
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1	História e progressão da doença.....	9
3.2	A célula LAM.....	9
3.3	Quadro clínico na LAM.....	10
3.4	Linfangiogênese.....	11
3.5	Alterações histológicas da LAM.....	12
3.6	Caracterização funcional da LAM.....	14
3.7	<i>Transforming growth factor beta (TGFβ)</i>	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1	Delineamento do Estudo.....	18
4.2	Crítérios de inclusão.....	18
4.3	Crítérios de exclusão.....	19
4.4	Teste de função pulmonar.....	19
4.5	Escore Histológico de LAM (EHL).....	20
4.6	Análise morfométrica.....	20
4.7	Análise estatística.....	21
5	RESULTADOS.....	23
6	DISCUSSÃO.....	33
7	CONCLUSÃO.....	38
8	ANEXOS.....	40
	Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP.....	41
	Anexo B – Tabela 1 - Resultados das comparações das dos grupos LAM e controle em relação às variáveis morfológicas, utilizando a subdivisão por grupos de tamanho de vias aéreas.....	45
	Anexo C – Tabela 1 - Resultados das correlações entre o EHL e as variáveis morfológicas e funcionais do grupo LAM.....	46
	Anexo D – Tabela 1 - Resultados das correlações entre os parâmetros da PFP e as variáveis morfológicas do grupo LAM.....	47
9	REFERÊNCIAS.....	49

Listas

AML	Actina do músculo liso
MB	Membrana basal
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEP-FMUSP	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
CPT	Capacidade pulmonar total
CVF	Capacidade vital forçada
DLCO	Capacidade de difusão do monóxido de carbono
dp	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Dr.	Doutor
EHL	Escore Histológico de LAM
ET	Esclerose tuberosa
Et al	E outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HMB-45	<i>Human melanoma black</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
IH	Imuno-histoquímica
InCor	Instituto do Coração
L	Litro
LAM	Linfangioleiomiomatose
LAM-E	LAM esporádica
LAM-ET	LAM relacionada ao complexo da esclerose tuberosa
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitros
mL/min/mmHg	Mililitros por minuto por milímetros de mercúrio
mm	milímetros
MMP	Metaloproteinase
n	Número da amostra
p	Número da amostra
PFP	Prova de função pulmonar
R	Raio
SVOC	Serviço de Verificação de Óbito da Capital
TC	Tomografia computadorizada
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
μm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
VA	Via aéreas
VEF1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
VEGF-R	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VR	Volume residual
%	Porcentagem
\pm	Desvio padrão
< >	Menor que, maior que
$\leq \geq$	Menor ou igual a que, maior ou igual a que
vs	<i>Versus</i>

Figura 1	Fotomicrografias representativas de biópsias de pacientes com LAM (coloração H&E). Imagens evidenciam distribuição de cistos e nódulos característicos da patologia. A: Setas indicam nódulos formados pelas células LAM (5x). B: Seta indica presença de cisto no parênquima pulmonar (7x).....	13
Figura 2	Representação gráfica de (A) índice de fechamento de pequenas vias aéreas; (B) proporção de músculo liso das vias aéreas; (C) proporção de colágeno das vias aéreas; e (D) expressão de TGF- β epitelial das vias aéreas nos grupos LAM e controle.....	27
Figura 3	Fotomicrografias representativas das pequenas vias aéreas no grupo controle (A, C, E) e pacientes com LAM (B, D, F). A e B: Expressão epitelial de TGF- β ; C e D: Proporção de colágeno na coloração Sirius Red. E e F: proporção de músculo liso na imunocoloração AML.....	28
Figura 4	Representação gráfica das comparações morfológicas entre grupos mais e menos graves no parâmetro VEF1 (%predito) e no EHL. Índice de fechamento da via aérea(A,B); proporção de colágeno das vias aéreas (C,D); proporção de músculo liso das vias aéreas (E,F); expressão de TGF- β epitelial das vias aéreas. (G,H).....	29
Figura 5	Representação gráfica da espessura da via aérea. Comparação entre os casos mais e menos graves de LAM do ponto de vista funcional (A) e segundo o escore histológico (B).....	30
Figura 6	A: Imagem representativa da destruição cística do parênquima pulmonar na LAM (imunocoloração AML); B: Maior aumento de cisto pulmonar peribronquiolar (*) observado no painel A, com nódulo proliferativo típico (seta) contendo células LAM AML positivas; C: Fotomicrografia da mesma lesão cística contendo células LAM HMB-45 positivas (seta); D: Fotomicrografia de pequena via aérea com infiltrado de células inflamatórias; E: Fotomicrografia de infiltração de pequenas vias aéreas por células LAM.....	32

Tabela 1	Dados clínicos, funcionais e EHL de pacientes com LAM.....	24
Tabela 2	Dados das subclassificações de tamanho de VAs nos grupos LAM e controle.....	26
Figura 3	Correlações significativas entre variáveis funcionais e morfológicas em pacientes com LAM.....	31

Resumo

Mendonça LP. *Alterações morfológicas das pequenas vias aéreas associadas ao comprometimento funcional na linfangioleiomiomatose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A linfangioleiomiomatose (LAM) é uma doença pulmonar rara, neoplásica e cística, caracterizada pela proliferação anormal das chamadas células LAM. Apesar do padrão funcional obstrutivo observado na maioria dos pacientes com LAM, poucos estudos investigaram as alterações morfológicas das pequenas vias aéreas que podem estar associadas à doença. O presente estudo teve como objetivo caracterizar as alterações morfológicas das pequenas vias aéreas em pacientes com LAM de diferentes gravidades em relação aos controles, e sua associação com variáveis funcionais e com o Escore Histológico de LAM (EHL). Foram avaliadas 39 mulheres com LAM submetidas a biópsia pulmonar aberta ou transplante pulmonar e nove controles que morreram de doenças não pulmonares. Foram analisados os dados clínicos e as variáveis obtidas nas provas de função pulmonar (PFP). A gravidade histológica da doença foi avaliada como EHL e graduada em escores de 1 a 3, como segue: EHL-1, <25%; EHL-2, 25% a 50% (EHL-1 e EHL-2: menos graves); e EHL-3, >50% de envolvimento pulmonar (mais grave). Os seguintes parâmetros foram obtidos na análise morfométrica: espessura das vias aéreas, índice de fechamento das vias aéreas, proporção de colágeno e músculo liso das vias aéreas, expressão epitelial de TGF- β das vias aéreas e infiltração de células LAM e células inflamatórias nas paredes das pequenas vias aéreas. Essas variáveis foram comparadas com controles e correlacionadas entre si. A idade dos pacientes com LAM foi de 39 ± 8 anos, com VEF1 e DLCO de $62 \pm 30\%$ previsto e $62 \pm 32\%$ previsto, respectivamente. Pacientes com LAM apresentaram aumento do índice de fechamento das pequenas vias aéreas, proporção de colágeno e músculo liso e expressão epitelial de TGF- β em comparação com os controles. Pacientes com LAM com EHL mais grave e com maior gravidade funcional (VEF1 $\leq 30\%$) apresentaram maior espessura das vias aéreas. Inflamação bronquiolar leve ou ausente foi observada na maioria das vias aéreas; a infiltração da parede das pequenas vias aéreas por células LAM foi um achado raro. O EHL foi associado ao padrão obstrutivo, aprisionamento aéreo e redução da DLCO, enquanto a espessura da parede das pequenas vias aéreas foi associada ao VEF1, CVF e proporção de colágeno. Foi concluído que a LAM está associada ao remodelamento e fechamento parcial das pequenas vias aéreas, com alterações estruturais observadas em diferentes compartimentos. O comprometimento funcional na LAM está associado ao remodelamento das vias aéreas e, de forma mais importante, à gravidade da histológica da doença (EHL).

Palavras-chave: Linfangioleiomiomatose; Pequenas vias aéreas; Prova de função pulmonar; Escore histológico de LAM.

Abstract

Mendonça LP. *Small airways morphological alterations associated to functional impairment in lymphangiomyomatosis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare neoplastic and cystic pulmonary disease, which is characterized by abnormal proliferation of the so-called LAM cells. Despite the functional obstructive pattern observed in most patients with LAM, few studies investigated the morphological changes in the small airways that may be associated with the disease. Our study aimed to characterize the morphological alterations of the small airways in patients with LAM with different severities compared to controls, and their association with functional variables and with LAM Histological Score (LHS). Thirty-nine women with LAM who had undergone open lung biopsy or lung transplantation, and nine control subjects that died from non-pulmonary diseases were evaluated. Clinical data and variables obtained from pulmonary function tests (PFT) were analyzed. The histological severity of the disease was assessed as LHS and graded in scores 1 to 3, as follows: LHS-1, <25%; LHS-2, 25% to 50% (LHS-1 and LHS-2: less severe); and LHS-3, >50% of lung involvement (more severe). The following parameters were obtained in the morphometrical analysis: airway thickness, airway closure index, collagen and airway smooth muscle content, airway epithelial TGF- β expression, and infiltration of LAM cells and inflammatory cells within the small airway walls. These variables were compared with controls and correlated with each other. The age of patients with LAM was 39 ± 8 years, with FEV1 and DLCO of $62 \pm 30\%$ predicted and $62 \pm 32\%$ predicted, respectively. Patients with LAM had increased small airway closure index, collagen and smooth muscle content, and epithelial TGF- β expression compared with controls. Patients with LAM with the more severe LHS and with greater functional severity (FEV1 $\leq 30\%$) presented higher thickness of the airways. Bronchiolar inflammation was mild; infiltration of the small airways wall by LAM cells was rare. LHS was associated with obstructive pattern, air trapping and reduced DLCO, whereas small airway wall thickness was associated with FEV1, FVC and collagen content. LAM is associated with small airway remodeling and partial airway closure, with structural alterations observed at different airway compartments. Functional impairment in LAM is associated with airway remodeling and, most importantly, with the histological severity (LHS).

Keywords: Lymphangiomyomatosis, Small airways, Pulmonary function test, Score LAM.

1. Introdução

A linfangioleiomiomatose (LAM) é uma doença sistêmica rara caracterizada pela ocorrência de cistos difusos no parênquima pulmonar, predominantemente em mulheres em idade reprodutiva¹. Com etiologia ainda não esclarecida, a LAM pode ocorrer de forma esporádica (LAM-E) ou relacionada ao Complexo da Esclerose Tuberosa (LAM-ET). A forma esporádica é responsável pela maioria dos casos, com prevalência estimada de aproximadamente 3,3 a 7,7 por 1.000.000 de mulheres^{2,3}. A esclerose tuberosa (ET) é uma doença autossômica dominante, associada aos oncogenes supressores TSC-1 no cromossomo 9 e TSC-2 no cromossomo 16, e mutações em seus alelos podem levar à proliferação celular⁴. Estima-se que cerca de 80% das mulheres com ET apresentarão cistos pulmonares no seguimento, condição comumente encontrada na LAM⁵.

Frequentemente, o diagnóstico de LAM só é concretizado na faixa etária entre 30 e 40 anos, mas as manifestações clínicas são geralmente observadas meses ou anos antes do diagnóstico⁶. Em estudo com 32 pacientes, foi verificado que o diagnóstico só foi concluído cerca de 3 anos e meio após o início dos sintomas⁷. As principais manifestações clínicas incluem pneumotórax e dispneia⁸ e os achados radiológicos predominantes em pacientes com a doença, mostram um padrão de hiperinsulflação bilateral e difuso, com pneumotórax verificado em cerca de 35% dos pacientes e quilotórax presente em 10% a 20% das pacientes. Há ainda aqueles que não evidenciaram anormalidade no exame radiográfico: 10% a 20%. Outro achado importante é visto na tomografia computadorizada: grande quantidade de cistos envolvidos por parênquima pulmonar normal. Estes cistos são estruturas preenchidas de ar, de aproximadamente 0,2 a 2,0 cm de diâmetro, ocasionalmente maiores que isso dependendo do grau de evolução da doença podendo ser encontrados em pacientes com radiografias normais ou com poucas opacidades^{9,10}.

A doença é caracterizada pela proliferação anormal das chamadas células LAM: células musculares atípicas que se assemelham ao músculo liso em sua constituição histológica e ultraestrutural, localizadas no interstício pulmonar peribrônquico e perivascular e nos linfáticos torácicos e abdominais,

e tipicamente associadas a destruição pulmonar cística¹¹⁻¹³. À proliferação celular associa-se ainda uma destruição pulmonar cística e doença extrapulmonar que consiste em angiomiolipomas e tumores linfáticos, como linfangioleiomiomas¹³. Devido às suas propriedades metastáticas, a LAM é considerada uma doença neoplásica de baixo grau, com sobrevida livre de transplante de 10 anos em 86% dos casos¹³⁻¹⁵.

O acometimento pulmonar na LAM é determinado pelo teste de função pulmonar, o método mais eficaz para esta avaliação¹⁶. A princípio as pacientes com LAM podem não apresentar qualquer alteração neste teste, porém no decorrer da doença, estudos evidenciam a alteração mais comum: o padrão obstrutivo¹⁶. As anormalidades mais frequentes são redução da capacidade de difusão do monóxido de carbono (DLCO), aprisionamento de ar e obstrução do fluxo aéreo, que podem não estar presentes no início da doença, mas se tornam evidentes à medida que a doença progride^{16,17}. A redução anual que vai além de 5 a 10% do valor predito do Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF1) e da DLCO é sinônimo de acometimento pulmonar progressivo rápido, sendo de primordial importância em pacientes com LAM, a monitorização da função pulmonar, especialmente destes parâmetros. Afirma-se que os intervalos de tempo indicados para estas avaliações sejam de três a seis meses para pacientes em fase de progressão da doença, e seis a doze meses para aquelas com quadro mais estável¹⁶.

Apesar do padrão obstrutivo observado na maioria dos pacientes com LAM, poucos estudos até o momento investigaram as alterações morfológicas das pequenas vias aéreas associadas à doença.

Um método prognóstico específico para avaliar a gravidade histológica do envolvimento pulmonar na LAM é o Escore Histológico de LAM (EHL)¹⁸, que se baseia na porcentagem total de envolvimento do tecido pulmonar tanto pelo músculo liso quanto pela extensão das lesões císticas causadas pela LAM, ao invés de uma pontuação individual para cada componente, como estudado anteriormente por Kitaichi et al. (1995)¹⁹. Esta análise correlaciona-se mais estreitamente com a sobrevida dos pacientes do que a classificação apenas por lesões císticas e permite graduar o envolvimento tecidual semiquantitativamente, sendo: EHL-1 relacionado ao acometimento menor que

25% do tecido pulmonar; o EHL-2 relacionado ao acometimento de 25% a 50%; e o EHL-3 relacionado a um nível maior que 50% de acometimento do tecido pulmonar¹⁸.

Em análise histológica, pouco foi explorado em relação às alterações morfológicas das vias aéreas que caracterizam de fato, o paciente com LAM. Entre alguns achados, o estudo de Hayashi et al. (2016)²⁰ descreve em pacientes em estágio avançado da doença: proliferação irregular dos vasos linfáticos nas vias aéreas e alterações associadas à inflamação crônica. Também observaram que a grande quantidade e a dilatação de vasos linfáticos nas paredes finas dos brônquios estavam presentes em todos os pacientes do estudo, com ou sem lesões da LAM.

Em relação às lesões da LAM, Hayashi et al. (2016)²⁰ afirmam que estão presentes em todas as camadas das paredes brônquicas, principalmente em regiões muito próximas ao parênquima pulmonar. Henske, McCormack (2012)²¹ concordam e descrevem as “células LAM invasoras” pela sua morfologia fusiforme ou epitelióide, e pelo abundante citoplasma eosinofílico. Os autores também descrevem uma alteração cística circundada por células LAM no pulmão das pacientes. As células LAM expressaram o antígeno melanocítico, *monoclonal human Black 45* (HMB-45), assim como o receptor de estrogênio, e a actina de músculo liso²¹.

Em um relato de três pacientes que morreram de LAM, Sobonya et al. (1985)²² relataram diminuição significativa dos diâmetros das pequenas vias aéreas, com quantidades semelhantes de músculo liso quando comparados com controles. As pequenas vias aéreas pareciam estar colapsadas, sugerindo perda de suporte pelo parênquima alveolar com “lesões semelhantes a enfisema”. Taveira DaSilva et al. (2001)²³ observaram inflamação das vias aéreas em 47/74 (63%) biópsias pulmonares de pacientes com LAM e hiperplasia da musculatura lisa das vias aéreas em poucos casos (4%). Hayashi et al. (2016)²⁰ relataram proliferação de células LAM ao redor dos brônquios em pacientes com LAM avançada submetidos a transplante pulmonar. Mais recentemente, Verleden et al. (2020)²⁴ estudaram explantes de pacientes submetidos a transplante de pulmão para LAM em estágio terminal usando uma combinação de tomografia computadorizada (TC) ex vivo,

microCT e histologia, os autores relataram uma diminuição significativa no número de pequenas vias aéreas em pacientes com LAM grave, causada por destruição cística, bem como espessamento dos bronquíolos terminais, sugerindo que essas alterações nas pequenas vias aéreas seriam responsáveis pela perda progressiva da função pulmonar. Até o momento, nenhum estudo investigou as alterações das pequenas vias aéreas na LAM em estágios iniciais da doença.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Primário

No presente estudo, o objetivo primário foi caracterizar as alterações morfológicas das pequenas vias aéreas em pacientes com LAM com diferentes gravidades funcionais, submetidos a biópsia pulmonar cirúrgica para fins diagnósticos ou transplante pulmonar, e sua associação com parâmetros funcionais obtidos na prova de função pulmonar com um parâmetro morfológico de gravidade da doença (escore histológico de LAM - LHS).

2.2 Objetivos Secundários

- Avaliar de forma quantitativa os diferentes componentes da parede de pequenas vias aéreas (músculo liso, proporção de colágeno, espessura total, índice de fechamento) em pacientes com LAM e comparar com pacientes controles.
- Avaliar a expressão de TGF- β pelas células epiteliais bronquiolares em pacientes com LAM e comparar com pacientes controles.
- Avaliar o grau de inflamação de pequenas vias aéreas em pacientes com LAM.
- Avaliar a presença de infiltração de células LAM na parede de pequenas vias aéreas.
- Correlacionar os parâmetros morfométricos com parâmetros funcionais obtidos na prova de função pulmonar e com o escore histológico de LAM.

3. Revisão da Literatura

3.1 História e progressão da doença

Desde 1937 há na literatura a descrição de casos de mulheres com sinais e sintomas característicos da LAM esporádica apresentando cistos pulmonares, pneumotórax, quilotórax e outros²⁵, porém até 20 anos depois, apenas 3 publicações foram feitas a esse respeito^{25,26,27}. Já em 1982, foram apresentados os primeiros relatos da doença no Brasil²⁸.

Em 1974, Silverstein et al.²⁹, verificaram que a morte por insuficiência respiratória acontecia em cerca de 5 anos após o início dos sintomas pulmonares da doença. E em 1975, Corrin et al.¹, afirmaram que a maior parte das pacientes acometidas pela LAM faleciam em 10 anos após o início da doença. Desta forma, é possível notar o quão fatal era o acometimento da LAM com pouquíssimas opções de tratamento. Atualmente, com maior conhecimento da doença em todo o mundo, muitos meios de tratamento estão sendo avaliados¹³.

A datar do início dos sintomas, ocorre uma variação de 10 a 20% de mortalidade em 10 anos, e esporadicamente pode alcançar 30%^{18,11}. Entretanto, casos esporádicos de progressão lenta foram relatados com 30 anos de evolução, além de mulheres com idade superior a 80 anos que iniciaram relatos de sintomatologia da LAM³⁰. É visto que a mortalidade está intimamente associada a algumas características clínicas apresentadas no diagnóstico da doença, e que pacientes mais jovens apresentam uma pior progressão³¹.

3.2 A célula LAM

As células LAM constituem as lesões pulmonares e estão presentes nas paredes dos cistos e ao longo de vasos sanguíneos, linfáticos e bronquíolos, ocasionando o estreitamento das vias aéreas, espessamento das paredes vasculares, oclusão venosa e ruptura de vasos linfáticos. Além disso, as lesões

pulmonares não císticas são formadas por infiltrados nodulares de células LAM. Estes nódulos possuem um centro que apresenta um predomínio de pequenas células fusiformes, e a parte periférica apresenta células epitelioides^{31,32}.

Estas células ocasionam linfangioleiomiomas que são massas linfáticas de tamanhos variados encontradas com maior frequência no retroperitônio, pelve e mediastino posterior. A proliferação de células epitelióides nas paredes dos vasos linfáticos leva a obstrução do fluxo linfático e formação de massas preenchidas por quilo^{31,32}.

Embora as células LAM exibam características de baixo grau de malignidade, elas têm propriedades metastáticas. Foram encontradas células LAM em pulmões pós-transplante, ou seja, de doadores de pacientes transplantados que não possuíam a doença, o que sugere a migração destas células a partir de outros locais, como: rins, vias linfáticas, útero³³.

Os mecanismos pelos quais a propagação das células LAM provoca a formação de cistos pulmonares e destruição do seu parênquima ainda não estão bem estabelecidos²¹. Uma causa considerada para este acometimento tem sido a compressão das vias aéreas pelas células LAM o que leva a uma distensão das vias aéreas terminais em decorrência da via aérea ocluída³⁰. Outra causa discutida para as lesões císticas é a degradação das fibras elásticas pulmonares causadas por proteinases. Esta degradação pode ocasionar um aumento da atividade de metaloproteinase (MMP) nos pulmões, que têm relevante função no remodelamento do pulmão e linfangiogênese²¹. Nódulos LAM contem MMP2, MMP9, MMP1, ativadores de MMP, e inibidores de MMP (TIMPs), sendo que há descrições de redução dos níveis de um inibidor de MMP (TIMP-3) em lesões LAM³⁴, e elevação dos níveis séricos de MMP-9³⁵, ou seja, um desequilíbrio entre os inibidores de MMP e de MMP pode ser um fator que contribui para a destruição do parênquima do pulmão³⁶.

3.3 Quadro clínico na LAM

É comum ocorrer a conclusão do diagnóstico da LAM em torno de 30 a 40 anos de idade da paciente, frequentemente anos depois do início dos

sintomas⁶. Junior e Carvalho (2004)⁴ afirmam que o surgimento de dispneia, tosse seca com aumento gradativo, episódios de pneumotórax espontâneo em mulheres que se encontram em idade fértil e sem histórico de acometimentos cardiorrespiratórios ou outra condição que justifique o quadro são características comuns de pacientes com LAM e determinantes para a suspeita da doença. Johnson e Tattersfield (2000)⁸ comprovaram em estudo realizado com 50 mulheres, que o principal achado clínico encontrado na doença é o pneumotórax e a dispneia.

Há também a tosse e escarro hemoptoico como parte da sintomatologia pulmonar da doença, além de derrame pleural, hemorragia intra-abdominal, quilotórax e linfangioleiomiomas³⁷.

Na radiologia, os achados da LAM são vistos bilateralmente e algumas estimativas evidenciam características nos pacientes portadores da doença: na maior parte deles, é notório o padrão de hiperinsuflação e em aproximadamente 80% dos casos, há o acometimento dos pulmões de forma difusa e com mesmo grau. Nos outros 20% observou-se maior expressão de lesões nas bases pulmonares^{9,10}.

A avaliação e descrição de vasos pulmonares na LAM ainda é pouco relatada, porém Ando et al. (2012)³⁸ ao compararem a tomografia computadorizada de pacientes com LAM e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) no mesmo grau de perda de função pulmonar, verificaram que as pacientes com LAM apresentam maiores densidades de pequenos vasos pulmonares e áreas parenquimatosas do que os pacientes com DPOC.

3.4 Linfangiogênese

Em 1976 Vazquez, Fernandez-Cuervo e Fidalgo³⁹ caracterizaram pela primeira vez o envolvimento linfático presente na LAM, e em 2004, Kumasaka et al.⁴⁰, descreveram que a alteração histopatológica mais comumente encontrada é o grande número de vasos linfáticos no interior de aglomerados

de células LAM, que apresentam um aspecto mais alargado, como cistos ou fendas.

A proliferação de vasos linfáticos, conhecida como linfangiogênese, tem sido vastamente estudada principalmente nos últimos 15 anos, havendo uma clara evolução em seu entendimento. Em 2008, Glasgow et al.⁴¹, descreveram marcadores imunohistoquímicos específicos do endotélio linfático, como o VEGF-R (*vascular endothelial growth factor receptor*) e PROX-1 (*transcription factor required for lymphatic vessel growth*), ambos em biópsia de linfangioleiomiomas e linfonodos, e marcadores como o VEGF-D no sangue destas pacientes.

Nestes estudos também foi verificado a dispersão das células LAM para locais distantes, como o interior de vasos linfáticos, nos derrames pleurais e outros. Nestes casos, se apresentaram como um emaranhado de células LAM envoltos por células endoteliais linfáticas^{40,41}.

3.5 Alterações histológicas da LAM

Em análise histológica, a caracterização das lesões relacionadas à LAM está descrita. Hayashi et al. (2016)²⁰ afirmam que cada lesão de LAM é constituída exclusivamente de células LAM em formato de pequenos e médios fusos com citoplasma eosinofílico e núcleos arredondados a ovóides organizados em fascículos e ao redor uma ramificação de pequenas fendas. Ferrans et al. (2000)³¹ descrevem conjuntos de células musculares lisas imaturas no mesmo formato fusiforme citado anteriormente, localizadas próximo aos cistos e adjacentes ao feixe peribroncovascular (Figura 1).

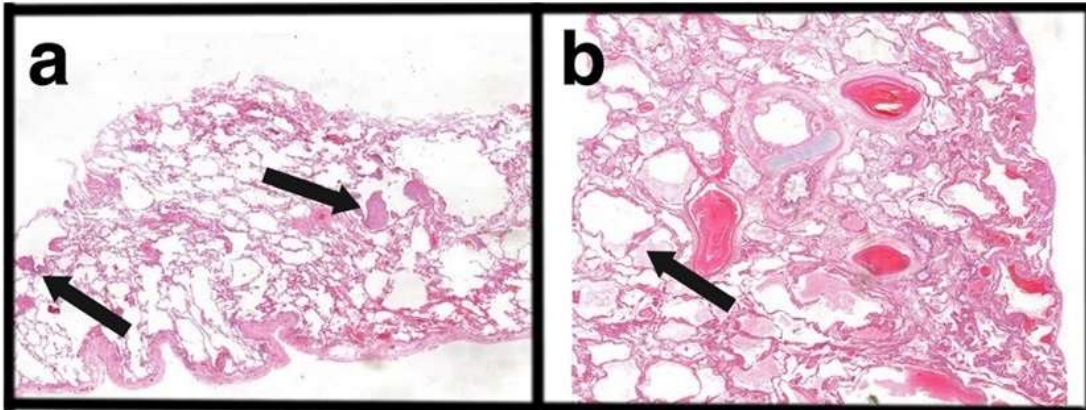


Figura 1: Fotomicrografias representativas de biópsias de pacientes com LAM (coloração H&E). Imagens evidenciam distribuição de cistos e nódulos característicos da patologia. A: Setas indicam nódulos formados pelas células LAM (5x). B: Seta indica presença de cisto no parênquima pulmonar (7x).

Fonte: Nascimento et al, 2018.⁴²

Hayashi et al. (2016)²⁰ descrevem a proliferação de vasos linfáticos dilatados e de finas paredes dentro de lesões LAM, e quando observado um aumento exagerado destes vasos, também era evidenciada: uma ausência das glândulas brônquicas, da camada muscular lisa e de tecidos conjuntivos.

Henske, McCormack (2012)²¹ descrevem células LAM ao redor de lesões císticas nos pulmões das pacientes além da expressão do antígeno melanocítico HMB-45 e actina de músculo liso. Há também uma evidência de canais linfáticos dentro das lesões císticas e de aglomerados de células LAM no interior do lúmen linfático.

Ferrans et al. (2000)³¹ descrevem conjuntos de células musculares lisas citadas anteriormente, e também uma proliferação anormal das células LAM que leva à formação dos angiomiolipomas, caracterizados histologicamente por proliferação de células musculares lisas do tipo LAM, além de vasos sanguíneos e adipócitos. Segundo os autores, o fornecimento de sangue para eles é geralmente originado nas artérias renais ou vasos sanguíneos anormais e os tumores podem variar em tamanho, desde alguns milímetros até mais de 20 cm de diâmetro.

Na imuno-histoquímica, o anticorpo alfa actina de músculo liso é positivo nas células LAM, que são dois tipos: células fusiformes, semelhantes a músculo liso; e células epitelioides que expressam HMB-45. Bretani et al. (1984)⁴³ também descreve receptores para estrogênio e progesterona nas

células LAM. Outros componentes expressados pelas células fusiformes são as metaloproteinases de matriz (MMPs)⁴⁴. Foi verificada ainda, uma reatividade importante de MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar destas pacientes quando comparado ao grupo controle⁴⁵. Odajima et al.(2009)³⁵ em avaliação da hiperreatividade tecidual da MMP-9 evidenciou níveis séricos e plasmáticos consideravelmente aumentados.

Alterações de vasos pulmonares também foram descritas. Baldi et al. (2011)⁴⁶, em um estudo de caso descreveram uma paciente de 39 anos com quadro de hemorragia alveolar difusa que evoluiu para insuficiência respiratória aguda e morte. Posteriormente em autópsia, foi confirmado o diagnóstico de LAM e o envolvimento e ruptura da camada elástica da artéria pulmonar pelas células LAM, o que pode explicar a emergência clínica de hemorragia alveolar. Em análise histológica, além das alterações no tecido pulmonar, foram encontradas células positivas para HMB-45, sendo observado a presença destas células dentro das pequenas paredes da artéria pulmonar. Também foram identificados macrófagos carregados de hemossiderina nos espaços alveolares adjacentes aos vasos, indicativo de hemorragia anterior. Os autores afirmam que o acometimento arterial pulmonar da doença pode ser o fator determinante para uma apresentação clínica grave.

3.6 Caracterização funcional da LAM

O acometimento pulmonar na LAM é determinado pelo teste de função pulmonar, o método mais eficaz para esta avaliação. Inicialmente as pacientes com LAM podem não apresentar qualquer alteração neste teste, porém no decorrer da doença, é evidenciada a alteração mais comum: o padrão obstrutivo¹⁶.

Este padrão é evidenciado pela redução na difusão do monóxido de carbono (DLCO) e a obstrução ao fluxo aéreo^{47,48,13}. Em estudo feito com 275 pacientes em 2004, os autores comprovaram que estas pacientes exibem um quadro de redução, a cada ano, do VEF1 de 75 ± 9 mL ($1,7 \pm 0,4\%$ do valor

predito) e do DLCO de $0,69 \pm 0,07$ mL/min/mmHg ($2,4 \pm 0,4\%$ do valor predito)⁴⁸.

Em estudo anterior foi demonstrado uma diminuição mais significativa do VEF1 e DLCO, de 118 ± 142 mL e $0,905 \pm 1,54$ mL/min/mmHg, respectivamente. Foi possível observar ainda, que o padrão restritivo único pode existir, mas neste caso é relacionado a pneumotórax ou derrame quiloso. O quadro que, de fato, melhor caracteriza estas pacientes é o padrão obstrutivo, com diferentes graus⁵¹.

Em outros estudos também foi evidenciado uma diminuição do VEF1 e DLCO e, em relação à capacidade pulmonar total (CPT), pode manter-se sem alterações ou haver uma elevação, o que normalmente vem acompanhada de uma elevação do volume residual e hipoxemia^{49,50}. Desta forma, torna-se necessária a avaliação do Índice de Tiffeneau: a fração que representa o VEF1 em relação à Capacidade Vital Forçada (CVF) e defini o caráter obstrutivo da doença.

Apesar do padrão obstrutivo observado na maioria das pacientes com LAM, poucos estudos até o momento investigaram as alterações das pequenas vias aéreas associadas à doença.

Algumas alterações de vias aéreas já foram parcialmente descritas em pacientes com estágio avançado da doença, como: aumento da quantidade de vasos linfáticos próximos à via aérea, alterações associadas à inflamação crônica, como: hiperplasia de células caliciformes em 97% das amostras avaliadas, metaplasia de células escamosas em 83%, espessamento da membrana basal do epitélio em 93%, além de proliferação de células LAM e de vasos linfáticos ao redor dos brônquios. Há também maior expressão dos sinalizadores da via mTOR que conduzem à expressão do fator de crescimento vascular, levando à proliferação de vasos linfáticos nas células LAM²⁰. Outros estudos descreveram uma redução do diâmetro²² e no número de pequenas vias aéreas em pacientes com LAM grave²⁴, bem como presença de inflamação das vias aéreas²³. Contudo, nestes estudos prévios não foram incluídos pacientes em estágios mais precoces da LAM nem se investigou a possível associação das alterações de vias aéreas com parâmetros da prova de função pulmonar.

3.7 *Transforming growth factor beta* - TGF β

O TGF β é um mediador vastamente conhecido quando associado ao processo de fibrose em qualquer órgão, pois está associado à deposição de colágeno e também contribui para a progressão de muitas doenças intersticiais do pulmão. O TGF β 1 promove a proliferação de células mesenquimais, com indução associada de componentes da matriz extracelular, particularmente fibronectinas e colágenos. Em estados patológicos, a expressão aumentada de TGF β 1 contribui para uma desregulada proliferação celular e a deposição excessiva de matriz⁵². Em estudo realizado com pacientes com LAM, Evans et al. (2004)⁵³ avaliaram a expressão do TGF β 1 e da fibronectina associada a matriz em amostras de pulmão com LAM e pulmão saudável. Em todos os 13 casos de LAM e também no parênquima pulmonar saudável, o TGF β 1 localiza-se nas células epiteliais das vias respiratórias. Nos tecidos com LAM, o TGF β 1 associado à matriz foi vastamente encontrado em regiões contendo células LAM. Também foi relatado a evidente e abundante presença do TGF β 1 em áreas que possuíam muitas células, em comparação com as paredes das regiões císticas crônicas nos tecidos LAM. A fibronectina, componente da matriz, é fortemente expressada em resposta ao TGF β 1 ativo, e dá suporte a atividade de TGF1 nestas regiões⁵³.

4. Materiais e Métodos

4.1 Delineamento do Estudo

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo na data de 22/05/2017 com número de parecer 2.074.927-versão 1 e 4.415.408-versão 2 (Anexo A). E aprovado pelo comitê de ética em seres humanos da Universidade de São Paulo (CAPPesq-FMUSP nº68159817.1.0000.0068). O financiamento se deu através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do processo 88882.376527/2019-01, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) através do processo 401825/2020-5.

Representa um projeto complementar ao projeto intitulado “Fatores histológicos relacionados às alterações da função pulmonar e à resposta ao tratamento com doxiciclina na linfangioleiomiomatose.” aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) na data de 01/07/2009 com número de protocolo 0623/09.

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, conduzido no Departamento de Patologia da FMUSP.

4.2 Critérios de inclusão

Foram incluídas 39 mulheres adultas com diagnóstico clínico-radiológico e confirmação histopatológica de LAM submetidas a biópsia pulmonar cirúrgica para fins diagnósticos (n=27) ou transplante pulmonar (n=12) entre 1994 e 2016 (material retrospectivo do arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP). As variáveis clínicas e funcionais foram obtidas nos prontuários clínicos.

Nove indivíduos provenientes do Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVOC), de 2002 a 2009, que morreram de doenças não pulmonares e com histologia pulmonar normal, avaliados durante autópsias de rotina, foram selecionados como controles.

Os controles eram não fumantes, não tinham doença pulmonar crônica prévia e não necessitaram de ventilação mecânica.

4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do grupo LAM, casos com material insuficiente nos blocos de parafina, tanto na fase de seleção dos casos quanto no decorrer das análises.

4.4 Teste de função pulmonar

O teste de função pulmonar de cada paciente foi obtido através do arquivo digital de prontuários do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – Instituto do Coração (InCor).

A espirometria, os volumes pulmonares e a DLCO foram realizados usando um pneumotacógrafo calibrado e um pletismógrafo corporal, respectivamente (Medical Graphics Corporation e Elite Dx, Elite Series; Medical Graphics Corporation), e de acordo com os padrões recomendados⁵⁴. Foram considerados os valores obtidos de: capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), índice de Tiffeneau (VEF1/CVF), capacidade pulmonar total (CPT), volume residual (VR), relação VR/CPT e Difusão de Monóxido de Carbono (DLCO), e considerados os valores previstos para a população brasileira⁵⁴⁻⁵⁷. As variáveis funcionais utilizadas foram as PFP mais próximas cronologicamente à realização das biópsias ou transplante pulmonar.

De acordo com os parâmetros funcionais, as pacientes com LAM foram subdivididas em dois grupos com base na gravidade da doença: 1) VEF1 previsto $\geq 70\%$: o grupo menos grave e 2) VEF1 previsto $\leq 30\%$: o grupo mais grave.

4.5 Escore histológico de LAM (EHL)

Biópsias pulmonares cirúrgicas e fragmentos de tecido periférico de explantes pulmonares foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados rotineiramente. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise de rotina e com Sirius Red para detecção de colágeno. A imuno-histoquímica (IH) foi realizada com anticorpos anti-alfa-actina de músculo liso (AML), anti-HMB45 e anti-TGF- β . As lâminas foram digitalizadas usando o Panoramic Flash Scanner (3D Histech, Budapeste, Hungria) e as imagens foram visualizadas com o Software Panoramic Viewer versão 6.5 (3D Histech, Budapest, Hungria).

A gravidade histológica da doença foi avaliada escore histológico de gravidade da LAM (EHL)¹⁸ nas lâminas imunocoradas com AML, onde as lesões de LAM foram graduadas em escores de 1 a 3, de acordo com a porcentagem total de envolvimento do tecido pulmonar tanto pelo componente proliferativo quanto cístico das lesões, como segue: EHL-1 <25%; EHL-2 25% a 50%; e EHL-3 >50% de envolvimento pulmonar¹⁸. De acordo com o EHL, as pacientes com LAM foram subdivididas ainda em dois grupos de gravidade histológica: menos grave (EHL-1 e EHL-2), correspondendo ao envolvimento pulmonar de até 50%, e mais grave, correspondendo ao EHL-3, > 50% de envolvimento do tecido pulmonar).

4.6 Análise morfométrica

Quatro a seis pequenas vias aéreas cortadas transversalmente [com perímetro da membrana basal (MB) ≤ 6 mm] e com arquitetura preservada foram selecionadas aleatoriamente em lâminas coradas com Sirius Red de indivíduos LAM e controles. As vias aéreas envolvidas pela destruição cística do parênquima pulmonar não foram incluídas na análise. As áreas de vias aéreas selecionadas foram exportadas para formato TIFF mantendo a resolução original e posteriormente convertidas em JPG de qualidade máxima utilizando-se o software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose - CA, USA). As imagens foram então transferidas para o software Image Pro Plus, versão 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) previamente calibrado para a conversão de pixels em micrometros.

Os seguintes parâmetros morfológicos foram obtidos: 1) espessura da parede da via aérea (um) - corresponde à área da parede da via aérea (um²) dividida pelo perímetro correspondente da MB (um); 2) índice de fechamento das vias aéreas (%) - corresponde à diferença entre a área medida do lúmen das vias aéreas e a área prevista do lúmen relaxado, calculada da seguinte forma: $[1 - (\text{área medida do lúmen (um}^2) / \text{área prevista do lúmen relaxado (um}^2)] \times 100$. A área prevista do lúmen das vias aéreas relaxado foi calculada como πR^2 , onde R = raio do lúmen das vias aéreas. A área do lúmen foi delimitada a partir da MB⁵⁸, 3) proporção de colágeno - corresponde à área de colágeno da parede das vias aéreas dividida pelo perímetro da MB (um²/um); 4) proporção do músculo liso das vias aéreas - corresponde à área do músculo liso das vias aéreas dividida pelo perímetro da MB (um²/um); e 5) expressão de TGF- β epitelial das vias aéreas (avaliada em lâminas imunocoradas por TGF- β) - corresponde à área de células epiteliais TGF- β imunopositivas dividida pelo perímetro da MB (um²/um).

Também foi avaliada a presença de infiltração de células LAM nas pequenas paredes das vias aéreas (lâminas imunomarcadas com HMB-45) e a presença de infiltrado de células inflamatórias bronquiolares (lâminas coradas com H&E).

4.7 Análise Estatística

O software SPSS 20 (SPSS Inc/IBM, Chicago, EUA) foi utilizado para a análise estatística.

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou como número e proporções. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido pelo teste T-student ou Mann-Whitney. O teste de correlação de Pearson ou Spearman foi realizado entre as variáveis. A diferença estatística foi assumida ao nível de significância de 5%.

5. Resultados

Os casos LAM foram selecionados a partir do Ambulatório de Doenças Intersticiais, pacientes referendados de todo o Brasil para o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os casos controles foram selecionados previamente por outros projetos do Departamento de Patologia, provenientes do SVOC.

Inicialmente, foram pré-selecionados 48 casos para compor o grupo LAM e excluídos 9 casos devido à escassez de tecido nos blocos de parafina, restando o total de 39 casos. No decorrer do estudo, na fase de processamento de materiais para análise imunohistoquímica (IH) para α -AML e TGF- β , um caso foi excluído pelo mesmo motivo, formando um total de 38 casos para estas duas análises. No grupo controle, foram pré-selecionados 10 casos e excluído 1 caso por não apresentar material suficiente para as análises propostas, restando o total de 9 casos.

Dos 39 casos incluídos, uma paciente não realizou PFP por apresentar déficit cognitivo (n=38) e alguns dados específicos da PFP de algumas pacientes não foram localizados nos arquivos de prontuário, sendo excluídos da análise (01 paciente não apresentou registro de CVF predito, 5 pacientes não apresentaram registro de DLCO, CPT, VR e VR/CPT e 4 pacientes não apresentaram registro de DLCO predito, CPT predito, VR predito).

A Tabela 1 mostra os dados clínicos e funcionais das pacientes com LAM e os escores histológicos de LAM. A média de idade das pacientes do grupo LAM no momento da coleta da biópsia foi de $39,49 \pm 8,20$ anos e a média da idade do óbito do grupo controle foi de $50,66 \pm 10,27$ anos. As causas de óbito mais comuns do grupo controle foram decorrentes de morte súbita cardiovascular, entre elas: infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, choque cardiogênico e edema pulmonar cardiogênico. No grupo LAM trinta e cinco pacientes (89,7%) tiveram LAM-E e 4 (10,3%) tiveram LAM-ET. Sete pacientes eram tabagistas.

Tabela 1. Dados clínicos, funcionais e EHL de pacientes com LAM.

Dados clínicos	N	LAM
Idade	39	$39,5 \pm 8,2$
Tabagistas - n (%)	39	7 (17,9%)

Angiomiolipoma - n (%)	39	11 (28,2%)
Esclerose Tuberosa - n (%)	39	4 (10,3%)
Prova de Função Pulmonar	N	LAM
VEF1 (L)	38	1,8±0,8
VEF1 (% predito)	38	62,4±30,0
CVF (L)	38	2,8±0,8
CVF (% predito)	37	80,7±24,7
VEF1/CVF	38	0,6±0,2
DLCO (ml/min/mmHg)	33	16,2±8,2
DLCO (% predito)	34	62,5±31,8
CPT (L)	33	5,2±1,1
CPT (% predito)	34	105,4±17,7
VR (L)	33	2,2±1,0
VR (% predito)	34	153,7±59,1
VR/CPT	33	0,4±0,1
VR/CPT (% predicted)	33	42,6±14,5
Escore Histológico de LAM (EHL)	N	LAM
Até 50%	38	22 (57,9%)
Acima 50%	38	16 (42,1%)

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. VEF1: volume expiratório forçado no primeiro segundo, CVF: capacidade vital forçada, DLCO: capacidade de difusão pulmonar para monóxido de carbono, CPT: capacidade pulmonar total, VR: volume residual, L: litros, % predito: porcentagem do valor predito.

Inicialmente, como critério de seleção das VAs, foram consideradas aquelas de uma mesma faixa de tamanho (até 2mm de diâmetro, que corresponde a 6mm de perímetro). Em segundo momento, para confirmar que as vias aéreas eram de tamanhos semelhantes nos grupos LAM e controle, uma análise de comparação foi feita em subclassificações de tamanhos: abaixo de 1000 μ m; de 1001-2000 μ m; de 2001-3000 μ m; de 3001-4000 μ m; de 4001-6000 μ m. Foi possível observar que as vias aéreas com tamanho de 1000-4000 μ m corresponderam à maioria das vias aéreas analisadas: 76,8% no grupo LAM e 70,2 % no grupo controle. A tabela 2 mostra o número e o percentual de VAs em cada subclassificação de tamanho.

A Tabela 1 do Anexo B mostra os resultados das comparações entre os grupos LAM e controle em relação às variáveis morfológicas, utilizando a subdivisão por grupos de tamanho de vias aéreas.

Tabela 2. Dados das subclassificações de tamanho de VAs nos grupos LAM e controle.

	LAM (N=169 VAs)		Controle (N=37 VAs)	
	N	%	N	%
VAs abaixo 1000µm	35	20,7	6	16,2
VAs 1000-2000 µm	91	53,8	13	35,1
VAs 2000-3000µm	31	18,3	9	24,3
VAs 3000-4000µm	8	4,7	4	10,8
VAs 4000-6000µm	4	2,4	5	13,5

Os dados são apresentados como número total (N) e porcentagem (%). VAs: vias aéreas.

Em relação à análise das variáveis morfológicas nos grupos LAM e controle, o grupo LAM apresentou aumento do índice de fechamento das pequenas vias aéreas ($p=0,016$), proporção de colágeno ($p=0,005$), proporção de músculo liso ($p\leq 0,0001$) e expressão epitelial de TGF-beta (0,015) em comparação aos controles (Figura 2). Não houve diferença estatística na espessura das vias aéreas entre os dois grupos.

A Figura 3 mostra fotomicrografias representativas das principais diferenças morfológicas observadas entre as vias aéreas LAM e controles na expressão epitelial de TGF- β , na proporção de colágeno na coloração Sirius Red e na proporção de músculo liso na imunocoloração AML

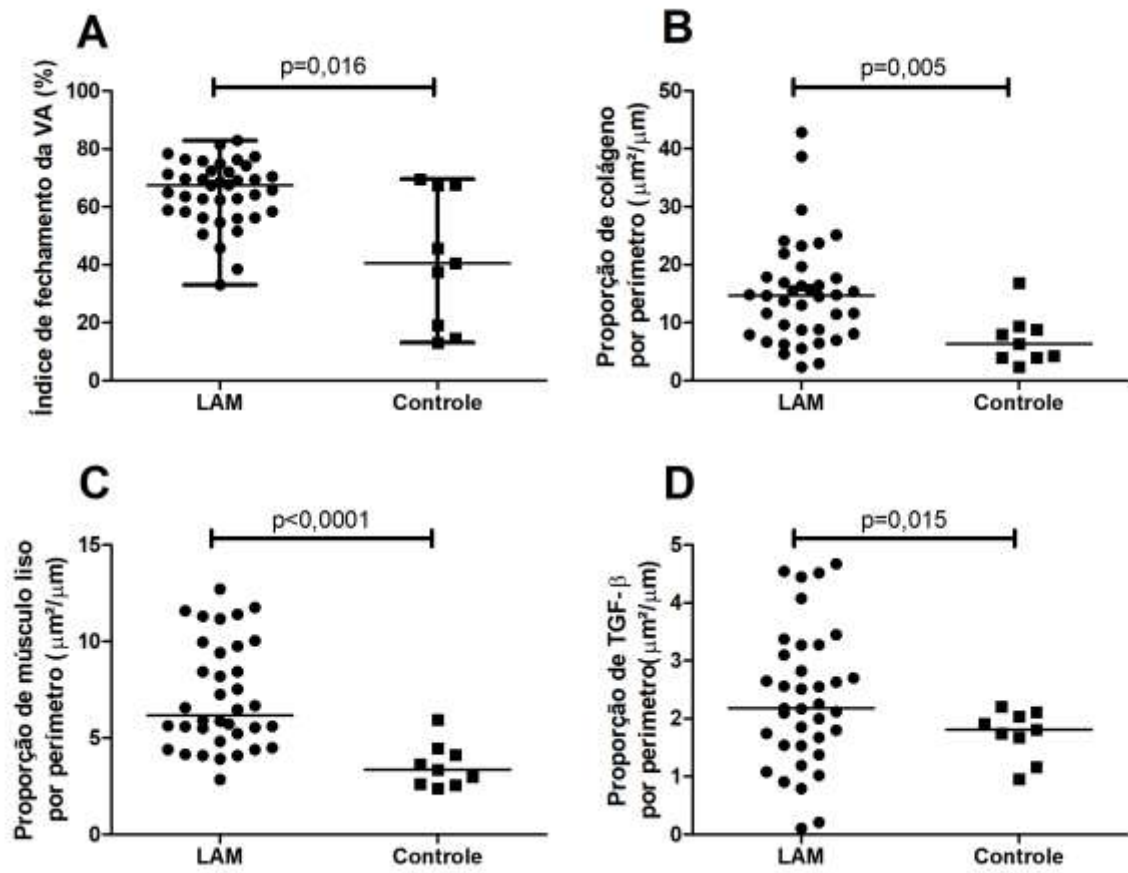


Figura 2: Representação gráfica de (A) índice de fechamento de pequenas vias aéreas; (B) proporção de músculo liso das vias aéreas; (C) proporção de colágeno das vias aéreas; e (D) expressão de TGF- β epitelial das vias aéreas nos grupos LAM e controle.

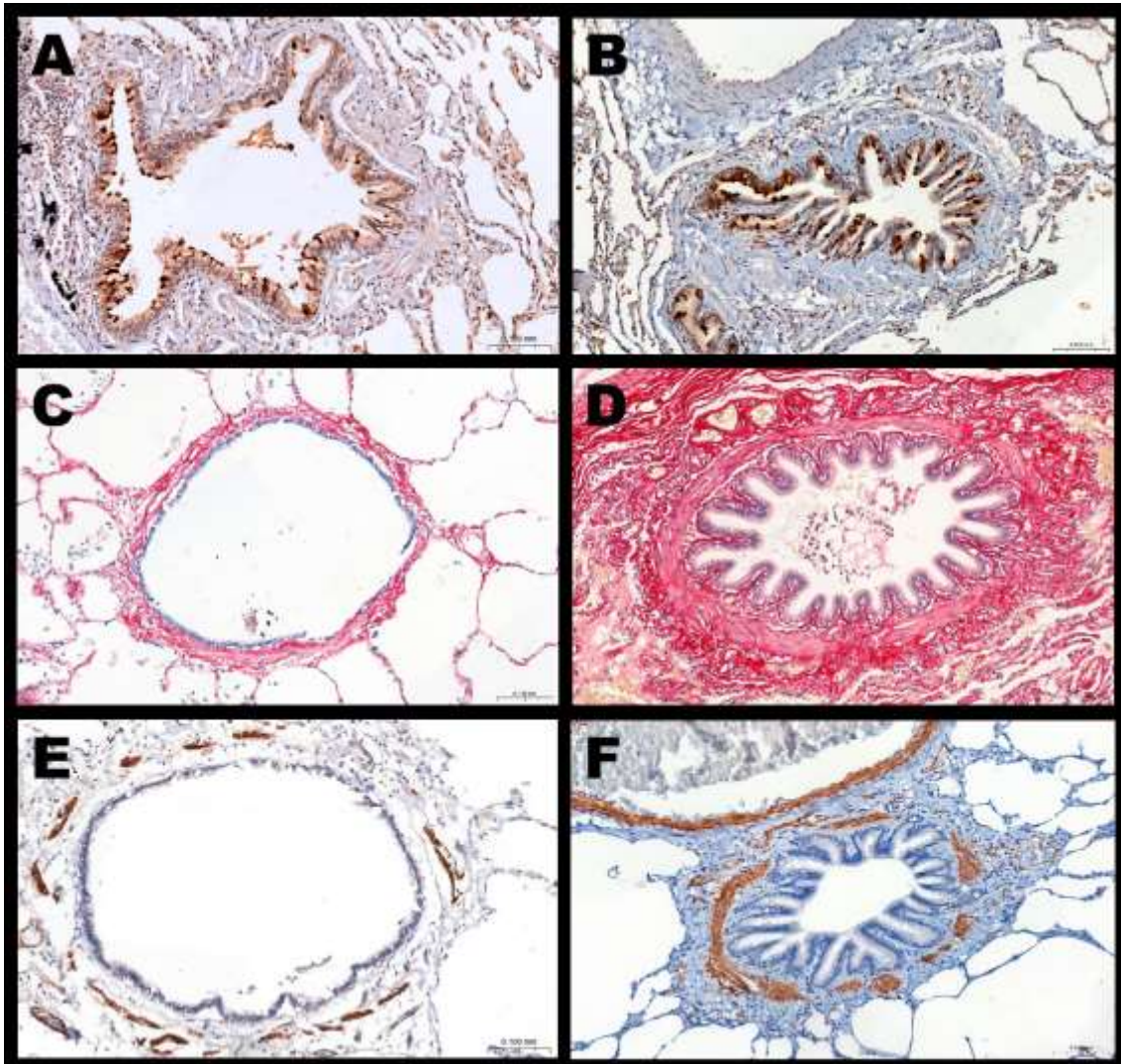


Figura 3: Fotomicrografias representativas das pequenas vias aéreas no grupo controle (A, C, E) e pacientes com LAM (B, D, F). **A e B:** Expressão epitelial de TGF- β ; **C e D:** Proporção de colágeno na coloração Sirius Red. **E e F:** proporção de músculo liso na imunocoloração AML.

Ao comparar os casos de LAM divididos de acordo com a gravidade histológica [EHL até 50% (n=22) vs. EHL acima de 50% (n=16)] e gravidade funcional [VEF1 \geq 70% (n=15) vs. VEF1 \leq 30% (n=8)], não houve diferença estatística com variáveis morfológicas (Figura 4), exceto para a espessura das vias aéreas.

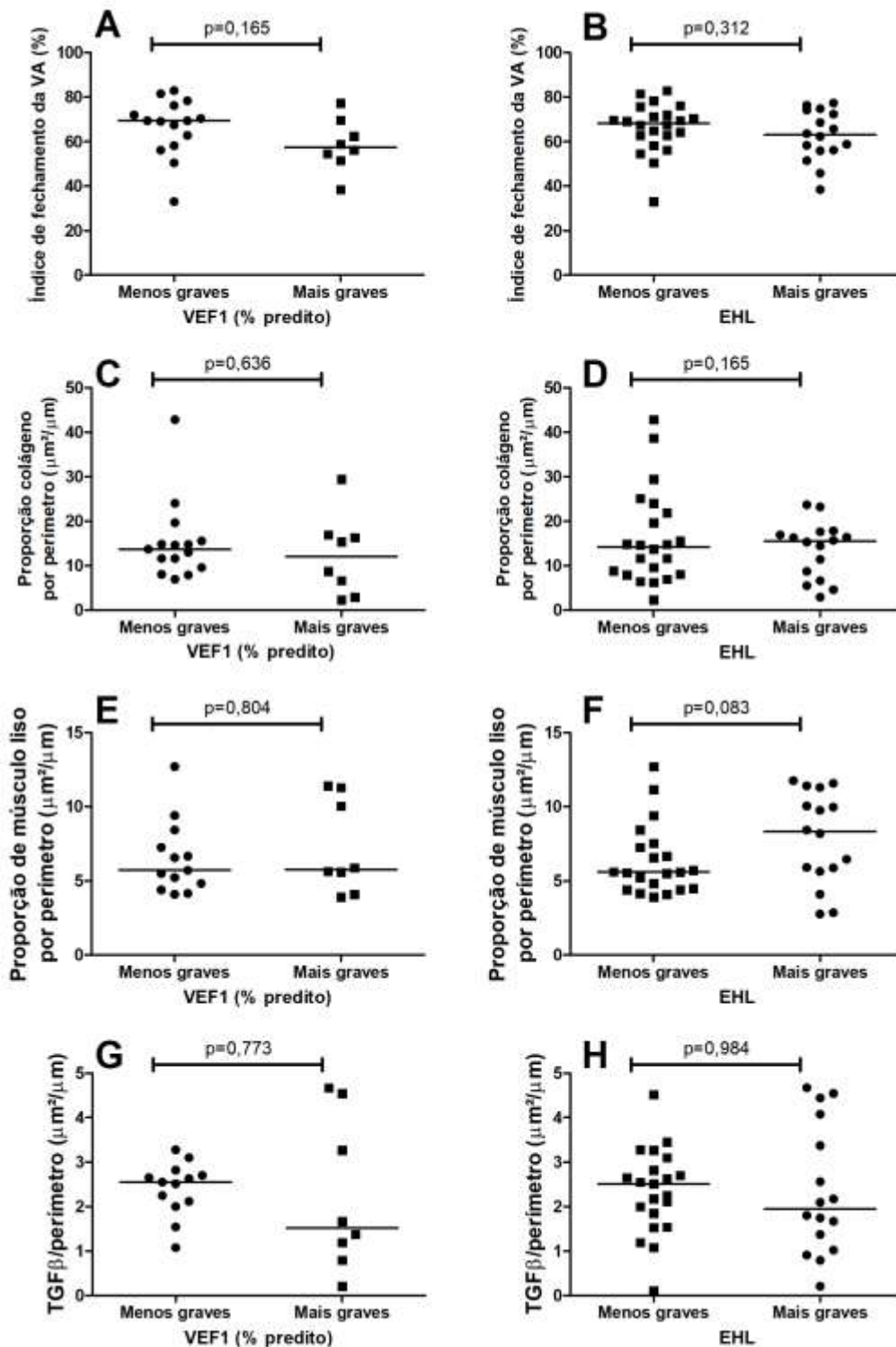


Figura 4: Representação gráfica das comparações morfológicas entre grupos mais e menos graves no parâmetro VEF1 (%predito) e no EHL. Índice de fechamento da via aérea(A,B); proporção de colágeno das vias aéreas (C,D); proporção de músculo liso das vias aéreas (E,F); expressão de TGF- β epitelial das vias aéreas. (G,H).

Os casos de LAM com EHL mais grave apresentaram maior espessura das vias aéreas em comparação com os casos menos graves ($p=0,011$). Além disso, os casos de LAM com $VEF1 \leq 30\%$ apresentaram tendência a maior espessura das vias aéreas ($73,7 \pm 21,9$) em comparação aos casos de LAM com $VEF1 \geq 70\%$ ($55,7 \pm 18,8$; $p=0,05$) (Figura 5). Comparações entre pacientes com LAM com $VEF1 \geq 70\%$ ($n=15$) vs $VEF1 < 70\%$ ($n=23$) não mostraram diferenças significativas nas variáveis morfológicas.

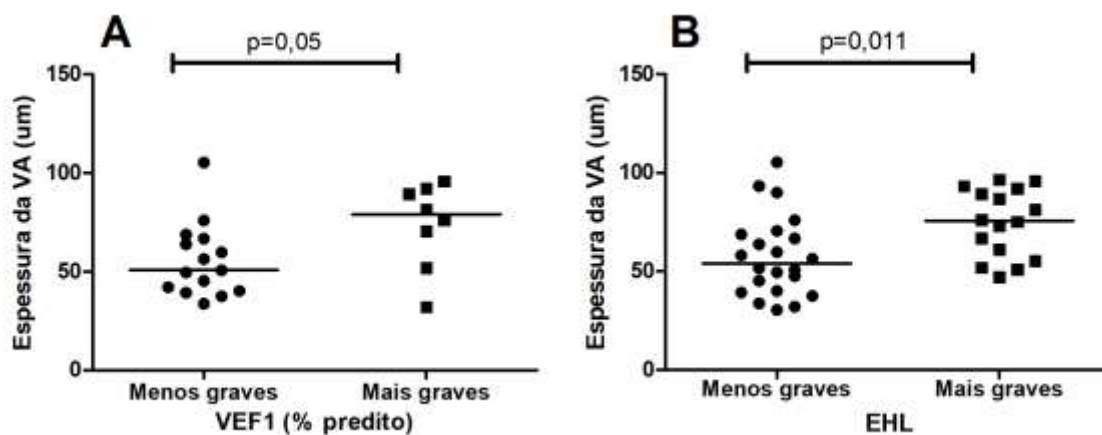


Figura 5: Representação gráfica da espessura da via aérea. Comparação entre os casos mais e menos graves de LAM do ponto de vista funcional (A) e segundo o escore histológico (B).

A Tabela 3 mostra as correlações entre os parâmetros funcionais e morfológicos em pacientes com LAM; foram apresentadas correlações significativas com coeficiente de correlação $\geq 0,50$. Houve uma correlação significativa entre EHL e vários parâmetros da função pulmonar. A espessura das vias aéreas apresentou correlação negativa com VEF1 e CVF e foi associada ao conteúdo de colágeno.

A tabela 1 do Anexo C mostra os resultados de todas as correlações entre o EHL e as variáveis morfológicas e funcionais do grupo LAM. E a tabela 1 do Anexo D mostra os resultados das correlações entre os parâmetros da PFP e as variáveis morfológicas do grupo LAM.

Tabela 3. Correlações significativas entre variáveis funcionais e morfológicas em pacientes com LAM.

	Coefficiente de correlação	Valor-p	
Escore histológico de LAM x	VEF1 (L)	-0,755	≤0,0001
	VEF1 (% predito)	-0,720	≤0,0001
	CVF (L)	-0,522	0,001
	VEF1/CVF	-0,674	≤0,0001
	DLCO (mL/min/mmHg)	-0,612	≤0,0001
	DLCO (% predito)	-0,614	≤0,0001
	VR (L)	0,702	≤0,0001
	VR (% predito)	0,714	≤0,0001
	VR/CPT razão (%)	0,686	≤0,0001
Espessura da VA x	VEF1 (L)	-0,502	0,001
	CVF (L)	-0,506	0,001
	Proporção de colágeno	0,575	≤0,0001

Em relação às lesões LAM, foi possível observar cisto e nódulo peribronquiolar evidenciado na imunocoloração AML (Figura 6-A,B). Essa mesma lesão cística com infiltrado de células LAM também é expressada no antígeno melanocítico HMB-45 (Figura 6-C) A infiltração das vias aéreas por células LAM (Figura 6-E) estava presente em raras pequenas vias aéreas de 14/39 pacientes (36%).

Inflamação leve das vias aéreas foi observada em 29/39 pacientes (74%). As células inflamatórias consistiam principalmente de linfócitos e macrófagos. Várias pequenas vias aéreas não apresentaram infiltração de células inflamatórias (Figura 6-D). Considerando todos os pacientes, raras vias aéreas apresentaram uma inflamação moderada contendo folículos linfóides.

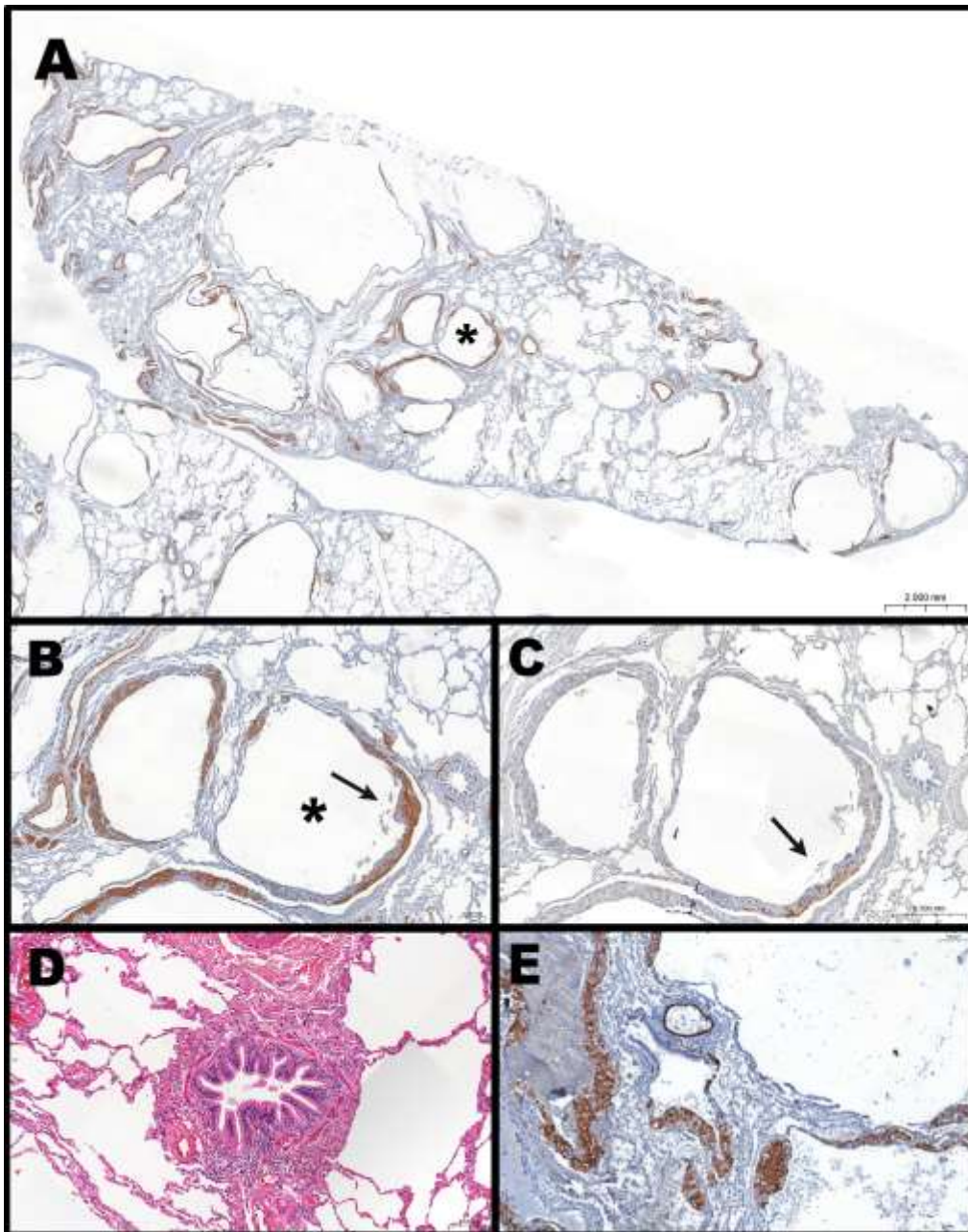


Figura 6: **A:** Imagem representativa da destruição cística do parênquima pulmonar na LAM (imunocoloração AML); **B:** Maior aumento de cisto pulmonar peribronquiolar (*) observado no painel A, com nódulo proliferativo típico (seta) contendo células LAM AML positivas; **C:** Fotomicrografia da mesma lesão cística contendo células LAM HMB-45 positivas (seta); **D:** Fotomicrografia de pequena via aérea com infiltrado de células inflamatórias; **E:** Fotomicrografia de infiltração de pequenas vias aéreas por células LAM.

6. Discussão

Neste estudo, realizado com biópsias pulmonares cirúrgicas e explantes pulmonares de pacientes com LAM em diferentes estágios da doença, foram avaliados quantitativamente os compartimentos morfológicos das paredes bronquiolares e sua associação com parâmetros de função pulmonar. Os principais resultados são: 1) a proporção de músculo liso das vias aéreas, a proporção de colágeno, o grau de fechamento das vias aéreas e a expressão epitelial de TGF- β estão aumentados em pacientes com LAM; 2) Como esperado, o parâmetro morfológico de gravidade da LAM (EHL) está associado a alterações funcionais relacionadas à obstrução das vias aéreas e aprisionamento aéreo; 3) a espessura da parede das pequenas vias aéreas é maior em pacientes com doença mais grave e está associada a parâmetros de obstrução do fluxo aéreo e proporção de colágeno; 4) A inflamação bronquiolar na LAM é predominantemente leve; 5) a infiltração da parede das pequenas vias aéreas por células LAM é um evento raro.

Inicialmente, para que os grupos LAM e controle pudessem ser comparados, foram selecionadas VAs de uma mesma faixa de tamanho (até 2mm de diâmetro, que corresponde a 6mm de perímetro). Como as biópsias pulmonares representam tecido pulmonar subpleural, contendo apenas vias aéreas periféricas, para confirmar que as análises ocorreram em vias aéreas de tamanhos semelhantes nos grupos LAM e controle, uma segunda análise de comparação foi feita em subfaixas de tamanhos: abaixo de 1000 μ m; de 1001-2000 μ m; de 2001-3000 μ m; de 3001-4000 μ m; de 4001-6000 μ m. Foi possível observar que as vias aéreas com tamanho de 1000-4000 μ m corresponderam à maioria das vias aéreas analisadas: 76,8% no grupo LAM e 70,2 % no grupo controle.

Sabe-se que a LAM frequentemente apresenta anormalidades funcionais, principalmente obstrução do fluxo aéreo, aprisionamento aéreo e redução da DLCO; no entanto, as bases morfológicas relacionadas a essas alterações precisam ser melhor compreendidas. Estudos anteriores sugerem que a destruição cística do tecido pulmonar (que envolve e incorpora pequenas vias aéreas alteradas), associada à proliferação nodular de células LAM, são os principais determinantes da obstrução do fluxo aéreo na LAM^{22,23}. Os resultados deste estudo vão ao encontro desse conceito e mostram ainda que

alterações estruturais das pequenas vias aéreas podem contribuir para a gravidade da doença, incluindo: fechamento parcial das vias aéreas, hipertrofia da musculatura lisa e deposição de colágeno nas paredes das vias aéreas.

A hipótese de que as pequenas vias aéreas estão alteradas na LAM já foi parcialmente demonstrada em um pequeno número de estudos de explantes e autópsias de pacientes com LAM grave avançada, que demonstraram diminuição do número de pequenas vias aéreas (causadas por destruição cística), estreitamento e colapso (também secundário à destruição cística), inflamação das vias aéreas e infiltração das vias aéreas por células LAM^{20,22,24}. O presente estudo apresenta novos *insights* sobre a fisiopatologia da obstrução ao fluxo aéreo na LAM, pois foram incluídas pacientes em diferentes estágios da doença, o que permitiu a comparação entre dois grupos de pacientes de acordo com a gravidade. Além disso, o foco do estudo foi a avaliação das vias aéreas com estrutura preservada, não envolvidas pela destruição cística do tecido pulmonar. Curiosamente, a espessura das vias aéreas foi o melhor parâmetro morfológico para diferenciar pacientes mais e menos graves, e que também foi correlacionado com medidas de VEF1. No entanto, a espessura das vias aéreas na LAM não foi diferente dos controles. Como os controles foram provenientes de material de autópsia, é possível que tenha havido algum grau de edema nas vias aéreas do grupo controle que pode ter interferido nesse resultado, o que pode ser considerado uma limitação do estudo. Apesar de não detectarmos diferença significativa da espessura de vias aéreas entre pacientes com LAM e controles, houve diferença na proporção de colágeno e de músculo liso, elementos principais da constituição da parede da via aérea, e que determinam a espessura total. Foi possível perceber que a doença tem grande heterogeneidade de alterações, havendo VAs normais, contraídas, doença mais e menos nodular. Diante dos achados e da heterogeneidade intrínseca da doença percebida tanto entre pacientes quanto dentro de um mesmo pulmão, não foi possível afirmar que indivíduos com LAM apresentam VAs mais espessas, mas sim que quanto mais espessas elas estão, pior é a função pulmonar.

O colapso das vias aéreas devido à perda de suporte alveolar secundário à destruição cística foi previamente sugerido como um possível mecanismo de

obstrução na LAM²². No presente estudo foi demonstrado que, além dos possíveis efeitos da perda dos acoplamentos alveolares, existem alterações estruturais primárias nas vias aéreas, como hipertrofia muscular e deposição de colágeno, que provavelmente contribuíram para o estreitamento do lúmen.

O resultado da análise do índice de fechamento da via aérea se dá em porcentagem do tamanho que a VA deveria ter, ou seja, o quanto a luz diminuiu em relação ao predito. Desta forma, este índice é resultado de um cálculo de área medida por área predita e considera o quanto a VA está fechada. As vias aéreas da LAM apresentaram índice de fechamento significativamente maior que os controles, o que poderia ser causado por aumento dos elementos constitutivos (como músculo liso e matriz extracelular) ou por broncoconstrição. Nossos resultados sugerem que a primeira hipótese é a mais provável.

Ao contrário do que foi relatado anteriormente por Taveira-DaSilva et al. (2001)²³ bronquiólite, ou seja, infiltrado inflamatório nas pequenas vias aéreas, e infiltração das vias aéreas por células LAM, não foram achados relevantes neste estudo. No estudo de Taveira-DaSilva et al. (2001)²³, a presença de bronquiólite em biópsias de LAM não foi um fator preditor de resposta aos broncodilatadores. Por outro lado, a hipertrofia da musculatura lisa bronquiolar, que foi um achado importante nas pacientes de nosso estudo, foi detectada em apenas 3 dos 74 pacientes avaliados pelos autores²³.

A expressão de TGF- β , um fator de crescimento associado à produção de matriz extracelular (MEC), foi previamente descrita em nódulos LAM. Esses estudos sugeriram que a proliferação de células LAM pode estar associada à expressão regional alterada de TGF- β 1 e proteínas relacionadas da MEC, e postularam que o TGF- β 1 pode promover a progressão da doença⁵³. No presente estudo, tanto a expressão de TGF- β quanto a proporção de colágeno foram maiores nas vias aéreas de pacientes com LAM quando comparados aos controles, indicando um possível mecanismo para o fechamento parcial das vias aéreas observado nessas pacientes. TGF- β é uma citocina também associada à proliferação muscular e pode estar envolvida no mecanismo de hipertrofia da musculatura lisa das vias aéreas. Não é possível descartar que outros mediadores, não investigados no presente estudo e relacionados à proliferação de células LAM, como fatores de crescimento (IGF-1, VEGF) e

quimiocinas, também tenham papel na hipertrofia do músculo liso das vias aéreas dessas pacientes.

O EHL se refere à gravidade das lesões pulmonares do ponto de vista histológico, classificando a extensão da substituição de tecido pulmonar normal por lesões císticas e infiltrados de células LAM, e é considerado um indicador prognóstico da doença²⁰. No presente estudo, o EHL apresentou correlação com alterações morfológicas e funcionais, mostrando correlação positiva com os parâmetros VR, CPT e com a relação VR/CPT, ou seja, quanto mais grave a doença, maior os parâmetros funcionais relacionados à doença obstrutiva. A relação do VR/CPT se refere à porcentagem da CPT representada pelo VR, e essa também tem correlação positiva com a espessura da via aérea.

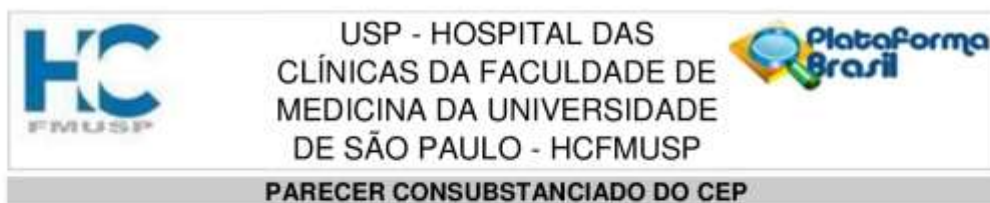
As limitações deste estudo incluem o pequeno número de pacientes com LAM e controles. Considerando que a LAM é uma doença rara, esta série é semelhante em tamanho a outros estudos anteriores. A opção por incluir controles de autópsia, foi devido ao alto grau de inflamação tecidual e alterações relacionadas ao tabagismo presentes na maioria dos pulmões obtidos em procedimentos cirúrgicos em nosso serviço. No entanto, pulmões normais também são incomuns em autópsias, onde frequentemente existem alterações pulmonares relacionadas a complicações da doença de base, como pneumonias e, mesmo em pulmões preservados é comum haver algumas alterações teciduais relacionadas à morte, como edema leve.

7. Conclusão

É possível concluir que a LAM apresenta remodelamento e fechamento parcial das pequenas vias aéreas, com alterações estruturais observadas em diferentes compartimentos, incluindo o epitélio, músculo liso e MEC, contribuindo para a obstrução ao fluxo aéreo e a gravidade da doença. A destruição cística do tecido pulmonar associada à proliferação nodular, parece ser o principal determinante da obstrução do fluxo e aprisionamento aéreo em pacientes com LAM.

8. Anexos

Anexo A- Parecer Consubstanciado do CEP

**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Caracterização anátomo-funcional das pequenas vias aéreas na linfangioleiomiomatose **Pesquisador:** MARISA DOLHNIKOFF **Área Temática:**

Versão: 2

CAAE: 68159817.1.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.415.408

Apresentação do Projeto:

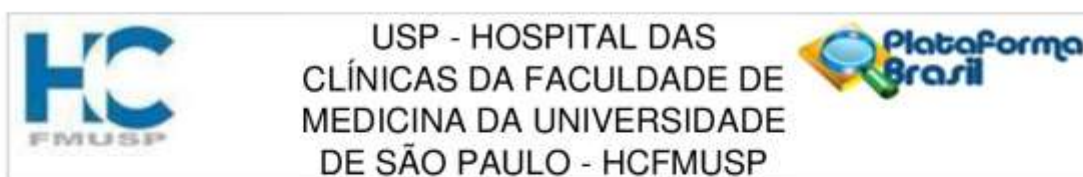
A Linfangioleiomiomatose (LAM) é uma doença rara, predominante em mulheres em idade fértil. Com etiologia ainda não esclarecida, a doença é caracterizada por proliferação anormal das denominadas células LAM e evidencia ainda, uma destruição pulmonar cística e doença extrapulmonar. Devido às suas propriedades metastáticas, tem sido considerada uma doença neoplásica de baixo grau. O teste de função pulmonar é o método mais eficaz para avaliação do acometimento pulmonar na LAM e, em análise histológica, pouco foi explorado em relação às alterações morfológicas das vias aéreas e vasos pulmonares que caracterizam de fato, a paciente com LAM. Apesar do padrão obstrutivo observado na maioria destas pacientes, poucos estudos até o momento investigaram as alterações das pequenas vias aéreas e vasos associadas à doença. Algumas alterações de vias aéreas já foram parcialmente descritas em pacientes com estágio avançado da doença, entretanto nos estudos prévios não foram incluídos pacientes em estágios mais precoces da LAM nem se investigou a possível associação destas alterações com parâmetros da prova de função pulmonar. Neste contexto, o presente estudo visa esclarecer se existem alterações morfológicas de pequenas vias aéreas que caracterizam a paciente com LAM, e estabelecer qual a relação destas alterações com a apresentação funcional das pacientes. Além disso, busca-se investigar se a expressão das citocinas TGF, IL-13 e IL-17 apresentam uma possível relação com as alterações morfológicas das vias aéreas. A população do estudo será

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A emenda proposta pode ser aprovada pela CAPPesq na forma como proposta pela pesquisadora

Página 02 de

Continuação do Parecer: 4.415.408

responsável.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_140092_0_E1.pdf	12/11/2020 08:14:29		Aceito
Outros	CartaCAPPesq.pdf	12/11/2020 08:09:11	Lígia Pelosi Mendonça	Aceito
Outros	FORMULARIOPARASUBMISSAODEEMENDASEBROCHURAS.pdf	12/11/2020 08:08:39	Lígia Pelosi Mendonça	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	emendadoutorado.pdf	12/11/2020 08:08:24	Lígia Pelosi Mendonça	Aceito
Outros	CadastroLamviasaereas.pdf	10/05/2017 09:26:37	MARISA DOLHNIKOFF	Aceito
Folha de Rosto	FolhaLAMviasaereas.pdf	09/05/2017 16:17:05	MARISA DOLHNIKOFF	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Novembro de 2020

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5ª andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Página 03 de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B - Tabela 1

Tabela 1: Resultados das comparações das dos grupos LAM e controle em relação às variáveis morfológicas, utilizando a subdivisão por grupos de tamanho de vias aéreas.

	LAM abaixo de 1000 μ m x Controle abaixo de 1000 μ m	LAM 1001-2000 μ m x Controle 1001-2000 μ m	LAM 2001-3000 μ m x Controle 2001-3000 μ m	LAM acima de 3000 μ m x Controle acima de 3000 μ m
Proporção de colágeno por perímetro (μ m ² / μ m)	p=0,002*	P=0,0001**	P=0,003*	P=0,095
Espessura da via aérea (μ m)	p=0,028*	P=0,887	p=0,633	P=0,972
Índice de fechamento da via aérea (%)	p=0,004*	P=0,0001**	P=0,001*	P=0,219
Proporção de músculo liso por perímetro (μ m ² / μ m)	p=0,009*	P=0,0001**	P=0,202	P=0,015*
Média da área do TGF- β por perímetro (μ m ² / μ m)	p=0,920	P=0,004*	P=0,312	P=0,965

Legenda: *A correlação é significativa no nível 0,05. **A correlação é significativa no nível 0,01.

Anexo C - Tabela 1

Tabela 1: Resultados das correlações entre o EHL e as variáveis morfológicas e funcionais do grupo LAM.

	Variável	N	P	Coefficiente de Correlação
EHL	Proporção de colágeno por área perímetro (um ² /um)	38	0,88	-0,024
EHL	Espessura da VA	38	0,03	0,352
EHL	Índice de fechamento da VA (%)	38	0,12	-0,258
EHL	Área de actina/perímetro (um ² /um)	38	0,26	0,191
EHL	media Área de TGF/ perímetro	38	0,69	-0,066
EHL	VEF1 (L)	37	0,0001	-0,755
EHL	VEF1 pred (%)	37	0,0001	-0,720
EHL	CVF (L)	37	0,001	-0,522
EHL	CVF pred (%)	36	0,03	-0,361
EHL	Índice de Tiffeneau	37	0,0001	-0,674
EHL	DLCO (L)	32	0,0001	-0,612
EHL	DLCO pred (%)	33	0,0001	-0,614
EHL	CPT (L)	32	0,07	0,325
EHL	CPT pred (%)	33	0,03	0,377
EHL	VR (L)	32	0,0001	0,702
EHL	VR pred (%)	33	0,0001	0,714
EHL	VR/CPT (%)	32	0,0001	0,686

Anexo D - Tabela 1

Tabela 1: Resultados das correlações entre os parâmetros da PFP e as variáveis morfológicas do grupo LAM.

		VEF1 (L)	VEF1 pred (%)	CVF (L)	CVF pred (%)	VEF1/C VF	DLCO	DLCO pred (%)	CPT	CPT pred (%)	VR	VR pred (%)	VR absoluto/ CPT absoluto %
Proporção de colágeno por perímetro (um ² /um)	Coeficiente de Correlação	-0,039	-0,015	-0,028	-0,011	-0,027	0,039	0,021	-0,208	-0,238	-0,207	-0,329	-0,138
	P valor	0,81	0,92	0,86	0,94	0,87	0,82	0,90	0,24	0,17	0,24	0,05	0,44
	N	38	38	38	37	38	33	34	33	34	33	34	33
Espessura da VA	Coeficiente de Correlação	-0,502**	-0,492**	-0,506**	-0,483**	-0,328*	-0,310	-0,264	-0,135	-0,083	0,326	0,238	0,441*
	P valor	0,001	0,002	0,001	0,002	0,04	0,07	0,13	0,45	0,64	0,06	0,17	0,01
	N	38	38	38	37	38	33	34	33	34	33	34	33
Índice de fechamento da VA (%)	Coeficiente de Correlação	0,313	0,343*	0,302	0,366*	0,197	0,410*	0,427*	-0,085	-0,109	-0,405*	-0,403*	-0,422*
	P valor	0,05	0,03	0,06	0,02	0,23	0,01	0,01	0,63	0,53	0,01	0,01	0,01
	N	38	38	38	37	38	33	34	33	34	33	34	33
Área de actina/ perímetro (um ² /um)	Coeficiente de Correlação	-0,139	-0,116	-0,119	-0,070	-0,115	-0,062	0,026	-0,112	-0,105	-0,085	-0,126	-0,067
	P valor	0,41	0,49	0,48	0,68	0,50	0,73	0,88	0,54	0,56	0,64	0,48	0,71
	N	37	37	37	36	37	32	33	32	33	32	33	32
media Area de TGF/ perímetro	Coeficiente de Correlação	0,173	0,178	0,016	0,037	0,194	0,136	0,074	-0,148	-0,133	-0,213	-0,148	-0,196
	P valor	0,30	0,29	0,92	0,82	0,25	0,45	0,68	0,41	0,46	0,24	0,01	0,28
	N	37	37	37	36	37	32	33	32	33	32	33	32

Legenda: * A correlação é significativa no nível 0,05. **A correlação é significativa no nível 0,01.

9. Referências

1. Corrin B, Liebow AA, Friedman PJ. Pulmonary lymphangiomyomatosis. A review. *Am J Pathol.* 1975;79(2):348-82.
2. Yu J, Astrinidis A, Henske EP. Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(8): 1537–1540.
3. Harknett EC, Chang WY, Byrnes S, et al. Use of variability in national and regional data to estimate the prevalence of lymphangiomyomatosis. *Q J Med.* 2011; 104(11):971–979.
4. Junior PM, Carvalho CRR. Linfangioleiomiomatose pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2004; 30(1):66-77.
5. Cudzilo CJ, Szczesniak RD, Brody AS, et al. Lymphangiomyomatosis screening in women with tuberous sclerosis. *Chest.* 2013; 144(2):578–585.
6. Aubry MC, Myers JL, Ryn JH, Henske EP, Logginidou H, Jalal SM, et al. Pulmonary lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:749-52.
7. Taylor JR, Ryu J, Colby T, et al. Lymphangiomyomatosis: clinical course in 32 patients. *N Engl J Med.* 1990; 323:1254-60.
8. Johnson SR, Tattersfield AE. Clinical experience of lymphangiomyomatosis in the UK. *Thorax.* 2000;55(12):1052-7.
9. Muller NL, Chiles C, Kullnig P. Pulmonary lymphangiomyomatosis: correlation of CT with radiographic and functional findings. *Radiology* 1990; 175:335-339
10. Lenoir S, Grenier P, Brauner MW, et al. Pulmonary lymphangiomyomatosis and tuberous sclerosis: comparison of radiographic and thin-section CT findings. *Radiology* 1990;175:329–34.
11. Johnson SR, Whale CI, Hubbard RB, Lewis SA, Tattersfield AE. Survival and disease progression in UK patients with lymphangiomyomatosis. *Thorax.* 2004; 59(9):800-3.
12. Glassberg MK. Lymphangiomyomatosis. *Clin Chest Med.* 2004; 25(3):573-82.
13. Ryu JH, Moss J, Beck GJ, et al. The NHLBI Lymphangiomyomatosis Registry: characteristics of 230 patients at enrollment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173(1):105–111.
14. Cohen MM, Pollock-Barziv S, Johnson SR. Emerging clinical picture of lymphangiomyomatosis. *Thorax.* 2005; 60(10):875–879.

15. Oprescu N, McCormack FX, Byrnes S, et al. Clinical predictors of mortality and cause of death in lymphangioleiomyomatosis: a population-based registry. *Lung*. 2013; 191(1):35–42.
16. Taveira-dasilva AM, Pacheco-Rodriguez G, Moss J. The natural history of lymphangioleiomyomatosis: markers of severity, rate of progression and prognosis. *Lymphat Res Biol*. 2010; 8(1):9-19.
17. Baldi BG, Freitas CSG, Araujo MS, Dias OM, Pereira DAS, Pimenta SP, Kairalla RA, Carvalho CRR. Clinical Course and characterisation of lymphangioleiomyomatosis in a Brazilian reference centre. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2014 ;31(2):129-35.
18. Matsui K, Beasley MB, Nelson WK, Barnes PM, Bechtel J, Falk R, et al. Prognostic significance of pulmonary lymphangioleiomyomatosis histologic score. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(4):479-84.
19. Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, et al. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151: 527–33.
20. Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, et al. Bronchial involvement in advanced stage lymphangioleiomyomatosis: histopathologic and molecular analyses. *Hum Pathol*. 2016; 50:34-42.
21. Henske EP, McCormack FX. Lymphangioleiomyomatosis – a wolf in sheep’s clothing. *J Clin Invest* 2012; 122(11): 3807–3816.
22. Sobonya RE, Quan SF, Fleishman JS. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: quantitative analysis of lesions producing airflow limitation. *Hum Pathol*. 1985;16:1122-8.
23. Taveira-DaSilva AM, Hedin C, Stylianou MP, Travis WD, Matsui K, Ferrans VJ, Moss J. Reversible Airflow Obstruction, Proliferation of Abnormal Smooth Muscle Cells, and Impairment of Gas Exchange as Predictors of Outcome in Lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(6):1072-6.
24. Verleden SE, Vanstapel A, Sadeleer LD, et al. Quantitative analysis of airway obstruction in lymphangioleiomyomatosis. *Europ Resp J*. 2020; 56(1):1901965.
25. Von Stössel E. Über musculare cirrose der lunge. *Beitr Klein Tuberk* 1937;90:432-42.
26. Rosendal T. A case of diffuse myomatosis and cyst formation in the lung. *Acta Radiol*. 1942;23:138—46.

27. Enterline HT, Roberts B. Lymphangiopericytoma; case report of a previously undescribed tumor type. *Cancer* 1955, 8: 582–7.
28. Carvalho CRR, Saldiva PHN, Barbas Filho JV, Takagaki T. Pulmonary lymphangioliomyomatosis. Two cases report. Considerations about diagnosis and treatment. in: Fifth International Symposium On The Prevention And Detection Of Cancer, International Society For Preventive Oncology, 1982, São Paulo. *Cancer Detection Prev.* 1982;5:112.
29. Silverstein EF, Ellis K, Wolff M, Jaretzki A, III. Pulmonary lymphangiomyomatosis. *AmJ Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1974, 120: 832–50.
30. McCormack FX. Lymphangioliomyomatosis: a clinical update. *Chest* 2008; 133 (2): 507-16
31. Ferrans VJ, Yu ZX, Nelson WK, et al. Lymphangioliomyomatosis (LAM): a review of clinical and morphological features. *J Nihon Med Sch.* 2000;67:311–329
32. Avila NA, Kelly JA, Chu SC, Dwyer AJ, Moss J. Lymphangioliomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings. *Radiology.* 2000;216(1):147-153.
33. Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, et al. Prevalence of uterine and adnexal involvement in pulmonary lymphangioliomyomatosis: a clinicopathologic study of 10 patients. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35(12): 1776–1785.
34. Papakonstantinou E, Dionyssopoulos A, Aletras AJ, Pesintzaki C, Minas A, Karakiulakis G. Expression of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in skin lesions from patients with tuberous sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 2004 Oct;51(4):526-33.
35. Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Inoue H, Seyama K, Nishimura M. Matrix metalloproteinases in blood from patients with LAM. *Respir Med.* 2009;103(1):124-9.
36. Goncharova EA, Goncharov DA, Fehrenbach M, Khavin I, Ducka B, Hino O, Colby TV, Merrilees MJ, Haczku A, Albelda SM, Krymskaya VP. Prevention of alveolar destruction and airspace enlargement in a mouse model of pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM). *Sci Transl Med.* 2012 Oct 3;4(154):154ra134.
37. Taveira Da Silva AM, Steagall WK, Moss J. Lymphangioliomyomatosis. *Cancer Control.* 2006;13(4):276–85.

38. Ando K; Tobino K; Kurihara M; Kataoka H; Doi T; Hoshika Y; Takahashi K; Seyama K. Quantitative CT analysis of small pulmonary vessels in lymphangiomyomatosis. *Eur J Radiol.* 2012; 81(12):3925-30.
39. Vazquez JJ, Fernandez-Cuervo L, Fidalgo B. Lymphangiomyomatosis. Morphogenetic study and ultrastructural confirmation of the histogenesis of the lung lesion. *Cancer.* 1976; 37(5):2321–2328.
40. Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Sato T, Souma S, Kondo T, Hayashi S, Minami M, Uekusa T, Fukuchi Y, et al. Lymphangiogenesis in lymphangiomyomatosis: its implication in the progression of lymphangiomyomatosis. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:1007–1016.
41. Glasgow CG, Taveira-Dasilva AM, Darling TN, Moss J (2008). Lymphatic involvement in lymphangiomyomatosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1131 (1): 206–14.
42. Nascimento ECT, Baldi BG, Mariani AW, Annoni R, Kairalla RA, Pimenta SP, Silva LFF, Carvalho CRR, Dolhnikoff M. Immunohistological features related to functional impairment in lymphangiomyomatosis. *Respiratory Research.* 2018; 19(1):1-10.
43. Brentani MM, Carvalho CR, Saldiva PH, Pacheco MM, Oshima CT. Steroid receptors in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Chest.* 1984;85(1):96-9.
44. Ji. RC. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol* 2006;4(2):83-100.
45. Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *Hum Pathol.* 1997;28(9):1071-8.
46. Baldi BG, Pimenta SP, Kawassaki A de M, Bernardi F del C, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Pulmonary arterial involvement leading to alveolar hemorrhage in lymphangiomyomatosis. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(7):1301–1303.
47. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Kristof AS, Avila NA, Rabel A, Travis WD, Moss J. Maximal oxygen uptake and severity of disease in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1427–1431.
48. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Hathaway O, Moss J. Decline in lung function in patients with lymphangiomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest* 2004;126:1867–1874.

49. Chu SC, Horiba K, Usuki J, Avila NA, Chen CC, Travis WD, Ferrans VJ, Moss J. Comprehensive evaluation of 35 patients with lymphangioleiomyomatosis. *Chest* 1999;115:1041–1052.
50. Johnson S. Lymphangioleiomyomatosis: clinical features, management and basic mechanisms. *Thorax* 1999;54:254–264.
51. Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangioleiomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):628-33.
52. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6642–6.
53. Evans SE, Colby TV, Ryu JH, Limper AH. Transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix-associated fibronectin expression in pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 2004; 25(3):1063-70.
54. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes para testes de função pulmonar. *J Pneumol*. 2002;28(suppl 3): S1-S238.
55. Pereira CA, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33(4):397-406.
56. Neder JA, Andreoni S, Castelo-Filho A, Nery LE. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(6):703-717.
57. Neder JA, Andreoni S, Peres C, Nery LE. Reference values for lung function tests. III. Carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(6):729-737.
58. James AL, Hogg JC, Dunn LA, Paré PD. The Use of the Internal Perimeter to Compare Airway Size and to Calculate Smooth Muscle Shortening. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138(1):136-9