

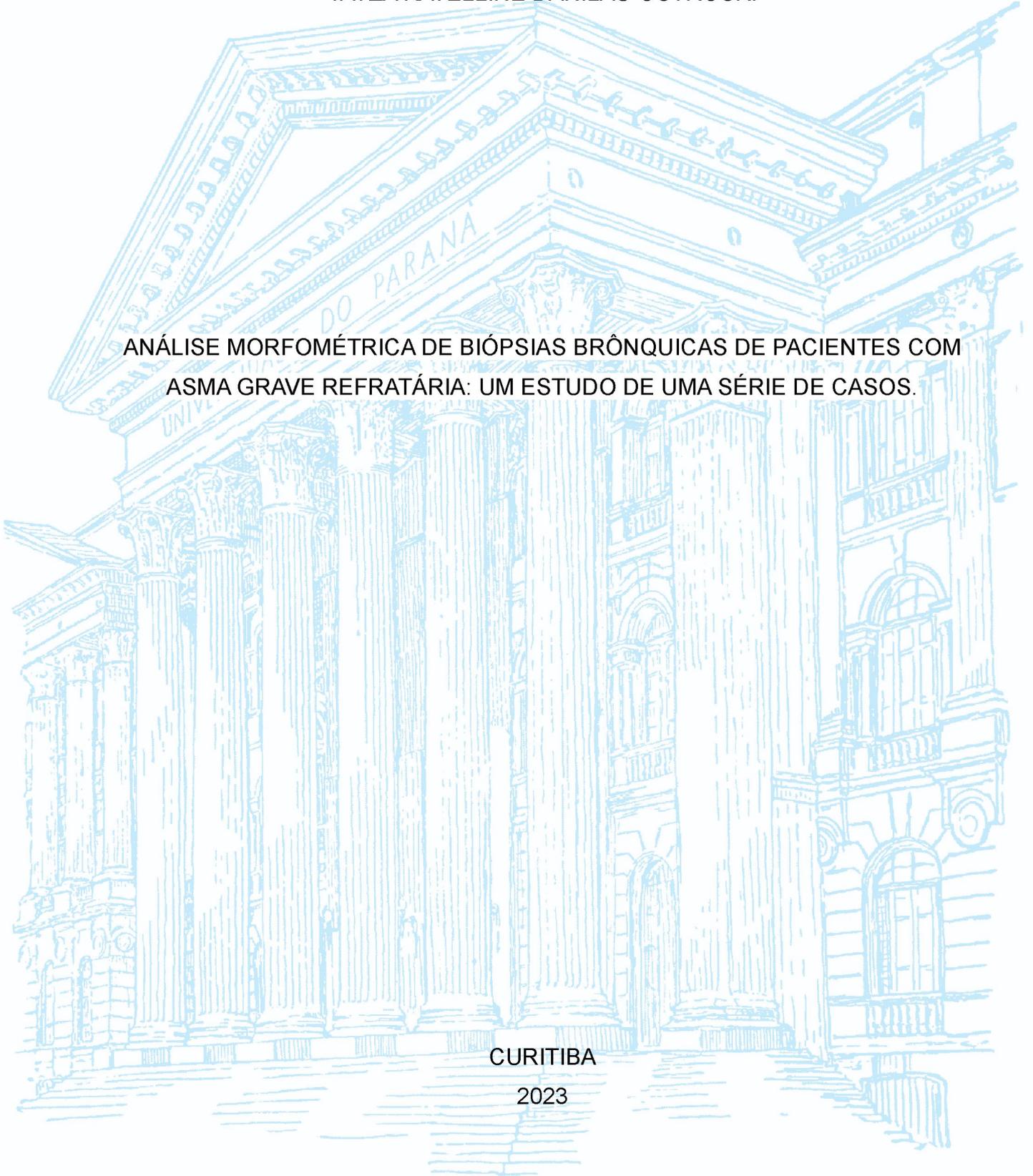
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYZA KATELLINE DANILAU OSTROSKI

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE BIÓPSIAS BRÔNQUICAS DE PACIENTES COM  
ASMA GRAVE REFRATÁRIA: UM ESTUDO DE UMA SÉRIE DE CASOS.

CURITIBA

2023



TAYZA KATELLINE DANILAU OSTROSKI

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE BIÓPSIAS BRÔNQUICAS DE PACIENTES COM  
ASMA GRAVE REFRATÁRIA: UM ESTUDO DE UMA SÉRIE DE CASOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Dante Luiz Escuissato

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lêda Maria Rabelo

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

CURITIBA

2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

O85 Ostroski, Tayza Katelline Danilau  
Análise morfométrica de biópsias brônquicas de pacientes com asma grave refratária: um estudo de uma série de casos.  
[recurso eletrônico] / Tayza Katelline Danilau Ostroski. – Curitiba, 2023.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Dante Luiz Escuissato  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lêda Maria Rabelo  
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

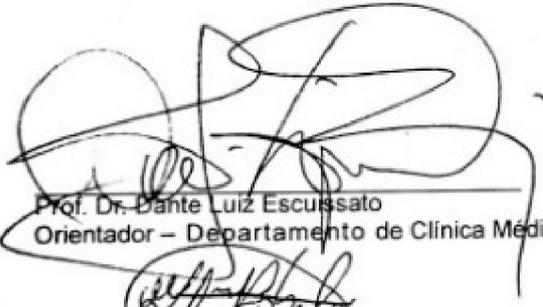
1. Asma. 2. Prognóstico. 3. Imuno-histoquímica. 4. Patologia.  
I. Escuissato, Dante Luiz. II. Rabelo, Lêda Maria. III. Ioshii, Sérgio Ossamu. IV. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

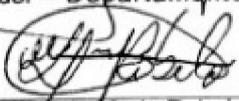
## TERMO DE APROVAÇÃO

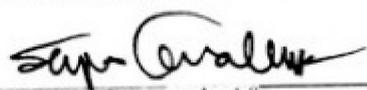
TAYZA KATELLINE DANILAU OSTROSKI

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE BIÓPSIAS BRÔNQUICAS DE PACIENTES COM ASMA GRAVE REFRACTÁRIA: UM ESTUDO DE UMA SÉRIE DE CASOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof. Dr. Dante Luiz Escussato  
Orientador – Departamento de Clínica Médica – CHC-UFPR

  
Profa. Dra. Veda Maria Rabelo  
Departamento de Clínica Médica – CHC-UFPR

  
Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii  
Departamento de Anatomia Patológica – CHC-UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2023.

Ao meu avô João Maria Ferraz Diniz (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e pelo dom da vida o que me permitiu a realização deste trabalho.

Ao meu esposo e meu filho por todo amor e cuidado a mim dedicados.

Aos meus familiares, meu pai e sua esposa, minhas irmãs e irmão por sempre estarem me dando forças para perseverar.

Ao meu orientador e aos coorientadores pela paciência e compreensão pelo momento delicado ao qual estive envolvida, e por acreditarem sempre na conclusão e realização deste trabalho.

Aos nossos amigos e colegas de pós-graduação.

Às pessoas que não estão mais presentes fisicamente, mas que de alguma forma se fazem presentes nos nossos corações e lembranças.

Agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

**“Tudo vale a pena. Se a alma não é pequena”**

**Fernando Pessoa**

## RESUMO

A asma é uma doença respiratória crônica, heterogênea e comum, que afeta cerca de 1% a 18% da população em diferentes países. Estima-se que seja a causa de 346.000 mortes anualmente em todo o mundo. Entretanto, apesar dos avanços no conhecimento sobre a doença, ela ainda é sub-diagnosticada, sendo que atualmente há poucos dados nacionais sobre o impacto da asma. Esse é um estudo observacional transversal e descritivo, onde foram revisados os prontuários e os exames anatomopatológicos de pacientes atendidos no Ambulatório de Asma do Serviço de Pneumologia do CHC-UFPR. Foram avaliados dados como: idade, sexo, comorbidades associadas, prevalência de tabagismo, medicação em uso e exames laboratoriais e comparados com os achados citopatológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos de lavados broncoalveolares e biópsias broncopulmonares de pacientes com asma grave de difícil controle. A população estudada é de 14 pacientes de ambos os sexos, entre 18 a 90 anos de idade, todos com diagnóstico firmado de asma grave de difícil controle. Um estudo detalhado desta população, poderá evidenciar dados relevantes para futuras melhorias no atendimento desses pacientes.

Palavras-chave: Asma grave. Prognóstico. Patologia. Imuno-histoquímica.

## **ABSTRACT**

Asthma is a chronic, heterogeneous and common respiratory disease that affects approximately 1% to 18% of the population in different countries. It is estimated to cause 346,000 deaths annually worldwide. However, despite advances in knowledge about the disease, it is still underdiagnosed, and currently there is little national data on the impact of asthma. This is a cross-sectional observational and descriptive study, in which the medical records and pathological examinations of patients treated at the Asthma Outpatient Clinic of the Pulmonology Service of CHC-UFPR were reviewed. Data such as: age, sex, associated comorbidities, prevalence of smoking, medication in use and laboratory tests were evaluated and compared with the cytopathological, anatomopathological and immunohistochemical findings of bronchoalveolar lavage fluids and bronchopulmonary biopsies of patients with severe, difficult-to-control asthma. The studied population consisted of 14 patients of both sexes, between 18 and 90 years of age, all with a confirmed diagnosis of severe, difficult-to-control asthma. A detailed study of this population may provide relevant data for future improvements in the care of these patients.

Keywords: Severe Asthma. Prognosis. Pathology. Immunohistochemistry.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 ASMA GRAVE E ASMA GRAVE REFRATÁRIA.....	13
1.2 AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NA ASMA.....	14
1.3 OS FENÓTIPOS E ENDOTIPOS DA ASMA .....	15
1.4 AS CARACTERÍSTICAS DO FENÓTIPO INFLAMATÓRIO T2.....	17
1.5 AS CARACTERÍSTICAS DO FENÓTIPO INFLAMATÓRIO NÃO-T2.....	17
1.6 A CLASSIFICAÇÃO DAS CITOCINAS.....	18
1.7 AS ALTERAÇÕES RADIOLÓGICAS NA ASMA.....	19
1.8 O USO DA PATOLOGIA DIGITAL COMO FERRAMENTA DE AUXÍLIO DIAGNÓSTICO.....	19
1.9. UMA VISÃO FUTURISTA NO SEGUIMENTO DE PACIENTES COM ASMA...	20
<b>2 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO.....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS DO TRABALHO.....</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO I – COMISSÃO DE ÉTICA.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO II – SUBMISSÃO DO ARTIGO .....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica, heterogênea, que afeta mais de 300 milhões de pessoas, e é responsável por 346.000 mortes anualmente em todo mundo, de acordo com relatórios da *Global Initiative for Asthma* (GINA). O Brasil ocupa a 8ª posição mundial em prevalência de asma, e cinco pessoas morrem a cada dia por complicações da doença em nosso país. Os custos com a doença superam os gastos com o HIV e tuberculose somados. (CARDOSO *et al.*, 2017), (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2020), (OPAS/OMS, acesso em janeiro de 2023)

É caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, e pode ser definida pela história de sintomas respiratórios, como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse, combinado a limitação variável do fluxo aéreo expiratório. Além disso, os sintomas variam em tempo e intensidade, uma vez que muitas vezes são desencadeados por fatores como exercício, exposição a alérgenos, alterações climáticas ou infecções respiratórias virais. (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2020)

A asma é uma doença complexa, resultado da associação multigênica com fatores ambientais. A genética pode predispor à hiperresponsividade a fatores ambientais como infecções virais, infecções bacterianas, exposição a alérgenos inalatórios, exposição ocupacional, aditivos alimentares e produtos químicos, irritantes, aspirina em pessoas predispostas, fortes emoções e reações como riso. (OBER; HOFFJAN, 2006), (SEE; PHUA; LIM, 2016), (SINGH; BUSSE, 2006)

O diagnóstico deve ser baseado em anamnese, exame clínico, provas de função pulmonar e avaliação de alergia. São indicativos de asma um ou mais dos sintomas: dispneia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, geralmente a noite ou pela manhã; sintomas episódicos; melhora espontânea ou pelo uso de medicações específicas para asma; três ou mais episódios de sibilância no último ano; variabilidade sazonal dos sintomas e história familiar positiva para asma ou atopia; excluindo-se diagnósticos alternativos. O exame físico pode ser normal ou apresentar sibilos expiratórios. A prova de função pulmonar incluindo volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), capacidade vital forçada

(CVF), e razão VEF1/CVF podem ajudar no diagnóstico. Mas a confirmação do diagnóstico de asma se dá com demonstração de limitação reversível do fluxo de ar através da análise do VEF1, geralmente definido como melhora em 12% e 200mL após o uso de broncodilatador de curta ação. Já a avaliação de alergia pode ser feita através de testes cutâneos ou determinação sérica de imunoglobulina E (IgE) específica. (BUSSE; LEMANSKE, 2001), (FATTEH; REKKERTH; HADLEY, 2014)

Além disso, outros exames podem ser realizados como hemograma, que quando apresenta eosinofilia em sangue periférico, associada à obstrução de vias aéreas pode sugerir diagnóstico de asma em adultos; estudo de escarro induzido para estudo de inflamação de vias aéreas, em que a presença de eosinofilia suporta o diagnóstico de asma; estudo do condensado brônquico aspirado, apesar de seu uso limitado apenas a centros de pesquisa em asma, pode ser útil no diagnóstico, permitindo análise de marcadores inflamatórios como óxidos de nitrogênio (nitrito e nitrato), peróxido de hidrogênio, citocinas, leucotrienos, prostaglandinas e o pH. (TAVARES, 2006)

No *Global Initiative for Asthma* a doença é classificada em três categorias: leve, moderada e grave; a categorização utilizada leva em consideração para classificação de gravidade, o nível mínimo de tratamento requerido para o controle dos sintomas e de exacerbações da doença. (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2020), (NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, 2007)

Segundo os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – PCDT (2022) para manejo da asma, disponibilizado pelo Ministério da Saúde, o objetivo do tratamento deve ser a melhora da qualidade de vida, obtida pelo controle dos sintomas e melhora, ou estabilização, da função pulmonar. O tratamento deve incluir medidas não farmacológicas, indicadas em todos os casos, e farmacoterapia, conforme indicado. A cada retorno do paciente, deve-se avaliar a adesão e tolerância ao tratamento, a ocorrência de sintomas e a função pulmonar, sendo que, aqueles com dificuldade de controle da doença, ou seja, os pacientes com asma grave, devem ter acompanhamento por um pneumologista.

O tratamento farmacológico é definido com base nos sintomas, na avaliação funcional e na história clínica do paciente. É importante evidenciar a existência de

duas categorias de medicamentos: os de controle e os de alívio/resgate. Os medicamentos de controle atuam no sentido de reduzir a atividade inflamatória e prevenir a ocorrência dos sintomas da asma; os de resgate buscam o alívio rápido dos sintomas da asma. O medicamento de controle mais utilizados é o corticoide inalatório, podendo ser associado ao beta-2-adrenérgico de longa duração, conforme a classificação de gravidade da doença. O uso de Inibidores de leucotrieno, anticolinérgicos de longa ação e imunobiológicos também são empregados como tratamento; o uso de corticoide oral de forma contínua, mesmo em baixas doses, tem sido desencorajado atualmente, devido aos seus efeitos colaterais. (PROTOCOLOS CLÍNICOS DE DIRETRIZES TERAPÊUTICAS – PCDT, 2022), (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2022)

### 1.1. ASMA GRAVE E ASMA GRAVE REFRATÁRIA

A asma não controlada é definida por pobre controle dos sintomas, indicada pelo uso frequente de medicação de alívio, limitações das atividades diárias e despertar noturno; e/ ou frequentes exacerbações, mais de duas por ano que requeiram uso de corticoides orais, ou uma que necessite de hospitalização. (DIAGNOSIS AND MANAGEMENT TO DIFFICULT-TO-TREAT & SEVERE ASTHMA, 2019)

A asma grave é aquela que não é controlada a despeito do uso de doses médias ou altas de corticoide inalado, associada a uma segunda medicação, adicionada ao uso do corticoide oral de manutenção. A asma grave refratária é a asma não controlada por um período de seis meses, mesmo com o uso otimizado da dose máxima terapêutica, ou que apresente piora dos sintomas com a redução da dose da medicação. O paciente necessita ser aderente à terapia e fazer uso correto na medicação para ser classificado nesta categoria. (DIAGNOSIS AND MANAGEMENT TO DIFFICULT-TO-TREAT & SEVERE ASTHMA, 2019).

A prevalência da asma grave é de 17% entre a população de asmáticos, e aproximadamente um quinto destes doentes (3,7%) apresenta asma grave refratária. Estima-se que dois terços destes pacientes sejam do sexo feminino. Muitos deles apresentam redução da expectativa de vida pelas morbidades causadas pela

doença e pelos efeitos colaterais do uso de altas doses de corticoide oral. Apesar do número absoluto de pacientes com asma grave refratária parecer baixo, os custos com estes pacientes ultrapassa em mais da metade o total de custos de todos os pacientes com asma. (BAYES; THOMSON, 2016), (CHUNG, 2017), (DIAGNOSIS AND MANAGEMENT TO DIFFICULT-TO-TREAT & SEVERE ASTHMA, 2019)

É importante sempre identificar possíveis causas do não controle da asma, tais como: pobre adesão à medicação, sub-doses de medicação e comorbidades existentes. O diagnóstico correto também inclui a distinção entre possíveis diagnósticos diferenciais, como doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia, respiração disfuncional, lesões endobrônquicas, tromboembolismo pulmonar, disfunção das cordas vocais ou problemas de origem cardíaca. (BAYES; THOMSON, 2016)

## 1.2. AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NA ASMA

Para muitos pacientes com asma grave, a avaliação diagnóstica é dependente de um estudo broncoscópico, seguido de realização de lavado brônquico e biópsia. Para que o paciente seja eleito a uma biópsia das vias aéreas, é necessário que a terapia esteja otimizada. Aproximadamente 30% dos pacientes com asma grave refratária serão submetidos à biópsia. Dois pontos são cruciais na avaliação de uma biópsia brônquica: o diagnóstico estrutural preciso da doença das vias aéreas, e a heterogeneidade dos fenótipos determinantes de terapia específica. A avaliação visual das vias aéreas também é útil para descartar outras anormalidades estruturais, aspiração ou infecção. Achados atípicos (aumento da fração de óxido nítrico exalado, eosinofilia persistente, necessidade de tratamento com oxigênio, autoanticorpos positivos, doença autoimune coexistente ou histórico familiar de autoimunidade, e diagnóstico incerto), e alterações tomográficas (aprisionamento aéreo, alterações em vidro fosco, entre outras) também podem tornar o paciente candidato ao procedimento de biópsia. (DOBERER; TREJO BITTAR; WENZEL, 2015)

As alterações histológicas na asma podem ser observadas à macroscopia e à microscopia. Os estudos com as alterações macroscópicas, em sua maioria, são

achados de necrópsia de pacientes com o diagnóstico de asma. Notam-se alterações como hiperinsuflação pulmonar, e tampões de muco em toda a extensão da árvore brônquica. Até 20% dos pacientes apresentam bronquiectasias. (BARRIOS, 2006),(TREJO BITTAR, 2017)

Os achados microscópicos incluem descamação do epitélio brônquico, espessamento do epitélio, metaplasia escamosa, espessamento da membrana basal, aumento do número de células caliciformes com a conseqüente formação de tampões de muco, inflamação muitas vezes com predomínio eosinofílico, fibrose e edema em lâmina própria, aumento da vascularização capilar, hiperplasia do músculo liso e hipertrofia de glândulas submucosas. Episódios repetidos de inflamação com as constantes alterações citadas acima levam a uma série de mudanças nas vias aéreas denominadas remodelamento. (BARRIOS, 2006), (TREJO BITTAR, 2017), (JENKINS, 2003)

### 1.3. OS FENÓTIPOS E ENDOTIPOS DA ASMA

Fenótipo é um termo utilizado para descrever as características que podemos observar. Em se tratando de pacientes com asma, o que podemos “observar” são: as características clínicas, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, e as respostas terapêuticas. Há uma relevância clínica em estudar os fenótipos, mas apresenta a limitação de fornecer uma visão mais estática do doente, e não dinâmica de todos os processos que envolvem a doença. (LÖTVALL, 2011), (YOO, 2013)

De acordo com o *Global Initiative for Asthma* (GINA) vários são os fenótipos da asma. A asma alérgica é o fenótipo mais comum, sendo caracterizado por pacientes que desenvolvem a doença na infância, e geralmente estão relacionados a um perfil inflamatório eosinofílico. A asma não alérgica tem um perfil inflamatório heterogêneo, podendo ser neutrofílico, eosinofílico ou paucicelular. A asma de início na idade adulta é mais comum em mulheres e geralmente não é alérgica, e pode estar relacionada às atividades laborais. A asma com persistente limitação do fluxo aéreo é decorrente do intenso remodelamento das vias aéreas. E a asma relacionada à obesidade na qual os pacientes apresentam limitação respiratória e leve aumento de

eosinófilos. (GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION, 2020)

Endotipo é uma nova forma de subdivisão da asma, ainda não totalmente compreendida, definida por um mecanismo funcional ou fisiopatológico distinto. É uma forma diferente de classificar os fenótipos. É uma tentativa de explicar os sintomas clínicos, a epidemiologia e a resposta terapêutica através de mecanismos genéticos, ambientais, patológicos, imunológicos e moleculares. Os vários endotipos da asma visam compreender melhor as diferentes vias fisiopatológicas da doença com o fim de identificar novos alvos terapêuticos e biomarcadores que possam ajudar a prever a melhor resposta ao tratamento instituído, e melhorar o prognóstico dos pacientes. (LÖTVALL, 2011), (YOO, 2013)

A princípio todos os pacientes eram tratados da mesma forma, tendo por princípio que a via patofisiológica tradicional da asma era a Th2, ou seja, uma doença mediada por células *T-helper 2*, comumente associada a pessoas que apresentam atopia e têm uma tendência a produzir imunoglobulina E (IgE). A não responsividade de alguns pacientes à terapia, e a heterogeneidade da doença é que faz da endotipagem uma nova tendência terapêutica visando a personalização da medicina. (KURUVILLA; LEE; LEE, 2019), (LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019)

As citocinas exercem um papel-chave nos fenótipos inflamatórios da asma. As citocinas são proteínas de sinalização extracelulares, com tamanho inferior a 80 kD. Não se sabe exatamente o papel preciso de cada citocina na asma, porém sabe-se que esses mediadores desempenham um papel importante na inflamação. Quase todos os tipos de células nucleadas podem produzir citocinas, e elas possuem as mais variadas funções, atuando em uma complexa via em cascata. Podem ser classificadas em: linfocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas inibitórias, fatores de crescimento e quimiocinas. E suas vias de atuação podem ser autócrinas (efeitos nas células de origem), parácrina (efeitos em células adjacentes), ou endócrinas (efeitos em células distantes). (KURUVILLA; LEE; LEE, 2019), (MAHAJAN; MEHTA, 2006)

#### 1.4. AS CARACTERÍSTICAS DO FENÓTIPO INFLAMATÓRIO T2

A ativação da via T2 é feita através de um sistema complexo que envolve imunidade inata e adaptativa. Para que haja a ativação destas células Th2, é necessário uma série de estímulos ambientais, tais como alérgenos, poluentes, exposição a vírus, entre outros, o que levará a síntese de citocinas, estimulação de células dendríticas, resultando em diferenciação e expansão clonal de células Th2 com posterior ativação destas células e consequente eosinofilia tecidual. As citocinas que mais estão envolvidas com esta via são: interleucina – 4 (IL-4), interleucina – 5 (IL-5), e interleucina – 13 (IL-13). A imunoglobulina E (IgE) apesar de não ser uma citocina, também assume um papel importante na alergia, modulando e ativando a secreção de citocinas, o que levará a ativação de eosinófilos, e apresentando afinidade com basófilos e mastócitos. Os fenótipos que mais se correlacionam com esta via inflamatória são aqueles relacionados à asma alérgica. Os biomarcadores mais utilizados para avaliação clínica da gravidade da asma em pacientes com este fenótipo são a quantificação de eosinófilos em sangue periférico e a medida sérica de IgE. (CHUNG, 2015), (KURUVILLA; LEE; LEE, 2019)

#### 1.5. AS CARACTERÍSTICAS DA VIA INFLAMATÓRIA NÃO T2

Ao contrário da via T2 que é marcada por aumento do número de eosinófilos, a via não-T2 é marcada por neutrofilia. Os mecanismos da asma neutrofílica não são totalmente conhecidos. Encontrou-se associação desta via inflamatória a doenças crônicas, infecção bacteriana, obesidade, tabagismo e anormalidades do músculo liso. As principais citocinas envolvidas com esta via são a interleucina – 8 (IL-8) e interleucina – 17 (IL-17), além do fator de necrose tumoral (TNF-alfa) que está aumentado nos pacientes desta via. Estudos experimentais mostraram que a IL-17 promove a proliferação de fibroblastos o que neutraliza o papel anti-inflamatório das células-T reguladoras e causa contração direta do músculo liso brônquico. Sabe-se também que a produção de citocinas pelas células Th17 tem uma associação com a resistência a esteroides. Isso explica a não responsividade ao tratamento com corticoides e a busca de terapias alternativas a estes pacientes. Os fenótipos

correlacionados com esta via inflamatória são aqueles relacionados à obesidade e tabagismo. Clinicamente ainda não há nenhum biomarcador efetivo para o seguimento dos pacientes deste grupo, pois ainda não se encontrou nenhum biomarcador sensível a neutrófilos. (CHUNG, 2015), (KURUVILLA; LEE; LEE, 2019)

## 1.6. A CLASSIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

As citocinas podem ser subdivididas de acordo com o seu papel na patofisiologia da asma. As linfocinas, ou citocinas derivadas das células Th2 são produzidas principalmente por linfócitos T. A IL-4 é um dos principais representantes deste grupo. A IL-4 tem um peso molecular de 18kD e tem um papel importante na inflamação alérgica e na síntese de IgE. É secretada por timócitos maduros, células-T, mastócitos, basófilos e linfócitos T CD4 +. O seu papel fundamental na asma vai além de protagonizar os distúrbios alérgicos, mas estimular as células a produzir muco e fibroblastos, implicando na patogênese da remodelação das vias aéreas. Ela induz um padrão de inflamação predominantemente linfocítico e eosinofílico, porém ainda não se estabeleceu a relação desta citocina com a hiperresponsividade das vias aéreas. (MAHAJAN; MEHTA, 2006)

As citocinas pró-inflamatórias participam de uma série de reações pró-inflamatórias tais como o recrutamento de leucócitos através da regulação de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares e indução da síntese de citocinas e quimiocinas. Tem como um dos principais representantes o TNF-alfa. É uma citocina abundante nas vias aéreas de pacientes asmáticos, produzida principalmente por macrófagos, e também por linfócitos T, células epiteliais e eosinófilos. Estudos in vitro demonstram que o TNF-alfa desempenha um papel na hiperresponsividade brônquica e na remodelação das vias aéreas na asma. (MAHAJAN; MEHTA, 2006)

As citocinas inibitórias são tão importantes na asma alérgica quanto as linfocinas. Assim como as linfocinas estimulam a inflamação, a não inibição da mesma via é tão prejudicial quanto. É neste contexto que a interleucina – 10 (IL-10) é atuante. A IL-10 tem um peso molecular de 40kD, é produzida por células Th0, Th1, linfócitos T CD4 + e CD8 +, e monócitos ativados. Em pulmões saudáveis ela é

secretada pelos macrófagos. Seu papel na asma não é conhecido, mas acredita-se que ela tenha o potencial de diminuir a regulação de processos inflamatórios, tanto Th1 quanto Th2, e que ela pode ter um efeito benéfico na remodelação das vias aéreas, pela sua capacidade de reduzir a síntese de colágeno tipo I e reduzir a proliferação de músculo liso. (MAHAJAN; MEHTA, 2006)

O último grupo de citocinas inclui os fatores de crescimento, que atuam na proliferação e na diferenciação de células musculares lisas. O fator de crescimento transformador – beta (TGF-beta) é um dos seus integrantes. É produzido por eosinófilos, neutrófilos, células do músculo liso das vias aéreas, fibroblastos pulmonares, células epiteliais e mastócitos ativados. Em indivíduos asmáticos a secreção desta citocina pode estar relacionada a gravidade da doença e o grau de fibrose subepitelial, demonstrando o seu papel no processo de remodelamento. (MAHAJAN; MEHTA, 2006)

### 1.7. AS ALTERAÇÕES RADIOLÓGICAS NA ASMA

Uma alteração muito prevalente em exames de tomografia computadorizada de alta resolução em pacientes com asma é o espessamento da parede brônquica, e geralmente este espessamento é mais evidente em pacientes com obstrução grave do fluxo aéreo. Apesar da maioria dos pacientes com asma apresentarem diâmetro interno dos brônquios diminuídos, a dilatação ou bronquiectasia pode ser vista em cerca de 40% dos doentes. Áreas de atenuação, aprisionamento aéreo, e a presença de estruturas centrolobulares proeminentes também podem ser observados. No parênquima as alterações mais comuns são hiperinsuflação e enfisema. Cistos raramente são vistos. (SILVA; COLBY; MÜLLER, 2004)

### 1.8. O USO DA PATOLOGIA DIGITAL COMO FERRAMENTA DE AUXÍLIO DIAGNÓSTICO

Não há um teste padrão ouro diagnóstico para a asma devido a sua heterogeneidade de apresentações clínicas. Aproximadamente 30% dos pacientes podem receber um diagnóstico errado sobre a doença, e assim ter implicações

terapêuticas inadequadas e pior prognóstico. Técnicas de diagnóstico digital e de inteligência artificial têm cada vez sido mais empregadas com o intuito de deixar o processo mais rápido, preciso e confiável. Sistemas de redes neurais já conseguem identificar por base de dados clínicos os pacientes que apresentam o diagnóstico de asma. Análise de imagens de lâminas histológicas escaneadas vem para complementar este processo. (TOMITA, 2019)

### 1.9. UMA VISÃO FUTURISTA NO SEGUIMENTO DE PACIENTES COM ASMA

Sabe-se cada vez mais que a asma é uma doença heterogênea com diferentes mecanismos fisiopatológicos e distintos fenótipos. Compreender melhor estes mecanismos é o objetivo para melhorar as respostas terapêuticas e suas possíveis falhas. Cada vez mais ensaios clínicos deverão levar em conta fatores genéticos e biomarcadores para direcionar a terapêutica. O uso de medicamentos como terapia alvo na asma é o futuro otimista que esperamos. (LÖTVALL, 2011)

## 2. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

De posse dos dados que permitam o delineamento de um perfil epidemiológico da amostra sob estudo, é possível conhecer o serviço e suas demandas de forma mais específica, guiando assim o planejamento em saúde e evitando práticas onerosas desnecessárias aos profissionais, aos pacientes e às entidades públicas. Além disso, o conhecimento das situações prevalentes ou pouco prevalentes no grupo em análise gera a possibilidade de delineamento de abordagens mais centradas na saúde daqueles com as mesmas condições dos participantes ou mesmo como exemplo a outras unidades de atendimento, melhorando o serviço como um todo.

Busca-se também gerar ferramentas de comparação entre dados mundiais, nacionais e o serviço sob estudo, buscando por alterações que possam ser corrigidas e melhoradas a partir do delineamento do perfil epidemiológico.

Sabe-se que as doenças respiratórias possuem correlação com diversas outras condições clínicas. Vê-se, portanto, uma necessidade de atualização do perfil

epidemiológico do Ambulatório de Asma do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná para correlacionar índices, avaliar o serviço e direcionar condutas. Tais condutas não serão apenas benéficas ao próprio serviço, que atende grande contingente populacional do Estado do Paraná, mas também exemplo para outras unidades do próprio Complexo e mesmo interação com serviços de Pneumologia de outras localidades, buscando atualização e informação.

O conhecimento da realidade do paciente com o diagnóstico da doença sob análise gera benefícios ao compreendê-lo de forma mais abrangente, gerando a possibilidade da interferência do profissional da saúde não apenas na doença em si, mas contribuindo para a melhora da qualidade de vida do enfermo amplamente como benefício direto. Além disso, permite ao serviço direcionar recursos às situações mais prevalentes, possibilita o planejamento e a gestão da saúde. Ao profissional é possível estar seguro de suas práticas baseadas na evidência científica e à sociedade, gera-se melhoria no atendimento e na confiança ao serviço.

### **3. OBJETIVOS DO TRABALHO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Conhecer o perfil epidemiológico e clínico-patológico de pacientes com asma grave em nosso meio atendido num ambulatório especializado.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1. Conhecer as características patológicas de biópsias pulmonares em pacientes portadores de asma grave;

3.2.2. Avaliar qualitativa e quantitativamente os tipos de células inflamatórias identificadas em biópsias pulmonares de pacientes com asma grave;

3.2.3. Realizar estudo morfométrico das alterações histopatológicas encontradas nas biópsias pulmonares de pacientes portadores de asma grave;

3.2.4. Conhecer o perfil imuno-histoquímico de biomarcadores de atividade inflamatória nas biópsias pulmonares destes pacientes.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Trata-se de estudo observacional, transversal e descritivo. A pesquisa foi realizada a partir da coleta e análise estatística de dados dos prontuários de pacientes que fizeram acompanhamento no Ambulatório de Asma do Serviço de Pneumologia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) durante o período de 2013 a 2019. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CHC-UFPR sob o número 030-76918.00000.0096.

Foram revisados os prontuários dos pacientes atendidos entre 2013 e 2019 no Ambulatório de Asma do Serviço de Pneumologia do CHC-UFPR. Os dados foram obtidos dos prontuários dos pacientes e tabulados em uma planilha do Excel®. Posteriormente, foram submetidos à análise estatística. A coleta foi realizada exclusivamente pelos pesquisadores. Foram valorizados dados como: idade, sexo, comorbidades associadas, prevalência de tabagismo, classificação de gravidade da asma, medidas do exame de espirometria, laudo de tomografia computadorizada de tórax, laudo de exames anatomopatológicos de biópsias de pulmão, medicação em uso e número de exacerbações.

Em relação aos exames anatomopatológicos, os laudos foram revisados e os achados principais anotados. As lâminas mantidas em arquivo foram avaliadas conforme parâmetros qualitativos e quantitativos, observando-se as características da mucosa respiratória, da parede bronquiolar e da arquitetura dos alvéolos. Foram identificadas e quantificadas células inflamatórias e os elementos estruturais como quantidade de fibras musculares lisas. Os parâmetros foram avaliados por ferramentas de morfometria.

Estudo imuno-histoquímico para identificação de biomarcadores relacionadas a atividade inflamatória foram realizados, em especial na identificação da expressão de citocinas. Para o estudo imuno-histoquímico foram obtidos cortes de parafina com 4µm de espessura. As lâminas preparadas foram submetidas ao processo de

imuno-histoquímica, sendo submetidas à desparafinização com xilol quente (37 °C), à desidratação com banhos sucessivos de álcool e à reidratação com água. Foi utilizado álcool metílico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o segundo bloqueio. Seguiu a incubação com os anticorpos primários escolhidos para o estudo nas diluições determinadas, com duração de uma hora, em câmara úmida e temperatura ambiente. O anticorpo secundário (Advance<sup>TM</sup> HRP Agilent Technologies®), associado ao polímero dextrana, foi incubado com o material por 30 minutos, também em temperatura ambiente. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB e substrato e a contra-coloração com hematoxilina de Mayer, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e da clarificação com xilol. Controles externos positivos e negativos, estes últimos obtidos através da omissão do anticorpo primário, para cada anticorpo foram utilizados.

As lâminas de imuno-histoquímica foram escaneadas no equipamento Zeiss Axio Scan Z1®, o qual processa a imagem em software próprio e específico, e realiza cortes em diferentes pontos específicos das imagens escaneadas. Estas imagens foram posteriormente selecionadas e os dados de morfometria foram calculados no software livre ImageJ®.

Com os parâmetros anatomopatológicos e morfológicos, foi realizada correlação anátomo-clínica-radiológica para identificação de características específicas que possibilitem identificação de grupos fenotípicos específicos e que tenham alguma relação com resposta clínico-laboratorial, terapêutica e prognóstico da asma grave.

Para a análise estatística foram utilizados os testes de *Chi*-quadrado e de Mann-Whitney, e foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram selecionados 14 pacientes e analisados parâmetros clínicos e laboratoriais, incluindo provas de função pulmonar. Destes 14 pacientes, 17 biópsias pulmonares foram estudadas e as lâminas histológicas encontram-se no arquivo da Unidade de Anatomia Patológica do CHC-UFPR, onde a pesquisa foi realizada.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de estudo, os que apresentavam asma de início precoce, e os que apresentavam asma de início tardio, conforme descrição da tabela 2.

Ao todo foram estudados 13 pacientes do sexo feminino e 1 paciente do sexo masculino. No grupo de início precoce da asma não há pacientes do sexo masculino. Define-se asma de início precoce, aquela em que o diagnóstico é realizado antes dos 18 anos de idade. De maneira geral, a asma de início precoce acomete mais pacientes do sexo masculino, porém com a idade a tendência é que a prevalência aumente nas pessoas do sexo feminino, pois os sintomas da asma tendem a ser mais graves e de difícil controle, que é o caso dos pacientes do nosso estudo. Uma das teorias para que a asma tenha prevalência no sexo feminino está relacionada a maior variação hormonal sofrida pelas mulheres o que pode influenciar na gravidade dos sintomas e na dificuldade terapêutica. (CHOWDHURY *et al*, 2021), (DE GROOT *et al*, 2016)

A média de idade foi de  $45,6 \pm 13,7$  anos, variando de 26 a 76 anos. Metade dos pacientes apresentavam obesidade, com índice de massa corporal (IMC) maior que  $30 \text{ kg/m}^2$ , Sendo que um dos pacientes apresentava obesidade grau III (IMC maior que  $40 \text{ kg/m}^2$ ). A asma é uma doença mais prevalente na população de pacientes com obesidade, e mais da metade dos pacientes com obesidade e asma apresentam maior gravidade dos sintomas. Isso se explica porque a obesidade é uma doença multifatorial e de caráter inflamatório onde várias citocinas são liberadas, dentre elas IL1, IL5, IL6, TNF-alfa, entre outras, o que ativa a via pró-inflamatória exacerbando os sintomas da asma. Fatores genéticos, dietéticos e anatômicos (menor capacidade de expansão pulmonar e menor volume de reserva expiratório), também estão presentes na relação obesidade / asma. (MOHAN *et al*; 2019)

Apenas dois dos pacientes apresentavam histórico de tabagismo. Sabe-se que o tabagismo está relacionado com a piora do controle dos sintomas da asma, mas em nosso estudo este parece não ser um fator relevante. (VIEGAS, 2009) Apesar da relação entre gravidade dos sintomas da asma aumentar com a idade, aumentar com o grau de obesidade, ou estarem relacionados com histórico de tabagismo,

entre os grupos estudados não obtivemos significância estatística para estas variáveis.

Em relação às variáveis relacionadas à asma, doze pacientes (85%) apresentava história de atopia e aproximadamente 43% tinha padrão eosinofílico, que em nosso estudo este padrão foi mais visto nos pacientes de início tardio. Para De Groot *et al*, pacientes com início tardio e perfil eosinofílico tendem a apresentar sintomas mais graves e de mais difícil controle (2016).

Aproximadamente 65% dos pacientes demonstravam espessamento parietal nos exames de tomografia computadorizada do pulmão. Sete dos pacientes apresentavam bronquiectasias, sendo dois deles com secreção impactada em vias aéreas, e seis apresentavam nódulos ou micronódulos centrolobulares ou no parênquima, cinco apresentavam atenuação em mosaico. Sinais de enfisema e aprisionamento aéreo também foram descritos para quatro pacientes. Estudos mostram que o espessamento da parede brônquica é um dado presente em tomografias de pacientes asmáticos, e que a gravidade dos sintomas e o grau de remodelamento podem interferir nesta mensuração, porém os dados ainda são um tanto subjetivos e necessitam de mais estudos para que se estabeleça relação causal objetiva entre esta variável. (NIIMI *et al*, 2000)

Histórico familiar de asma foi mais percebido em pacientes com início precoce da asma; seis dos oito pacientes com história familiar da doença apresentavam este fenótipo. Fatores genéticos podem aumentar entre 25% até 75% as chances de incidência de asma quando se apresenta histórico familiar da doença, a depender do grau de parentesco (primeiro grau), ou se apresentar irmão gêmeo monozigótico, respectivamente. Apesar de o nosso estudo acompanhar os dados da literatura, não houve significância estatística para esta variável (SHABIR; HENDERSON, 2003).

Medicamentos imunobiológicos foram indicados para dez dos quatorze pacientes. Somente dois pacientes apresentavam o *status* de asma controlada.

Na avaliação dos exames laboratoriais, valores de IgE total em 13 pacientes revelou concentração média de  $251,5 \pm 265,6$  kU/l, variando de 25 kU/l a 811 kU/l. O valor dos eosinófilos absolutos em exames de sangue foram de uma concentração média de 254  $\mu$ l, com menor valor de 13  $\mu$ l e maior valor de 568  $\mu$ l. Valores elevados

de IgE, e eosinofilia costumam estar presentes em pacientes com fenótipo de asma alérgica e eosinofílica. (SCHATZ; ROSENWASSER, 2014)

Das comorbidades apresentadas pelos pacientes, a rinite alérgica e a obesidade são as mais prevalentes, estando presente em quase 79% do total. Aproximadamente 43% dos pacientes apresentam doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia, osteoporose, fibromialgia, transtorno de ansiedade, hipotireoidismo, depressão, bronquiectasia, acalasia e hidrocefalia são outras comorbidades encontradas. Com relação ao exame de espirometria os valores estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1 – Dados de espirometria de 14 pacientes com asma grave refratária atendidos no ambulatório de pneumologia do CHC-UFPR**

Paciente	VEF1 (pré-BD)	VEF1 (pós-BD)	VEF1 (%)	CVF (pré-BD)	CVF (pós-BD)
1	1,76	1,97	59	3,3	3,5
2	0,8	0,85	44	1,85	1,79
3	1,61	2,24	82	2,46	2,98
4	1,06	1,15	38	3,27	3,36
5	1,49	1,47	35	3,19	2,88
6	2,16	2,4	82	3,47	3,75
7	1,18	1,46	57	2,82	3,05
8	0,65	0,72	43	1,19	1,26
9	1,98	2,76	89	2,59	3,6
10	1,39	1,6	68	1,94	2,16
11	0,62	0,92	49	1,53	1,9
12	1,2	1,25	49	2,5	2,45
13	0,9	0,94	33	2,63	2,66
14	1,22	1,41	51	2,49	2,85

VEF1 – volume expiratório forçado no primeiro segundo (em litros); BD – broncodilatador, CVF – capacidade vital forçada (em litros)

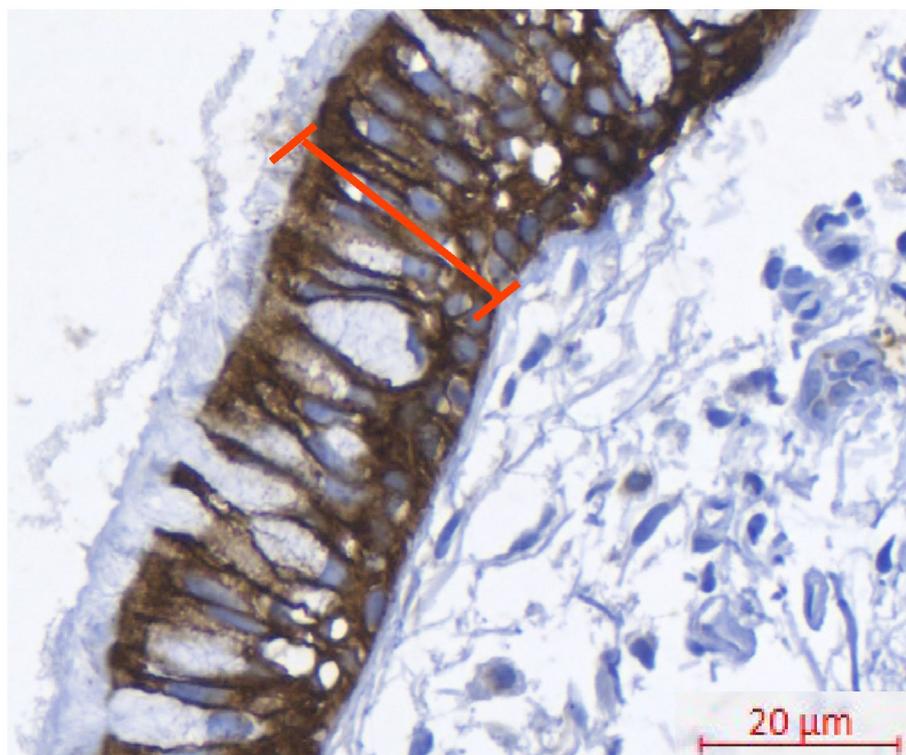
**Tabela 2. Análise estatística dos dados dos pacientes com asma de início precoce e de início tardio**

	Pacientes com asma de início precoce n= 8	Pacientes com asma de início tardio n= 6	Valor de p (<0,05)
<b>Dados demográficos</b>			
<b>Gênero</b>	8 (feminino) 0 (masculino)	5 (feminino) 1 (masculino)	-
<b>Média de idade</b>	44 (28 - 80)	51 (47-61)	0,13
<b>Índice de massa corporal (IMC – kg / m<sup>2</sup>)</b>	32,14 (23,78 – 40,60)	31,69 (28 – 38,28)	0,92
<b>Histórico de tabagismo (%)</b>	12,5	16,7	0,82
<b>Variáveis relacionadas à asma</b>			
<b>Histórico de atopia (%)</b>	87,5	83,4	0,82
<b>Padrão eosinofílico (%)</b>	25	66,7	0,11
<b>Presença de espessamento parietal na tomografia (%)</b>	75	50	0,9
<b>Uso de imunobiológico (%)</b>	62,5	83,4	0,72
<b>Status da asma não controlada (%)</b>	50	50	1
<b>Histórico familiar de asma (%)</b>	75	33,4	0,11
<b>Valores de espirometria</b>			
<b>VEF1 pré-broncodilatador</b>	1,30 (0,65 – 2,16)	1,26 (0,62 – 1,76)	0,95
<b>VEF1 pós-broncodilatador</b>	1,54 (0,72 – 2,4)	1,46 (0,92 – 1,97)	0,95
<b>CVF pré-broncodilatador</b>	2,45 (1,19 – 3,47)	2,72 (1,26 – 3,6)	0,84
<b>CVF pós-broncodilatador</b>	2,60 (1,53 – 3,3)	2,73 (1,9 – 3,5)	0,84
<b>Valores de exames laboratoriais</b>			
<b>Imunoglobulina E IU/ ml</b>	246,06 (25 - 811)	255,8 (25 – 752,5)	1
<b>Eosinófilos absolutos µl</b>	221,75 (13 - 362)	297,67 (51 - 568)	0,56
<b>Dados morfométricos</b>			
<b>Espessura do epitélio µm</b>	29,71 (23,52 – 42,04)	28,81 (18,72 – 58,95)	0,27
<b>Espessura membrana basal µm</b>	4,21 (1,85 – 6,82)	2,98 (1,5 – 6,36)	0,47
<b>Músculo liso (área ocupada em %)</b>	4,72 (0,05 - 12)	2,87 (1 - 9)	0,21
<b>Linfócitos intraepiteliais/ mm<sup>2</sup></b>	15 (8 - 35)	9 (1 - 21)	0,23
<b>Linfócitos em lâmina própria/ mm<sup>2</sup></b>	42 (14 - 62)	37 (14 - 76)	0,38
<b>IL4/ mm<sup>2</sup></b>	17 (4 - 34)	12 (6 - 36)	0,14
<b>IL10/ mm<sup>2</sup></b>	13 (6 - 30)	8 (3 - 18)	0,1
<b>TNF-alfa/ mm<sup>2</sup></b>	2 (2 - 3)	2 (0 -9)	0,06
<b>TGF-beta/ mm<sup>2</sup></b>	6 (2 - 12)	3 (0 - 7)	<b>0,03</b>

IMC – índice de massa corporal, VEF1 – volume expiratório forçado no primeiro segundo, CVF – capacidade vital forçada, IL – interleucina, TNF – fator de necrose tumoral, TGF – fator transformador de crescimento

Para avaliação dos achados microscópicos, as lâminas histológicas foram escaneadas e as imagens processadas pelo *Zeiss Zen Microscope Software* o qual seleciona imagens com a mesma medida e tamanho em pixels, o que padroniza a avaliação. Posteriormente áreas de um mm<sup>2</sup> foram selecionadas manualmente e analisadas pelo software livre *ImageJ*. Através de análise morfométrica foi avaliado espessamento do epitélio pela marcação do anticorpo pancitoqueratina (figura 1), espessamento da membrana basal (figura 2), contagem do número de linfócitos intraepiteliais e em lâmina própria pela expressão do anticorpo CD45 (figura 3), quantificação da porcentagem de área de hiperplasia do músculo liso através da utilização do anticorpo actina de músculo específica (figuras 4 e 5), e estudo quantitativo da análise das citocinas IL4 (figura 6), IL10, TNF-alfa e TGF-beta.

**Figura 1. Anticorpo pancitoqueratina para avaliação da espessura do epitélio (linha vermelha)**



As medidas da espessura do epitélio variaram dependendo de áreas de epitélio menos afetado, e áreas com descamação e metaplasia escamosa. A menor medida avaliada foi de 2.78 micrômetros, e a maior 89.46 micrômetros. Foram feitas

medidas médias para cálculo final, as quais variaram de 18.72 até 58.95 micrômetros. De acordo com Jeffery *et al.* (1989) a espessura do epitélio brônquico em um paciente não asmático é estimada em uma média de 49  $\mu\text{m}$ . Nos pacientes asmáticos esta espessura é geralmente menor, devido a fatores como metaplasia escamosa e descamação do epitélio, sendo estimada uma média de 39  $\mu\text{m}$  em pacientes sintomáticos.

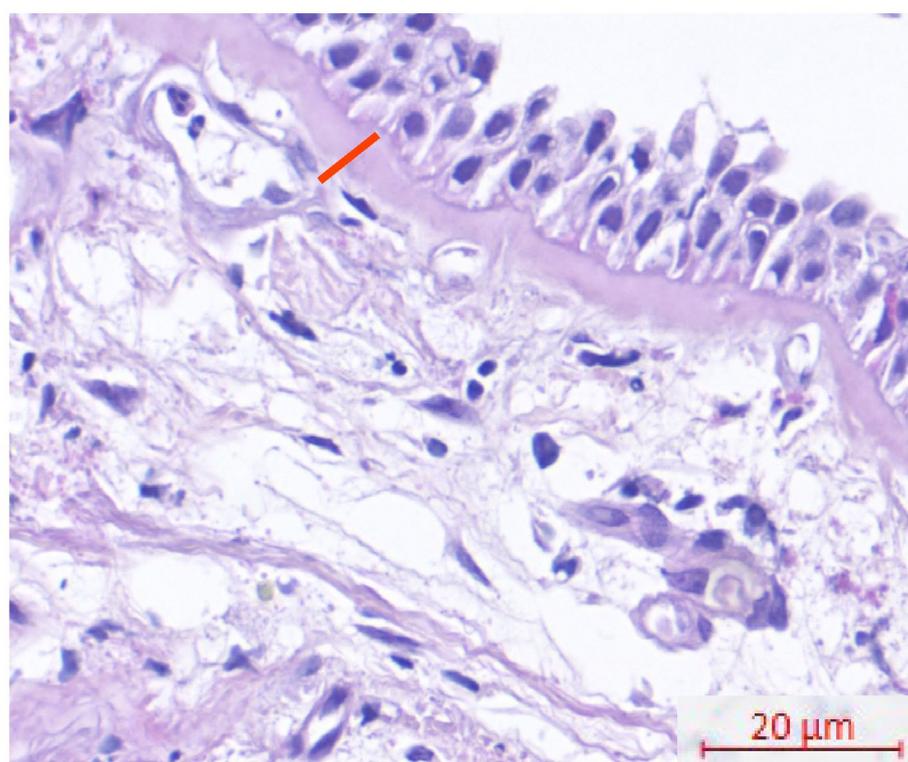
A espessura da membrana basal seguiu no mesmo padrão de medida da espessura do epitélio. A menor medida foi de 0.29 micrômetros, e a maior medida isolada foi de 13.07. As medidas médias variaram de 1.85 a 6.82 micrômetros. De acordo com Ward *et al.* (2002) houve variabilidade em todos os estudos analisados, sendo que para as amostras de pacientes sem o diagnóstico de asma, o espessamento da membrana basal varia em torno de 2.5  $\mu\text{m}$  a 3.4  $\mu\text{m}$ , e para os pacientes com o diagnóstico de asma estabelecido este mesmo parâmetro variou de 7.4  $\mu\text{m}$  até 23.1  $\mu\text{m}$ . Acredita-se que o espessamento ocorra devido à deposição excessiva de colágeno e matriz extracelular envolvendo mecanismos de ativação de células-T e miofibroblastos. Não há consenso na literatura a respeito de qual a medida seria utilizada como padrão ouro de referência. (BOURDIN *et al.*, 2007)

Para Chu *et al.* (1998), não há evidência clara na literatura a respeito da gravidade do quadro da asma e o nível de espessamento da membrana basal. Uma das hipóteses para a diferença de parâmetros estabelecidos poderia ser o uso de corticoides na terapêutica da asma, o que poderia induzir a diferentes interpretações das medidas em diferentes fases de tratamento. A idade do paciente também não parece ser um fator que modifique o nível de espessamento da membrana basal, uma vez que em ele está presente em estudos com crianças asmáticas em igual grau aos pacientes adultos com manifestações leves da doença. (PAYNE; BUSH, 2004)

Em outras linhas de pesquisa, sugere-se que o espessamento da membrana basal está relacionado a expressão de mais de 100 genes. Os genes LAMA3, USH2A, MIS12, e CDK20 foram os mais relacionados com o evento. Outros genes como TACC2, NEK5, MYO1B, CORO2A também foram citados. O mecanismo de atuação dos genes na fisiopatologia do espessamento da membrana basal é variado. Alguns dos genes atuam codificando proteínas de interação com

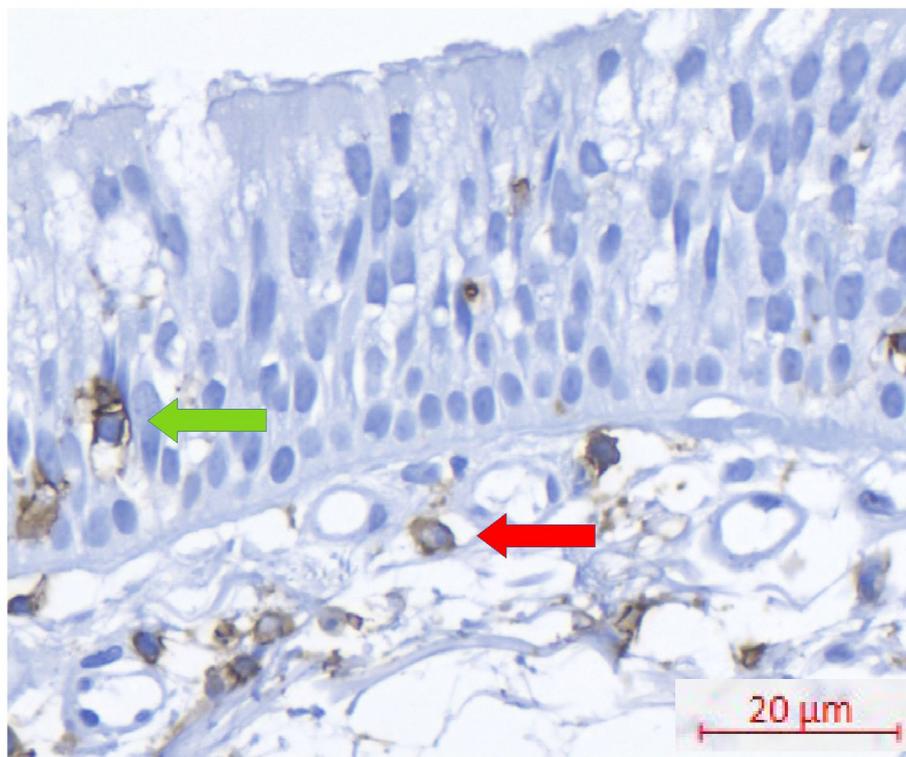
centrossoma e microtúbulos, outros modulam a replicação do DNA, os que participam de autofagia, sobrevivência e proliferação celular, e os que controlam mecanismos complexos de ciclo celular, apoptose e expressão gênica. (BAZAN-SOCHA *et al*, 2021)

**Figura 2. Medida da espessura da membrana basal (linha vermelha), em lâmina corada pela hematoxilina-eosina**



Os linfócitos maduros foram evidenciados pelo anticorpo CD45, e feita a contagem individual das células, tanto em área intraepitelial, como em lâmina própria. Para a contagem de linfócitos intraepiteliais em números absolutos, a contagem das células variou de 1 até 35 linfócitos por  $\text{mm}^2$ . As células contadas em território de lâmina própria variaram de 14 a 76 linfócitos por  $\text{mm}^2$ . No estudo de Jeffrey *et al.* (1989) na contagem de células inflamatórias intraepiteliais foi encontrada um valor médio de 22.4 células inflamatórias / mm de epitélio. Na região da lâmina própria foram contadas 599 células em uma área de 50  $\mu\text{m}$

**Figura 3. Contagem de linfócitos intraepiteliais (seta verde), e linfócitos de lâmina própria (seta vermelho)**



A hiperplasia do músculo liso foi estimada em porcentagem, primeiramente estimando a área total da imagem ocupada por tecido pulmonar, e posteriormente avaliando a área corada pelo anticorpo actina músculo específica. A menor porcentagem de área calculada foi estimada em 0,5% e a maior porcentagem foi de 12%. Pretolani *et al.* (2017), encontraram valores de porcentagem que variavam de aproximadamente 9% até 30% de área de submucosa preenchida pelo músculo liso. A variabilidade entre o nosso estudo e o descrito na literatura deve-se ao fato de que em nosso estudo contabilizamos toda a área útil da biópsia, e não somente a área de submucosa. (figuras 4 e 5)

Figura 4. Anticorpo actina músculo específico (coloração marrom)

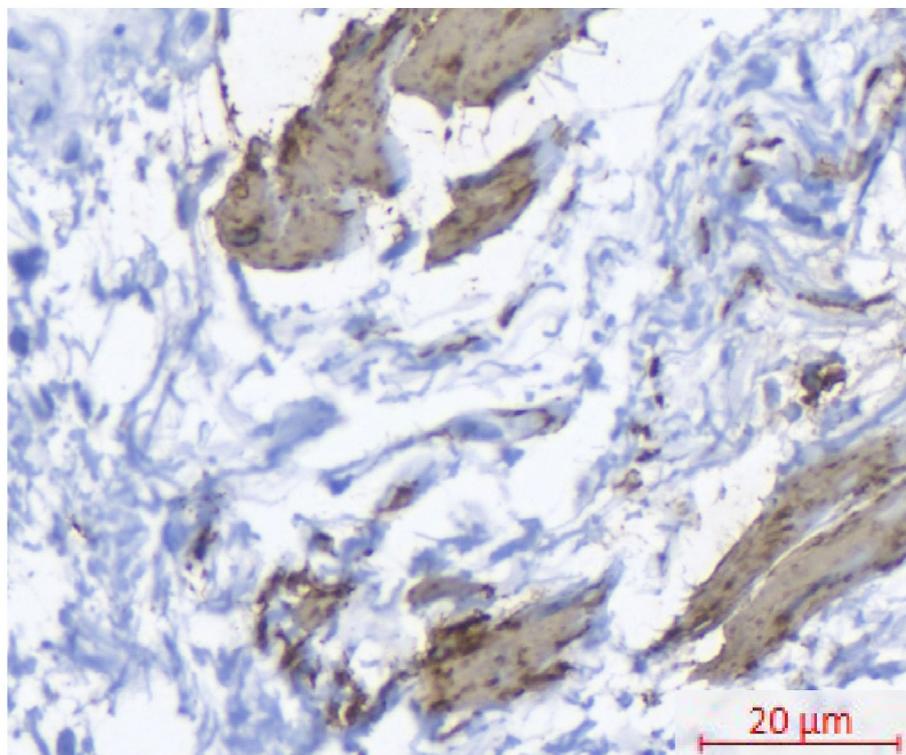
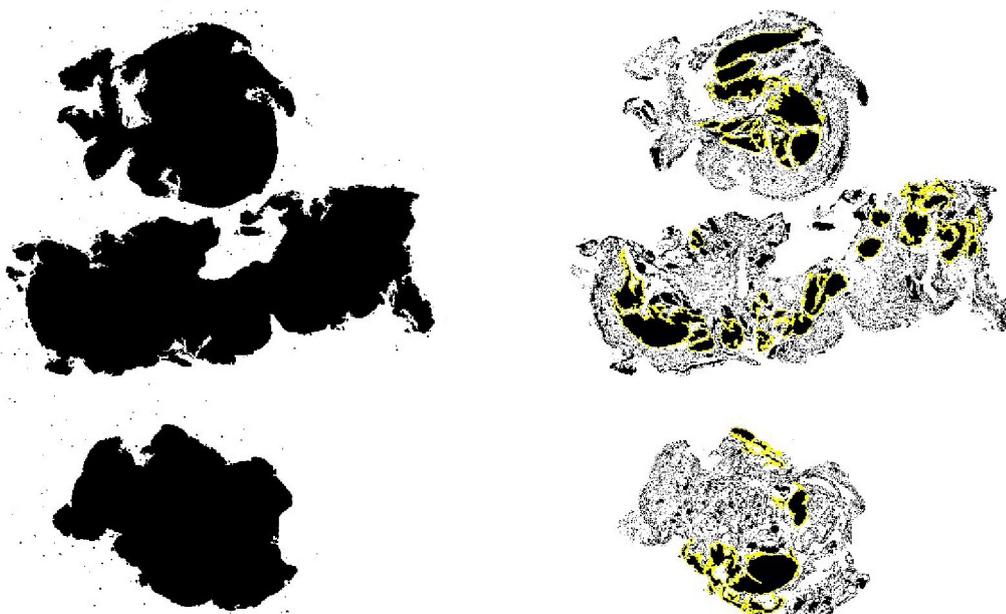
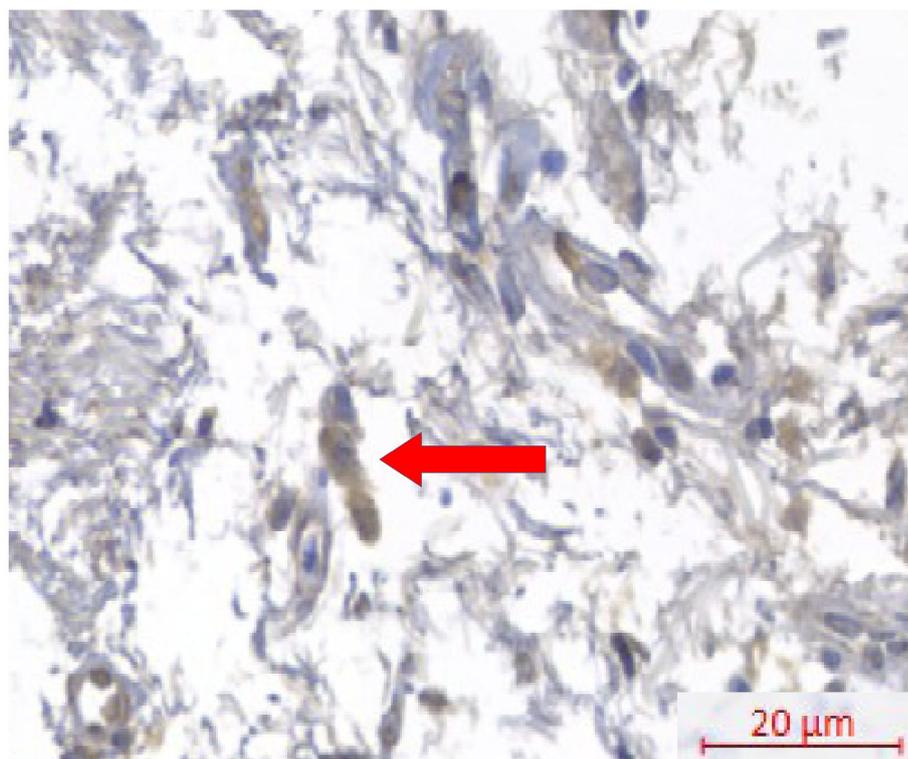


Figura 5. Estimativa da porcentagem da área de músculo liso hiperplásica. Área total (esquerda), e área de músculo liso (direita)



As interleucinas IL4, IL10, TNF-alfa e TGF-beta foram quantificados através de células inflamatórias (macrófagos) corados pelos respectivos anticorpos em lâmina própria, e todas elas apresentam o mesmo padrão de marcações exemplificadas pela figura 6. A IL4 variou em números absolutos de 4 até 36 células por  $\text{mm}^2$ , a IL10 de 3 a 30 células por  $\text{mm}^2$ , TNF – alfa de nenhuma expressão até 9 células por  $\text{mm}^2$ , e o TGF – beta de nenhuma expressão até 12 células por  $\text{mm}^2$ . Somente para a expressão de TGF – beta foi encontrado valor de p significativo ( $p < 0,03$ ). Para os demais dados não houve relação causal entre os grupos estudados.

**Figura 6. Expressão de IL4 (células coradas em marrom, seta vermelha)**



Neste contexto os macrófagos exercem um papel fundamental na asma, pois são estas células responsáveis por secretar agentes pró-inflamatórios, e anti-inflamatórios que serão essenciais no processo de remodelamento das vias aéreas. Os macrófagos alveolares são células especializadas que podem ser subdivididas em fenótipos de acordo com as interleucinas e substâncias que secretam e o seu papel na atividade inflamatória. Os macrófagos M1 são conhecidos por exercer

atividade pró-inflamatória e por induzirem resposta Th1, com a secreção de citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IL-10 em níveis baixos. Os macrófagos M2 têm ação anti-inflamatória e são polarizados pelas citocinas da via Th2, levando a alta secreção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Os macrófagos desta via têm importante ação angiogênica e fibrótica, tendo grande atuação no papel do remodelamento tecidual. (SHAPOURI-MOGHADDAM et al, 2018)

A interleucina 4 (IL-4) está intimamente associada à fisiopatologia da asma alérgica. Uma vez que substâncias alérgicas entram em contato com as vias aéreas (ácaro, pólen, poeira, etc.), elas são processadas e internalizadas pelas células dendríticas das vias aéreas, que por sua vez os apresentam às moléculas do complexo de histocompatibilidade tipo II, induzindo uma resposta mediada por linfócitos TCD4 +, polarizando a resposta imunológica para a linhagem Th2. Quando secretadas em grande quantidade os linfócitos B são induzidos a sintetizar IgE que são imunoglobulinas específicas para os alérgenos. Neste contexto, outra interleucina secretada é a IL-5, que possui efeito anti-apoptótico contra os eosinófilos, caracterizando o papel eosinofílico da asma alérgica em uma parcela dos casos. Na asma grave, é esta interleucina que exercerá papel importante na ativação de eosinófilos no epitélio brônquico, levando a uma das vias de remodelamento das vias aéreas, através do aumento da secreção de fator de crescimento transformador beta (TGF-beta). Pela via Th1 as células mais envolvidas no processo de resposta inflamatória são os neutrófilos. Associados aos níveis aumentados de linfócitos Th1 outras interleucinas estão aumentadas nos pacientes com asma grave nesta via, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Pacientes com asma grave costumam apresentar um perfil misto inflamatório eosinofílico/ neutrofílico, com processos inflamatórios ativados pelas duas vias Th1 e Th2 o que explica o processo terapêutico mais difícil. (PELAIA *et al*, 2020), (CHUNG *et al*, 2022)

## 7. CONCLUSÃO

Estudos de morfometria com pacientes com asma grave ainda são pouco realizados e relatados na literatura mundial. Para algumas variáveis ainda não há

dados comparativos na literatura, bem como a expressão das citocinas. Para as demais variáveis estudadas não há consenso a respeito de valores padrão ouro para comparação entre os espécimes.

Em nosso estudo não se estabeleceu relação causal que pudesse caracterizar melhor os pacientes com asma de início precoce e tardio para a maioria das variáveis. Porém esperamos que num futuro próximo possamos tornar uma prática diária estudos com patologia digital, auxiliando no diagnóstico, no estabelecimento de relações de causalidade e levando a uma terapêutica mais eficaz dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

BARRIOS, R. J. et al. Asthma: Pathology and pathophysiology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 130, n. 4, p. 447–451, 2006.

BAYES, H. K.; THOMSON, N. C. Chronic severe asthma in adults. **Medicine (Abingdon, England: UK ed.)**, v. 44, n. 5, p. 301–304, 2016.

BAZAN-SOCHA, S. et al. Reticular basement membrane thickness is associated with growth- and fibrosis-promoting airway transcriptome profile-study in asthma patients. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 3, p. 998, 2021.

BOURDIN, A. et al. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 6, p. 1367–1374, 2007.

BUSSE, W. W.; LEMANSKE, R. F., Jr. Asthma. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 5, p. 350–362, 2001.

CARDOSO, T. DE A. et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 43, n. 3, p. 163–168, 2017.

CHOWDHURY, N. U. et al. Sex and gender in asthma. **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, v. 30, n. 162, p. 210067, 2021.

CHUNG, K. F. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. **Lancet**, v. 386, n. 9998, p. 1086–1096, 2015.

CHUNG, K. F. Clinical management of severe therapy-resistant asthma. **Expert review of respiratory medicine**, v. 11, n. 5, p. 395–402, 2017.

CHUNG, K. F. et al. Characteristics, phenotypes, mechanisms and management of severe asthma. **Chinese medical journal**, v. 135, n. 10, p. 1141–1155, 2022.

DE GROOT, J. C. et al. Clinical profile of patients with adult-onset eosinophilic asthma. **ERJ open research**, v. 2, n. 2, p. 00100–02015, 2016.

**Diagnosis and Management of Difficult-to-treat & Severe Asthma**. Disponível em: <<https://ginasthma.org/severeasthma/>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

DOBERER, D.; TREJO BITTAR, H. E.; WENZEL, S. E. Should lung biopsies be performed in patients with severe asthma? **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, v. 24, n. 137, p. 525–539, 2015.

FATTEH, S.; REKKERTH, D. J.; HADLEY, J. A. Skin prick/puncture testing in North America: a call for standards and consistency. **Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 44, 2014.

**Global strategy for asthma management and prevention**. Disponível em: <[https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report\\_-final-\\_wms.pdf](https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final-_wms.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2023.

JEFFERY, P. K. et al. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. **The American review of respiratory disease**, v. 140, n. 6, p. 1745–1753, 1989.

JENKINS, H. A. et al. Histopathology of severe childhood asthma: a case series. **Chest**, v. 124, n. 1, p. 32–41, 2003.

KURUVILLA, M. E.; LEE, F. E.-H.; LEE, G. B. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 56, n. 2, p. 219–233, 2019.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. The cytokines of asthma. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 975–991, 2019.

LÖTVALL, J. et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 127, n. 2, p. 355–360, 2011.

MAHAJAN, S.; MEHTA, A. Role of cytokines in pathophysiology of asthma. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, 2006.

MOHAN, A. et al. The effects of obesity in asthma. **Current allergy and asthma reports**, v. 19, n. 10, p. 49, 2019.

**National heart, lung, and blood institute national asthma education and prevention program expert panel report 3: Guidelines for the diagnosis and management of asthma.** Disponível em: <[https://www.nhlbi.nih.gov/sites/default/files/media/docs/EPR-3\\_Asthma\\_Full\\_Report\\_2007.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/sites/default/files/media/docs/EPR-3_Asthma_Full_Report_2007.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2023.

NIIMI, A. et al. Airway wall thickness in asthma assessed by computed tomography. Relation to clinical indices: Relation to clinical indices. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 162, n. 4 Pt 1, p. 1518–1523, 2000.

OBER, C.; HOFFJAN, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **Genes and immunity**, v. 7, n. 2, p. 95–100, 2006.

**OPAS/OMS.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/search/r?keys=oencas+respiratorias+cronicas+Brasil>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

PAYNE, D.; BUSH, A. Phenotype-specific treatment of difficult asthma in children. **Paediatric respiratory reviews**, v. 5, n. 2, p. 116–123, 2004.

PELAIA, C. et al. Molecular targets for biological therapies of severe asthma. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 603312, 2020.

PRETOLANI, M. et al. Effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe refractory asthma: Clinical and histopathologic correlations. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 139, n. 4, p. 1176–1185, 2017.

**Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas - PCDT.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas-pcdt>>. Acesso em: 23 jan. 2023.

SCHATZ, M.; ROSENWASSER, L. The allergic asthma phenotype. **The journal of allergy and clinical immunology in practice**, v. 2, n. 6, p. 645–8; quiz 649, 2014.

SEE, K. C.; PHUA, J.; LIM, T. K. Trigger factors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a single-centre cross-sectional survey. **Singapore medical journal**, v. 57, n. 10, p. 561–565, 2016.

SHABIR, O.; EMILY HENDERSON, B. S. **The genetics of asthma**. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/health/The-Genetics-of-Asthma.aspx>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018.

SILVA, C. I. S.; COLBY, T. V.; MÜLLER, N. L. Asthma and associated conditions: high-resolution CT and pathologic findings. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 183, n. 3, p. 817–824, 2004.

SINGH, A. M.; BUSSE, W. W. Asthma exacerbations. 2: aetiology. **Thorax**, v. 61, n. 9, p. 809–816, 2006.

TAVARES, B. Exames complementares no diagnóstico da asma grave. **Rev. bras. alergologia imunopatol**, p. 117–122, 2006.

TOMITA, K. et al. Deep learning facilitates the diagnosis of adult asthma. **Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 68, n. 4, p. 456–461, 2019.

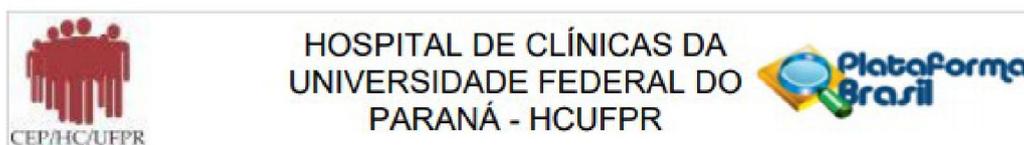
TREJO BITTAR, H. E. et al. Histologic findings of severe/therapy-resistant asthma from video-assisted thoracoscopic surgery biopsies. **The American journal of surgical pathology**, v. 41, n. 2, p. 182–188, 2017.

VIEGAS, C. A. DE A. Tabagismo e controle da asma brônquica. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 35, n. 3, p. 197–198, 2009.

WARD, C. et al. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. **Thorax**, v. 57, n. 4, p. 309–316, 2002.

YOO, Y. Phenotypes and endotypes of severe asthma in children. **Korean journal of pediatrics**, v. 56, n. 5, p. 191–195, 2013.

## ANEXO I

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Perfil clínico, funcional e inflamatório dos pacientes com asma atendidos no serviço de pneumologia do Complexo Hospital de Clínicas

**Pesquisador:** Lêda Maria rabelo

**Versão:** 4

**CAAE:** 03076918.0.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**DADOS DO COMPROVANTE**

**Número do Comprovante:**

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Perfil clínico, funcional e inflamatório dos pacientes com asma atendidos no serviço de pneumologia do Complexo Hospital de Clínicas que tem como pesquisador responsável Lêda Maria rabelo, foi recebido para análise ética no CEP Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR em 06/12/2019 às 13:40.

## ANEXO II

---

## Submission Confirmation

[Print](#)

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Revista da Associação Médica Brasileira

**Manuscript ID**

RAMB-2023-0114

**Title**

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF BRONCHIAL BIOPSES FROM PATIENTS WITH SEVERE, DIFFICULT-TO-CONTROL ASTHMA: A STUDY OF A CASE SERIES

**Authors**

Ostroski, Tayza

Nabhen, Jacqueline

Rabelo, Lêda Maria

Ioshii, Sérgio

Luiz Escuiçato, Dante

**Date Submitted**

29-Jan-2023