

BIANCA BERGAMO DE ARAÚJO

**Componentes da matriz extracelular e seus
reguladores no músculo liso brônquico na asma**

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

Área de Concentração: Patologia Pulmonar

Orientadora: Profa. Dra. Thais Mauad

**São Paulo
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho

Ao meu Deus, pela companhia e cuidado constantes,

*Aos meus queridos pais, Noel e Maria Lúcia, por toda
dedicação e amor incondicionais,*

Aos meus lindos irmãos, Fábio e Márcio, pela amizade e apoio,

Aos meus avós, exemplos de vida, por todo amor recebido,

Ao Wanderson, por tornar minha vida mais bela,

Aos meus familiares e amigos.

Minha gratidão,

À querida Profa. Dra. Thaís Mauad, minha orientadora, por proporcionar-me mais que conhecimento científico e acadêmico nestes quatro anos de doutorado. Obrigada por todo auxílio e incentivo para que eu pudesse vivenciar outra cultura, e para que este trabalho se tornasse realidade. Meu apreço e admiração pela sua dedicação e genialidade.

Aos grandes colaboradores para realização deste trabalho: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff, Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, Sandra Morais Fernezlían e Hígor Alexandre Gomes.

Aos pós-graduandos: Tatiana Lanças, Diógenes Seraphim Ferreira, Aletéia Senhoríni, Maína Maria Barbosa Morales, Ruy de Camargo Pires Neto, Denise Símlão Carnieli, Raquel Annoni, Ana Laura Nicoletti Carvalho, George Castro Figueira de Mello, pelo apoio mútuo.

Aos funcionários dos Laboratórios de Histologia e de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelo processamento das lâminas.

Aos funcionários do Museu e Sala de Imagem, da Sala dos Residentes, e às secretárias do Departamento de Patologia da FMUSP, por todo o auxílio.

Aos funcionários do Serviço de Verificação de Óbito da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo auxílio na coleta do material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Asma - Definição	2
1.2 Asma - Epidemiologia	3
1.3 Patogênese da asma	4
1.3.1 Inflamação	4
1.3.2 Alterações estruturais brônquicas na asma	5
1.4 Matriz extracelular	8
1.4.1 Reguladores da matriz extracelular (MEC)	12
1.4.2 Inibidores teciduais de metaloproteinases	13
1.5 O músculo liso brônquico (MLB) na asma	13
1.5.1 Hipertrofia	15
1.5.2 Hiperplasia	16
1.6 Deposição de MEC na camada do MLB	17
1.7 Mecanismos de alterações da MEC no MLB na asma	19
2. OBJETIVOS	24
2.1 Gerais	25
2.2 Específicos	25
3. MÉTODOS	26
3.1 Casuística	27
3.1.1 Indivíduos de São Paulo	27
3.1.2 Indivíduos de Perth	28
3.2 Métodos	31

3.2.1	Histoquímica.....	31
3.2.2	Imunohistoquímica	31
3.2.3	Morfometria	33
3.2.4	Análise Estatística	35
4.	RESULTADOS	36
4.1	Casuística	37
4.2	Morfometria	38
4.3	Análise histoquímica.....	40
4.4	Análise imunohistoquímica	42
4.5	Subgrupos analisados	46
4.5.1	Fumantes <i>versus</i> não fumantes	46
4.5.2	Uso de corticosteróide	47
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÕES	60
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	62
8.	ANEXOS.....	64
9.	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE.....	85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Anticorpos e procedimentos utilizados na análise imunohistoquímica65
- Tabela 2. Dados clínicos do grupo de Asma Fatal, Asma Não Fatal e Controle.....66
- Tabela 3. Área fracionada dos componentes de matriz extracelular no músculo liso brônquico na Asma Fatal, Asma Não Fatal e Controle.....67
- Tabela 4. Área fracionada das metaloproteinases 1, 2, 9 e 12; e inibidores das metaloproteinases 1 e 2 no interior do músculo liso brônquico nos casos de Asma Fatal e Controle.....68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação macroscópica de pulmões (A) e via aérea (B).....	30
Figura 2.	Representação da análise morfométrica realizada na camada do músculo liso brônquico.....	34
Figura 3.	Representação histológica de grande via aérea de indivíduo do grupo Controle (A) e Asma Fatal (B).....	38
Figura 4.	Área fracionada de fibras elásticas no músculo liso brônquico em grandes e pequenas vias aéreas nos grupos Asma Fatal, Asma Não Fatal e Controle.....	40
Figura 5.	Fotomicrografias mostrando área fracionada de fibras elásticas no músculo liso brônquico de indivíduo do grupo Controle (A) e Asma Fatal (B).....	41
Figura 6.	Fotomicrografias mostrando área fracionada de fibronectina no músculo liso brônquico de indivíduo do grupo Controle (A) e Asma Fatal (B).....	43
Figura 7.	Área fracionada de fibronectina no músculo liso brônquico em grandes e pequenas vias aéreas nos grupos Asma Fatal e Controle.	43
Figura 8.	Fotomicrografias mostrando expressão de metaloproteinase-9 e metaloptoteinase-12 no músculo liso brônquico, epitélio e lâmina própria de indivíduo do grupo Controle (A) e Asma Fatal (B).....	44
Figura 9.	Expressão de metaloproteinase-9 no músculo liso brônquico de grandes e pequenas vias aéreas nos grupos de Asma Fatal e Controle.	45
Figura 10.	Expressão de metaloproteinase-12 no músculo liso brônquico de grandes e pequenas vias aéreas nos grupos de Asma Fatal e Controle.	45
Figura 11.	Expressão de metaloproteinase-9 no músculo liso brônquico de grandes e pequenas vias aéreas no grupo de Asma Fatal.....	47
Figura 12.	Área fracionada de fibras elásticas no músculo liso brônquico de grandes e pequenas vias aéreas no grupo de Asma Fatal.	48

RESUMO

Araújo BB. *Componentes da matriz extracelular e seus reguladores no músculo liso brônquico na asma* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 84p.

A matriz extracelular e as células musculares lisas das vias aéreas estão intimamente interrelacionadas. Poucos estudos porém, avaliaram a composição dos diferentes componentes da matriz extracelular e seus reguladores na camada do músculo liso brônquico na asma. Utilizando um programa de análise de imagens, a área fracionada do colágeno total e das fibras elásticas foi quantificada no interior do músculo liso brônquico de 35 indivíduos que faleceram devido a um ataque de asma (Asma Fatal), e comparada com 10 casos de indivíduos com asma e que faleceram de outras causas (Asma Não Fatal), e com 22 indivíduos controles sem patologia pulmonar. Expressão dos colágenos I e III, fibronectina, versicam, metaloprotease (MMP)-1, 2, 9 e 12, e inibidores de metaloprotease 1 e 2 foram quantificados no interior do músculo liso brônquico de 22 casos de asma fatal e 10 controles. Nas grandes vias aéreas dos casos de asma fatal, a área fracionada das fibras elásticas foi significativamente maior na camada do músculo liso brônquico quando comparada com os grupos de Asma Não Fatal e Controle. Semelhantemente, fibronectina, MMP-9 e MMP-12 estavam aumentadas no músculo liso das grandes vias aéreas nos casos de asma fatal quando comparadas aos controles. Apenas aumento das fibras elásticas foi observado nas pequenas vias aéreas na Asma Fatal, e somente quando comparadas aos casos de Asma Não Fatal. O conjunto dos resultados mostra que há uma composição alterada dos elementos da matriz extracelular e um ambiente de degradação protéica no músculo liso brônquico de indivíduos que morreram por asma, o qual pode acarretar importantes conseqüências nas funções sintéticas e mecânicas do músculo liso das vias áreas.

Descritores: 1.Músculo liso 2.Matriz extracelular 3.Asma 4.Metaloproteases 5.Inibidores de proteases

SUMMARY

Araújo BB. *Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 84p.

There is an intimate relationship between the extracellular matrix (ECM) and smooth muscle cells within the airways. Few studies have comprehensively assessed the composition of different ECM components and its regulators within the airway smooth muscle (ASM) in asthma. With the aid of image analysis, the fractional area of total collagen and elastic fibres was quantified within the ASM of 35 subjects with Fatal Asthma (FA) and compared with 10 Nonfatal Asthma (NFA) patients and 22 nonasthmatic control cases. Expression of collagen I and III, fibronectin, versican, matrix metalloprotease (MMP)-1, 2, 9 and 12 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 and 2 was quantified within the ASM in 22 FA and 10 control cases. In the large airways of FA cases, the fractional area of elastic fibres within the ASM was increased compared with NFA and controls. Similarly, fibronectin, MMP-9 and MMP-12 were increased within the ASM in large airways of FA cases compared with controls. Elastic fibres were increased in small airways in FA only in comparison with NFA cases. The results show that, there is altered extracellular matrix composition and a degradative environment within the airway smooth muscle in fatal asthma patients, which may have important consequences for the mechanical and synthetic functions of airway smooth muscle.

Descriptors: 1.Smooth muscle 2.Extracellular matrix 3.Asthma
4.Metalloproteases 5.Inhibitor of Protease

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma - Definição

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar (GINA 2006).

A hiperresponsividade brônquica, uma das características dos pacientes asmáticos, é o estreitamento excessivo da via aérea, que ocorre em resposta ao desafio da via aérea a uma ampla variedade de agonistas inflamatórios e irritantes não específico, como frio, ar seco e gases oxidantes. Apesar da hiperresponsividade brônquica ser o substrato de base do estreitamento variável das vias aéreas característico da asma, o seu mecanismo não está ainda bem estabelecido. Não se sabe se, este fenômeno é causado por alterações fundamentais do fenótipo muscular ou se é causado por alterações estruturais-mecânicas dos elementos não contráteis, ou ainda por alterações na relação entre a parede da via aérea e o parênquima pulmonar adjacente (King et al., 1999; Brusasco et al., 1998). Embora os mecanismos que envolvem esta hiperresponsividade permaneçam obscuros, acredita-se que o músculo liso brônquico (MLB) dos asmáticos seja um dos principais responsáveis pelo fenômeno (An et al., 2007).

1.2 Asma - Epidemiologia

Apesar de a asma ser uma doença cujos mecanismos patogênicos e terapêuticos são relativamente bem conhecidos, a mortalidade aumentou de maneira estatisticamente significativa na década de 80, em nível mundial, e o termo paradoxo da asma foi introduzido para descrever esta observação. Mais recentemente, parece ter havido uma queda gradual na mortalidade da asma em alguns países onde as estatísticas de mortalidade são atualizadas de maneira acurada. Esta tendência tem sido observada particularmente em países que adotaram terapêuticas modernas no tratamento de asma, entre elas o uso de corticosteróide inalatório (Baluga et al., 2001; Sly, 2004; Neffen et al., 2006).

No Brasil, estima-se que 11% da população seja asmática (Masoli et al., 2004). A asma é um grande problema de saúde pública brasileira. Anualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (2,3% do total) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens (Ministério da Saúde, 2004). O estudo multicêntrico ISAAC (*International Study for Asthma and Allergies in Childhood*) realizado em 56 países mostrou uma variabilidade de asma ativa de 1,6% a 36,8%, estando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência média de 20% (ERJ, 1998). Estima-se que cerca de 2000 pessoas morram por ano no Brasil em decorrência da asma, sendo 200 delas na cidade de São Paulo (Mauad et al., 2008).

1.3 Patogênese da asma

1.3.1 Inflamação

A inflamação brônquica constitui um dos mais importantes fatores patogênicos da asma. É resultante de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas (Barnes et al., 1997; Djukanovic et al., 1990). Está presente em pacientes com asma de início recente, em pacientes com formas leves da doença e mesmo entre os assintomáticos (Vignola et al., 1998a).

A resposta inflamatória tem características especiais que incluem infiltração eosinofílica, degranulação de mastócitos e ativação de células T *helper* (auxiliadoras) 2 que produzem citocinas, como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-13, entre outras, responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório (Bousquet et al., 1990). A presença de inflamação crônica poderia agir, teoricamente, em cada um dos compartimentos da via aérea, inclusive entre as células do músculo liso brônquico, com infiltração de mastócitos (Brightling et al., 2002), tendo como consequência as alterações de caráter anatômico. É sabido que a inflamação, que pode seguir um quadro agudo ou apresentar-se de maneira crônica, promove dano tecidual progressivo.

1.3.2 Alterações estruturais brônquicas na asma

Um aspecto importante da asma são as alterações estruturais da parede dos brônquios. Através de seus mediadores, as células inflamatórias causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (Holgate, 2000).

Acredita-se que as alterações estruturais das vias aéreas, muitas delas de caráter definitivo, possam ser responsáveis pela obstrução persistente das vias aéreas e perda progressiva da função pulmonar observadas nestes pacientes (Mauad et al., 2007; Chiappara et al., 2001; Lange et al., 1998). Também é sugerido que as alterações estruturais brônquicas estejam associadas com a gravidade da doença (Chetta et al., 1997).

1.3.2.1 Remodelamento brônquico na asma

O termo Remodelamento Brônquico é normalmente utilizado para expressar modificações estruturais que ocorrem nos pulmões, especialmente em situações patológicas decorrentes do próprio processo inflamatório e da falta de reparo adequado à injúria crônica (Vignola et al., 2003). Várias alterações estruturais são relatadas no remodelamento brônquico. As principais alterações estruturais das vias aéreas descritas na asma, resumidamente, são:

Epitélio de revestimento brônquico:

No indivíduo fora da crise observa-se metaplasia de células caliciformes, e em menor grau, metaplasia escamosa. Nos casos de asma grave e fatal observa-se intensa descamação epitelial que concede ao epitélio um aspecto frágil (Mauad e Dolhnikoff, 2008). O principal fator que pode levar à lesão epitelial na asma é a ação de produtos derivados da degradação de eosinófilos, entre eles a MPB (proteína básica principal), proteína com ação citotóxica epitelial (Rennard et al., 1995). Além da função de barreira fisiológica, o epitélio brônquico exerce um importante papel na resposta inflamatória. A lesão epitelial cria condições que facilita a ação de linfócitos T *helper* 2, mantém o processo inflamatório eosinofílico através de citocinas como o fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (GINA 2006).

Membrana basal epitelial:

Representa uma camada de matriz extracelular especializada, composta por colágeno tipo IV, proteoglicanos e fibronectina, a qual exerce significativa influência no crescimento celular, maturação, função celular, suporte mecânico e barreira química. Na asma, a verdadeira membrana basal está íntegra. Contudo, existe uma característica deposição de colágeno I, colágeno III e fibronectina na região abaixo da membrana basal epitelial (lamina reticular) que é típico desta doença (Roche et al., 1989).

Lâmina própria:

Esta camada da via aérea contém, basicamente, elementos da matriz extracelular, vasos e células inflamatórias. Os processos inflamatórios a deposição de matriz e a angiogênese encontradas na asma podem causar um espessamento desta camada, promovendo uma diminuição acentuada da luz da via aérea (James et al., 1989).

Músculo liso brônquico:

Vários estudos em asma fatal e não fatal mostraram que há hipertrofia e hiperplasia da camada de músculo liso, sendo essa alteração um fator chave na patogênese da asma. Pacientes que morreram de um episódio agudo de asma apresentam aumento na espessura da camada muscular comparados com os que morreram de outras causas (Carroll et al., 1993). Detalhes desses processos serão descritos adiante.

Glândulas submucosas:

Na asma observa-se hiperplasia e hipertrofia de glândulas submucosas que contribuem para a excessiva produção de muco presente na asma fatal. Tampões mucosos são característicos desta doença e ocorrem em vias aéreas de todos os tamanhos (Benayoun et al., 2003).

Adventícia

A adventícia é a camada mais externa da parede da via aérea e inclui tecido conectivo fibroso, componente vascular e cartilagem, esta última

presente apenas nas grandes vias aéreas. Espessamento da adventícia nas pequenas vias aéreas de asmáticos tem sido descrito (Bai et al., 2000, Dolhnikoff et al., 2008 submetido). Além de estreitar o lúmen, o espessamento desta camada pode aumentar a capacidade de contração do MLB pelo “desacoplamento” do músculo à carga aplicada pelo recolhimento elástico pulmonar.

Além das alterações estruturais citadas acima, os componentes da matriz extracelular (MEC) dos pulmões (fibras elásticas e colágenas, proteoglicanos e glicoproteína), as metaloproteinases (MMPs) e seus reguladores teciduais (TIMPs) podem estar alterados na asma.

1.4 Matriz extracelular

A MEC tem um papel importante na manutenção da estrutura e função das vias aéreas. As proteínas da MEC estão envolvidas na interação célula-célula, célula substrato de adesão, recebendo e emitindo sinais moleculares, controlando a arquitetura tissular, orquestrando a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celular (Johnson et al., 2004; Parameswaran et al., 2006). A composição da MEC envolve processos dinâmicos de produção e degradação de proteínas da matriz. As fibras colágenas e elásticas, os proteoglicanos e as glicoproteínas são as principais proteínas da matriz extracelular. Os principais fatores que controlam esse processo são as metaloproteinases (MMPs), os inibidores de

metaloproteinases (TIMPs) e os fatores de crescimento (James, 2005). Em um processo inflamatório como o que ocorre na asma este equilíbrio é prejudicado, resultando em uma quantidade anormal da matriz depositada como também, uma composição alterada dos seus componentes.

Os principais componentes da MEC que participam do remodelamento brônquico na asma são:

Fibras Elásticas: Têm como principal componente a elastina que é uma glicoproteína estrutural. Diferentes proporções de elastina e microfibrilas promovem características funcionais variáveis, adaptáveis às necessidades locais dos tecidos (Kielty et al., 2002). O desenvolvimento da elastogênese se dá através de três estágios graduais e sucessivos: fibras oxitalânicas (formadas exclusivamente por microfibrilas e sem elastina), elaunínicas (formadas por grande quantidade de microfibrilas e pouca elastina) e fibras elásticas maduras (formadas por grande quantidade de elastina e poucas microfibrilas). Assim, a propriedade da fibra é relatada pela sua grande quantidade de elastina, sendo que as fibras oxitalânicas e elaunínicas, sem ou com pouca elastina, dariam resistência à tensão mecânica, o que representa ser um elemento capaz de sustentar as variações de distensão a que se submetem, garantindo assim sua integridade. Já as fibras elásticas maduras, as quais possuem grande quantidade de elastina, representariam o elemento responsável pela distensibilidade reversível do tecido conectivo, sendo capaz de aumentar até uma vez e meia o seu comprimento e retornarem ao seu comprimento inicial,

regulando a patência das vias aéreas e o recolhimento elástico pulmonar (Paniagua et al., 1983). São sintetizadas por fibroblastos, MLB, condrócitos e hidrolisadas facilmente por elastases.

Fibras colágenas: O colágeno é uma glicoproteína estrutural, com peso molecular de 290 quilodalton, composto pelos aminoácidos glicina (33,5%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%) formando três cadeias polipeptídicas enroladas entre si configurando uma estrutura de tripla hélice. É formado por fibrilas e microfibrilas que originam as fibras com diâmetros variados e presentes sob a forma de uma rede delicadamente trançada ou de feixes espessos (Gelse et al., 2003). No pulmão já foram identificados mais de 20 tipos diferentes de colágenos (Suki et al., 2005). Entre os vários tipos de colágenos, os tipos I e III são os mais abundantes e com distribuição difusa no tecido pulmonar. O colágeno tipo I é produzido pelos fibroblastos, conferindo um grau de polimerização máxima e conferindo maior capacidade de resistir às tensões. O colágeno tipo III é produzido pelas células do músculo liso e células reticulares, conferindo ao músculo liso, o tecido hematopoiético e nervos as suas propriedades, devida a média polimerização das suas finas fibrilas (Junqueira e Carneiro, 2000).

Proteoglicanos: Os proteoglicanos (PGs) representam uma família de macromoléculas composta por uma proteína central e cadeias laterais de polissacarídeos sulfatados, glicosaminoglicanos (GAGs), covalentemente ligadas (Iozzo, 1985). A proteína, sintetizada no retículo endoplasmático

rugoso, tem a função principal de interagir especificamente com outras macromoléculas alvo, repercutindo na distribuição dos PGs nos tecidos (Pogány et al., 1994; Sini et al., 1997). As cadeias GAGs são ionicamente carregadas e funcionam fisicamente como criadoras de compartimentos preenchidos por água, mantendo a matriz hidratada (Hardingham, 1992; Yanagishita, 1993). Vários PGs como biglicano, decorina, lumican, heparina, versican, entre outros, foram identificados na MEC, na superfície ou entre as células. Participam da organização de fibras colágenas (Wiberg et al., 2002), do equilíbrio hídrico tecidual, auxiliam a migração (Saika et al., 2000) e influenciam a permeabilidade vascular (Iozzo, 1985). Versican é um grande proteoglicano *chondroitin* sulfato isolado a partir de culturas de fibroblastos humanos com uma proteína central rica em resíduos de ácido glutâmico, serina e treonina. Sua estrutura complexa com vários domínios de ligação confere a este PG participação em várias funções como estimular a proliferação e diferenciação celular, e inibir a formação de tecido cartilaginoso (Zhang et al., 1998; de Kluijver et al., 2005).

Glicoproteínas: A principal alteração de glicoproteínas descrita na asma é a deposição subepitelial de fibronectina, tenascina e laminina (Vignola et al., 2003). Dentre os componentes da matriz extracelular, a fibronectina, um dímero de 450 quilodalton, caracterizada por ser uma proteína com a função de adesão entre as células, em outras moléculas de fibronectina e em estruturas fibrosas da matriz, serve de ponte de união entre as células não epiteliais, promove a migração celular e a quimiotaxia, regulando a

proliferação e diferenciação celular (Hocking, 2002). Fibronectina esta altamente expressa em tecidos lesados, com importante implicação no reparo tecidual (Limper e Roman, 1992), sendo que níveis aumentados de fibronectina no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos, correlaciona-se com a imunorreatividade de macrófagos alveolares.(Vignola et al., 1996).

1.4.1 Reguladores da matriz extracelular

Metaloproteinases: De acordo com sua estrutura e substrato específico ao qual se liga, membros da família das metaloproteinases são classificados em subgrupos de colagenases, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinases tipo-membrana, gelatinases e outras MMPs. Constituem uma família de proteinases que contêm um íon zinco no seu sítio catalítico. Apresentam ampla gama de funções fisiológicas e patológicas, incluindo o desenvolvimento embrionário, reparos teciduais, ovulação, funções macrofágicas e neutrofilicas, desenvolvimento de câncer, remodelação óssea entre outros (Yoon et al., 2003). Células mesenquimais, epiteliais, macrófagos e neutrófilos são capazes de sintetizar as MMPs. Várias MMPs têm sido implicadas no processo de remodelamento brônquico na asma, principalmente as MMP-2 e MMP-9, da família das gelatinases, capazes de degradar elastina, fibronectina, colágenos I, II, III e IV, ser pró-MMP-9 e 13. A MMP-1, da família das colagenases intersticiais, a qual degrada colágeno I, II, III, VII, VIII e X, e gelatina, é pró-MMP-9 e moduladora do Fator de Crescimento Insulínico (GFI). Já a MMP-12, é uma metaloelastase capaz de

degradar elastina e influenciar no recrutamento de células inflamatórias (Gueders et al., 2006).

1.4.2 Inibidores teciduais de metaloproteinases

A inibição das formas ativas das MMPs pode dar-se pela ação de seus inibidores teciduais (TIMPs). São quatro os TIMPs descritos (1, 2, 3, 4). Com exceção do TIMP-3, são secretados sob forma solúvel. Todos são capazes de efetuar fortes ligações com membros da família das MMPs, com conseqüente formação de complexos inibitórios. São importantes no estabelecimento de “balanço” entre síntese e degradação da MEC induzidas pelas MMPs (Yoon et al., 2003). Estudo pós lesão do tecido muscular esquelético mostra que a TIMP-1 é ativada numa fase mais precoce (6 horas), enquanto que a TIMP-2 apresenta-se ativada após 2 dias. As TIMPs 1 e 2 possivelmente têm papéis diferentes de acordo com o tempo do dano tissular e de reparo (Koskinen et al., 2001).

1.5 O músculo liso brônquico na asma

Evidências sugerem que a célula muscular lisa é o componente mais importante envolvido na patogênese da asma, pois além de modular o tônus broncomotor, participa na função imunomoduladora da orquestração e perpetuação da inflamação das vias aéreas (An et al., 2007; Chung et al.,

2000). Além da capacidade proliferativa e contrátil, o músculo liso brônquico é também uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, e componentes da matriz extracelular (Panettieri, 2003; Howarth et al., 2004). Estudos patológicos de quase um século atrás demonstram que o MLB de pacientes asmáticos está aumentado (Huber e Koessler, 1922), desde então, esta observação vem sendo repetidamente confirmada por Kuwano et al., 1993; James et al., 1989; Heard e Hossain, 1973; Carroll et al., 1993; Takizawa e Thurlbeck, 1971; Ebina et al., 1990; Sobonya, 1984; Bai et al., 2000; Saetta et al., 1991; Thomson et al., 1993; Woodruff et al., 2004, e os dados destes estudos mostram que a quantia do MLB, comparado com casos controles, está aumentado de 50 a 400% do MLB nos casos de asma fatal e de 25 a 200% nos casos de asma não fatal, dependendo do tamanho da via aérea examinada, e há correlação com a hiperreatividade e aumento da resistência das vias aéreas. Avanços têm sido feitos para identificar os processos mitogênicos e as vias que modulam o crescimento do MLB (Noveral et al., 1994).

O paradigma a respeito do aumento da quantia do MLB na asma é que a inflamação crônica secreta mediadores que resulta em proliferação do MLB (Ma et al., 1998; Panettieri, 1998). Alguns fatores de crescimento estão aumentados no lavado broncoalveolar (LBA) das vias aéreas de asmáticos como, por exemplo: Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento Insulínico (GFI), entre outros, que podem alterar a contratilidade e a homeostase do cálcio e induzir hipertrofia e hiperplasia do MLB, podendo então as células musculares lisas responderem a substâncias

que elas próprias secretam (sinalização autócrina) (Laazar et al., 2000). De et al. (1993) demonstraram que a ação da IL-1 atua como um fator mitogênico para o músculo liso devido a secreção autócrina de Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF).

Ebina et al. (1990, 1993) compararam grandes e pequenas vias aéreas de 16 casos de asma fatal com indivíduos não asmáticos. Eles observaram duas categorias de pacientes baseados na distribuição do MLB, o tipo I com aumento do número de células do MLB (hiperplasia) somente na via aérea central, e o tipo II com aumento do tamanho do músculo liso (hipertrofia) nas vias aéreas centrais e periféricas. Este aumento da massa do MLB pode ser devido a um aumento na proliferação, sobrevivência ou recrutamento de células progenitoras de MLB.

1.5.1 Hipertrofia

O aumento do tamanho das células do músculo liso brônquico contribui para o espessamento da mucosa brônquica, o qual pode resultar de numerosos fatores estimulantes, incluindo cargas aumentadas (decorrentes do próprio espessamento da parede brônquica e de repetidos episódios de broncoespasmo) (Vignola et al., 1998a). A hipertrofia tem sido reportada em grandes e pequenas vias aéreas em casos de asma fatal (Ebina et al., 1993), mas não nas grandes vias aéreas em casos moderados-graves de asma (Woodruff et al., 2004). Benayoun et al. (2003) reportaram um aumento de aproximadamente 1,5 vezes no diâmetro de células de

músculo liso de grandes vias aéreas de pacientes com asma intermitente e moderada, e 3 vezes nos indivíduos com asma grave em relação a pacientes controles.

1.5.2 Hiperplasia

In vitro o MLB de asmáticos apresenta uma taxa de proliferação maior (Johnson et al., 2001), que em parte pode ser devido uma acelerada atividade metabólica (Trian et al., 2007) ou conseqüência a uma MEC de composição e quantidade alteradas (Johnson et al., 2004). A inflamação na asma também está associada com a produção de numerosos fatores mitogênicos para o MLB (Panettieri, 1998). Um estudo experimental de Bai et al. (1995) demonstrou um aumento da síntese de DNA no músculo liso das vias aéreas de porquinhos-da-índia sensibilizados com ovoalbumina, após provocação duas vezes por semana, por seis meses, quando comparado com animais-controles submetidos à provocação com solução salina. Os sinais que estimulam a proliferação do MLB podem ser divididos em dois grupos baseados nos receptores de superfície que eles interagem (Hirst et al., 2000). Fatores de crescimento de polipetídeos, como o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) interagem com os receptores de superfície específicos com atividade intrínseca da proteína tirosina-quinase. Outros estimulantes mitogênicos como a histamina e a trombina interagem com proteínas G. Ambas as vias ativam a quinase reguladora extracelular (ERK) e a fosforilação da proteína do retinoblastoma, aumentando a produção da ciclina

e a degradação do inibidor p27 KIP 1. Estes eventos resultam na fase S do ciclo da célula (síntese de DNA) e progride com a divisão celular. Heard e Hossain (1973) descreveram que o número de núcleos de miócitos por volume de MLB estava aumentado nas grandes vias aéreas de 5 casos de asma fatal, comparados com indivíduos não asmáticos.

1.6 Deposição de MEC na camada do MLB

Outro componente que poderia contribuir para o espessamento da camada muscular na asma seria um aumento da deposição da MEC na camada muscular lisa das vias aéreas.

As células do MLB são capazes de secretar uma grande variedade de proteínas da matriz, incluindo fibronectina, fibras colágenas, fibras elásticas, hialorunan, laminina e versicam.

Na asma, deposição anormal de proteínas da MEC tem sido descrita nas camadas da submucosa e adventícia de grandes e pequenas vias aéreas (Mauad et al., 1999; Mauad et al., 2004; Chakir et al., 2003; De Medeiros et al., 2005), incluindo anormalidades nos colágenos, laminina, tenascina e fibronectina (Laitinen et al., 1997; Wilson e Li, 1997). Mauad et al. (1999) observaram um aumento das fibras elásticas na submucosa de vias aéreas centrais de indivíduos que morreram por asma e um menor conteúdo de fibras elásticas quando se considera apenas a região subepitelial dessas vias aéreas em comparação aos controles. A perda de

acoplamento das fibras elásticas na membrana basal poderia resultar em uma diminuição da força elástica da via aérea, facilitando o mecanismo de broncoconstrição.

Na asma grave e fatal, os proteoglicanos versicam, biglicam e lumicam estão aumentados na lâmina própria e ao redor do MLB (De Medeiros et al., 2005; Pini et al., 2007; de Kluijver et al., 2005). Roberts (1995) encontrou deposição dos proteoglicanos versicam e ácido hialurônico entre as fibras do MLB e na submucosa de vias aéreas de asmáticos, sugerindo que a presença aumentada destas substâncias poderia contribuir para as alterações mecânicas observadas em uma via aérea espessa. Paré et al. (1997) notaram que, se a deposição de colágeno ocorrer na matriz subepitelial a contração do músculo liso pode ser dificultada, devido a resistência à compressão e tensão, entretanto, se a deposição dessas proteínas estiverem entre as células do músculo liso brônquico, podem promover um enrijecimento e estreitamento das paredes das vias aéreas. No entanto, McParland et al. (2003) relatam que a deposição de matriz extracelular na camada do MLB pode aumentar a carga e dificultar a contração desta musculatura, prevenindo o estreitamento excessivo das vias aéreas. Estudos *in vitro* demonstram que a digestão da MEC com colagenase promove um aumento da geração de força e encurtamento do músculo liso nas vias aéreas de humanos (Bramley et al., 1995), consistente também com os achados de Niimi et al. (2003), que sugerem que fibrose na parede da via aérea protege contra reatividades excessivas.

Hirst et al. (2000) observaram que a resposta proliferativa das células do músculo liso era maior quando acrescentava determinados componentes da MEC, como fibronectina e colágeno I, sendo que, culturas de MLB podem variar seus fenótipos em relação as condições de cultura (Ma et al., 1998). De acordo com Johnson et al. (2000), células de MLB de indivíduos normais expostas em soro de indivíduos com asma, produziram níveis aumentados de proteínas da MEC. E ainda, peptídeos de elastina degradada cultivadas com células musculares lisas de artérias coronárias de porcos estimularam a mitose de células musculares lisas (Mochizuki et al., 2002). Slats et al. (2008), descreveram uma correlação entre a hiperresponsividade brônquica e elastina na parede brônquica de indivíduos asmáticos. As células de MLB podem desenvolver um fenótipo secretório, proliferativo e um aumento das proteínas contráteis, resultando em um estado hipercontrátil celular de acordo com a composição da MEC que as circunda (Panettieri, 1998).

1.7 Mecanismos de alterações da MEC no MLB na asma

Entre as proteínas que parecem ter importante papel no remodelamento brônquico encontram-se as metaloproteinases. As MMPs são reconhecidas como coadjuvantes importantes em processos patológicos pulmonares, têm a capacidade de clivar proteínas estruturais como as fibras colágenas e elásticas.

Na presença de inflamação crônica, macrófagos e neutrófilos são capazes de sintetizar metaloproteinases. Além disso, as próprias células mesenquimais são capazes de produzir MMPs em condições associadas ao remodelamento tissular (Emonard et al., 1989). Várias são as MMPs que têm sido implicadas no processo de remodelamento brônquico na asma. Xie et al. (2005) observaram *in vitro* que células do MLB expressavam MMP-12 ao serem induzidas com IL-1 β , sendo que, a expressão dessa metaloproteinase pode ativar outras MMPs, clivar proteínas da MEC, promover migração de células inflamatórias e induzir uma atividade elastolítica aumentada agravando doenças respiratórias como a asma. Poucos trabalhos avaliaram o papel da MMP-1 na asma. Rajah et al. (1999) mostraram expressão aumentada de MMP-1 em MLB de asmáticos e sugeriram que MMP-1 poderia induzir a hiperplasia de MLB, além de clivar os colágenos tipo I e III, os mais importantes colágenos fibrilares da MEC pulmonar. Elshaw et al. (2004) também demonstraram que o MLB expressa constitutivamente MMP-2, capaz de degradar colágeno tipo IV, um dos maiores componentes da camada subepitelial da membrana basal. Já, a MMP-3, é capaz de degradar uma ampla gama de proteínas incluindo colágenos tipos IV e V, fibronectina, elastina e proteoglicanos (Whitelock et al., 1996). Kelly e Jarjour (2003) encontraram aumento da expressão de MMP-9 no lavado broncoalveolar e no escarro durante exacerbação asmática, voltando a níveis normais após estabilização da crise. Porém, Vignola et al. (1998b) encontraram níveis aumentados de MMP-9 em escarro de pacientes com asma estável. A imunorreatividade subepitelial de MMP-9

tem sido associada com a gravidade da asma (Wenzel et al., 2003), sendo a MMP-9 considerada a metaloproteinase predominante nas vias aéreas de indivíduos asmáticos.

Além das MMPs, os inibidores teciduais de metaloproteinases também contribuem para o reparo tecidual e remodelamento brônquico encontrado na parede brônquica de asmáticos. O equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores controla a deposição dos componentes da MEC nos tecidos. A expressão de TIMP-1 também foi encontrada em LBA durante exacerbações de pacientes com asma (Kelly e Jarjour et al., 2003).

Ao longo dos anos, o grupo do Departamento de Patologia Pulmonar da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, vem organizando um banco de tecidos de pulmões de indivíduos que morreram por asma e que foram submetidos a autópsia no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital. Estes pacientes têm em comum apresentarem asma grave pobremente controlada, baixo uso de corticosteróides inalados, ausência de acompanhamento médico regular, baixo índice sócio econômico e educacional (Mauad et al., 2008).

Desde então, vários trabalhos já foram publicados utilizando-se deste material e vários outros estão em andamento. A pesquisa realizada nesse material tem a vantagem de nos proporcionar o acesso a diferentes regiões do tecido pulmonar e de vias aéreas de vários calibres, permitindo também a análise das diferentes camadas da parede brônquica.

Nos últimos anos, temos desenvolvido colaborações com outros grupos de pesquisadores que trabalham com o tecido de pacientes que faleceram

de asma. Entre eles, temos colaborado com o Professor Alan James e seu grupo, de Perth, Austrália. Esta colaboração nos permitiu acesso ao tecido de um grupo de pacientes que apresentavam asma (em geral leve) e que morreram de outras causas que não asma. Este grupo de estudo é importante de ser acrescentado ao nosso, pois pode fornecer informações importantes sobre as especificidades de nossos achados em relação à asma ou a sua gravidade.

No entanto, a pesquisa com este material apresenta algumas limitações importantes, como a ausência de dados relativos à função pulmonar ou dados confiáveis em relação à terapia medicamentosa. A ausência destes dados não nos permite avançar nos mecanismos relacionados à relação estrutura-função neste material.

O material de autópsia é portanto, útil para a caracterização da matriz extracelular nos diversos compartimentos pulmonares em pacientes com asma.

Até o momento do desenho deste estudo, havia poucos estudos em *in vivo* onde a composição dos diferentes componentes da MEC e seus reguladores no interior do músculo liso de grandes e pequenas vias aéreas era descrita de maneira abrangente (Pini et al., 2007). Acreditamos haver importantes razões para entender melhor este assunto. Primeiro, alterações da composição da MEC no MLB podem afetar suas propriedades contráteis. Segundo, descrever a expressão das MMPs e TIMPs no MLB pode aumentar o conhecimento do envolvimento do MLB no remodelamento na

asma. Terceiro, uma composição alterada da MEC pode influenciar o fenótipo das células do MLB (Johnson et al., 2000).

Assim, o presente estudo tem como objetivo caracterizar os principais componentes da MEC e seus reguladores em vias aéreas grandes e pequenas de indivíduos que faleceram devido a um ataque de asma (asma fatal), comparar com indivíduos com asma e que faleceram de outras causas, e indivíduos sem patologia pulmonar.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Caracterizar as alterações dos componentes da matriz extracelular e seus reguladores na camada muscular lisa das vias aéreas de indivíduos com asma.

2.2 Específicos

2.1.2 Determinar a fração de área de colágeno total e fibras elásticas no músculo liso de vias aéreas grandes e pequenas de indivíduos falecidos por asma, comparando com indivíduos asmáticos falecidos por causas não pulmonares e com indivíduos falecidos por causas não pulmonares, não asmáticos e sem doença pulmonar à autópsia.

2.2.2. Quantificar a fração de área dos colágenos I e III, versicam, fibronectina, a expressão das metalopreinasas 1, 2, 9 e 12, e dos inibidores das metaloproteinasas 1 e 2 no músculo liso de vias aéreas grandes e pequenas de indivíduos falecidos por asma e comparar com indivíduos falecidos por causas não pulmonares, não asmáticos e sem doença pulmonar à autópsia.

3. MÉTODOS

O protocolo deste estudo retrospectivo teve a aprovação do Comitê de Ética para a Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-FMUSP) e pelo *Sir Charles Gairdner Hospital Ethics Committee (Nedlands, Australia)*.

Parte da população do presente estudo foi descrita previamente (Mauad et al., 1999; Mauad et al., 2004; De Medeiros et al., 2005; De Magalhães et al., 2005; Carroll et al., 1993; Carroll et al., 1996) em outros estudos do Grupo de Patologia Pulmonar da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo *Department of Pulmonary Physiology, Sir Charles Gairdner Hospital, Nedlands, Western Australia*.

3.1 Casuística

3.1.1 Indivíduos de São Paulo

3.1.1.1 Grupo Asma Fatal

Tecido pulmonar foi obtido de indivíduos autopsiados no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre os anos de 1996 e 2003.

Indivíduos que morreram por uma crise aguda de asma. Todos apresentaram história progressiva de asma documentada por um questionário aplicado por uma assistente social aos familiares dos indivíduos. Foram coletadas informações relativas à história clínica, acompanhamento médico, tratamentos anteriores, início da doença, hospitalizações prévias relacionadas à asma, tabagismo, duração da crise final assim como o nível socioeconômico. Dentre os achados macroscópicos, todos os indivíduos que morreram por asma mostraram hipersecreção e hiperinsulflação pulmonar. (FIGURA 1A e 1B). Microscopicamente, as espécimes pulmonares apresentavam descamação epitelial, espessamento da membrana basal, hiperplasia de glândulas submucosas, hipertrofia de músculo liso e inflamação da mucosa com ou sem eosinófilos.

3.1.1.2 Grupo Controle

Os indivíduos controles foram considerados aqueles que morreram por causas não pulmonares, sem história de asma, não fumantes e que apresentavam pulmões macroscopicamente e microscopicamente sem alterações.

3.1.2 Indivíduos de Perth

Tecido pulmonar foi obtido de indivíduos autopsiados no *Coroner's Court of Western Australia*.

3.1.2.1 Grupo Asma Fatal

Pulmão foi obtido de indivíduos que morreram por mal asmático, com história de asma confirmada por familiares e médicos. Os casos de asma fatal não ocorreram em ambiente hospitalar e ventilação mecânica não foi utilizada. Os indivíduos apresentavam histórias de internações hospitalares progressivas decorrentes de problemas relacionados à asma, períodos de ausências na escola ou trabalho devido à asma e uso freqüente de corticosteróide oral.

3.1.2.2 Grupo Asma Não Fatal

Consistiu de indivíduos que morreram por causas não pulmonares e sem trauma torácico. Através de questionários aplicados aos familiares, médicos ou análise de prontuários hospitalares, história progressiva de asma foi bem definida. Os sintomas decorrentes da asma eram considerados leves, com menos ocorrências de internações hospitalares devido à asma quando comparado ao grupo de Asma Fatal.

3.1.2.3 Grupo Controle

Os indivíduos que apresentavam pulmões macroscopicamente e microscopicamente normais e que morreram por causas não pulmonares foram incluídos no grupo controle.

Os critérios de exclusão para todos os grupos basearam-se na presença de infecções, neoplasias ou inflamação.

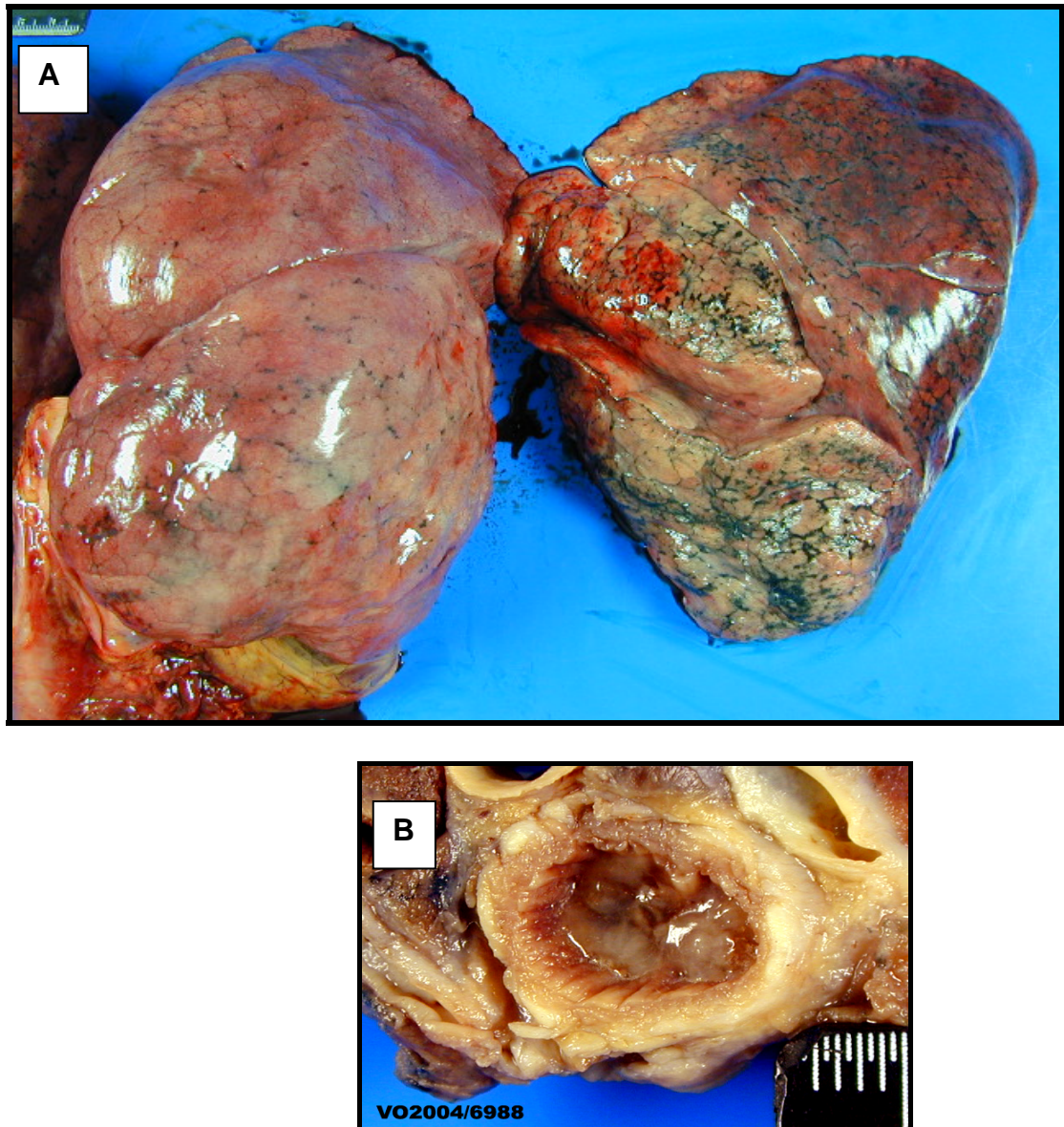


Figura 1. Achados macroscópicos característicos de indivíduo que foi a óbito por asma (à esquerda). Destaca-se a distensão do pulmão pela hiperinsuflação (A) e a oclusão das vias aéreas por tampões mucosos espessos e aderentes (B). O pulmão à direita em (A) é de um tabagista que morreu por causa não pulmonar (comparar o tamanho).

3.2 Métodos

3.2.1 Histoquímica

Fragmentos de tecido foram coletados das áreas centrais e periféricas dos pulmões, fixados em formaldeído a 10% e emblocados em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram submetidos a coloração Hematoxilina Eosina (HE) para avaliação inicial.

Para identificação das fibras elásticas, a técnica de Resorcina Fuchsin de Weigert oxidada foi utilizada e previamente descrita em Mauad et al., 1999. Para a análise do colágeno total nas vias aéreas, a coloração de Picrosírius foi utilizada (Dolhnikoff et al., 1999).

3.2.2 Imunohistoquímica

Os anticorpos específicos contra os colágenos I e III, fibronectina, versicam, metaloproteinases 1, 2, 9 e 12 e inibidores das metaloproteinases 1 e 2 utilizados no estudo estão apresentados no Anexo A, Tabela 1 (anticorpo, pré-tratamento, clone, titulação e fabricante). Resumidamente, as lâminas previamente preparadas com silane (Sigma Chemical, Saint Louis, Missouri, USA) contendo os cortes histológicos dos pulmões foram desparafinadas, hidratadas e submetidas a uma solução de H₂O₂ a 3% por 40 minutos com o objetivo inibir a atividade endógena da peroxidase. Em seguida, foi realizada a incubação por 24 horas com o anticorpo primário e

posteriormente utilizado um complexo de estreptoavidina-biotina (LSAB, DAKO, Glostrup, Denmark) como anticorpo secundário.

Os cortes foram então corados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical, Saint Louis, Missouri, EUA) e contra-corados com Hematoxilina de Meyer. Para o processamento dos controles negativos, foi omitida a utilização do anticorpo primário, substituído por PBS (solução tampão fosfato).

Essas reações foram realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo apenas o colágeno I realizado no *Division of Biomedical Research, TNO Prevention and Health, Leiden University Medical Center (LUMC), The Netherlands*.

Para a otimização da imunorreatividade do material a ser analisado, as reações de cada anticorpo foram realizadas em uma mesma bateria. Após realização desse processo padronizado, foi observado que a intensidade da coloração da reação variava significativamente entre os casos de Perth e os casos de São Paulo, apresentando um padrão fraco de coloração nos casos de Perth, provavelmente pelo fato desses casos terem sido submetidos a longos períodos de imersão no formol. Devido a esse fato, a análise imunohistoquímica foi realizada apenas nos casos de asma fatal e controles coletados em São Paulo.

3.2.3 Morfometria

As imagens foram analisadas a partir de um programa de computador Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA) em um computador pessoal acoplado a uma câmera de vídeo que captura imagens de um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany). Em cada caso foram analisadas 2 vias aéreas grandes e 3 vias aéreas pequenas cortadas transversalmente, classificadas de acordo com o perímetro da membrana basal epitelial (Pmb), sendo considerada via aérea grande ($Pmb > 6$ mm), e via aérea pequena ($Pmb \leq 6$ mm) (Saetta et al., 1998).

As áreas do músculo liso foram medidas em toda a circunferência das vias aéreas num aumento de 400X e sempre que o campo apresentasse a camada muscular claramente definida.

A positividade de cada reação foi determinada utilizando uma ferramenta do analisador de imagem denominada “color cube”. Esta ferramenta realiza medidas através de diferenças de cor da amostra, calculando um parâmetro baseado em uma tonalidade de cor definida pelo usuário. Para cada reação um padrão de cor foi previamente estabelecido. O programa permite a seleção de uma região onde a medida deve ser realizada, denominada área de interesse. Assim, a área de interesse, no caso a camada muscular lisa, foi manualmente determinada em cada campo (Figura 2).

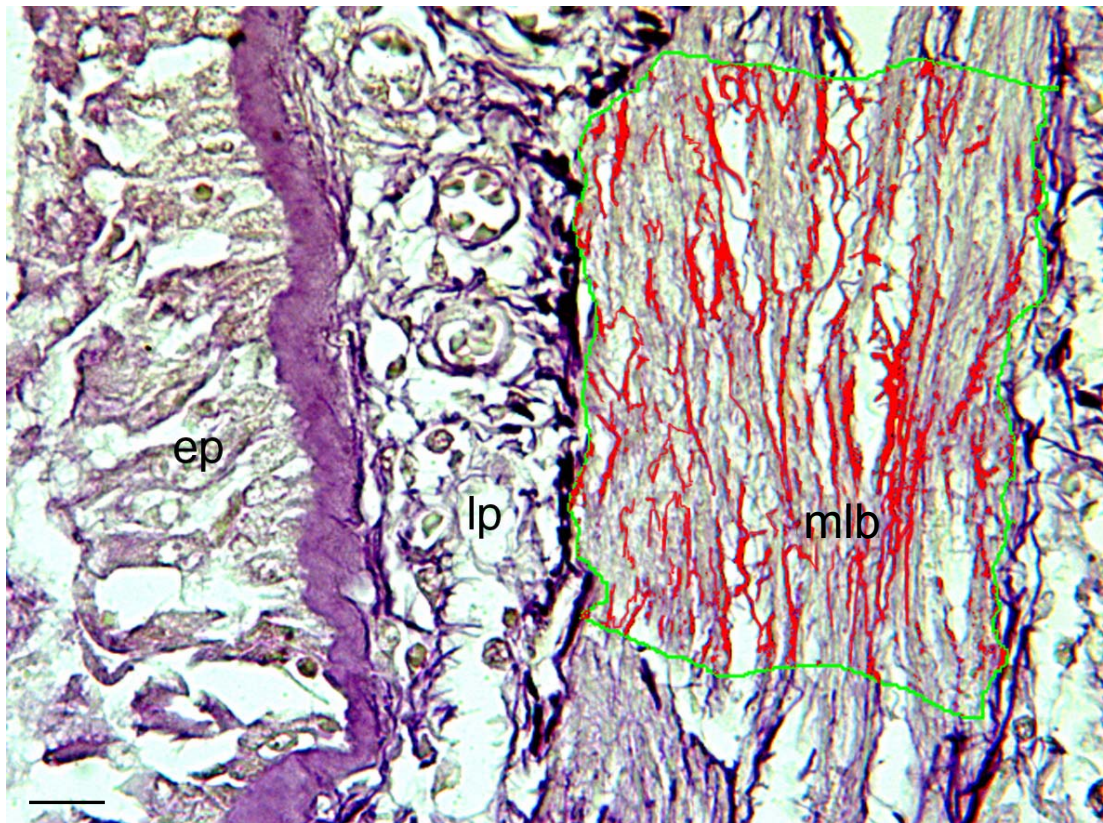


Figura 2. Representação da análise morfométrica realizada na camada do músculo liso brônquico.

Após delimitação manual da área de interesse (linha verde) num aumento de 400x, a marcação da área positiva previamente estabelecida para uma determinada proteína (fibras elásticas na figura), é quantificada pelo programa de análise de imagem (área vermelha). Os resultados foram expressos em porcentagem. Coloração por Resorcina Fuchsin de Weigert oxidada. Ep = camada epitelial; lp = lâmina própria; mlb = músculo liso brônquico. Barra de escala = 20 μ m.

3.2.4 Análise Estatística

Dados demográficos foram apresentados como mediana e interquartis e os dados numéricos como média \pm DP.

A área fracionada de cada reação específica foi corrigida pela área do músculo liso brônquico ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$) e expressa em porcentagem.

Foi realizada transformação logarítmica dos dados antes das análises.

Para comparar a área fracionada de cada proteína, para os dados paramétricos, foi realizado ANOVA ou Teste T, e para dados não paramétricos, o teste de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis. Pós-teste de Bonferroni foi utilizado para discriminar diferença entre os grupos Asma Fatal, Não Fatal e Controle.

A área fracionada de cada reação foi comparada entre as vias aéreas grandes e pequenas utilizando teste T pareado ou Wilcoxon. As correlações foram realizadas utilizando o teste de Spearman.

Valores de p menor que 0,05 foram considerados significantes, em todos os testes aplicados neste estudo.

O programa estatístico utilizado para a análise dos dados foi o programa de computador “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) 13.0 (Chicago, Illinois).

4. RESULTADOS

4.1 Casuística

As características clínicas dos indivíduos são apresentadas no Anexo B, Tabela 2.

Foram estudados os pulmões de 35 indivíduos vítimas de asma, sendo 15 homens com a mediana da idade 38 (26 – 50) anos, sendo 25 fumantes ou ex-fumantes.

Todos os indivíduos asmáticos apresentaram diagnóstico macro e microscópicos compatíveis com asma fatal, e suas mortes foram atestadas pelo patologista como “mal asmático”. Em geral, as características clínicas deste grupo sugerem asma grave, com admissões hospitalares freqüentes, uso de corticosteróide oral, ou prejuízo de suas atividades diárias devido à asma.

Dos 10 indivíduos do grupo de Asma Não Fatal, cinco eram homens e apresentaram idade mediana de 24 (17 – 34) anos, sendo cinco fumantes ou ex-fumantes. Em geral, o grupo de Asma Não Fatal apresentou poucos sintomas relacionados a asma, com uso ocasional de β -agonistas, baixas doses de corticosteróides inalados e sem histórias prévias de hospitalizações devido a asma, sugerindo classificação clínica de asma leve.

Os 22 indivíduos controles apresentaram pulmões normais aos exames, sendo 11 homens com mediana da idade de 43 (26 - 58) anos e todos não fumantes.

4.2 Morfometria

A Figura 3 ilustra na coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) as alterações morfológicas mais proeminentes presentes nas grandes vias aéreas de indivíduos asmáticos quando comparado as vias aéreas de indivíduos sem patologia pulmonar. Nota-se na asma fatal, a espessa camada de músculo liso, infiltrado inflamatório, hiperplasia das glândulas submucosas e rolha de muco no lúmen quando comparado ao controle.

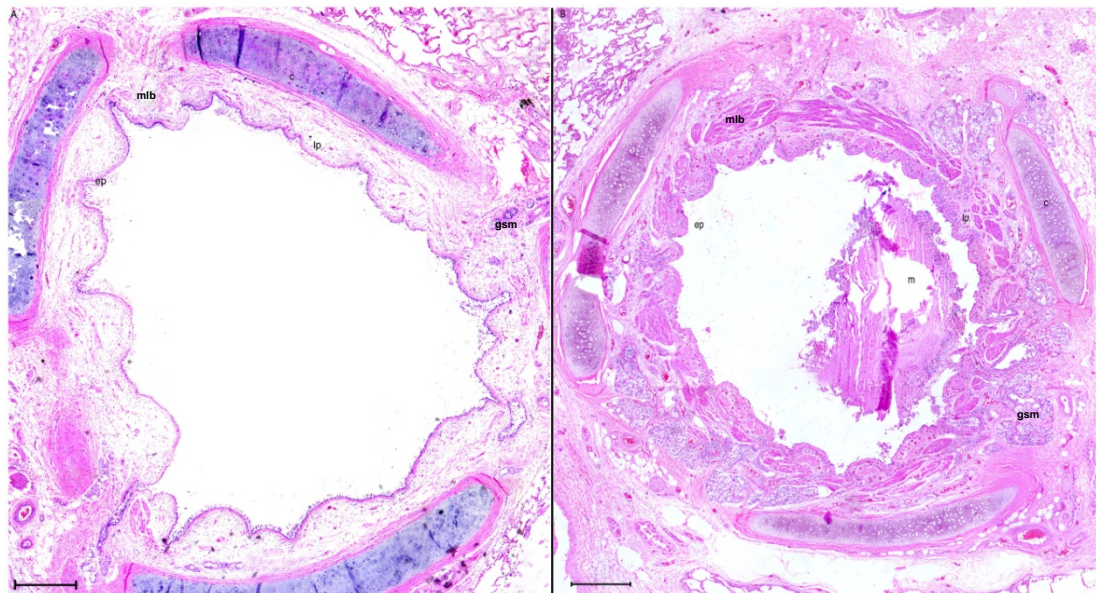


Figura 3. Grande via aérea de um indivíduo do grupo Controle (A) e Asma Fatal (B). Dentre as principais alterações histológicas observadas na via aérea (B), destaca-se a exuberante camada muscular (mlb). Há também aumento do número de glândulas submucosas (gsm) e muco no lúmen da via aérea (m). Ep = camada epitelial; lp = lâmina própria, c = cartilagem. H&E. Barra de escala = 200 μ m.

No total, foram analisadas 458 grandes e 651 pequenas vias aéreas no grupo Asma Fatal, 40 grandes e 60 pequenas vias aéreas no grupo de Asma Não Fatal (somente análise histoquímica) e 199 grandes e 375 pequenas vias aéreas no grupo Controle.

A área de músculo liso brônquico por campo nas grandes vias aéreas foi $15,4 \pm 3,76 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ na Asma Fatal, $12,2 \pm 4,16 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ na Asma Não Fatal e $9,1 \pm 3,66 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ no Controle ($p < 0,001$ para Asma Fatal *versus* Controle; $p = 0,085$ para Asma Fatal *versus* Asma Não Fatal; $p = 0,16$ para Asma Não Fatal *versus* Controle). A área de músculo liso brônquico por campo nas pequenas vias aéreas foi $5,4 \pm 3,56 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ na Asma Fatal, $2,5 \pm 1,96 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ na Asma Não Fatal e $2,9 \pm 2,16 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ no Controle ($p = 0,03$ para Asma Fatal *versus* Controle; $p = 0,02$ para Asma Fatal *versus* Asma Não Fatal; $p = 0,99$ para Asma Não Fatal *versus* Controle).

Nas vias aéreas grandes, a média do perímetro da membrana basal (Pmb) foi $10,6 \pm 3,4$ mm no grupo Asma Fatal, $12,6 \pm 3,1$ mm no grupo Asma Não Fatal e $10,3 \pm 3,8$ mm no grupo Controle ($p = 0,23$). Nas pequenas vias aéreas, o Pmb foi $2,7 \pm 1,0$ mm no grupo de Asma Fatal, $2,6 \pm 0,9$ mm no grupo de Asma Não Fatal e $2,4 \pm 0,5$ mm no grupo Controle ($p = 0,58$).

4.3 Análise histoquímica

Encontramos um aumento significativo na área fracionada das fibras elásticas na camada do músculo liso nas grandes vias aéreas de Asma Fatal quando comparado ao grupo Asma Não Fatal ($p = 0,002$) e grupo Controle ($p = 0,007$). Não houve diferença significativa entres os grupos Asma Não Fatal e Controle. Em relação as pequenas vias aéreas, observamos um aumento significativo da área fracionada das fibras elásticas no grupo Asma Fatal quando comparado com o grupo Asma Não Fatal ($p = 0,019$), mas não quando comparado com o grupo Controle. Não houve diferença na área fracionada das fibras elásticas na camada do músculo liso das pequenas vias aéreas quando comparado aos grupos Asma Não Fatal e Controle (Figura 4).

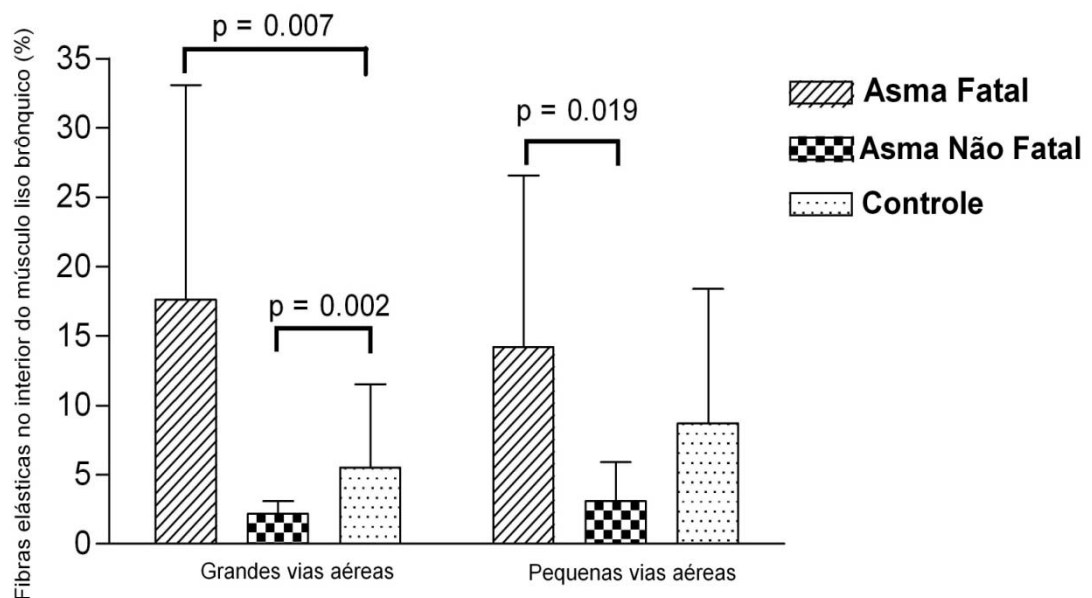


Figura 4. Área fracionada de fibras elásticas no músculo liso brônquico em grandes e pequenas vias aéreas nos grupos Asma Fatal, Asma Não Fatal e Controle. Dados apresentados em média \pm DP.

A comparação do conteúdo de fibras elásticas do músculo liso brônquico, entre as grandes e pequenas vias aéreas, não mostrou diferença significativa para os grupos Asma Fatal e Asma Não Fatal. No grupo Controle, as fibras elásticas nas pequenas vias aéreas foram significativamente maior que nas grandes vias aéreas ($p = 0,035$).

Figura 5 (A e B) mostra exemplos de fotomicrografias representativas de vias aéreas grandes de casos controles e asma fatal corados para fibras elásticas.

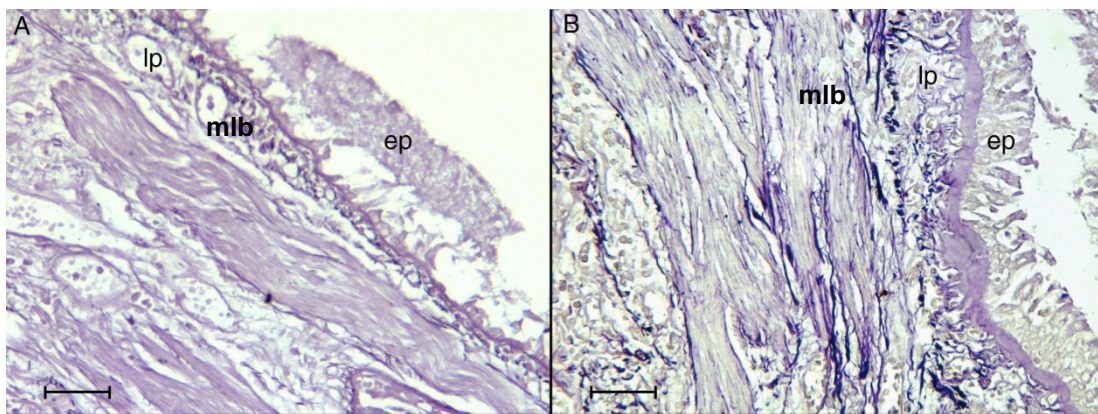


Figura 5. Fotomicrografias mostrando área fracionada de fibras elásticas no músculo liso brônquico (mlb) de indivíduo Controle (A) e asmático (B). Corados por Resorcina Fuchsina de Weigert oxidada. Ep = camada epitelial e lp = lâmina própria. Barra de escala = 50 μ m.

Para a porcentagem da área fracionada do colágeno total, na camada do músculo liso brônquico analisado nas grandes e pequenas vias aéreas, não houve diferença significativa entre os grupos, assim como, não houve diferença significativa quando comparado as grandes e pequenas vias aéreas entre os grupos. Os dados estão sumarizados no Anexo C, Tabela 3.

4.4 Imunohistoquímica

Dentre os componentes da matriz extracelular, não encontramos diferença significativa na camada do músculo liso brônquico de grandes e pequenas vias aéreas entre os grupos para: versicam, colágeno I ou colágeno III.

Para ambos os grupos, asmáticos e controles, a área fracionada de versicam, colágeno I e colágeno III apresentou aumento significativo nas pequenas vias aéreas quando comparado as grandes vias aéreas (Asma Fatal, $p = 0,005$, $p = 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente; Controle, $p = 0,033$, $p = 0,018$ e $p = 0,011$, respectivamente; Anexo C, Tabela 3).

A fibronectina apresentou uma porcentagem de área fracionada no músculo liso brônquico significativamente maior nas grandes vias aéreas de asmáticos quando comparada ao grupo Controle ($p = 0,04$: Anexo C, Tabela 3, e Figuras 6 e 7). A expressão de fibronectina apresentou correlação positiva com a idade ($r = 0,48$; $p = 0,03$) nas grandes vias aéreas dos asmáticos.

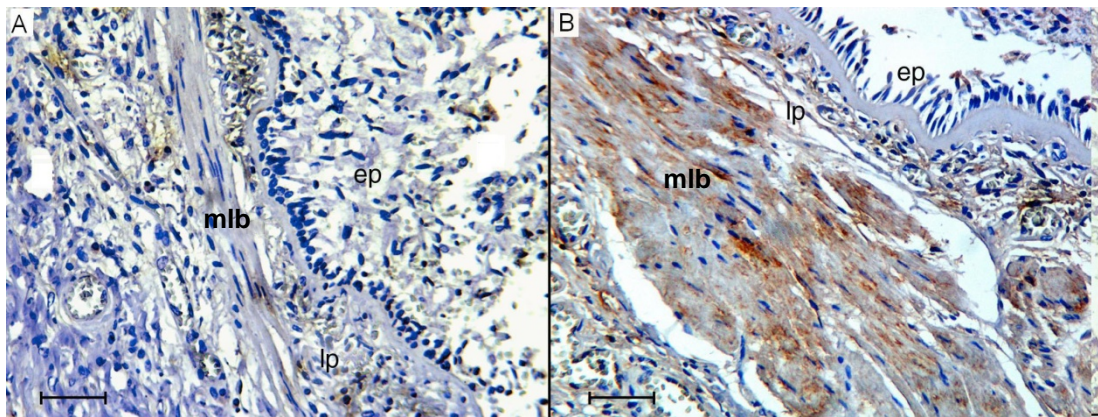


Figura 6. Fotomicrografias mostrando área fracionada de fibronectina no músculo liso brônquico (mlb) de indivíduo controle (A) e asmático (B). Corados por imunohistoquímica anti-fibronectina. Ep = camada epitelial, lp = lâmina própria. Barra de escala: 50 μ m.

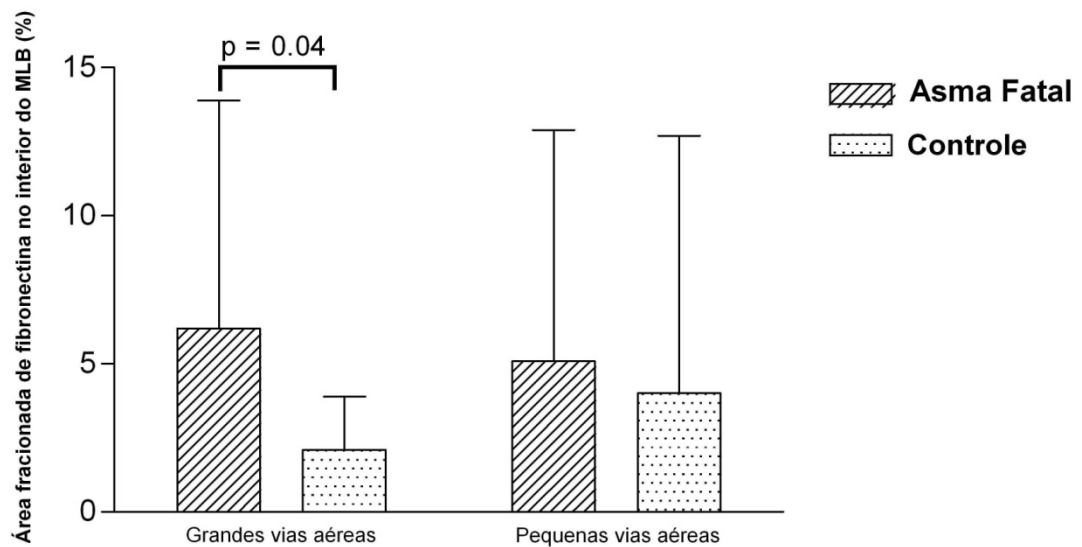


Figura 7. Área fracionada de fibronectina no músculo liso brônquico (MLB) em grandes e pequenas vias aéreas nos grupos Asma Fatal e Controle. Dados apresentados em média \pm DP.

Dentre as metaloproteinases estudadas, encontramos um aumento significativo da metaloproteinase-9 (Figura 8 e 9) e metaloproteinase-12 (Figura 8 e 10) no músculo liso das grandes vias aéreas de asmáticos, mas não nas pequenas vias aéreas, quando comparado aos controles. Os indivíduos controles apresentaram uma maior área fracionada de MMP-9 no músculo liso das pequenas vias aéreas quando comparada as grandes vias aéreas ($p = 0,043$), e os asmáticos apresentaram maior área fracionada de MMP-12 nas grandes vias aéreas quando comparadas as pequenas vias aéreas ($p = 0,001$).

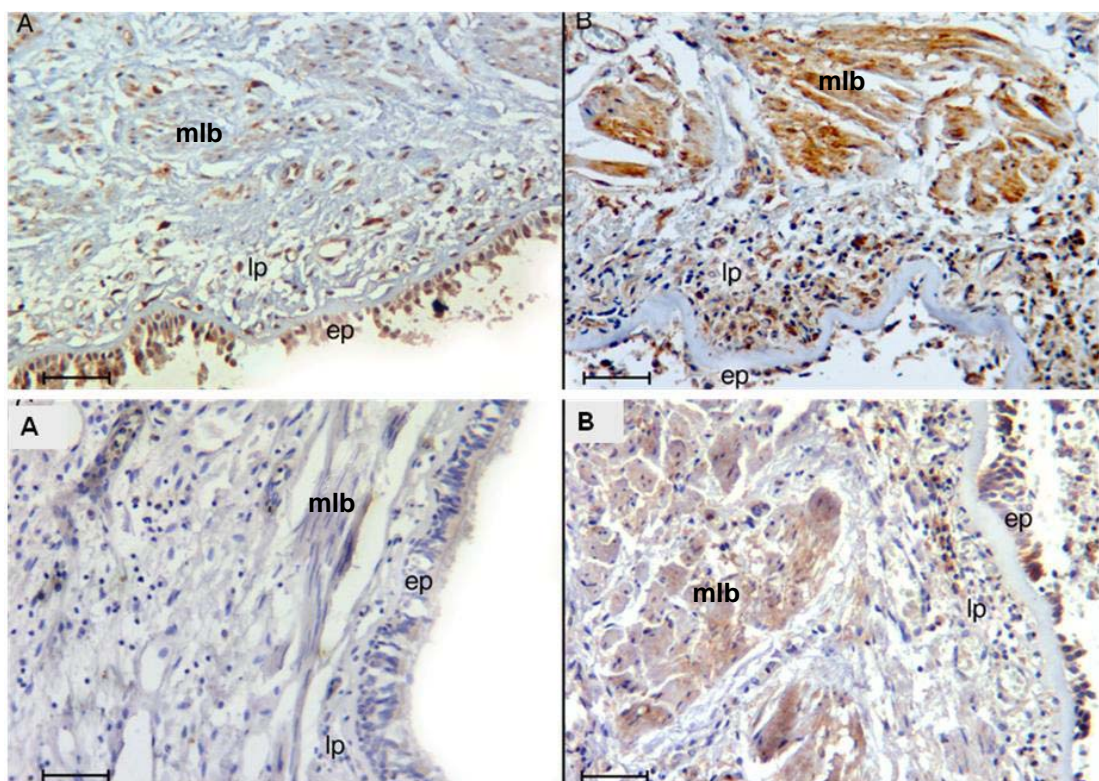


Figura 8. Fotomicrografias mostrando expressão de metaloproteinase-9 e metaloptoteinase-12 no músculo liso brônquico (mlb), camada epitelial (ep) e lâmina própria (lp) de indivíduo controle (A) e asmático (B). Corados por imunohistoquímica anti-MMP-9 e anti-MMP-12. Barra de escala = 50 μ m.

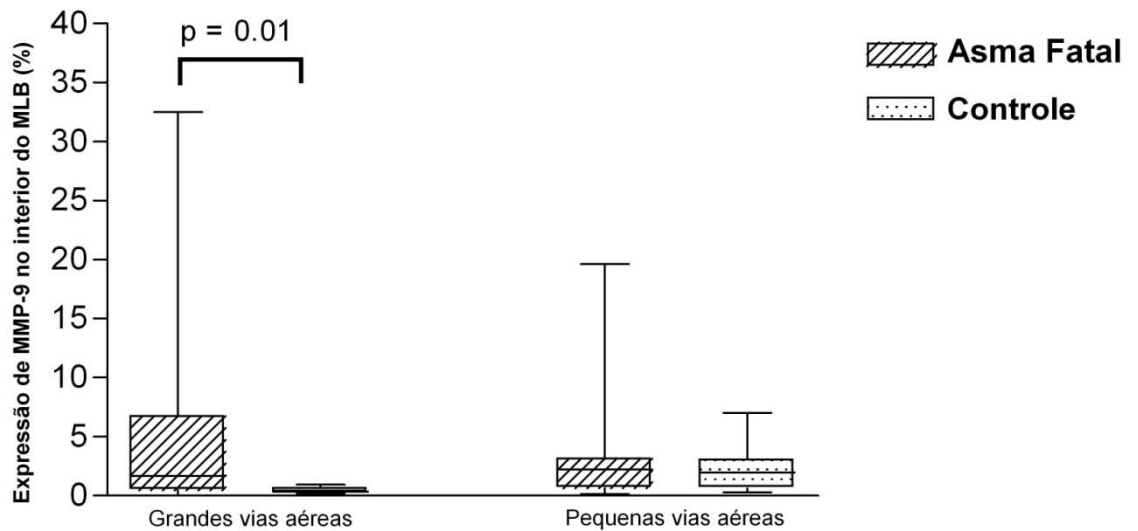


Figura 9. Expressão de metaloproteinase (MMP)-9 no músculo liso brônquico (MLB) de grandes e pequenas vias aéreas nos grupos de Asma Fatal e Controle. Resultados expressos em %. Box-plots representam mediana e interquartis.

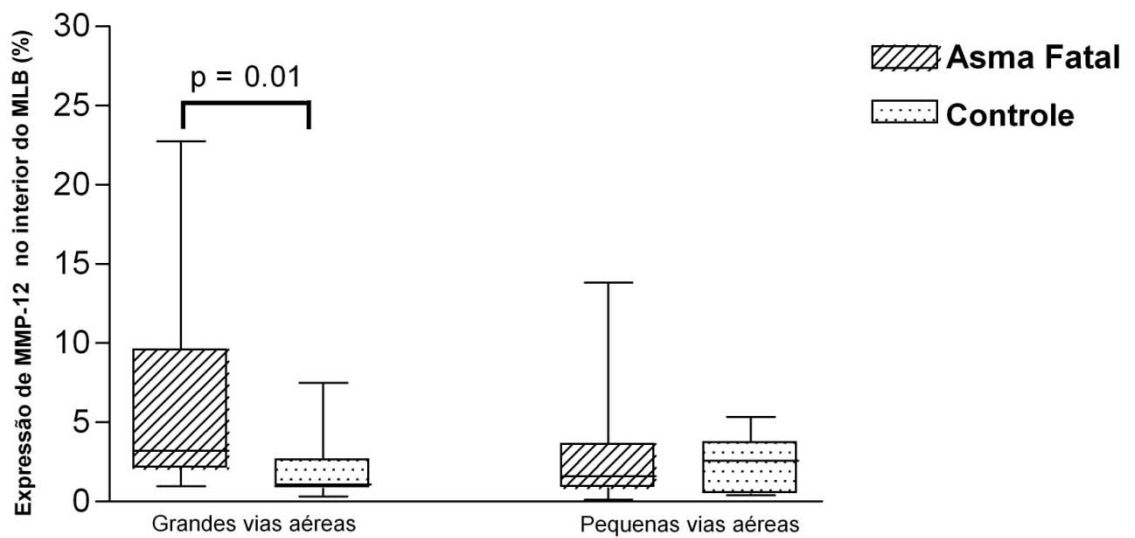


Figura 10. Expressão de metaloproteinase (MMP)-12 no músculo liso brônquico (MLB) de grandes e pequenas vias aéreas nos grupos de Asma Fatal e Controle. Resultados expressos em %.

As expressões de MMP-9 ($r = 0,51$; $p = 0,01$) e MMP-12 ($r = 0,52$; $p = 0,02$) se correlacionaram positivamente com a idade de início da duração da asma. A metaloelastase MMP-12, apresentou correlação positiva com as fibras elásticas no músculo liso das grandes vias aéreas dos asmáticos ($r = 0,71$; $p = 0,003$).

Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para as MMP-1, MMP-2, TIMP-1 ou TIMP-2. Os controles apresentaram maior área fracionada de TIMP-2 no músculo liso das pequenas vias aéreas quando comparado as grandes vias aéreas ($p = 0,025$), sendo os resultados demonstrados resumidamente no Anexo D, Tabela 4.

4.5 Subgrupos analisados

4.5.1 Fumantes *versus* não fumantes

No grupo de indivíduos asmáticos de São Paulo, onze eram fumantes ou ex-fumantes, sendo que os fumantes apresentaram uma maior área fracionada de MMP-9 nas grandes e pequenas vias aéreas que os asmáticos não fumantes (vias aéreas grandes $8,6 \pm 10,6$ *versus* $2,8 \pm 4,4$ %, $p = 0,001$; pequenas vias aéreas e $6,5 \pm 6,0$ *versus* $1,2 \pm 1,0$ %, $p = 0,024$), como mostra a Figura 11.

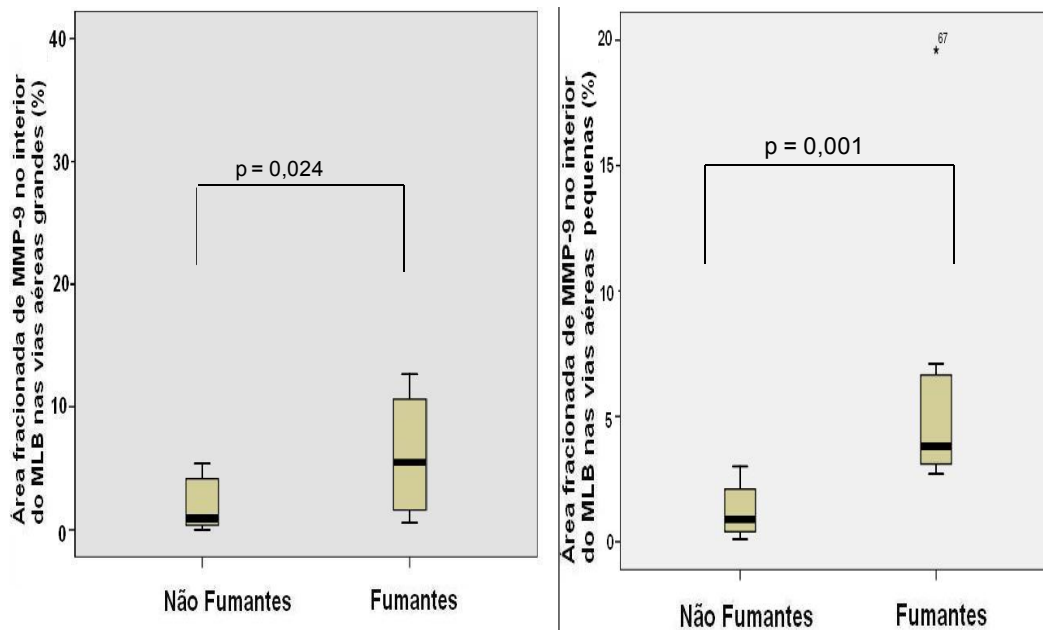


Figura 11. Expressão de metaloproteinase (MMP)-9 no músculo liso brônquico (MLB) de grandes e pequenas vias aéreas no grupo de Asma Fatal. Resultados expressos em %.

Não houve diferença significativa nas frações de fibras elásticas e colágenas entre fumantes e não fumantes nos casos de Asma Não Fatal.

4.5.2 Uso de corticosteróide

Os indivíduos do grupo de Asma Fatal que receberam tratamento regular com corticosteróides ($n = 13$) apresentaram menor área fracionada de fibras elásticas nas grandes e pequenas vias aéreas quando comparados àqueles que não receberam nenhum corticosteróide (vias aéreas grandes $8,8 \pm 13,7$ versus $28,8 \pm 9,5\%$, $p = 0,003$; vias aéreas pequenas $10,0 \pm 12,8$ versus $20,4 \pm 9,5\%$, $p = 0,01$), como mostra a Figura 12.

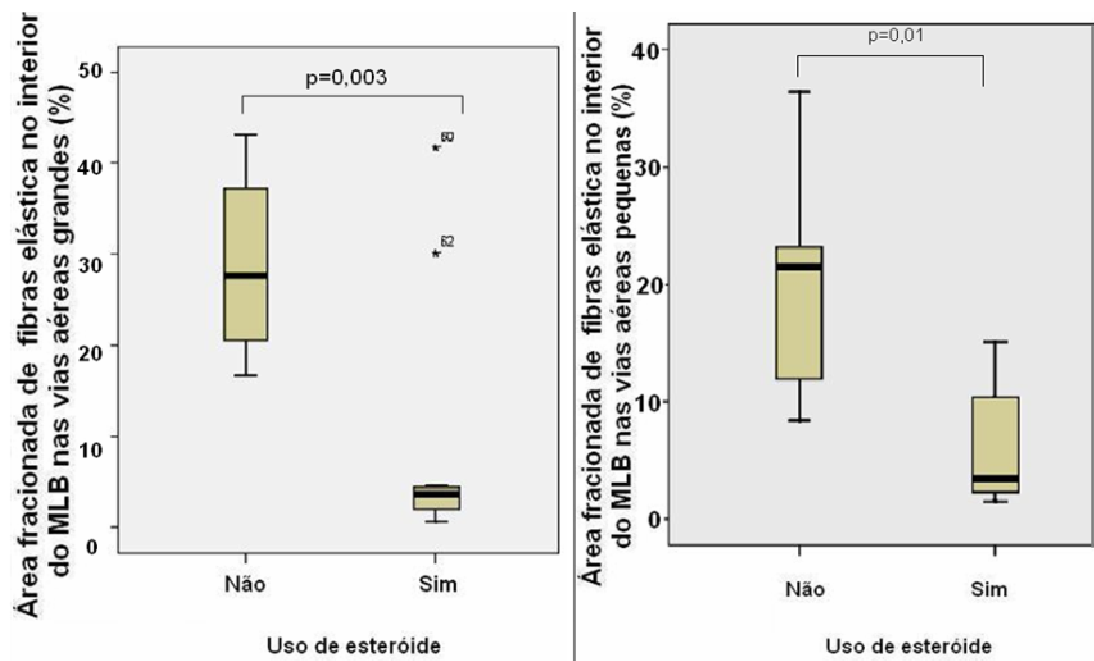


Figura 12. Área fracionada de fibras elásticas no músculo liso brônquico (MLB) de grandes e pequenas vias aéreas no grupo de Asma Fatal. Resultados expressos em %.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos o conteúdo dos diferentes componentes da matriz extracelular, metaloproteinases e seus inibidores teciduais na camada do músculo liso de vias aéreas grandes e pequenas de indivíduos com asma e comparamos com controles. Até o momento, este é o primeiro estudo em tecido humano *in vivo* que descreve de maneira bastante abrangente a composição dos diferentes componentes da MEC e seus reguladores no interior do músculo liso de grandes e pequenas vias aéreas em pacientes com asma fatal e asma não fatal.

Nós encontramos nos casos de asma fatal: uma área aumentada de músculo liso com aumento de fibras elásticas, fibronectina e metaloproteinases (MMP-9 e MMP-12) nas grandes vias aéreas; e uma área aumentada de músculo liso com aumento somente de fibras elásticas nas pequenas vias aéreas em relação aos controles e aos indivíduos asmáticos que faleceram de outras causas.

O aumento significativo das fibras elásticas no MLB das grandes vias aéreas nos casos de Asma Fatal foi observado quando comparado aos grupos Asma Não Fatal e Controle, e nas vias aéreas pequenas quando comparado ao grupo Asma Não Fatal.

As fibras elásticas é um componente integral da matriz extracelular das vias aéreas e do parênquima pulmonar, as quais têm a função de regular a patência das vias aéreas e o recolhimento elástico pulmonar. As

fibras elásticas são abundantes entre as células do MLB e, embora seu papel fisiológico não esteja totalmente esclarecido, são provavelmente importantes nas alterações do calibre e comprimento das vias aéreas durante a tosse, respirações normais e profundas, contribuindo para o comportamento de histerese das vias aéreas e parênquima pulmonar, se opondo a broncoconstrição durante a inspiração (Moreno et al., 1993; Noble et al., 2005).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram uma diminuição de fibras elásticas na região subepitelial de vias aéreas centrais asmáticas quando comparado aos controles, e uma diminuição das fibras elásticas na adventícia das pequenas vias aéreas e nos septos alveolares peribronquiolares, local de ancoramento do parênquima pulmonar (Mauad et al., 1999; Mauad et al., 2004). Estes achados contrastam com os nossos atuais, onde observamos um aumento de fibras elásticas na camada muscular de vias aéreas de indivíduos falecidos por asma. Essa variação da fração de fibras elásticas poderia ser explicada devido à ação de proteases e elastases liberadas por células inflamatórias, que é exuberante na camada interna (lâmina própria) e adventícia na asma (De Magalhães et al., 2005), e pela potencial função secretora do músculo liso de promover formação de elastina. Sabe-se que o músculo liso brônquico não apresenta somente um papel broncoconstritor, mas tem importante papel imunomodulador. Graças a chamada plasticidade fenotípica, as células da musculatura lisa brônquica podem secretar elementos da matriz extracelular, além de fatores de crescimento. A secreção destes elementos é influenciada pelo ambiente

inflamatório próprio da asma, mas também a modula. Assim, células musculares lisas de asmáticos secretam determinados elementos da matriz extracelular em maior quantidade que células musculares lisas obtidas de pacientes não asmáticos (Chan et al., 2006).

A contração do músculo pode ser influenciada pelo tecido conectivo externo a camada do MLB e dentro da própria camada. Enquanto o tecido conectivo externo ao músculo pode atuar como um componente paralelo elástico, limitando a broncoconstrição, o aumento das fibras elásticas entre os feixes de MLB pode representar uma maior carga contrátil as células, ou mesmo dificultar a transmissão de forças, representando um possível efeito “protetor” contra a broncoconstrição excessiva. Pode-se hipotetizar ainda, que alterações quantitativas nas fibras elásticas reflitam uma desorganização estrutural e funcional. Sabemos que o reparo das fibras elásticas é um processo bastante difícil em adultos, pois requer a formação ordenada de microfibrilas e elastina (Shifren e Mecham, 2006). Dessa maneira, o próprio relaxamento muscular pós-contrátil pode estar danificado na asma fatal por alteração quantitativa e possivelmente qualitativa das fibras elásticas intermusculares.

O fato do aumento de fibras elásticas ocorrer apenas no grupo de pacientes que foram á óbito por asma mostra que estes pacientes são aqueles realmente mais suscetíveis a desenvolverem alterações estruturais da parede da via aérea, e que alterações estruturais, de alguma maneira, podem contribuir para a gravidade da doença ou para ataques mais graves.

Nossos resultados apontam para um aumento de fibras elásticas dentro da camada muscular das vias aéreas de asmáticos que foram a óbito por asma fatal, mas não em asmáticos que foram a óbito por outras causas ou em pacientes sem doenças pulmonares. Uma possível explicação para este achado, é que no interior da camada muscular predominem mecanismos proteolíticos e que um “turnover” exagerado de fibras elásticas esteja ocorrendo, ou ainda que o aumento das fibras elásticas reflita o pólo secretório que as células musculares lisas podem assumir, resultando numa maior proporção de fibras elásticas nos casos mais graves da doença.

Encontramos também um aumento de fibras elásticas na camada de músculo liso de vias aéreas grandes e pequenas em pacientes que faziam uso regular de corticosteróides em relação aos que não faziam, sugerindo que o tratamento antiinflamatório pode alterar o conteúdo de fibras elásticas na camada muscular lisa. São escassos os dados referentes ao uso de terapias para asma sobre a composição da MEC. Na doença estável, o uso de corticosteróide inalado por 6 semanas não alterou a composição de colágeno III (Bergeron et al., 2005), já um estudo com desafios alérgicos, demonstra que a composição de MEC aumentou em respostas aos alérgicos e, apesar de diminuir as células inflamatórias, aumentou o conteúdo de biglicano na mucosa brônquica de asmáticos quando comparado a indivíduos controles (De Kluijver et al., 2005). Portanto, tratamento com corticosteróide pode paradoxalmente aumentar certas proteínas da MEC. Não se conhece porém, o efeito funcional destes achados.

No tecido de adultos, o reparo funcional das fibras elásticas é prejudicado, pois demanda uma reexpressão coordenada da incorporação de moléculas de elastina nas fibras elásticas (Shifren e Mecham, 2006). Sendo possível especular que, embora haja um aumento de fibras elásticas no MLB de asmáticos, essas fibras elásticas apresentam uma estrutura anormal, com prejuízos na sua funcionalidade. Este fato pode contribuir para mecanismos alterados de contração e relaxamento do MLB na asma.

Os proteoglicanos (PGs) integram uma família de proteínas, possuindo importantes funções biológicas (Iozzo, 1985). Uma dessas proteínas, o versicam, é capaz de regular o conteúdo hídrico e a resiliência dos tecidos (De Kluijver et al., 2005). Estudos prévios têm demonstrado um aumento do versicam na camada interna de grandes e pequenas vias aéreas em casos de asma, porém diferenças não foram detectadas na camada de MLB (De Medeiros et al., 2005; Pini et al., 2007; De Kluijver et al., 2005). Pini et al. (2007) recentemente comparou a área de versicam no MLB num pequeno grupo de pacientes com asma moderada e grave, e comparou com indivíduos controles, e também não encontrou diferenças significativas entre os grupos. O aumento do versicam observado na camada interna de vias aéreas pode estar relacionado ao acúmulo de edema encontrado nessa região. Esses achados indicam que as alterações da MEC podem variar entre diferentes compartimentos das vias aéreas (Brightling et al., 2002). Entender a relação entre as estruturas das vias aéreas e função na asma, dependerá do estudo da composição e propriedades mecânicas dos componentes alterados em cada compartimento da via aérea e no

parênquima circundante. Seria extremamente interessante conectar os nossos achados com os dados de função pulmonar dos pacientes deste estudo, mas infelizmente esses dados de função pulmonar não estão disponíveis na grande maioria dos casos. Estudos correlacionando a estrutura das vias aéreas e a função pulmonar na asma certamente serão necessários para aumentar a compreensão dos nossos resultados.

A fibronectina é uma proteína de matriz também expressa no MLB, e apresenta um conteúdo aumentado na parede da via aérea na asma (Roche et al., 1989). Embora nosso estudo seja o primeiro a demonstrar que a fibronectina está aumentada nas grandes vias aéreas de indivíduos com asma, existem muitas evidências *in vitro* que a fibronectina influencia bastante as funções biológicas do MLB na asma. A fibronectina apresenta efeitos biológicos na proliferação do MLB (Hirst et al., 2000), migração (Parameswaran et al., 2004), e sobrevivência da célula (Freyer et al., 2001). O aumento do conteúdo de fibronectina no MLB nas grandes vias aéreas de asmáticos por nós descritos pode então, estar contribuindo criticamente para a possível hiperplasia do MLB observada na asma. Chan et al. (2006) demonstraram que, *in vitro*, células do músculo liso brônquico de asmáticos secretam mais fibronectina, e que esta secreção pode contribuir autocrinamente para elevar os níveis de eotaxina dependente de IL-13.

Por outro lado, o aumento observado de fibronectina associado ao aumento de fibras elásticas no músculo liso de grandes vias aéreas de asmáticos pode levar a um aumento da resistência do tecido à deformação,

representando um efeito protetor, promovendo uma maior pré-carga à contração do MLB, opondo-se ao seu encurtamento e conseqüentemente o estreitamento da via aérea.

A composição da MEC pode estar também influenciando na contração do músculo liso brônquico (Zhang e Gunst, 2008). Os colágenos tipos I e III são os mais abundantes colágenos fibrilares no tecido muscular, enquanto que o colágeno IV é o maior componente da membrana basal (Kovanen, 2002). Estudos *in vitro* têm demonstrado que o MLB de asmáticos secreta maior quantidade de colágeno (Johnson et al., 2004). *In vivo*, alguns estudos detectaram aumento de colágeno na submucosa bronquial de asmáticos (Roche et al., 1989; Wilson e Li, 1995; Benayoun et al., 2003), enquanto que resultados conflitantes são encontrados na literatura (Chu et al., 1998). Bergeron et al. (2005) analisaram biópsias endobrônquicas e transbrônquicas de pacientes com asma leve e moderada, não observando diferença entre as vias aéreas grandes e pequenas ao analisar o conteúdo de colágeno III na submucosa. Nossos resultados estão de acordo com Chu et al. (1998), mostrando que não há diferença significativa do conteúdo dos colágenos analisados no MLB de asmáticos em comparação com o MLB de indivíduos controles, utilizando coloração de Sirius Red e imunohistoquímica para a marcação de colágenos. O aumento de colágeno fibrilar na camada do MLB poderia diminuir a resposta broncodilatadora a estímulos mecânicos e farmacológicos, ou mesmo, contribuir para a obstrução irreversível das vias aéreas. Por outro lado, uma fibrose na região da mucosa poderia agir limitando a força de transferência entre as células do músculo liso brônquico e desse

modo diminuindo a broncoconstrição (Okazawa et al., 1995), hipótese esta não sustentada pelos nossos dados.

Diferentes expressões de metaloproteinases têm sido associadas à patogênese da asma. Além de degradarem os componentes da MEC e serem responsáveis em grande parte pelo “turnover” dos elementos da MEC (Atkinson e Senior, 2003), as MMPs estão envolvidas no tráfego das células inflamatórias, nos processo de defesa e reparo tissular (Greenlee et al., 2007). Observamos no presente estudo aumento da expressão de MMP-9 e MMP-12, mas não de MMP-1e MMP-2, ou TIMP-1 e TIMP-2 nos feixes de MLB nos casos de asma fatal. Esses dados favorecem um ambiente proteolítico na camada de MLB, especialmente envolvendo MMPs com atividade elastolítica, com possíveis ciclos repetidos de degradação da matriz seguidos de reparo inadequado. Interessante ressaltar que, o aumento da expressão de MMP-9 e MMP-12 no MLB sugerem um processo dinâmico que pode ser amenizado com terapia.

É bem conhecida a super expressão de MMP-9 na asma, particularmente em pacientes com asma grave (Wenzel et al., 2003), e durante exacerbações (Oshita et al., 2003). Células inflamatórias e células estruturais pulmonares, incluindo células da musculatura lisa brônquica podem expressar MMP-9. É interessante observar que no presente estudo a MMP-9 apresentou-se aumentada no MLB de fumantes quando comparada a indivíduos não fumantes. Assim como a MMP-9, a MMP-12 tem ação de elastase, e também é capaz de clivar colágeno tipo IV, fibronectina, laminina e gelatina (Xie et al., 2005). O presente estudo encontrou aumento da

expressão de MMP-12 no MLB de indivíduos asmáticos, e uma correlação positiva desta protease com as fibras elásticas, consistente com a idéia de que um “turnover” dinâmico de fibras elásticas ocorra na asma. Não foram observadas diferenças na expressão dos inibidores de metaloproteinasas teciduais na MLB, refletindo uma perda do equilíbrio entre MMPs e TIMPs, com aumento da atividade das MMPs.

O presente estudo tem importantes limitações:

1) Dados clínicos e funcionais limitados dos indivíduos asmáticos, que não nos permitem traçar correlações fidedignas entre os nossos achados;

2) Os indivíduos controles apresentam histologia pulmonar normal, porém não eram desprovidos de outras doenças; não sabemos o quanto as doenças de base podem ter influenciado nosso resultado. No entanto, por termos selecionados pulmões com estrutura de vias aéreas normais, essa influência de outras patologias pode ser minimizada.

3) Não foi possível realizar as colorações de imunohistoquímica nos casos de Asma Não Fatal de Perth. Os casos de nossa colaboração australiana exibiam padrões de coloração bastante distintos dos nossos, possivelmente pelo maior tempo de fixação dos casos em formol. Sabe-se que a fixação em formol por tempo prolongado acarreta a perda de epítomos necessários para o sucesso da reação imunohistoquímica. Portanto, optamos por não comparar os nossos achados imunohistoquímicos com o de Perth, a interpretação dos resultados seria bastante difícil e possivelmente não correta. No entanto, descrevemos o conteúdo do colágeno “total” e das fibras elásticas, as duas principais proteínas da MEC pulmonar, nos casos de Asma Fatal, Asma Não Fatal e Controle. Estas

proteínas provavelmente têm importante papel na mecânica da musculatura lisa brônquica. Além disso, os nossos dados histoquímicos do conteúdo do colágeno “total” realizados nos três grupos foram confirmados pela imunohistoquímica nos casos de São Paulo.

Encontramos correlações estatisticamente significativas entre algumas proteínas e idade e início de asma, embora a relevância clínica destes achados seja obscura, Bai et al. (2000) também demonstram uma relação entre idade e fração de área de componentes da MEC no MLB na asma.

Os dados atuais baseiam-se em estudos histoquímicos e imunohistoquímicos. Sendo que poderia ser útil a confirmação de nossos achados utilizando estudos de RNA. Infelizmente, tentativas de extrair RNA do músculo liso brônquico dissecado de material de autópsia não foi bem sucedido, devido à extensa degradação de RNA *post-mortem*.

Apesar da proporção de MEC no MLB das vias aéreas pequenas ser maior em geral, nossos resultados apontaram para maiores alterações nos asmáticos nas grandes vias aéreas. Recentemente, dois estudos (Brown et al., 2006 e Permutt, 2007) enfatizaram o envolvimento estrutural das grandes vias aéreas como principais determinantes da hiperresponsividade na asma. É possível que, alterações dos componentes da MEC no MLB das grandes vias aéreas contribuam de maneira mais significativa nas alterações intrínsecas na asma que as pequenas vias aéreas.

6. CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo *in vivo* confirmam que componentes da matriz extracelular (fibras elásticas e fibronectina) e seus reguladores (metaloproteinases 9 e 12) estão alterados no músculo liso brônquico na asma, podendo acarretar importantes conseqüências funcionais para o músculo liso brônquico e excessivo estreitamento das vias aéreas na asma.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

As alterações da MEC associadas à inflamação crônica das vias aéreas na asma devem ser consideradas em conjunto, refletindo o processo dinâmico e de interação entre os diversos componentes envolvidos. Avanços nos estudos por imagens não-invasivas, como tomografia computadorizada de alta resolução e técnicas de imagens invasivas como, microscopia fluorescente confocal *in vivo* (Thiberville et al., 2007), assim como ultrassonografia endobrônquica (Coxson et al., 2008), poderão fornecer informações detalhadas da geometria das vias aéreas. O advento da termoplastia brônquica é uma das novas oportunidades terapêuticas como uma ferramenta para modificar o remodelamento brônquico (Cox et al., 2007) em pacientes com asma grave, porém mais estudos são necessários para compreender os seus benefícios a longo prazo. Mais estudos buscando um melhor entendimento sobre as relação estrutura–função dos componentes da matriz extracelular em indivíduos sem patologias pulmonares e asmáticos são necessários para podermos compreender se as alterações do remodelamento são prejudiciais ou protetoras na asma.

8. ANEXOS

Tabela 1. Anticorpos e procedimentos utilizados na análise imunohistoquímica

Anticorpo	Pré-tratamento	Espécies	Diluição	Clone	Origem
Colágeno I	Citrato/pepsina	Cabra	1:2000	Policlonal	US Biological-Swampscott, MA, USA
Colágeno III	Tripsina	Camundongo	1:2500	III-53	Oncogene & Calbiochem, Darmstadt, Germany
Fibronectina	Tripsina	Coelho	1:4000	Policlonal	Dako, Glostrup, Denmark
Versicam	Sem digestão	Camundongo	1:2000	2-b-1	Seikagaku Co., Tokyo, Japan
MMP-1	Citrato	Camundongo	1:1500	41-1E5	Oncogene & Calbiochem, Darmstadt, Germany
MMP-2	Citrato	Camundongo	1:3000	A-Gel VC2	Labvision, Fremont, CA, USA
MMP-9	Citrato	Camundongo	1:40	626-644	Oncogene & Calbiochem, Darmstadt, Germany
MMP-12	Citrato	Camundongo	1:10	4D2	R&D System, Minneapolis, USA
TIMP-1	Sem digestão	Camundongo	1:25	2A5	Labvision, Fremont, CA, USA
TIMP-2	Tripsina	Camundongo	1:100	3A4	Labvision, Fremont, CA, USA

Abreviações: MMP = metaloproteinases; TIMP = inibidor das metaloproteinases de tecido.

Tabela 2. Dados clínicos do grupo de Asma Fatal, Asma Não Fatal e Controle

	ASMA FATAL (n=35)	ASMA NÃO FATAL (n=10)	CONTROLE (n=22)
Sexo (M/F)	15/20	5/5	11/11
Idade (anos)*	38 (26-50)	24 (17-34)	43 (26-58)
Fumo, NF/F/Ex	8/22/3 [†]	3/4/1 [†]	100/0/0
Início da doença (anos)*	12 [‡] (3-24)	3 [§] (2-19)	
Duração da doença (anos)*	24 [‡] (2-60)	14 [§] (2-27)	
Corticosteróide, oral ou inalado (%)	37	20	
Corticosteróide Oral (%)	20	0	
Corticosteróide inalado (%)	34	20	
Broncodilatador de curta duração (%)	97	80	
Causa de Morte	Asma	DCV: 3 AM: 2 ECO: 2 Overdose (droga): 1 Sufocamento: 1 Indeterminada: 1	DCV: 11 AM: 3 DH: 2 Indeterminada: 2 HGI: 1 Enforcamento: 1 Asfixia: 1 ECO: 1

Definição das abreviações: ECO = envenenamento por monóxido de carbono; DCV = doenças cardiovasculares; DH = doenças hepáticas; EX = ex-fumante; F = feminino; HGI = hemorragia gastrointestinal; M = masculino; AM = acidente de moto; NF = não fumante; F = fumante.

*Dados expressos como mediana e interquartis.

[†]Informação não disponível para 2 indivíduos em cada grupo.

[‡]Informação disponível para 32 indivíduos.

[§] Informação disponível para 6 indivíduos.

Tabela 3. Área fracionada (%) dos componentes de matriz extracelular (MEC) no músculo liso brônquico na Asma Fatal (AF), Asma Não Fatal (ANF) e Controle.

Área fracionada dos componentes da MEC (%)	Via aérea	ASMA FATAL	ASMA NÃO FATAL	CONTROLE	P [∞]
Fibras elásticas	Grande	17,6 ± 15,5 ^{†‡}	2,2 ± 0,9	5,5 ± 6,0	0,001
	Pequena	14,2 ± 12,4 [§]	3,1 ± 2,8	8,7 ± 9,7	0,019
p ^φ		0,791	0,905	0,035	
Colágeno total	Grande	7,7 ± 4,3	5,2 ± 2,1	7,5 ± 5,9	0,33
	Pequena	9,1 ± 4,8	6,2 ± 5,1	7,2 ± 4,5	0,21
P		0,517	0,924	0,106	
Fibronectina	Grande	6,2 ± 7,0		2,1 ± 1,8	0,034
	Pequena	5,1 ± 7,8		4,0 ± 8,7	0,056
P		0,188		0,439	
Versicam	Grande	2,6 ± 2,3		1,0 ± 0,7	0,12
	Pequena	5,0 ± 3,1		2,8 ± 1,6	0,073
P		0,005		0,033	
Colágeno I	Grande	1,5 (0,3 – 2,0)*		0,7 (0,4 – 1,3)*	0,63
	Pequena	11,0 ± 6,7		11,0 ± 8,9	0,38
P		0,0001		0,018	
Colágeno III	Grande	0,2 (0,2 – 0,5)*		1,0 (0,4 – 1,5)*	0,068
	Pequena	7,0 ± 7,0		8,0 ± 4,7	0,71
P		0,001		0,011	

Abreviações: ECM = matriz extracelular

* Dados expressos como mediana e interquartil.

† p = 0,002 em relação a AF vs ANF.

‡ p = 0,007 em relação a AF vs Controle.

§ p = 0,019 em relação a AF vs ANF.

φ valor de "p" para teste t pareado ou Wilcoxon das áreas fracionadas das vias aéreas grandes VS pequenas.

∞ valor de "p" para teste t, Mann Whitney ou ANOVA para comparação entre os grupos.

Tabela 4. Área fracionada (%) das metaloproteínas (MMP)-1, 2, 9 e 12; e inibidores das metaloproteínas (TIMP)-1 e 2 no interior do músculo liso brônquico nos casos de Asma Fatal e Controle. Resultados expressos em média \pm DP, a menos se especificado

Área fracionada de MMP e TIMP (%)	Via aérea	ASMA FATAL	CONTROLE	P $^{\infty}$
MMP-9	Grande	1,7 (0,5 – 5,4)*	0,4 (0,3 – 0,4)*	0,01
	SA	2,2 (0,6 – 3,2)*	2,0 (0,8 – 2,8)*	0,88
p $^{\phi}$		0,520	0,043	
MP-12	Grande	3,2 (2,1 – 7,9)*	1,0 (0,8 – 2,0)*	0,01
	Pequena	1,6 (0,9 – 3,6)*	2,6 (0,6 – 3,7)*	0,97
P		0,001	0,866	
MMP-1	Grande	1,1 \pm 2,3	0,2 \pm 0,2	0,17
	Pequena	0,6 \pm 0,7	0,2 \pm 0,3	0,22
P		0,080	0,295	
MMP-2	Grande	0,7 \pm 0,7	0,8 \pm 0,8	0,54
	Pequena	0,5 \pm 0,5	0,6 \pm 0,5	0,59
P		0,484	0,638	
TIMP-1	Grande	4,3 \pm 6,0	1,3 \pm 1,6	0,55
	Pequena	1,7 \pm 3,3	1,4 \pm 2,4	0,85
		0,054	0,516	
TIMP-2	Grande	4,0 (1,3 – 10,1)*	2,0 (1,4 – 2,1)*	0,099
	Pequena	1,7 (0,5 – 7,8)*	6,7 (2,6 – 9,8)*	0,18
P		0,687	0,025	

Abreviações: MMP = metaloproteínas; TIMP = tecido inibidor das metaloproteínas.

* Resultados expresso em mediana e interquartis.

$^{\phi}$ valor de “p” para teste t pareado ou Wilcoxon da área fracionada das vias aéreas grandes vs pequenas.

$^{\infty}$ valor de “p” para teste t, Mann Whitney ou ANOVA para comparação entre os grupos.

9. REFERÊNCIAS

An SS, Bai TR, Bates JH, Black JL, Brown RH, Brusasco V, Chitano P, Deng L, Dowell M, Eidelman DH, Fabry B, Fairbank NJ, Ford LE, Fredberg JJ, Gerthoffer WT, Gilbert SH, Gosens R, Gunst SJ, Halayko AJ, Ingram RH, Irvin CG, James AL, Janssen LJ, King GG, Knight DA, Lauzon AM, Lakser OJ, Ludwig MS, Lutchen KR, Maksym GN, Martin JG, Mauad T, McParland BE, Mijailovich SM, Mitchell HW, Mitchell RW, Mitzner W, Murphy TM, Paré PD, Pellegrino R, Sanderson MJ, Schellenberg RR, Seow CV, Silveira PS, Smith PG, Solway J, Stephens NL, Sterk PJ, Stewart AG, Tang DD, Tepper RS, Tran T, Wang L. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J*. 2007;29:834-860.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28:12-24.

Bai TR, Wang ZL, Walker B, Paré PD. Chronic allergic inflammation induces replication of airway smooth muscle cells in vivo in guinea pigs. *Chest*. 1995;107S:93S.

Bai TR, Cooper J, Koelmeyer T, Paré PD, Weir TD. The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:663-9.

Baluga JC, Sueta A, Ceni M. Asthma mortality in Uruguay, 1984-1998. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87:124-8.

Barnes NC. Are leukotrienes involved in causing bronchial hyperresponsiveness? *Eur Respir J*. 1997;10:2701-3.

Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1360-8.

Bergeron C, Hauber HP, Gotfried M, Newman K, Dhanda R, Servi RJ, Ludwig MS, Hamid Q. Evidence of remodeling in peripheral airways of patients with mild to moderate asthma: effect of hydrofluoroalkane-flunisolide. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:983-9.

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323:1033-9.

Bramley AM, Roberts CR, Schellenberg RR. Collagenase increases shortening of human bronchial smooth muscle in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:1513-7.

Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002;346:1699-705.

Brown RH, Pearse DB, Pyrgos G, Liu MC, Togias A, Permutt S. The structural basis of airways hyperresponsiveness in asthma. *J Appl Physiol.* 2006;101:30-39.

Brusasco V, Crimi E, Pellegrino R. Airway hyperresponsiveness in asthma: not just a matter of airway inflammation. *Thorax.* 1998;53:992-8.

Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:405-10.

Carroll N, Lehmann E, Barret J, Morton A, Cooke C, James A. Variability of airway structure and inflammation in normal subjects and in cases of nonfatal and fatal asthma. *Pathol Res Pract.* 1996;192:238-48.

Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet LP, Hamid Q. Airway remodeling associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:1293-8.

Chan V, Burgess JK, Ratoff JC, O'Connor BJ, Greenough A, Lee TH, Hirst SJ. Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:379-85.

Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest.* 1997;111:852-7.

Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001;1:85-93.

Chu HW, Halliday JL, Martin RJ, Leung DY, Szeffler SJ, Wenzel SE. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1936-44.

Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J.* 2000;15:961-8.

Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Niven RM, Corris PA, Siersted HC, Olivenstein R, Pavord ID, McCormack D, Chaudhuri R, Miller JD, Laviolette

M; AIR Trial Study Group. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med.* 2007;356:1327-37.

Coxson HO, Quiney B, Sin DD, Xing L, McWilliams AM, Mayo Jr, Lam S. Airway wall thickness assessed using computed tomography and optical coherence tomography. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1201-6.

De S, Zelazny ET, Souhrada JF, Souhrada M. Interleukin-1 stimulates the proliferation of cultured air-way smooth muscle cells via platelet-derived growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:645-51.

De Kluijver J, Schrumpf JA, Evertse CE, Sont JK, Roughley PJ, Rabe KF, Hiemstra PS, Mauad T, Sterk PJ. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1361-9.

De Magalhães SS, Dos Santos MA, Da Silva OM, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, De Arruda MM, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:602-11.

De Medeiros MM, DA Silva LF, Dos Santos MA, Fernezlian S, Schrumpf JA, Roughley P, Hiemstra PS, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol.* 2005;207:102-10.

Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:434-57.

Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1750-7.

Dolhnikoff M, Silva LFF, Araujo BB, Gomes HAP, Fernezlian SM, Mulder A, Lindeman J, Mauad T. The outer wall area of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* (submitted). 2008.

Ebina M, Yaegashi H, Takahashi T, Motomiya M, Tanemura M. Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:1322-6.

Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:720-6.

Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, Watson SA, Buttle DJ, Johnson SR. Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2004;142:1318-24.

Emonard H, Takiya C, Dreze S, Cordier JF, Grimaud JA. Interstitial collagenase (MMP-1), gelatinase (MMP-2) and stromelysin (MMP-3) released by human fibroblasts cultured on acellular sarcoid granulomas (sarcoid matrix complex, SMC). *Matrix.* 1989;9:382-8.

Freyer AM, Johnson SR, Hall IP. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25:569-76.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:1531-46.

GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed. 2006. Reino Unido. [acessado em 20 de setembro de 2008]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>.

Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007;87:69-98.

Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:133-44.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6:861-70.

Heard BE, Hossain S. Hyperplasia of bronchial muscle in asthma. *J Pathol.* 1973;110:319-31.

Hirst SJ. Airway smooth muscle as a target in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:54-9.

Hocking DC. Fibronectin matrix deposition and cell contractility: implications for airway remodeling in asthma. *Chest.* 2002;122:275S-8S.

Holgate ST. The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:28-32.

Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, Panettieri RA Jr, Johnson M. Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:32S-50S.

Huber HL, Koessler KK. The pathology of fatal asthma. *Arch Intern Med.* 1922;30:689-760.

Iozzo RV. Proteoglycans: structure, function, and role in neoplasia. *Lab Invest.* 1985;53:373-96.

James AL, Paré PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139:242-6.

James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:1-6.

Johnson PR, Black JL, Carlin S, Ge Q, Underwood PA. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:2145-51.

Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burgess JK, Black JL. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:474-7.

Johnson PR, Burgess JK, Underwood PA, Au W, Poniris MH, Tamm M, Ge Q, Roth M, Black JL. Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:690-6.

Junqueira LL, Carneiro J. *Histopatologia Básica. 7ª Edição.* Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.

Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9:28-33.

Kielty CM, Wess TJ, Haston L, Ashworth JL, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23:581-96.

King GG, Paré PD, Seow CY. The mechanics of exaggerated airway narrowing in asthma: the role of smooth muscle. *Respir Physiol.* 1999;118:1-13.

Koskinen SO, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T, Martikkala V, Mäkinen TT, Oksa J, Rintamäki H, Löfberg M, Somer H, Takala TE. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand J Med Sci Sports.* 2001;11:9-15.

Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev.* 2002;30:20-5.

Kuwano K, Bosken CH, Paré PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1220-5.

Lazaar AL, Amrani Y, Panettieri RA Jr. The role of inflammation in the regulation of airway smooth muscle cell function and growth. In: Busse, W., Holgate, S. (Eds.), *Asthma and Rhinitis*. Blackwell Science, Ltd. Oxford, UK. 2000;1402-13.

Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:951-8.

Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med.* 1998;339:1194-200.

Limper AH, Roman J. Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest*. 1992;101:1663-73.

Ma X, Wang Y, Stephens NL. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998;274:C1206-14.

Masoli M, Fabiann D, Holt S, Beasley R. For the Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of GINA dissemination *Committee Report Allergy*. 2004;59:469-78.

Mauad T, Xavier AC, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:968-75.

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:857-62.

Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:997-1009.

Mauad T, Dolhnikoff M. Pathologic similarities and differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2008;14:31-38.

Mauad T, Ferreira DS, Costa MB, Araujo BB, Silva LF, Martins MA, Wenzel SE, Dolhnikoff M. Characterization of autopsy-proven fatal asthma patients in São Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;23:418-23.

McParland BE, Macklem PT, Paré PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol*. 2003;95:426-34.

Ministério da Saúde. DATASUS. Morbidade Hospitalar do SUS por local de internação – Brasil. Internações segundo lista de morbidade. CID -10. Período: 2004. Disponível em:
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miud.def>. Acessado em 10 de agosto de 2007.

Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2002;277:44854-63.

Moreno RH, Lisboa C, Hogg JC, Paré PD. Limitation of airway smooth muscle shortening by cartilage stiffness and lung elastic recoil in rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75:738-44.

Neffen H, Baena-Cagnani C, Passalacqua G, Canonica GW, Rocco D. Asthma mortality, inhaled steroids, and changing asthma therapy in Argentina (1990-1999). *Respir Med*. 2006;100:1431-5.

Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Mishima M. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:983-8.

Noble PB, Sharma A, mcfawn pk, Mitchell HW. Elastic properties of the bronchial mucosa: epithelial unfolding and stretch in response to airway inflation. *J Appl Physiol*. 2005;99:2061-6.

Noveral JP, Bhala A, Hintz RL, Grunstein MM, Cohen P. The insulin-like growth factor axis in airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 1994;267: L761-5.

Okazawa M, Wang L, Lambert RK, Verburgt L, Vedal S, Bert JL, Pinder KL, Paré PD. Mucosal folding and airway smooth muscle shortening. *Chest*. 1995;107:88S.

Oshita Y, Koga T, Kamimura T, Matsuo K, Rikimaru T, Aizawa H. Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. *Thorax*. 2003;58:757-60.

Panettieri RA Jr. Cellular and molecular mechanisms regulating airway smooth muscle proliferation and cell adhesion molecule expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:S133-40.

Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle: immunomodulatory cells that modulate airway remodeling? *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;137:277-93.

Paniagua R, Regadera J, Nistal M, Santamaría L. Elastic fibres of the human ductus deferens. *J Anat*. 1983;137:467-76.

Parameswaran K, Radford K, Zuo J, Janssen LJ, O'Byrne PM, Cox PG. Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration. *Eur Respir J*. 2004;24:545-51.

Parameswaran K, Willems-Widyastuti A, Alagappan VK, Radford K, Kranenburg AR, Sharma HS. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44:139-46.

Paré PD, Roberts CR, Bai TR, Wiggs BJ. The functional consequences of airway remodeling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1997;52:589-96.

Permutt S. The role of the large airways on smooth muscle contraction in asthma. *J Appl Physiol*. 2007;103:1457-8.

Pini L, Hamid Q, Shannon J, Lemelin L, Olivenstein R, Ernst P, Lemière C, Martin JG, Ludwig MS. Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. *Eur Respir J.* 2007;29:71-7.

Pogány G, Hernandez DJ, Vogel KG. The in vitro interaction of proteoglycans with type I collagen is modulated by phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 1994;313:102-11.

Rajah R, Nachajon RV, Collins MH, Hakonarson H, Grunstein MM, Cohen P. Elevated levels of the IGF-binding protein protease MMP-1 in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20:199-208.

Rennard SI, Romberger DJ, Robbins RA, Spurzem Jr. Is asthma an epithelial disease? *Chest.* 1995;107:127S-31.

Roberts CR. Is asthma a fibrotic disease. *Chest.* 1995;107:111S-7.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989;1:520-4.

Saetta M, Di Stefano D, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:138-43.

Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, MapP CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8_T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:822-6.

Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Funderburgh JL, Kao CW, Converse RL, Kao WW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem.* 2000;275:2607-12.

Shifren A, Mecham RP. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:428-33.

Sini P, Denti A, Tira ME, Balduini C. Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen. *Glycoconj J.* 1997;14:871-4.

Slats AM, Janssen K, Van Schadewijk A, Van Der Plas DT, Schot R, Van Den Aardweg JG, De Jongste JC, Hiemstra PS, Mauad T, Rabe KF, Sterk PJ. Expression of smooth muscle and extracellular matrix proteins in relation to airway function in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1196-202.

Sly RM. Continuing decreases in asthma mortality in the United States. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92:313-8.

Sobonya RE. Quantitative structural alterations in long-standing allergic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130:289-92.

Suki B, Ito S, Stamenovic D, Lutchen KR, Ingenito EP. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. *J Appl Physiol.* 2005;98:1892-9.

Takizawa T, Thurlbeck WM. Muscle and mucous gland size in the major bronchi of patients with chronic bronchitis, asthma, and asthmatic bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1971;104:331-6.

Thiberville L, Moreno-Swirc S, Vercauteren T, Peltier E, Cavé C, Bourg Heckly G. In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:22-31.

Thomson RJ, Bramley AM, Schellenberg RR. Airway muscle stereology: implications for increased shortening in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:749-57.

Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, Ousova O, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-De-Lara JM, Berger P. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med.* 2007;204:3173-81.

Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, Bellia V, Bonsignore G. Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol.* 1996;106:114-9.

Vignola AM, Chanez P, Siena L, Chiappara G, Bonsignore G, Bousquet J. Airways remodelling in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 1998a;11:359-67.

Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'Accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998b;158:1945-50.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest.* 2003;123:417S-22.

Xie S, Issa R, Sukkar MB, Oltmanns U, Bhavsar PK, Papi A, Caramori G, Adcock I, Chung KF. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. *Respir Res.* 2005;6:148.

Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:1345-52.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromolysin, collagenase, plasmin and heparinases. *J Biol Chem*. 1996;271:10079-86.

Wiberg C, Heinegård D, Wenglén C, Timpl R, Mörgelin M. biglycan organizes collagen vi into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem*. 2002;277:49120-6.

Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*. 1997; 27:363-71.

Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, Carter R, Wong HH, Cadbury PS, Fahy JV. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;11001-6.

Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998;12:315-35.

Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn*. 1993;43:283-93.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36:128-37.

Zhang Y, Cao L, Kiani CG, Yang BL, Yang BB. The G3 domain of versican inhibits mesenchymal chondrogenesis via the epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem*. 1998;273:33054-63.

Zhang W, Gunst SJ. Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix: implications for contraction. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:32-9.

APÊNDICE

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)