

IMUNOPATOLOGIA E REMODELAMENTO NA ASMA GRAVE

IMMUNOPATHOLOGY AND REMODELING IN SEVERE ASTHMA

Thais Mauad¹, Marisa Dolhnikoff², Diógenes Seraphim Ferreira¹, Silvia de Magalhães Simões², Adelmir Souza-Machado³
¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, SP; ²ProAR, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia; ³Prof. Adjunto de Farmacologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; Salvador, BA, Brasil

Os mecanismos inflamatórios da asma grave são heterogêneos e distintos da asma leve e moderada e as vias aéreas destes pacientes possuem alterações estruturais marcantes conhecidas como remodelamento. Há persistência da inflamação nas vias aéreas, com maior presença de neutrófilos e extensão do infiltrado celular até as vias aéreas distais. A melhora de muitos asmáticos graves alérgicos com uso de omalizumab realça o papel da IgE na doença, mas também o aumento de TNF- α , a redução de mediadores antiinflamatórios e alterações no metabolismo oxidativo contribuem com a inflamação. Existem alterações específicas do epitélio, vasos, músculo liso brônquico e matriz extracelular na asma grave, mas correlações precisas entre o remodelamento brônquico e parâmetros clínicos, hiperresponsividade ou obstrução brônquica não estão definidas. Algumas destas alterações estruturais também estão presentes no pulmão distal, possivelmente contribuindo para a maior gravidade destes pacientes.

Palavras-chave: Asma, patologia, asma grave, inflamação, IgE, remodelamento.

Inflammatory mechanisms in severe asthma are heterogeneous and different from mild and moderate asthma and the airways from these patients show marked structural alterations known as remodelling. There is persistent inflammation in the airways, with greater neutrophilic presence and extension of the cellular infiltrate to the distal airways. The improvement of many severe allergic asthmatics with omalizumab underscores the role of IgE in this disease, but increased TNF- α , reduced anti-inflammatory mediators and alterations in oxidative metabolism also contribute with the inflammation. There are specific alteration in the epithelium, in the bronchial smooth muscle and extracellular matrix in severe asthma, but precise correlations between airway remodelling and clinical parameters, hiperresponsiveness or bronchial obstruction are not defined. Some of these structural alterations are also present in the distal lung, possibly contributing to the severity of these asthmatics.

Key words: Asthma, pathology, severe asthma, IgE, remodelling.

A asma afeta 300 milhões de pessoas no mundo, incluindo indivíduos de países desenvolvidos e em desenvolvimento, tratando-se de uma doença com alto impacto econômico e de saúde pública⁽⁹⁾.

A asma é caracterizada por inflamação crônica e alterações estruturais das vias aéreas que constituem a base para a presença dos sintomas de caráter episódico, obstrução reversível e hiperresponsividade. A inflamação crônica da asma está associada à produção de anticorpos IgE, citocinas de padrão Th2 e eosinófilos, resultando na ativação e recrutamento de diversos elementos celulares para os pulmões e na produção de um complexo conjunto de mediadores pró-inflamatórios⁽²³⁾.

Na maioria dos indivíduos asmáticos, o tratamento com corticosteróides inalados diminui a inflamação, a obstrução e a hiperresponsividade das vias aéreas. No entanto, uma minoria de pacientes (cerca de 5 a 10%) não apresenta reversibilidade total dos sintomas mesmo com o uso regular de corticosteroide inalatório, associado aos broncodilatores ou aos antileucotrienos. Outras medidas terapêuticas são necessárias para o controle da doença nesses pacientes, como por exemplo, o uso de corticosteróides por via oral. Além disso, eles cursam com limitação de atividades diárias, pior qualidade de vida e maior risco de exacerbações graves o que aumenta o risco de mortalidade por asma. Apesar de representarem a minoria dos indivíduos asmáticos, estes pacientes causam o maior impacto em termos econômicos e de uso de recursos médicos e hospitalares⁽⁸²⁾.

Um estudo populacional holandês mostrou que pacientes com asma grave não controlada e com hospitalização custam em medicação até 700 euros por mês contra 300 euros dos pacientes graves, porém controlados. Os custos referentes a hospitalização de pacientes com asma grave giram em torno de 10.000 euros por ano⁽¹¹⁾. No Brasil, os custos relacionados à hospitalização por asma são bem menores que em países europeus, mas mesmo assim, pacientes com asma não

Recebido em 24/07/2008

Aceito em 20/10/2008

Endereço para correspondência: Dr. Thais Mauad, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455. CEP: 05449-030. São Paulo, SP, Brasil. Tel: 55 11 30617173; Fax: 55 11 30628098. E-mail: tmaud@usp.br. Fontes de financiamento: CNPq; Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB).

Gazeta Médica da Bahia

2008;78 (Suplemento 2):75-85

© 2008 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

controlada custam até oito vezes mais ao sistema de saúde pública do governo federal do que os pacientes controlados⁽⁸⁹⁾.

Uma proporção significativa de pacientes com asma grave tem uma doença potencialmente tratável, mas é subdiagnosticada ou não diagnosticada e sub-tratada. A falta de aderência ao tratamento é um importante fator que contribui para um inadequado controle da asma grave. Em nosso meio, a distribuição insuficiente de corticosteróide inalatório pelo sistema de saúde pública também contribui para o manejo inadequado da doença. Por exemplo, nos pacientes com asma grave controlada, a medicação tem impacto em até 18% da receita familiar, sendo um importante fator limitante no sucesso do tratamento medicamentoso⁽⁸⁹⁾.

Muito esforço tem sido feito para melhor caracterizar os pacientes com asma grave e entender os mecanismos de doença. Surpreendentemente, pouco se conhece sobre a epidemiologia da doença. A asma grave e refratária ao tratamento parece ser uma doença heterogênea que pode ser dividida com base nas suas diferentes características clínicas, funcionais ou fisiopatológicas, os chamados fenótipos.

Em alguns pacientes, a doença se inicia na infância, em outros na vida adulta. Não se sabe, porém se os pacientes com asma grave de início na vida adulta teriam apresentado algum tipo de distúrbio respiratório já na infância. Os pacientes com asma grave de início tardio cursam com um declínio mais acelerado da função pulmonar do que os pacientes de início precoce. A intensidade da obstrução, bem como a frequência das exacerbações também podem se apresentar de formas diferentes entre os pacientes⁽¹⁰⁵⁾.

Existem também tentativas de classificar estes doentes do ponto de vista anátomo-patológico⁽¹⁰⁸⁾. Miranda et al. categorizaram a asma grave em quatro fenótipos, de acordo com o início da doença e a eosinofilia tissular. Segundo estes autores, aqueles com asma de início precoce e eosinofilia das vias aéreas apresentam uma resposta anti-inflamatória diminuída ao corticóide (resistência clássica ao esteróide), enquanto aqueles sem eosinófilos têm uma boa resposta anti-inflamatória, mas continuam com sintomas e alterações fisiológicas resistentes à terapia com corticosteróides. A asma de início tardio é mais frequentemente eosinofílica, com menor evidência de um processo alérgico. Finalmente, estes autores acreditam que a asma de início tardio sem eosinófilos pode ser uma doença distinta⁽⁷²⁾.

Embora a asma apresente um padrão de secreção de citocinas tipo Th2 associado à presença de linfócitos TCD4⁺ o padrão inflamatório que ocorre em alguns pacientes com asma grave pode se assemelhar ao padrão dos pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Pacientes com asma grave podem apresentar aumento de neutrófilos e maior expressão da quimiocina CXCL8 (ou interleucina 8, IL-8) e fator de necrose tumoral, aumento do estresse oxidativo e conseqüente pior resposta aos corticosteróides. Na doença mais grave uma mistura de padrões inflamatórios Th1 e Th2 pode ocorrer, assim como mais células CD8⁺, com fenótipo citotóxico^(4,76,77).

Outros fatores importantes que poderiam contribuir para a gravidade da asma são o espessamento das vias aéreas por alterações estruturais da parede brônquica (o chamado remodelamento brônquico) e o envolvimento inflamatório/estrutural das porções mais distais do pulmão.

Neste capítulo apresentamos uma revisão dos aspectos inflamatórios e do remodelamento na asma grave. A importância de melhor entender os múltiplos fenótipos da asma grave reside na tentativa de identificar biomarcadores, estabelecer critérios de diagnóstico precoce e de prognóstico, além de estabelecer terapias medicamentosas diferenciadas.

Inflamação

Persistência e Localização da Inflamação na Asma Grave

Alguns mecanismos são propostos para a manutenção do processo inflamatório da asma grave: 1) resposta ineficaz ao medicamento glicocorticóide; 2) doença de fenótipo inflamatório distinto com infiltrado neutrofílico predominante; 3) comprometimento inflamatório do pulmão distal. Certamente, tais mecanismos não são excludentes, ou seja, um mesmo paciente pode apresentar uma superposição de alterações⁽¹⁰⁶⁾.

Resposta Ineficaz ao Corticosteróide ou Resistência ao Corticosteróide

Uma pequena proporção de asmáticos graves apresenta uma inflamação pulmonar eosinofílica persistente a despeito de altas doses de corticóide utilizadas⁽¹⁰⁹⁾. Alterações nos mecanismos de ligação de glicocorticóides aos seus receptores celulares são descritos nesses pacientes, incluindo seqüestro dos seus receptores celulares por mediadores inflamatórios, diminuição da ligação do receptor ao genoma e maior capacidade inibitória do receptor^(55,59,64). Anormalidades no balanço de acetilação e desacetilação de histonas que contribuem para a regulação da transcrição de genes, e já documentadas em asmáticos, pode contribuir para o processo de resistência ao corticosteróides⁽⁴⁸⁾. A baixa resposta aos glicocorticóides pode estar relacionada ao fenótipo predominantemente neutrofílico descrito em alguns pacientes com asma grave^(37,49).

Inflamação Neutrofílica

A participação dos neutrófilos na fisiopatologia da asma brônquica tem sido descrita em escarro, lavado broncoalveolar e biópsias brônquicas de asmáticos com asma grave de difícil controle, em uso de altas doses de corticóides orais^(108,109). Os mecanismos e as implicações clínicas desse achado neutrofílico permanecem desconhecidos. Algumas hipóteses são sugeridas: 1) em casos de doença iniciada há longo tempo, pode representar uma “doença patologicamente distinta” como uma variante da bronquiolite obliterante⁽⁵⁴⁾; 2) em casos de asma de início precoce, o infiltrado neutrofílico poderia significar uma inflamação “residual” após o uso de corticóide, de um processo inicialmente às custas de eosinófilos e neutrófilos. É sabido que corticóides inibem a apoptose de

neutrófilos, prolongam a sua sobrevivência, proporcionando o seu aumento nos tecidos⁽²²⁾. Alguns autores especulam que a presença de infiltrado neutrofílico seja resultante de infecção respiratória viral como fator precipitante da crise de asma⁽³⁰⁾. Está documentado que vírus podem induzir macrófagos e células epiteliais a produzirem interleucina 8 (IL-8) que constitui importante quimiotático para neutrófilos⁽²¹⁾. Lambling et al. evidenciaram aumento de neutrófilos e de IL-8 em lavado brônquico de pacientes com crise grave de asma submetidos a ventilação mecânica quando comparados a asma leve e controles não asmáticos⁽⁵⁸⁾.

O infiltrado inflamatório neutrofílico também tem sido descrito em alguns casos de asma fatal⁽³²⁾. Casos de morte súbita por asma mostram predominância do infiltrado neutrofílico sobre o eosinofílico nas vias aéreas. Observa-se maior número de neutrófilos nesses casos quando comparados a indivíduos cujo óbito ocorreu mais tardiamente ao início da crise, sugerindo a presença de uma entidade distinta, como preconizado por Sur et al.^(14, 51, 93).

Elastase neutrofílica, metaloproteinases (MMP-9), bem como radicais livres de oxigênio são produtos de neutrófilos capazes de causar dano epitelial e endotelial, obstrução das vias aéreas e remodelamento⁽⁸⁸⁾. Altas concentrações no plasma e lavado brônquico de MMP-9, associado a uma resposta diminuída da enzima ao seu inibidor (inibidor tecidual de metaloproteinase 1, TIMP-1) já foram demonstradas em pacientes com exacerbação aguda de asma e mal asmático^(5, 63).

Alguns autores sugerem que a MMP-9 represente um marcador de inflamação e remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma grave⁽⁶³⁾. Há evidências de que neutrófilos desempenhem importante papel na hipersecreção de muco através da elastase presente em seus grânulos, a qual constitui importante secretagogo de células calciformes e glândulas submucosas das vias aéreas^(75, 90). Outros autores, entretanto, não mostraram correlação significativa entre o número de neutrófilos presentes no tecido periglandular e a área de muco na luz das vias aéreas⁽¹⁶⁾.

Novos estudos são necessários para se definir com mais clareza o papel dos neutrófilos na asma grave, ressaltando inclusive, a melhor abordagem terapêutica para o controle da inflamação nesse grupo específico de pacientes.

Comprometimento Inflamatório do Pulmão Distal

Vários estudos anatomopatológicos têm demonstrado a presença de inflamação em vias aéreas distais na asma grave.^(87, 95) A parede das pequenas vias aéreas de pacientes com asma fatal são mais espessas em comparação com controles, principalmente às custas de hipertrofia de músculo liso, apresentando intenso infiltrado eosinofílico associado⁽¹⁵⁾. Na asma fatal, foi demonstrada a presença de infiltrado inflamatório em todos os compartimentos das vias aéreas e tecido pulmonar, evidenciado desde a mucosa nasal até o parênquima pulmonar periférico. O mesmo estudo mostrou que a camada externa de pequenas vias aéreas era a região mais acometida pela inflamação nos pacientes asmáticos

quando comparado a controles⁽⁶⁷⁾. Com relação à inflamação do parênquima pulmonar, existia um aumento significativo de neutrófilos, mastócitos e eosinófilos na região de acoplamento dos alvéolos às vias aéreas pequenas nos indivíduos asmáticos⁽⁶⁷⁾. Dessa forma, podemos supor que a presença de células efetoras nessa região possa ter implicações clínicas e funcionais através da liberação de enzimas (triptase, elastase, quimase) e de radicais livres no tecido, e que a presença de inflamação peribronquiolar na asma fatal possa estar associada a alterações estruturais previamente descritas nesses pacientes, como a ruptura de septos alveolares peribronquiolares⁽⁶⁹⁾.

Corticosteróides inalatórios, atualmente utilizados como terapia de escolha para o controle da asma se depositam predominantemente em vias aéreas centrais devido ao tamanho da partícula inalada⁽⁶¹⁾. Dessa forma, o pulmão distal (região compreendida entre vias aéreas de menor calibre e parênquima pulmonar periférico) não constitui alvo da terapia, comprometendo controle da inflamação pulmonar, o que para o asmático grave pode ter repercussões clínicas importantes⁽⁴⁴⁾.

IgE e Asma Grave

A imunoglobulina E (IgE) desempenha um papel importante na patogênese da asma brônquica e da rinite alérgica. Em coortes de crianças asmáticas, os níveis de IgE foram associados ao diagnóstico de asma e hiperreatividade brônquica. Além disso, altos níveis circulantes de IgE correlacionam-se com o risco de admissão por exacerbação de asma⁽⁴²⁾.

Ao alcançarem o trato respiratório, os alérgenos entram em contato com células dendríticas (DCs) presentes na mucosa brônquica, previamente sensibilizadas nos indivíduos suscetíveis. As respostas das DCs podem ser potencializadas pela ligação da IgE específica ao alérgeno a receptores de superfície de alta afinidade (FcεR1s). As DCs processam e apresentam o antígeno, ligado ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC), as células T CD4⁺. As células T CD4⁺ são estimuladas pela interação do antígeno-MHC com receptores de superfície de linfócitos T, causando proliferação e subsequente liberação de citocinas tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas estimulam os linfócitos a se transformarem em plasmócitos produtores de IgE. As células B expressam receptores de baixa afinidade de IgE (FcεRII); a interação da IgE com estes receptores influencia a diferenciação de linfócitos B e a regulação da síntese de IgE. A IgE produzida por plasmócitos liga-se à superfície de mastócitos e basófilos, que induz a degranulação e liberação de mediadores inflamatórios na presença de diferenciação de células B e regulação da síntese de IgE. Embora na asma grave os fenótipos tendam a ser não alérgicos, a produção local de IgE pode ser mais relevante do que os níveis circulantes deste anticorpo⁽³¹⁾.

A IgE regula positivamente os receptores FcεRI (alta afinidade) e FcεRII (CD23, baixa afinidade) da membrana celular

de mastócitos e de vários outros grupos celulares⁽¹¹⁰⁾. Os mastócitos são células muito sensíveis a ativação pelo receptor de alta afinidade FcεRI; apenas 10.000 receptores ocupados seriam necessários para a completa ativação e a liberação de histamina, mediadores neoformados e citocinas Th2 envolvidas no processo alérgico da asma^(80,110).

O FcεRII ligado à célula está elevado em indivíduos atópicos e durante as exacerbações da doença. Ao contrário, na remissão da doença alérgica e na presença de IFNγ, observa-se a queda dos níveis de CD23⁽²⁵⁾. Em monócitos e macrófagos o CD23 influencia atividades tais como citotoxicidade contra parasitos, libera mediadores e regula a síntese de IgE⁽²⁶⁾.

Omalizumab é um anticorpo monoclonal que tem sido usado para o tratamento de asma alérgica. Em estudos clínicos, omalizumab tem sido efetivo no controle das exacerbações de asma e rinite^(27,104). A terapia anti-IgE com omalizumab reduz os níveis séricos de IgE livre, a expressão de receptores de alta afinidade (FcεRI), e causa profunda redução da eosinofilia tecidual e de linfócitos T e B na submucosa das vias aéreas. Adicionalmente, o omalizumab reduz a expressão de FcεRI na superfície de DCs o que pode determinar a redução da apresentação de alérgenos, redução da proliferação e ativação de linfócitos Th2. Omalizumab liga-se à IgE e evita a ligação IgE-receptor de mastócitos e basófilos, reduzindo desta forma a liberação de mediadores das diversas fases da doença alérgica⁽²⁷⁾. As ações anti-inflamatórias do omalizumab em diferentes locais de inflamação alérgica e os benefícios clínicos alcançados com esta terapia sugerem e enfatizam o complexo e fundamental papel da IgE na regulação das respostas alérgicas.

O fenótipo dominante na asma grave tende a ser de pacientes não atópicos, com níveis menores do que aqueles observados em indivíduos com asma leve. Todavia, no estudo ENFUMOSA cerca de 60% dos pacientes com asma grave exibiram positividade cutânea a aeroalérgenos comuns⁽⁹⁶⁾. O uso de anti-IgE como terapia adicional para pacientes com asma grave alérgica tem se mostrado eficaz em diversos estudos, havendo sete estudos clínicos fase 3 realizados até o momento. Cerca de dois terços dos doentes mostram resposta favorável à droga, reduzindo as exacerbações e os sintomas, melhorando a função pulmonar e a qualidade de vida específica da asma. Ainda não se entende porque uma parcela significativa de pacientes com asma alérgica grave não responde ao anti-IgE, e não se identificaram ainda marcadores que distingam os respondedores dos não respondedores⁽⁴¹⁾.

Tem sido observado que os níveis séricos de IgE e o número de receptores aumentam após interrupção da terapia anti-IgE, o que sugere que o tratamento necessita ser continuado para persistência da eficácia, todavia não foram identificados estudos que determinem a duração destes efeitos após descontinuação da terapia com omalizumab.

Asma Grave e Mecanismos Inflamatórios Padrão Não Th2

Apesar da asma leve ser caracterizada por inflamação mediada por células Th2, com recrutamento de mastócitos,

eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos e maior liberação de mediadores, somente o processo Th2 não é suficiente para explicar a persistência da asma grave em adultos⁽¹⁸⁾. Randolph et al. observaram que estímulos do tipo Th1 potencializam a resposta imune Th2 e que portanto os dois padrões de resposta são necessários e concomitantes na inflamação na asma⁽⁸⁶⁾. Uma rede complexa de processos inflamatórios persistentes e regulatórios certamente contribui para perpetuação da doença e ainda não foi claramente elucidada.

Em um subgrupo de pacientes asmáticos com maior necessidade de medicação e exacerbações graves e frequentes, há evidências do envolvimento de mecanismos imunes inatos e Th1 na patogenia da asma. Por exemplo, Ying et al. demonstraram recentemente que a expressão da linfopoetina estromal tímica (TSLP- uma proteína considerada indutora de padrão inflamatório tipo Th2) e quimiocinas Th1 e Th2 estavam aumentadas de maneira similar em casos de asma grave e DPOC⁽¹¹²⁾.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) é uma importante citocina da resposta imune inata que tem papel fundamental na resposta de defesa imediata contra patógenos invasores antes da ativação da imunidade adaptativa. O possível envolvimento do TNF-α na patogenia da asma foi sugerido inicialmente por seus níveis elevados de RNA mensageiro (RNAm) e proteína nas vias aéreas de asmáticos^(10,113), e posteriormente pela inalação de TNF-α recombinante que provoca hiperreatividade brônquica e neutrofilia nas vias aéreas de indivíduos normais⁽⁹⁸⁾ e de asmáticos leves⁽⁹⁷⁾. Além disso, o TNF-α tem atividade quiomiotática para neutrófilos e eosinófilos, está envolvido na ativação de linfócitos T e aumenta a expressão de moléculas de adesão no epitélio⁽⁹⁹⁾. A relevância do TNF-α na asma grave foi ressaltada por estudos que mostraram um aumento de TNF-α no lavado broncoalveolar e em biópsia de asmáticos graves comparado a asmáticos leves⁽⁴⁵⁾ e maior expressão do precursor de TNF-α, da enzima conversora de TNF-α e do receptor de TNF-α 1 em monócitos periféricos de asmáticos graves⁽⁸⁾. Em ambos estudos, após tratamento com etanercept, uma proteína de fusão entre o receptor de TNF-α e o fragmento Fc de IgG1, houve melhora de VEF₁ e da hiperreatividade brônquica. Em outro estudo recente com maior número de asmáticos graves tratados com etanercept houve melhora no escore do Questionário de Controle de Asma (ACQ, *Asthma Control Questionnaire*), porém sem efeito na responsividade brônquica e função pulmonar⁽⁷⁴⁾. Os resultados destes estudos sugerem que o TNF-α desempenha papel na patogenia da asma grave, porém a terapia anti-TNF parece ser efetiva somente em um subgrupo de asmáticos refratários.

A persistência da inflamação na asma grave também pode ser resultante de deficiências em processos homeostáticos que promovem a resolução da inflamação. As lipoxinas são mediadores lipídicos que podem regular a inflamação e respostas funcionais pulmonares⁽⁹¹⁾, e uma redução da capacidade biossintética destes mediadores com potencial

antiinflamatório foi associada à asma grave^(65,83,101). Vachier et al.⁽¹⁰¹⁾, encontraram níveis diminuídos de lipoxina A4 (LXA4) no escarro induzido de asmáticos graves, e os níveis elevados desta lipoxina em asmáticos leves se correlacionaram com níveis de IL-8, sugerindo que a inflamação pode ser contrabalanceada por aumento na síntese de lipoxina antiinflamatória. Levy et al.⁽⁶⁵⁾, demonstraram redução da LXA4 em sangue periférico de asmáticos graves em contraste com aumento de leucotrienos inflamatórios (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4), e níveis maiores de LXA4 correlacionaram-se com melhor VEF₁, mostrando que um desequilíbrio entre mediadores lipídicos pró e antiinflamatórios podem favorecer a obstrução brônquica característica da asma grave. Resultados adicionais do Grupo de Pesquisa da Asma Grave (SARP, *Severe Asthma Research Group*) do *National Heart, Lung and Blood Institute* dos Estados Unidos complementam os achados anteriores, mostrando a diminuição da LXA4 no lavado broncoalveolar dos asmáticos graves, além de redução na expressão gênica e protéica do receptor de LXA4 em granulócitos periféricos destes pacientes⁽⁸³⁾. O desenvolvimento de análogos da LXA4 permitirá a investigação do impacto destes mediadores na asma grave⁽⁶⁶⁾.

Outro fator que pode limitar as respostas antiinflamatórias no pulmão de asmáticos graves é uma reduzida produção de prostaglandina E2 (PGE2) por macrófagos alveolares associada a uma defeituosa fagocitose de células apoptóticas⁽⁴⁶⁾.

Um aumento no metabolismo oxidativo foi descrito na asma⁽⁴⁰⁾, porém os mecanismos responsáveis por esta alteração e o quanto isto pode contribuir para a asma grave ainda não estão claros. De forma semelhante à redução de mediadores antiinflamatórios, concentrações plasmáticas reduzidas de antioxidantes naturais foram observadas na asma grave, o que pode ser decorrente de um defeito na produção ou de um maior consumo a longo prazo que reduz seus níveis⁽⁷³⁾. Redução na atividade da enzima antioxidante superóxido desmutase foi encontrada no plasma de pacientes asmáticos em relação a controles, sem especificidade para asma grave, e a perda da atividade da enzima correlacionou-se com a limitação ao fluxo aéreo⁽²⁰⁾.

A arginina é um importante substrato das enzimas óxido nítrico sintases, as quais produzem óxido nítrico, e alterações no seu metabolismo foram estudadas em relação à asma grave. Não se encontrou associação entre a biodisponibilidade de arginina e parâmetros inflamatórios na asma, porém a biodisponibilidade da arginina foi associada à obstrução brônquica na asma grave⁽⁶⁰⁾.

Remodelamento na Asma Grave

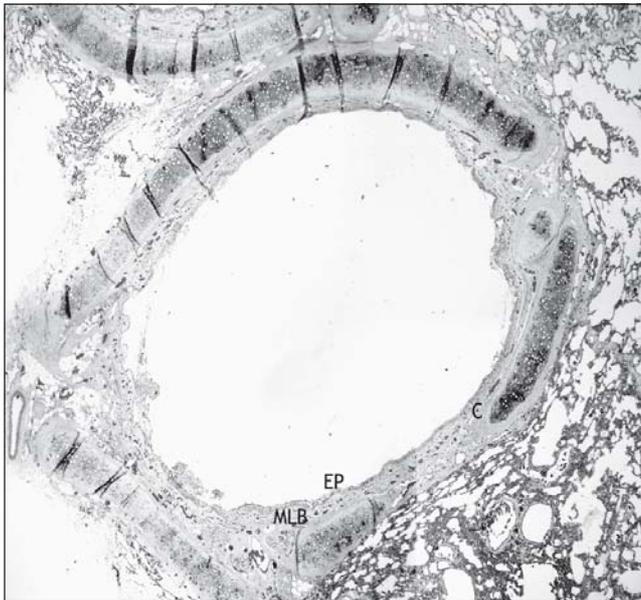
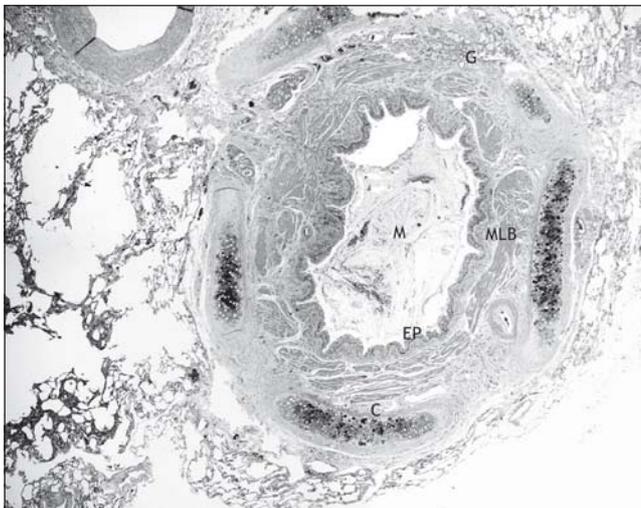
Alterações estruturais em vias aéreas de asmáticos foram já há algumas décadas caracterizadas no tecido pulmonar obtido através da autópsia de pacientes que foram a óbito por asma^(13,15,28,43,15). As principais alterações das vias aéreas da asma são: alterações do epitélio brônquico na forma de descamação e metaplasia mucosa, espessamento da camada subepitelial brônquica (camada reticular), aumento do número de pequenos vasos na mucosa, aumento da massa do músculo

liso brônquico (MLB) e das glândulas submucosas (Figuras 1 a 3). Ao conjunto destas alterações dá-se o nome de remodelamento brônquico, referindo-se às mudanças na composição, quantidade e organização dos componentes celulares e moleculares da parede das vias aéreas na asma⁽³⁾.

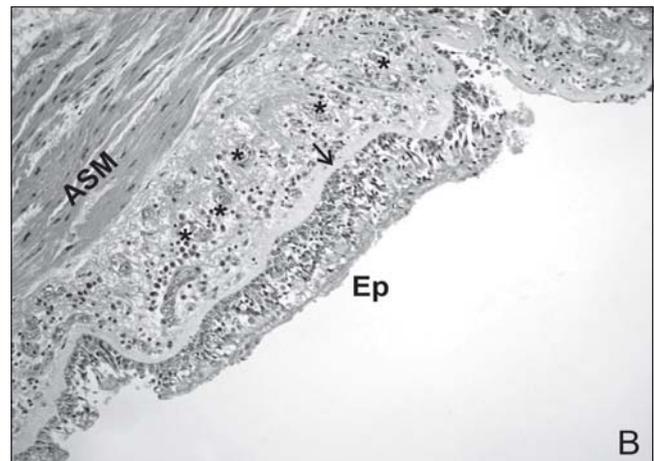
Alguns estudos identificaram relação entre gravidade da asma e alterações estruturais específicas nas vias aéreas. Estudos de autópsia mostram que os diversos componentes das vias aéreas encontram-se mais espessos em pacientes que morreram de asma do que aqueles que tinham asma leve.⁽¹⁵⁾ Benayoun et al., identificaram que a espessura do músculo liso e o acúmulo de fibroblastos nas vias aéreas proximais são aspectos discriminantes em pacientes com asma grave persistente, em comparação com pacientes com DPOC e asma leve⁽⁶⁾. O impacto do remodelamento na obstrução das vias aéreas e na hiperresponsividade ainda é bastante controverso. Ainda não sabemos se todos os componentes do remodelamento são prejudiciais, ou se representariam uma resposta protetora à broncoconstrição excessiva e, portanto, quais compartimentos do remodelamento devem ser alvos terapêuticos. Ainda não existem biomarcadores, características clínicas ou genótipos que indiquem quais fenótipos inflamatórios poderiam estar associados à maior chance de desenvolvimento de alterações estruturais das vias aéreas e progressão da asma⁽⁶⁸⁾. Em um estudo de pacientes do grupo SARP, os autores estimaram a espessura e área das vias aéreas por tomografia computadorizada. Os pacientes com asma grave apresentavam maior área e espessura da via aérea em relação aos pacientes asmáticos controles e com asma leve, sendo que estes parâmetros se correlacionavam inversamente com o grau de obstrução e com a espessura do epitélio brônquico e positivamente com a resposta ao broncodilatador⁽²⁾.

Um parâmetro bastante avaliado na asma grave é espessura da membrana basal epitelial (camada reticular), pois esta estrutura encontra-se acessível em biópsias brônquicas. Estudos são constantes em mostrar espessamento da camada subepitelial brônquica na asma por deposição de elementos da matriz extracelular (MEC), e este parâmetro parece correlacionar-se bem com a espessura da parede da via aérea na asma⁽⁵²⁾. O espessamento da membrana basal na asma grave já se encontra presente em crianças com asma grave, e tem a mesma magnitude que em adultos com asma também grave⁽⁸¹⁾. A relação desta alteração estrutural com a duração da doença, aspectos funcionais e resposta ao tratamento ainda é bastante controversa, e por enquanto, a membrana basal não deve ser considerada um alvo terapêutico na asma.

O epitélio brônquico é um importante imunomodulador na asma⁽⁴¹⁾. Em pacientes com asma grave, o epitélio apresenta importantes alterações estruturais como uma maior espessura e maior índice proliferativo⁽¹⁹⁾. O epitélio brônquico em pacientes com asma grave parece secretar mediadores inflamatórios como IL-8 e apresentar maior expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR). Estes fatores poderiam contribuir em manter a neutrofilia tecidual observada em alguns pacientes com asma grave⁽³⁹⁾.

Figura 1. Via aérea central histologicamente normal.**Figura 2.** Via aérea central de um paciente que faleceu de asma. Observe na figura 2 o acúmulo de muco na luz da via aérea, com sinais de broncoconstrição (dobraduras epiteliais) e a camada muito espessa de músculo liso brônquico. H&E. M= muco, MLB= músculo liso brônquico, C=cartilagem, G= glândulas submucosas, EP=epitélio. A e B=25x (Adaptado de Mauad et al. ref. 68).

Aumento do número ou da área de vasos na mucosa brônquica (angiogênese) é uma das alterações estruturais presentes na asma. Em pacientes com asma grave existe um aumento da área de vasos e da expressão da molécula de adesão vascular intercelular (ICAM)-1, no entanto estas alterações não se correlacionam com nenhuma das provas funcionais destes pacientes⁽¹⁰³⁾. Já em crianças com asma grave, o número de células endoteliais na mucosa brônquica se correlaciona com o grau de obstrução⁽¹⁰⁰⁾. O tratamento

Figura 3. 3A. Mucosa brônquica normal. O epitélio está intacto e composto por células colunares ciliadas. 3B. Mucosa brônquica de um paciente que foi a óbito por asma. Existe descamação epitelial e espessamento da camada subepitelial (seta). A mucosa está espessada por inflamação e numerosos capilares (asterisco). A camada de músculo liso está espessada. Ep= epitélio, ASM= músculo liso brônquico, SMG= glândula submucosa. H&E=200x. (Adaptado de Mauad et al., ref 68)

prolongado com corticosteróides parece ser necessário para reverter as alterações vasculares na asma⁽⁶⁸⁾.

A composição dos diferentes elementos da MEC tem sido extensamente estudada na asma. Uma dada alteração da composição de elementos da MEC nos diversos compartimentos das vias aéreas pode ter repercussões não só mecânicas, mas também afetar significativamente a biologia dos elementos celulares residentes. Os principais componentes da MEC no pulmão são os colágenos, as fibras elásticas e os proteoglicanos. O estudo de Chakir et al. mostra que pacientes com asma grave e moderada têm maior deposição de colágeno tipo I e III, além de maior expressão de fator de transformador tecidual (TGF- β), do que pacientes com asma leve e controles, e que esta deposição não é revertida com corticosteróides⁽¹⁷⁾. Na asma fatal, existe aumento da densidade de fibras elásticas acompanhada de elastólise na

mucosa de grandes vias aéreas, o que pode causar alterações importantes nos mecanismos de recolhimento elástico intrínseco da via aérea⁽²⁴⁾. Já o aumento de versicam detectado por Matsushita et al.⁽⁷⁰⁾ nesta mesma localização da via aérea pode representar um contraponto à broncoconstrição excessiva do músculo liso brônquico (MLB). O entendimento das conseqüências mecânicas conseqüentes ao remodelamento é ainda bastante incipiente, e estudos relacionando estrutura e função nas vias aéreas são extremamente importantes para melhor entendermos o remodelamento brônquico. De relevância, o uso de corticóides parece não alterar ou até aumentar a deposição de determinados elementos da MEC na mucosa brônquica de asmáticos⁽⁶⁸⁾.

O MLB é considerado um dos principais efetores na asma⁽¹⁾. As alterações do MLB parecem estar presentes precocemente em crianças com asma grave, as quais mostram aumento da massa de MLB e da proteína quinase de cadeia leve da miosina (MLCK)⁽¹⁰⁰⁾. James et al. analisaram um grande número de fragmentos de tecido pulmonar proveniente de autópsias de pacientes com asma de diferentes gravidades, mostrando que a espessura do MLB está correlacionada à gravidade da doença, mas não à idade do paciente ou à duração da asma, apoiando a hipótese que alterações estruturais ocorram precocemente na asma⁽⁵⁰⁾. Ainda não se conhece bem o efeito das terapias anti-asmáticas sobre a estrutura do MLB. Este tema tem sido alvo de extensas investigações, uma vez que o MLB é um potencial alvo terapêutico na asma grave⁽⁶⁸⁾. O uso da termoplastia brônquica em pacientes com asma grave, embora associado a uma piora dos sintomas em curto prazo, parece levar a desfechos favoráveis no controle da asma a longo-prazo⁽⁷⁹⁾.

Remodelamento do Pulmão Distal na Asma

A participação do pulmão distal na fisiopatologia da asma tem sido extensamente estudada nos últimos anos. Considera-se pulmão distal as vias aéreas menores que 2 mm de diâmetro associadas ao parênquima pulmonar periférico^(57,94). Além de importante sítio inflamatório, vias aéreas distais constituem importante local de obstrução ao fluxo de ar contribuindo significativamente para as alterações funcionais na asma, principalmente nos pacientes mais graves^(47,107,111). Acredita-se que o espessamento da parede das vias aéreas membranosas de asmáticos à custa de inflamação possa aumentar em até dez vezes a resistência dessas vias aéreas⁽⁵³⁾.

Estudos com tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) têm mostrado constrição de vias aéreas distais em asmáticos submetidos a broncoprovocação com metacolina^(34,56). O espessamento da parede das pequenas vias aéreas parece contribuir de maneira significativa para a broncoconstrição observada nos pacientes asmáticos e, conseqüentemente, para as reduções no fluxo de ar⁽⁷⁸⁾. Estudos radiológicos mostraram que mesmo em asmáticos assintomáticos com algum grau de obstrução ao fluxo aéreo pode ser observado o espessamento da parede das pequenas

vias aéreas⁽³⁶⁾.

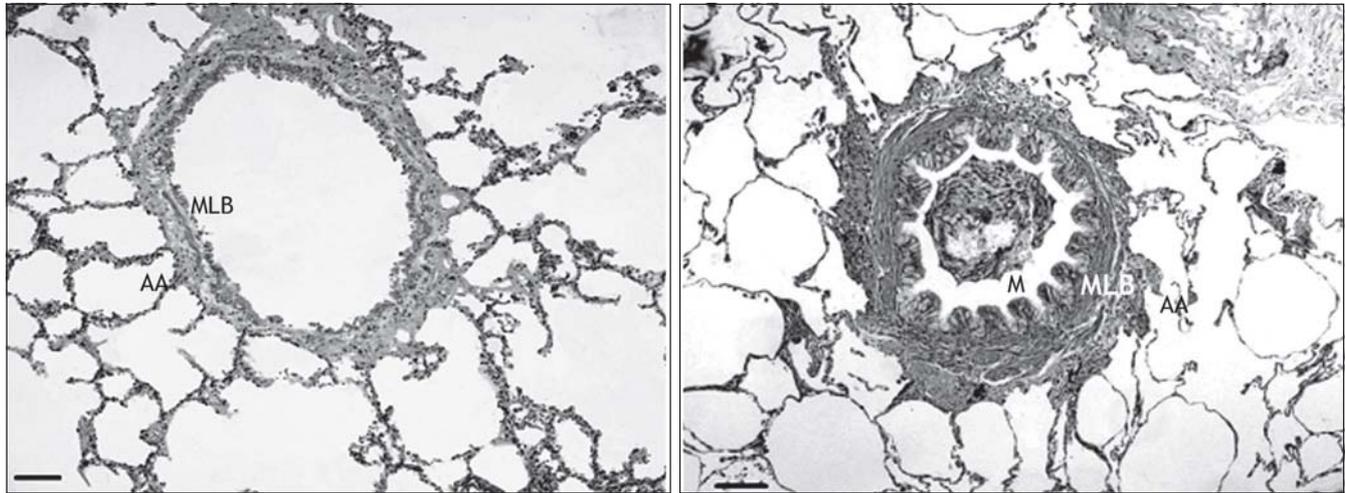
Poucos estudos até hoje enfocaram as alterações estruturais das vias aéreas distais na asma, provavelmente pela dificuldade de acesso a esses segmentos da árvore respiratória. Ressecções brônquicas de indivíduos com asma leve mostraram que as vias aéreas pequenas apresentam aumento da área total da parede e de sua área interna (compreendida entre a região subepitelial e a borda interna do músculo liso) e externa (compreendida entre a borda externa do músculo liso e a adventícia) quando comparado a controles⁽³⁸⁾.

Os estudos em asma fatal permitem o acesso às regiões mais periféricas do tecido pulmonar e a avaliação de alterações inflamatórias e estruturais de pequenas vias aéreas e parênquima pulmonar. Carroll et al.⁽¹⁵⁾ documentaram espessamento da parede de pequenas vias aéreas em casos de asma fatal e não fatal. A hipertrofia de fibras musculares é também descrita em vias aéreas periféricas⁽⁸⁶⁾.

As alterações da MEC representam uma característica importante do processo de remodelamento das vias aéreas distais podendo contribuir para a instalação de um quadro de obstrução irreversível observado em parte dos pacientes asmáticos. Demonstramos que na asma fatal há perda de acoplamentos alveolares nas vias aéreas distais (Figura 4), associado a diminuição do conteúdo de fibras elásticas na camada externa das vias aéreas e nos septos alveolares peribronquiolares⁽⁶⁹⁾. A integridade das fibras elásticas é essencial para a manutenção do recolhimento elástico pulmonar e para a preservação da interdependência entre vias aéreas e parênquima alveolar. A perda da interdependência entre esses dois compartimentos pulmonares, com diminuição das forças de tensão mecânica exercidas na parede da via aérea pelo parênquima circunjacente, pode resultar em um estado final pró-constritivo da via aérea e representar um mecanismo importante de desencadeamento de crises asmáticas graves. Além disso, alterações na região de interdependência poderiam explicar parcialmente algumas das alterações funcionais observadas em asmáticos, como a perda do efeito broncodilatador da inspiração profunda em episódios de broncoconstrição espontânea⁽¹²⁾, fechamento precoce das vias aéreas durante a expiração⁽⁴⁷⁾, e, em menor grau, a perda de recolhimento elástico pulmonar⁽³³⁾.

Além das alterações de fibras elásticas, o estudo da MEC do pulmão distal na asma fatal mostrou alterações de proteoglicanos caracterizadas pelo aumento de versicam na camada interna, contribuindo para o espessamento da pequena via aérea, e diminuição de decorina e lumican na camada externa quando comparado a controles⁽²⁴⁾. Decorina e lumican são proteoglicanos de baixo peso molecular envolvidos no controle de organização de fibrilas de colágeno, diminuindo a taxa de fibrilogênese^(84,85,92). Decorina apresenta também um importante papel regulatório do TGF- β , sendo considerada um proteoglicano anti-fibrótico. A diminuição de decorina e lumican em pequenas vias aéreas na asma pode estar associada a uma possível deposição de colágeno nessa região, podendo

Figura 4. Cortes histológicas de pequenas vias aéreas comparando controle (esquerda) com asma fatal (direita). Observa-se na pequena via aérea espessamento da parede por plug mucoso na luz, hipertrofia muscular e infiltrado inflamatório envolvendo toda espessura da parede. Note preservação dos acoplamentos alveolares no pulmão controle e ruptura de septos alveolares na asma fatal. AA= acoplamentos alveolares, M= muco, MLB= músculo liso brônquico. Barra de escala = 100 μ m (Adaptado de Mauad *et al.*, ref 69).



contribuir para a perda de interdependência entre vias aéreas e parênquima alveolar.

Bergeron *et al.*⁽⁷⁾, analisaram biópsias endobrônquicas e transbrônquicas de pacientes com asma leve e moderada, não observando diferenças entre vias aéreas centrais e periféricas quando se analisou o conteúdo de colágeno III, actina de músculo liso e número de células TGF- β positivas na submucosa. Os autores concluíram que o remodelamento está presente na mesma intensidade em vias aéreas centrais e distais nesse grupo de pacientes.

A constatação da presença de inflamação e remodelamento em vias aéreas distais na asma indica a necessidade de tratamento dessa região específica do território pulmonar. Sabe-se que os corticóides inalatórios usualmente utilizados para o tratamento da asma depositam-se preferencialmente ao longo das vias aéreas centrais⁽²⁹⁾. A modificação de propelentes para se produzir aerossóis mais finos de propulsão mais lenta tem sido testada na prática clínica. As preparações com clorofluorcarbono (CFC) utilizadas nos sistemas tradicionais produzem partículas grandes que dificilmente atingem a periferia pulmonar. Sistemas que utilizam hidrofluoralcano (HFA) como propelente produzem partículas menores com melhor alcance da periferia pulmonar^(62,102). Estudos que comparam tratamentos utilizando propelentes CFC ou HFA têm demonstrado controle mais eficaz da doença e melhora da função pulmonar com propelente HFA^(71,102). Porém, poucos estudos até o momento investigaram a eficácia do tratamento com propelente HFA na reversão das alterações estruturais das vias aéreas distais. A TCAR mostra diminuição da retenção de ar em indivíduos asmáticos tratados com beclometasona-HFA quando comparado a beclometasona-CFC, indicando uma melhora da função de vias aéreas distais com propelente HFA⁽³⁵⁾. Foi demonstrado que pacientes com

asma leve a moderada tratados com flunisolida-HFA por seis semanas apresentaram diminuição da expressão de actina de músculo liso em vias aéreas periféricas analisadas a partir de biópsias transbrônquicas, o que se correlacionou com a melhora da função das pequenas vias aéreas. Entretanto, o tratamento com flunisolida-HFA não alterou a deposição de colágeno nas vias aéreas distais desses pacientes⁽⁷⁾. Novos estudos são necessários para que se compreenda a extensão do remodelamento do pulmão distal na asma e a possibilidade de se modular as alterações estruturais com tratamento adequado.

Conclusão

Apesar de representar a minoria dos pacientes asmáticos, o impacto da asma grave no sistema de saúde público e na qualidade de vida do paciente é enorme. A asma grave é bastante heterogênea do ponto de vista clínico, funcional e até patológico, existindo variações quanto à idade de apresentação, os graus de obstrução, na hiperresponsividade, nas exacerbações, e na presença de inflamação e remodelamento da via aérea. A asma grave é, portanto, considerada um conjunto de diferentes entidades.

Sabemos que o paradigma clássico da inflamação Th2 não é suficiente nos casos de asma grave, com várias evidências do envolvimento do sistema imune inato e de citocinas Th1. As vias aéreas destes pacientes encontram-se espessadas, porém ainda não conhecemos a repercussão funcional destas alterações, se e como devemos tratar estas alterações estruturais. Aparentemente, as alterações estruturais parecem iniciar-se precocemente na asma grave, sendo talvez definidoras da doença e não consequência da inflamação apenas.

Melhor entender a fisiopatogenia da asma grave é essencial para avançar no conhecimento clínico e manejo desta entidade.

Referências

1. An SS, Bai TR, Bates JH, et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J* 29: 834-860, 2007.
2. Aysola RS, Hoffman EA, Gierada D, et al. Airway remodeling measured by multidetector computed tomography is increased in severe asthma and correlates with pathology. *Chest*. 2008 Jul 18. Epub ahead of print.
3. Bai TR, Knight DA. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci (Lond)*108: 463-477, 2005.
4. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8: 183-192, 2008.
5. Belleguic C, Corbel M, Germain N, Lena H, Boichot E, Delaval PH, Lagente V. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 32: 217-223, 2002.
6. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1360-13688, 2003.
7. Bergeron C, Hauber HP, Gotfried M, et al. Evidence of remodeling in peripheral airways of patients with mild to moderate asthma: effect of hydrofluoroalkane-flunisolide. *J Allergy Clin Immunol* 116: 983-989, 2005.
8. Berry MA, Hargadon B, Shelley M, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor α in refractory asthma. *N Engl J Med* 354:697-708, 2006.
9. Bousquet J, Dahl R, Khaltayev N. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *Eur Respir J* 29: 233-239, 2007.
10. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, et al. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways: evidence for the mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 471-480, 1994.
11. Breckveldt-Postma NS, Erkens JA, Aalbers R, van de Ven MJ, Lammers JW, Herings RM. Extent of uncontrolled disease and associated medical costs in severe asthma – a PHARMO study. *Curr Med Res Opin* 24: 975-983, 2008.
12. Brusasco V. External modulation of airway narrowing. *Monaldi Arch Chest Dis* 56: 322-324, 2001.
13. Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J* 9: 709-715, 1996.
14. Carroll N, Cooke C, James A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J* 10: 292-300, 1997.
15. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*147: 405-410, 1993.
16. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 57: 677-682, 2002.
17. Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. 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* 111: 1293-1298, 2003.
18. Chanez P, Wenzel SE, Anderson GP, et al. Severe asthma in adults: what are the important questions? *J Allergy Clin Immunol* 119:1337-1348, 2007.
19. Cohen L, EX, Tarsi J, Ramkumar T, et al. Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 138-45, 2007.
20. Comhair SAA, Ricci KS, Arroliga M, et al. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172:306-13, 2005.
21. Corne JM, Holgate ST. Mechanisms of virus induced exacerbations of asthma. *Thorax* 52: 380-9, 1997.
22. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154: 4719-4725, 1995.
23. D'Amato G, Salzillo A, Piccolo A, D'Amato M, Liccardi G. A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy for severe allergic (IgE-mediated) asthma. *Ther Clin Risk Manag* 3:613-619, 2007.
24. de Medeiros Matsushita M, da Silva LF, et al. Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol* 207:102-110, 2005.
25. Delespesse G, Sarfati M, Peleman R. Influence of recombinant IL-4, IFN- α , and IFN- γ on the production of human IgE-binding factor (soluble CD23). *J Immunol* 142: 134-38, 1989.
26. Delespesse G, Sarfati M. An update on human CD23 (Fc epsilon RII). Fc epsilon RII and IgE-BFs (soluble CD23) (FCeRII) and IgE-BFs (soluble CD23) play an essential role in the regulation of human IgE synthesis. *Clin Exp Allergy* 21: 153-61, 1990.
27. Djukanovic R, Wilson SJ, Kraft M, et al. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 583-93, 2004.
28. Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* 24: 176-179, 1969.
29. Esmailpour N, Högger P, Rabe KF, Heitmann U, Nakashima M, Rohdewald P. Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum in vivo. *Eur Respir J* 10: 1496-1499, 1997.
30. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 95:843-52, 1995.
31. Fahy JV. Anti-IgE: Lessons learned from effects on airway inflammation and asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1230-1232, 2006.
32. Fujisawa T, Kephart GM, Gray BH, Gleich GJ. The neutrophil and chronic allergic inflammation. *Immunochemical localization of neutrophil elastase. Am Rev Respir Dis* 141: 689-97, 1990.
33. Gelb AF, Licuanan J, Shinar CM, Zamel N. Unsuspected loss of lung elastic recoil in chronic persistent asthma. *Chest* 121: 715-721, 2002.
34. Goldin JG, McNitt-Gray MF, Sorenson SM, et al. Airway hyperreactivity: assessment with helical thin-section CT. *Radiology* 208:321-329, 1998.
35. Goldin JG, Tashkin DP, Kleerup EC, et al. Comparative effects of hydrofluoroalkane and chlorofluorocarbon beclomethasone dipropionate inhalation on small airways: assessment with functional helical thin-section computed tomography. *J Allergy Clin Immunol* 104: S258-S267, 1999.
36. Gono H, Fujimoto K, Kawakami S, Kubo K. Evaluation of airway wall thickness and air trapping by HRCT in asymptomatic asthma. *Eur Respir J* 22: 965-971, 2003.
37. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* 57: 875-879, 2002.
38. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 100: 44-51, 1997.
39. Hamilton LM, Torres-Lozano C, Puddicombe SM, Richter A, Kimber I, Dearman RJ, Vrugt B, Aalbers R, Holgate ST, Djukanovic R, Wilson SJ, Davies DE. The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma. *Clin Exp Allergy* 33: 233- 240, 2003.
40. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 409-20, 2001.
41. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* 57:1-10, 2008.

42. Holgate ST. The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history. *Lancet* 350: 5-9, 1997.
43. Hossain S. Quantitative measurement of bronchial muscle in men with asthma. *Am Rev Respir Dis* 107: 99-109, 1973.
44. Howarth PH. Small airways and asthma. An important therapeutic target? *Am J Respir Crit Care Med* 157: S173, 1998.
45. Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Buckley M, McConnell W, Beckett P, Al Ali M, Chauhan A, Wilson SJ, Reynolds A, Davies DE, Holgate ST. Tumour necrosis factor (TNF- α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid-dependent asthma. *Thorax* 73: 1012-8, 2005.
46. Huynh ML, Malcolm KC, Kotaru C, Tilstra JA, Westcott JY, Fadok VA, et al. Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 972-9, 2005.
47. in't Veen JC, Beekman AJ, Bel EH, Sterk PJ. Recurrent exacerbations in severe asthma are associated with enhanced airway closure during stable episodes *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1902-1906, 2000.
48. Ito K, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 392-396, 2002.
49. Ito K, Herbert C, Siegle JS, Vuppusetty C, Hansbro N, Thomas PS, Foster PS, Barnes PJ, Kumar RK. Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, May 12 [Epub ahead of print], 2008.
50. James A, Bai, T, Mauad T, Abramson, M, Dolhnikoff M, K. McKay K, Maxwell P, Elliot JG, Green FH. Effects of age, smoking, clinical severity and duration of asthma on airway smooth muscle area. *Thorax*, em revisão 2008.
51. James AL, Elliot JG, Abramson MJ, Walters EH. Time to death, airway wall inflammation and remodeling in fatal asthma. *Eur Respir J* 26: 429-34, 2005.
52. James AL, Maxwell PS, Pearce-Pinto G, Elliot JG, Carroll NG. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1590-5, 2002.
53. James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis* 139: 242-246, 1989.
54. Jensen SP, Lynch DA, Brown KK, Wenzel SE, Newell JD. High-resolution CT features of severe asthma and bronchiolitis obliterans. *Clin Radiol* 57: 1078-1085, 2002.
55. Kam JC, Szefer SJ, Surs W, Sher ER, Leung DY. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol* 151 :3460-3466, 1993.
56. King GG, Muller NL, Paré PD. Evaluation of airways in obstructive pulmonary disease using high-resolution computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 159:992-1004, 1999.
57. Kraft M. The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J* 14:1403-17, 1999.
58. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, Tonnel AB. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 394-402, 1998.
59. Lane SJ, Adcock IM, Richards D, Hawrylowicz C, Barnes PJ, Lee TH. Corticosteroid-resistant bronchial asthma is associated with increased c-fos expression in monocytes and T lymphocytes. *J Clin Invest* 102: 2156-2164, 1998.
60. Lara A, Khatri SB, Wang Z, Comhair SAA, Xu W, Dweik RA, Bodine M, Levison BS, Hammel J, Bleecker E, Busse W, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Curran-Everett D, Gaston B, Israel E, Jarjour N, Moore W, Erzurum SC. Alterations of the arginine metabolome in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 17 Jul 2008 [Epub ahead of print].
61. Leach C. Targeting inhaled steroids. *Int J Clin Pract Suppl* 96: 23-27, 1998.
62. Leach CL, Davidson PJ, Boudreau RJ. Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *Eur Respir J* 12: 1346-1353, 1998.
63. Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, Tillie I, Hartmann D, Wallaert B, Tonnel AB, Lafuma C. Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1298-1307, 1999.
64. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szefer SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP, Klemm DJ. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* 186:1567-1574, 1997.
65. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 824-30, 2005.
66. Levy BD, De Sanctis GT, Devchand PR, Kim E, Ackerman K, Schmidt BA, Szczeklik W, Drazen JM, Serhan CN. Multi-prolonged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A4. *Nat Med* 8: 1018-1023, 2002.
67. Magalhães Simões S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Ferezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 35: 602-611, 2005.
68. Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 120: 997-1009, 2007.
69. 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 Critical Care Med* 170:857-62, 2004.
70. 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* 160: 968-975, 1999.
71. Micheletto C, Guerriero M, Tognella S, Dal Negro RW. Effects of HFA- and CFC-beclomethasone dipropionate on the bronchial response to methacholine (MCh) in mild asthma. *Respir Med* 99:850-855, 2005.
72. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 113: 101- 108, 2004.
73. Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 26: 257-64, 2005.
74. Morjaria JB, Chauhan AJ, Babu KS, et al. The role of a soluble TNF α receptor fusion protein (etanercept) in corticosteroid refractory asthma: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *Thorax* 63: 584-91, 2008.
75. Nadel JA, Takeyama K. Mechanisms of hypersecretion in acute asthma, proposed cause of death, and novel therapy. *Pediatr Pulmonol Suppl* 18:54-5, 1999.
76. O'Sullivan SM. Asthma death, CD8+ T Cells, and viruses. *Proc Am Thorac Soc* 2: 162-65, 2005.
77. O'Sullivan S, Cormican L, Faul JL, Ichinohe S, Johnston SL, Burke CM, Poulter LW. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 15;164: 560-564, 2001.
78. Okazawa M, Muller N, Mcnamara AE, Child S, Verburgt L, Paré PD. Human airway narrowing measured using high resolution computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1557-1562, 1996.
79. Pavord ID, Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Corris PA, Niven RM, Chung KF, Laviolette M; RISA Trial Study Group. Safety and efficacy of bronchial thermoplasty in symptomatic, severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 1185-1191, 2007.
80. Pawankar R. Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor mast cell network. *Cur Opin Allergy Clin Immunol* 1: 3-6, 2001.

81. Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 78-82, 2003.
82. Peters SP, Ferguson G, Deniz Y, Reisner C. Uncontrolled asthma: a review of the prevalence, disease burden and options for treatment. *Respir Med* 100: 1139-1151, 2006.
83. Planagumà A, Kazani S, Marigowda G, Haworth O, Mariani TJ, Israel E, Mariani TJ, Israel E, Bleecker ER, Curran-Everett D, Erzurum SC, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Gaston B, Jarjour NN, Busse WW, Wenzel SE, Levy BD. Airway lipoxin A4 generation and lipoxin A4 receptor expression are decreased in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 178:574- 582, 2008.
84. Pogány G, Hernandez DJ, Vogel KG. The in vitro interaction of proteoglycans with type I collagen is modulated by phosphate. *Arch Biochem Biophys* 313: 102-11, 1994.
85. Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res* 56: 635-648, 1993.
86. Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJL, Chaplin DD. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 104: 1021-1029, 1999.
87. Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 143: 138-143, 1991.
88. Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30: 22- 27, 2000.
89. Santos LA, Oliveira MA, Faresin SM, Santoro IL, Fernandes AL. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Braz J Med Biol Res* 40: 943-948, 2007.
90. Schuster A, Ueki I, Nadel JA. Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200,355. *Am J Physiol* 262: L86-91, 1992.
91. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: Novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25: 101-137, 2007.
92. Sini P, Denti A, Tira ME, Balduini C. Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen. *Glycoconj J* 14: 871-874, 1997.
93. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis* 148: 713-719, 1993.
94. Sutherland ER, Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89: 119-124, 2002.
95. Synek M, Beasley R, Frew AJ, Goulding D, Holloway L, Lampe FC, Roche WR, Holgate ST. Cellular infiltration of the airways in asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 224-230, 1996.
96. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 22: 470-477, 2003.
97. Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax* 57: 774-8, 2002.
98. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Med Crit Care Med* 152: 76-80, 1995.
99. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol* 79: 132-140, 2001.
100. Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy* 63: 533-541, 2008.
101. Vachier I, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol* 115: 55-60, 2005.
102. Vanden Burt JA, Busse WW, Martin RJ, Szeffler SJ, Donnell D. Efficacy and safety overview of a new inhaled corticosteroid, QVAR (hydrofluoroalkane-beclomethasone extrafine inhalation aerosol), in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 106: 1209-1226, 2000.
103. Vrugt B, Wilson S, Bron A, Holgate ST, Djukanovic R, Aalbers R. Bronchial angiogenesis in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J* 15: 1014-1021, 2000.
104. Walker S, Monteil M, Phelan K, Lasserson TJ, Walters EH. Anti-IgE for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Issue 3. Art. No.: CD003559. DOI: 10.1002/14651858.CD003559.pub3
105. Wenzel S. Physiologic and pathologic abnormalities in severe asthma. *Clin Chest Med* 27: 29-40, 2006.
106. Wenzel S. Severe asthma: epidemiology, pathophysiology and treatment. *Mt Sinai J Med* 70(3): 185- 190, 2003.
107. Wenzel SE, Busse WW; the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Severe asthma: lessons from the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 119: 14-21, 2007.
108. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1001-1008, 1999.
109. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 737-743, 1997.
110. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Chisei Ra C, Costa JJ, Galli SJ. IgE Enhances Fc receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 162: 5455-5465, 1999.
111. Yanai M, Sekizawa K, Ohru T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol* 72: 1016-1023, 1992.
112. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Fang C, Cousins D, Zhang G, Gu S, Gao Z, Shamji B, Edwards MJ, Lee TH, Corrigan CJ. Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 181: 2790-2798, 2008.
113. Ying S, Robinson DS, Varney V, Meng Q, Tscopoulos A, Moqbel R, Durham SR, Kay AB, Hamid Q. TNF alpha mRNA expression in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 21:745-750, 1991.