

**RUBENS FRAGA ALVES PINTO**

**Avaliação imunohistoquímica das células inflamatórias  
presentes na parede de artérias pulmonares periféricas  
de pacientes com doença vaso-oclusiva pulmonar  
secundária a defeitos cardíacos congênitos**

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

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Dra. Vera Demarchi Aiello

**SÃO PAULO**

**2004**

## Dedicatória

---

A meus pais, **Raimundo** (*in memorian*) e **Rutira**, pela orientação, dedicação, amor, incentivo e compreensão ilimitados desde as primeiras palavras até o dia de hoje.

À **Liliane**, companheira que me incentivou em todos os momentos, exemplo de paciência, dedicação, sacrifício e que, com muito carinho e amor, soube me compreender, ajudar e estimular em todo o transcurso deste trabalho.

Aos meus filhos **Renan** e **Rafael**, estímulos incessantes, que, sorrindo, davam-me forças para prosseguir, e à sua maneira, tentaram compreender minhas freqüentes ausências.

## **Agradecimento Especial**

---

**À Dra. Vera Aiello**

Como em tese se pode definir um orientador? Acho que por uma sorte do destino, consegui vivenciar nesses quatro anos um exemplo concreto de uma definição abstrata. Poderia começar citando o respeito que impõe pela simplicidade e competência, consciente de sua capacidade, abrindo mão da vaidade e arrogância. A paciência e a sensibilidade de perceber as limitações e dificuldades das pessoas que a cercam e conseguir extrair delas, de maneira sutil, o máximo que podem oferecer. A confiança e segurança que emana, sendo calma e ponderada em todas as situações e opiniões, não deixando que a emoção norteie suas atitudes. A ética profissional e científica, fazendo com prazer a pesquisa e desta, um exercício da ciência. O interesse e sinceridade que demonstra ao tentar ajudar a todos os que a procuram. Uma pessoa de aparência frágil, mas onde quer que se apresente, agiganta-se e com muita firmeza e competência demonstra, a par de nossas dificuldades, toda a capacidade do profissional brasileiro e, mais particularmente, do Instituto do Coração, enchendo de orgulho a todos nós.

Durante quatro anos, semana a semana, não houve espaço para desânimo, por maiores que fossem as dificuldades. Seja pessoalmente, com palavras e atitudes de incentivo, ou por um “e-mail”, os obstáculos se

dissipavam. Particularmente, sinto que aprendi a andar no caminho da pesquisa, tendo o privilégio de ter como exemplo o seu, raro nos dias de hoje. Tentar segui-lo, aproximando-me dele, será a partir de agora o meu ideal científico.

Dra.Vera Demarchi Aiello, meu muito obrigado, não só pelo trabalho de orientação como por seu exemplo de vida. Palavras não conseguem exprimir todo o meu agradecimento, mas tenha a certeza, de que lhe devoto uma grande admiração, amizade e profunda gratidão.

## Agradecimentos

---

A Deus, que permitiu que eu atingisse com êxito mais essa etapa de crescimento pessoal e científico.

À **Dra Léa Maria Macruz Ferreira Demarchi**, pelo carinho da acolhida, incentivo e ajuda, muito importantes no desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuchi**, pelo apoio, incentivo e discussão dos resultados.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Patológica do Incor, em especial **Dr. Paulo Sampaio Gutierrez, Dra. Jussara Bianchi Castelli, Dr. Mauro Canzian, Dr. Luis Alberto Bevenuti**, pela disponibilidade e atenção que sempre me dedicaram.

À Fapesp, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento do trabalho (processo temático 99/00322-9).

Ao CNPq, Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa, o que permitiu minha maior dedicação ao curso (processo nº. 1401772002-7).

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor, particularmente **Solange Aparecida Consorti** e **Antônio José Vicente Guedes**, pelo atendimento e precisão no preparo das lâminas de biópsia.

Às biólogas **Nádia Vieira Sambiase**, **Márcia Martins Reis**, **Sueli Palomino** e especialmente **Júlia Maria Lucia La Chioma Silvestre**, pelo trabalho de preparo imunohistoquímico das biópsias.

Ao **Prof. Dr. Antônio Augusto Barbosa Lopes**, pelas sugestões ao trabalho.

À **Dra. Maria Angélica Binotto**, pelas sugestões ao trabalho.

Ao **Prof. Dr. Edécio Cunha Neto**, pela disponibilidade para sugestões ao trabalho.

À **Prof. Dra. Irma Seixas Duarte**, pela disponibilidade para discutir alguns aspectos do trabalho.

Aos funcionários **Gisele Silva Campos** e **Francisco Dênis Batista Veiga**, pela presteza e atenção nos serviços de secretaria.

Ao funcionário **Gerson Lilá Ramos**, pelo suporte de informática e também pela obtenção da documentação fotográfica.

Aos técnicos de necropsia, em especial ao Márcio Rodrigues Martins, pela presteza na procura de blocos no arquivo morto.

À **Jacqueline Sant 'Eufemia David**, pela primorosa assessoria na análise estatística.

Às funcionárias da Pós-Graduação da Cardiologia, **Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros Guiss de Oliveira**, pela orientação protocolar em todas as etapas do curso.

Aos colegas do Hospital do Coração da Associação Sanatório Sírio, em especial à **Dra. Ieda Jatene e Dr. Eriberto Tabosa do Egito**, por disponibilizar os dados clínicos dos pacientes aos seus cuidados.

Ao **Dr. César Augusto Conforti** e todos os colegas do Serviço de Cirurgia Cardíaca da Santa Casa de Misericórdia de Santos, pela compreensão e incentivo.

Ao **Dr. Carlos Vinetou Ayres**, pelo apoio, incentivo e coleguismo imprescindíveis em todo o transcurso deste trabalho.

Aos meus irmãos pelo incentivo e apoio.

À minha sogra **Marlene Corrêa**, por ter sido o anjo da guarda dos meus filhos, quando eu não podia estar presente.

A todos os não citados, que direta ou indiretamente, de alguma forma, colaboraram no transcurso deste trabalho.



# Sumário

---

**Lista de Tabelas**

**Lista de Figuras**

**Lista de Quadros**

**Símbolos e Abreviaturas**

**Resumo**

**Summary**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
1.1. Hipertensão Arterial Pulmonar	3
1.2. Hipertensão Pulmonar nas Cardiopatias Congênitas	4
1.3. Patogenia das lesões vasculares na hipertensão pulmonar	8
1.4. Resposta Inflamatória	12
1.5. Inflamação e Doenças Vasculares	15
1.6. Infecções Pulmonares em Cardiopatias Congênitas	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1. Substrato da hipótese	18
2.2. Hipótese	18
2.3. Objetivos propriamente ditos	19
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1. Análise Histopatológica	22
3.2. Reações de Imunohistoquímica	23
3.3. Medidas Morfométricas	27
3.4. Quantificação de Células Inflamatórias na Adventícia e na Média	28
3.5. Grupo Controle	30

3.6.	Diagnóstico Principal, Idade e Sexo de Pacientes e Controles	31
3.7.	Metodologia Estatística	33
3.7.1	Análise Descritiva e Diferencial	33
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
4.1	Caracterização da Amostra	38
4.2	Célula Inflamatória Prevalente nos Grupos HP, Controle e Subgrupos G1, GN1 e Comparações de Densidades Entre os Grupos	43
4.2.1	Células inflamatórias prevalentes dentro de cada grupo	43
4.2.1.1.	Grupos HP e Controle considerando marcador MAC387 para macrófagos	43
4.2.1.2.	Grupos HP e Controle, considerando marcador CD68 para macrófagos	50
4.2.1.3.	Grupo HP Quanto ao Grau Histológico (Subgrupos G1 e GN1)	55
4.2.1.4.	Célula prevalente em cada subgrupo de HP, considerando marcador MAC387 para macrófagos	56
4.2.1.5.	Célula prevalente em cada subgrupo de HP, considerando marcador CD68 para macrófagos	61
4.2.2.	Comparações de Densidades Entre Grupos	66
4.3.	Correlação Entre as Densidades dos Diferentes Tipos de Células Inflamatórias nos Grupos HP, Controle e Subgrupos G1, GN1 e Controle	81
4.3.1	Considerando o MAC387 como marcador de macrófagos	81
4.3.2	Considerando o CD68 como marcador de macrófagos	85
4.4.	Células Inflamatórias na Parede (túnicas média e íntima)	88
4.4.1	Comparações dentro de cada grupo	88
4.4.1.1.	Considerando MAC387 como marcador de macrófagos	88
4.4.1.2.	Considerando CD68 como marcador de macrófagos	89
4.4.2	Comparações entre grupos	90

4.5	Análise de células na presença de lesões plexiformes	94
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>97</b>
5.1	Introdução	97
5.2	Considerações Gerais Sobre a Amostra	98
5.3	Inflamação e Doenças Vasculares – discussão de resultados	99
5.3.1	Macrófagos	102
5.3.1.1	Marcadores imunohistoquímicos de macrófagos e sua especificidade	102
5.3.1.2	Quantificação de macrófagos adventiciais e na parede	104
5.3.2	Linfócitos B	106
5.3.3	Linfócitos T	107
5.3.4	Granulócitos	107
5.4	Relação das Células Inflamatórias e Grau de Lesão Vasclusiva	108
5.5	Células Inflamatórias no Interior de Lesões Plexiformes	109
5.6	Correlações entre densidades de células inflamatórias	109
5.7	Perfil Imunológico nas Cardiopatias Congênitas	110
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>114</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>117</b>

## Lista de Tabelas

---

	<b>PG</b>
<b>Tabela 1:</b> Pacientes: Dados clínicos, hemodinâmicos e histológicos (grau de HP)	32
<b>Tabela 2:</b> Grupo Controle: Sexo, idade, “causa mortis” nas autópsias e diagnóstico clínico nas biópsias	33
<b>Tabela 3:</b> Distribuição das variáveis grupo e grau histológico	38
<b>Tabela 4:</b> Estatísticas descritivas das variáveis idade e pressão da artéria pulmonar	40
<b>Tabela 5:</b> Distribuição de freqüências da variável sexo em relação aos grupos em estudo	40
<b>Tabela 6:</b> Distribuição de freqüências da variável sexo em relação ao grau histológico do grupo HP	41
<b>Tabela 7:</b> Estatísticas descritivas das variáveis relacionadas aos marcadores de células inflamatórias nos grupos HP e controle	42
<b>Tabela 8:</b> Estatísticas descritivas da média de densidades de células inflamatórias (todos os marcadores) por área da adventícia nos grupos controle e HP (células/mm <sup>2</sup> )	44
<b>Tabela 9:</b> Estatísticas descritivas da média de densidades de células inflamatórias na adventícia no grupo HP quanto ao grau histológico (células/mm <sup>2</sup> )	55
<b>Tabela 10:</b> Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no grupo controle (n=11), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	82
<b>Tabela 11:</b> Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no grupo HP (n=26), considerando MAC387	83

como marcador de macrófago

<b>Tabela 12:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no grupo HP - subgrupo G1 (n=10), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	83
<b>Tabela 13:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no grupo HP - subgrupo GN1 (n=16), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	84
<b>Tabela 14:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre diferentes tipos de células inflamatórias e a idade (em meses) em cada um dos grupos controle, HP, G1 e GN1	85
<b>Tabela 15:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades macrófagos marcados pelo CD68 e os diferentes tipos de células inflamatórias no grupo controle (n=11)	86
<b>Tabela 16:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades macrófagos marcados pelo CD68 e os diferentes tipos de células inflamatórias no grupo HP (n=26)	86
<b>Tabela 17.:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no subgrupo G1 (n=10)	87
<b>Tabela 18:</b>	Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no subgrupo GN1 (n=26)	87
<b>Tabela 19:</b>	Distribuição das freqüências do índice geral (soma de índices) em relação ao grupo, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	93
<b>Tabela 20:</b>	Distribuição de freqüências do índice geral em relação ao grupo, considerando CD68 como marcador de macrófagos	94
<b>Tabela 21:</b>	Análise dos casos com presença de artérias com lesões plexiformes em relação ao número de células inflamatórias marcadas	95

## Lista de Figuras

---

	<b>PG</b>
<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias de arteríolas de bronquíolos terminal (A), respiratório (B) e de ducto alveolar (C), em casos de hipertensão pulmonar. Cortes submetidos à marcação pelo anticorpo MAC387 e anticoloração pela técnica de Miller. Objetiva = 40 vezes	28
<b>Figura 2.</b> Tela de analisador de imagens mostrando o cálculo da área da adventícia	29
<b>Figura 3.</b> Ilustração de um gráfico tipo Box Plot	34
<b>Figura 4.</b> Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo controle (células /mm <sup>2</sup> ), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	45
<b>Figura 5.</b> Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da área da adventícia no grupo HP (células/mm <sup>2</sup> ), considerando o somatório CD20+CD3 - MAC387 como marcador de macrófagos	46
<b>Figura 6.</b> Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da área da adventícia no grupo HP (células/mm <sup>2</sup> ), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	48
<b>Figura 7.</b> Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP (células/mm <sup>2</sup> ), considerando o somatório CD20 + CD3 - MAC como marcador de macrófagos	49
<b>Figura 8.</b> Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando CD68 como marcador de macrófagos	51
<b>Figura 9.</b> Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando o somatório CD20 + CD3 - CD68 como	52

marcador de macrófagos

- Figura 10.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP (células/mm<sup>2</sup>), considerando CD68 como marcador de macrófagos 53
- Figura 11.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área de adventícia no grupo HP (células/mm<sup>2</sup>), considerando o somatório CD20 + CD3 - CD68 como marcador de macrófagos 54
- Figura 12.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP – subgrupo G1 (células/mm<sup>2</sup>), considerando MAC387 como marcador de macrófagos 57
- Figura 13.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP - subgrupo G1 (células/mm<sup>2</sup>), considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos 58
- Figura 14.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP - subgrupo GN1 (células/mm<sup>2</sup>), considerando MAC387 como marcador de macrófagos 59
- Figura 15.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP - subgrupo GN1 (células/mm<sup>2</sup>), considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos 60
- Figura 16.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área de adventícia no grupo HP – subgrupo G1 (células/mm<sup>2</sup>) - considerando o marcador CD68 para macrófagos 61
- Figura 17.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP (células/mm<sup>2</sup>) no grupo HP - subgrupo G1, considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos 62
- Figura 18.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias 64

por área e adventícia no grupo HP - subgrupo GN1(células/mm<sup>2</sup>), considerando CD68 como marcador para macrófagos

- Figura 19.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP - subgrupo GN1 (celulas/mm<sup>2</sup>), considerando o somatório CD20+CD3 – CD68 como marcador de macrófagos 65
- Figura 20.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle(células/mm<sup>2</sup>), considerando MAC387 como marcador de macrófagos 67
- Figura 21.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e controle (células/mm<sup>2</sup>), considerando MAC387 como marcador de macrófagos 68
- Figura 22.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos grupos HP e Controle (células/mm<sup>2</sup>), considerando CD68 como marcador de macrófagos 68
- Figura 23.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e controle (células/mm<sup>2</sup>), considerando CD68 como marcador de macrófagos 69
- Figura 24.** Distribuição da variável densidade de granulócitos por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle (células/mm<sup>2</sup>), considerando MAC387 como marcador de macrófagos 70
- Figura 25.** Distribuição da variável densidade de granulócitos por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e grupo controle (células/mm<sup>2</sup>). 70
- Figura 26.** Distribuição da variável densidade de linfócitos B por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle (células/mm<sup>2</sup>) 71



<b>Figura 27.</b>	Distribuição da variável densidade de linfócitos B por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e grupo controle (células/mm <sup>2</sup> )	72
<b>Figura 28.</b>	Distribuição da variável densidade de linfócitos T por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle. (células/mm <sup>2</sup> )	73
<b>Figura 29.</b>	Distribuição da variável densidade de linfócitos T por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e grupo controle (células/mm <sup>2</sup> )	74
<b>Figura 30.</b>	Distribuição da variável densidade por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando o somatório CD20+CD3	75
<b>Figura 31.</b>	Distribuição da variável densidade por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando o somatório CD20+CD3	76
<b>Figura 32.</b>	Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	77
<b>Figura 33.</b>	Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e grupo controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando MAC387 como marcador de macrófagos	78
<b>Figura 34.</b>	Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando CD68 como marcador de macrófagos	79
<b>Figura 35.</b>	Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e controle (células/mm <sup>2</sup> ), considerando CD68 como marcador de macrófagos	80
<b>Figura 36.</b>	Distribuição dos índices das células inflamatórias (ICI) quanto aos grupos HP e controle	92

## Lista de Quadros

---

	<b>PG</b>
<b>Quadro 1.</b> Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo controle, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	44
<b>Quadro 2. :</b> Resultados do teste t-pareado para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo controle, considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos	46
<b>Quadro 3.</b> Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	47
<b>Quadro 4.</b> Resultados do teste t-pareado para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP, considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos	49
<b>Quadro 5.</b> Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo controle, considerando CD68 como marcador de macrófagos	50
<b>Quadro 6.</b> Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo controle, considerando o somatório CD20+CD3 –	52

CD68 como marcador de macrófagos

<b>Quadro 7.</b>	Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades no grupo controle, considerando CD68 como marcador de macrófagos	53
<b>Quadro 8.</b>	Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades no grupo HP, considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos	54
<b>Quadro 9.</b>	Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo G1, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	56
<b>Quadro 10.</b>	Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo G1, considerando o somatório CD20+CD3 - MAC387 como marcador de macrófagos	58
<b>Quadro 11.</b>	Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo GN1, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	59
<b>Quadro 12.</b>	Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo GN1, considerando o somatório CD20+CD3 - MAC387 como marcador de macrófagos	60

<b>Quadro 13.</b>	Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo G1, considerando CD68 como marcador de macrófagos	61
<b>Quadro 14.</b>	Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo G1 – considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos	62
<b>Quadro 15.</b>	Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo GN1, considerando CD68 como de macrófagos	63
<b>Quadro 16.</b>	Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo GN1, considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos	64
<b>Quadro 17.</b>	Resultados das comparações dos grupos HP x Controle (testes t) e dos subgrupos G1 x GN1 x Controle (análise de variância) quanto à densidade de cada tipo de célula inflamatória em estudo.	66
<b>Quadro 18.</b>	Resultados do teste não paramétrico de Friedman para comparar a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no grupo controle, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	88
<b>Quadro 19.</b>	Resultados do teste não paramétrico de Friedman para comparar a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no grupo HP, considerando MAC387 como marcador de macrófagos	89

<b>Quadro 20.</b>	Resultado do teste não paramétrico de Friedman para a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no grupo controle, considerando CD68 como marcador de macrófagos	89
<b>Quadro 21.</b>	Resultado do teste não paramétrico de Friedman para a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no grupo HP, considerando CD68 como marcador de macrófagos	90
<b>Quadro 22.</b>	Resultados das comparações dos grupos HP x Controle (testes de Mann-Whitney) e dos grupos GI x GNI x Controle (Kruskal-Wallis) quanto ao índice de cada tipo de célula inflamatória em estudo.	91

## Símbolos e Abreviaturas

---

---

### Símbolos

=	Igual
<	Menor que
%	Porcentagem

---

---

### Abreviaturas

$\mu\text{m}$	Micrômetros
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
CC	Coeficiente de correlação
CD	“Cluster of differentiation”
$\text{cm}^2$	Centímetros quadrados
Cols	Colaboradores
G1	Subgrupo hum (conforme classificação de Heath-Edwards)
GN1	Subgrupo não hum (conforme classificação de Heath-Edwards)
HC – FMUSP	Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
HP	Hipertensão pulmonar
ICI	Índice de células infiltrantes

<b>IgA</b>	Imunoglobulina a
<b>IgG</b>	Imunoglobulina ge
<b>IgM</b>	Imunoglobulina eme
<b>IL</b>	Interleucina
<b>InCor</b>	Instituto do Coração
<b>Ld</b>	Limitada
<b>M</b>	Molar
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetros quadrados
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>PBS</b>	Tampão salino filtrado
<b>TNF</b>	Fator necrotizante tumoral

## Resumo

---

PINTO, R.F.A. **Avaliação imunohistoquímica das células inflamatórias presentes na parede de artérias pulmonares periféricas de pacientes com doença vaso-oclusiva pulmonar secundária a defeitos cardíacos congênitos.** São Paulo, 2004. 156 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Em doenças vasculares oclusivas, como na aterosclerose, o envolvimento do processo inflamatório na fisiopatologia das lesões encontra-se bem estabelecido. Também na hipertensão pulmonar (HP) primária, células e mediadores inflamatórios estão reconhecidamente implicados na patogênese das lesões, mas ainda não se investigou a sua participação na HP secundária. Com esse objetivo, procurou-se identificar e quantificar células inflamatórias na parede de artérias pulmonares periféricas de pacientes com cardiopatias congênitas que provocam hiperfluxo pulmonar, relacionando esse achado com o tipo de lesão histológica encontrada na biópsia: apenas hipertrofia da túnica média ou presença de lesões proliferativas da íntima. Analisaram-se 26 biópsias pulmonares colhidas com o propósito de determinação de diagnóstico, e 11 fragmentos de pulmão de indivíduos sem doença cardiovascular como grupo controle. Realizaram-se reações imunohistoquímicas com marcação para linfócitos B (CD20), linfócitos T (CD3), macrófagos jovens (MAC387), macrófagos residentes (CD68) e granulócitos (CD15). Foram quantificadas as células positivas por área da adventícia de artérias  $>50\mu\text{m}$  de diâmetro, e calculada a densidade média de células para cada caso e marcador celular. Determinou-se também em cada caso um índice de células inflamatórias atravessando a parede do vaso. Não houve diferença significativa na soma das densidades de células inflamatórias na adventícia entre os grupos HP e controle, quando se utilizou MAC387 como marcador de macrófagos, embora com valores médios menores no grupo HP. Observou-se, por outro lado, soma de densidades



significativamente maior no grupo controle, utilizando CD68 como marcador de macrófagos. Dentro do grupo HP, houve prevalência de células marcadas com MAC387 ( $p=0,003$ ) e nos controles das marcadas com CD3 ( $p=0,001$ ). Quando comparados os grupos entre si, houve menor número de linfócitos T nos pacientes hipertensos. Ainda dentro do grupo HP, nos pacientes sem lesões oclusivas da íntima, não se verificou diferença significativa nas quantidades das diferentes células analisadas. Já no grupo com lesões proliferativas, observou-se prevalência de macrófagos jovens com MAC387 ( $p=0,005$ ), mas não de macrófagos residentes (CD68). Quanto ao índice de células atravessando a parede, não houve diferença quanto ao tipo celular no grupo controle, enquanto nos indivíduos hipertensos os maiores índices foram os de células marcadas pelo MAC387, CD68 e CD15. Encontrou-se ainda uma correlação negativa entre quantidade de linfócitos T adventíciais e idade no grupo de pacientes cardiopatas. Embora a densidade total de células na adventícia tenha sido menor no grupo HP em relação aos controles, a predominância de macrófagos jovens no primeiro é compatível com reação inflamatória mais aguda na parede das artérias. Este fato está de acordo com o número aumentado de infecções respiratórias verificadas em crianças com hiperfluxo pulmonar. Além disso, pode estar relacionado com a patogenia das lesões vasculares oclusivas nessa forma de hipertensão pulmonar, em vista das citocinas produzidas pelas células inflamatórias. O menor número de linfócitos T em adventícia de artérias pulmonares de pacientes com cardiopatias congênitas pode refletir uma alteração do sistema imune desses doentes.

## Summary

---

PINTO, R.F.A. **Immunohistochemical evaluation of inflammatory cells in the walls of peripheral pulmonary arteries from patients with pulmonary vasocclusive disease secondary to cardiac congenital defects.** São Paulo, 2004. 156 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

In vaso-occlusive diseases such as in arteriosclerosis, the involvement of inflammation in the physiopathology of the lesions is well established. It is known that in the primary form of pulmonary hypertension (PH), inflammatory cells and mediators are also involved in the pathogenesis of the disease, but their participation in secondary PH has not been searched for. Then, we identified and quantified inflammatory cells in the walls of peripheral pulmonary arteries from patients with congenital heart defects and left to right shunt, correlating the findings with the grade of histological lesion found in the biopsy: isolated medial hypertrophy or intimal proliferative lesions. We analyzed 26 lung biopsies from patients with increased pulmonary flow and 11 lung fragments from control subjects. B-lymphocytes (CD20), T-lymphocytes (CD3), recently recruited macrophages (MAC387), resident macrophages (CD68) and granulocytes (CD15) were quantified by area of the adventitia in arteries  $>50\mu\text{m}$ . An index of inflammatory cells infiltrating the medial and intimal layers was also determined. There was no difference in the sum of densities of inflammatory cells in the adventitia between HP and control groups when MAC387 was used as the macrophage marker, although with lower mean values in the PH group. On the other hand, a significantly greater sum of densities in the control group was observed when CD68 was the macrophage marker. There was a significant prevalence of MAC387-labeled cells in the PH group ( $p=0.003$ ) and of CD3-

- labeled cells in the controls ( $p=0.001$ ). Comparing densities of different cells types between groups, there was a smaller number of T-lymphocytes in the PH patients. Within the PH group, patients showing exclusively arterial medial hypertrophy did not exhibit any significant difference in the quantities of the distinct cells analyzed. In the group with proliferative lesions of the intima there was prevalence of recently recruited macrophages ( $p=0.005$ ), but not of resident macrophages labeled with CD68. Concerning the index of cells infiltrating the arterial wall, no difference between the various types of cells was detected in the control group. On the other hand, in the PH group the highest indexes were for the cells marked with MAC387, CD68 and CD15. There was also a negative correlation between the quantity of T-lymphocytes and age in patients with heart defects. Although the total density of adventitial cells did not differ between the control and PH groups, the predominance of recently recruited macrophages in the last one is compatible with ongoing acute inflammatory reaction in the arterial walls. This is in conformity with the recurrent respiratory infections in patients with increased pulmonary flow, and could be related to the pathogenesis of the vascular lesions, as a consequence of cytokines produced by the inflammatory cells. The smaller number of adventitial T-lymphocytes in patients with congenital shunts can reflect an impairment of their immune response.

***Introdução***

---

## 1. INTRODUÇÃO

Lesões oclusivas de artérias pulmonares periféricas ocorrem na evolução de pacientes portadores de defeitos congênitos do sistema cardiovascular que provocam hiperfluxo pulmonar. A gravidade e extensão dessas lesões são variáveis não apenas dependendo do tipo do defeito, mas também do tempo de evolução da doença e ainda de fatores individuais de resposta vascular.

Admite-se que o estímulo injuriante seja o fluxo pulmonar aumentado<sup>32,46</sup>, o qual, atuando sobre a parede arterial e especificamente sobre o endotélio, promove reações das células de todas as camadas do vaso. A manutenção do estímulo ao longo do tempo acaba por propiciar o aparecimento de lesões arteriais oclusivas. Esse processo é mediado por fatores de crescimento e por citocinas, oriundos não só das células endoteliais, mas também das próprias células musculares da parede arterial numa forma autócrina e parácrina de ação<sup>47</sup>.

Também foram descritas alterações na túnica adventícia de artérias pulmonares, tanto em pacientes com hipertensão pulmonar primária como na secundária a cardiopatias congênitas<sup>1</sup>. O aumento da área da

adventícia e da fibrose peri-vascular parece estar relacionado ao grau de hipertrofia da túnica média<sup>1</sup>. Isso mostra claramente que existe uma interação entre as várias camadas da parede do vaso no que se refere à resposta a um agente injuriante.

### **1.1. Hipertensão Arterial Pulmonar**

Define-se hipertensão pulmonar como a conseqüência hemodinâmica de um grupo de condições com múltiplas etiologias, levando a progressivas alterações vasculares, notadamente arteriais<sup>40</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde, um indivíduo é considerado hipertenso pulmonar quando se constata a sua pressão sistólica arterial pulmonar maior que 30mmHg, em repouso, ou maior que 35mmHg sob esforço, a resistência vascular pulmonar maior que 4 unidades Wood e o gradiente transpulmonar maior que 10 a 12 mmHg.

Descrevem-se várias formas:

- A) Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido - Originária da má adaptação vascular à vida extra-uterina, apresenta alta morbidade e mortalidade, sendo multifatorial e comumente associada a doenças hipoxêmicas pulmonares.
- B) Hipertensão pulmonar primária – Nessa forma não é reconhecido um agente causal. Observam-se fatores genéticos associados: incidência familiar está presente em

6% dos casos, e defeito do gene BMPR2 (bone morphogenetic protein receptor type 2) é descrito em 26% dos casos. Outras associações descritas são disfunção endotelial, intensa vasoconstrição, disfunção plaquetária e alterações do sistema imune.

- C) Hipertensão pulmonar secundária - Pode ser resultado de múltiplas e diversas etiologias, entre elas os defeitos cardíacos congênitos, a doença pulmonar obstrutiva crônica, hepatopatias, especialmente hipertensão portal, doenças autoimunes, doenças do coração esquerdo com aumento de pressão em veias e capilares pulmonares, doença tromboembólica pulmonar, doenças infecciosas como já descrito nas infecções por HIV <sup>41</sup>.

Se a etiologia for reconhecida e a causa possível de ser tratada (Ex.: defeitos cardíacos congênitos), as possibilidades de regressão da hipertensão são boas, mas em casos de hipertensão pulmonar primária, a evolução em geral é rapidamente progressiva e com prognóstico reservado<sup>13,17</sup>.

## **1.2. Hipertensão Pulmonar nas Cardiopatias Congênitas**

As cardiopatias congênitas ocorrem em aproximadamente 4,05 a 12,3/1000 dos nascimentos, sendo estes dados variáveis de acordo com a

fonte pesquisada. Aproximadamente 50% das crianças acometidas têm fluxo pulmonar aumentado, podendo evoluir com hipertensão pulmonar<sup>16</sup>. Entre as cardiopatias que podem levar à hipertensão pulmonar, podemos citar: as comunicações interatriais, interventriculares, defeitos do septo atrioventricular, canal arterial persistente, tronco arterial comum, transposição dos grandes vasos com comunicação interventricular.

Desde o relato de hipertensão pulmonar secundária a uma cardiopatia congênita por Eisenmenger, em 1897, muito se tem estudado sobre esta entidade. A base morfológica para este estado clínico, que passou a ser conhecido por “Síndrome de Eisenmenger”, foi descrita como uma “endarterite obliterante” nas pequenas artérias periféricas do pulmão. A partir daí o termo doença vascular obstrutiva ou doença vaso-oclusiva pulmonar foi aplicado ao se referir a este estado funcional<sup>34</sup>.

A evolução das técnicas da cirurgia cardíaca mostra que pacientes portadores de cardiopatias congênitas cursando com graus elevados de hipertensão pulmonar em níveis críticos são cada vez mais raros. Isto se deve principalmente, entre outros fatores, ao aprimoramento técnico, ao aperfeiçoamento da circulação extra-corpórea, ao melhor preparo pré e pós operatório, bem como ao advento de novas drogas no controle do estado hipertensivo, como por exemplo uso do óxido nítrico, aliados a uma tendência crescente de se realizarem cirurgias corretivas definitivas mais precocemente.

Nas décadas de 1960 e 1970, um paciente com comunicação interventricular de grande repercussão hemodinâmica era tratado



cl clinicamente por um período suficientemente prolongado, até que apresentasse ganho de peso ou melhorasse as condições clínicas para que o risco cirúrgico fosse minimizado. Hoje se sabe que esse retardo no tratamento permitia o aparecimento de alterações vasculares importantes. Por vezes, como alternativa, fazia-se uso de cirurgias paliativas, como a bandagem da artéria pulmonar que apresenta risco cirúrgico relativamente alto<sup>24</sup> e que não evita completamente as alterações nos vasos pulmonares<sup>16</sup>.

Em nosso meio, devido às condições sócio-econômicas da maioria da população, há dificuldade de diagnóstico precoce e encaminhamento aos centros especializados com condições de realização de cirurgia no período neonatal. Esse encaminhamento também sofre retardo nos pacientes refratários ao tratamento clínico ou que apresentem evolução desfavorável. Assim, encontra-se com mais freqüência que nos países desenvolvidos, pacientes portadores de cardiopatias com graus avançados de hipertensão pulmonar e ainda praticamente virgens de tratamento específico.

Quando existe dúvida na indicação cirúrgica, mesmo na presença de avaliação hemodinâmica, deve-se lançar mão da análise histológica das artérias pulmonares para a obtenção de dados que auxiliem na decisão. Além disso, a possibilidade de se realizar correção cirúrgica de defeitos cardíacos complexos e em pacientes cada vez mais jovens, aumentou a necessidade de detecção de alterações vasculares precoces no intuito de determinar prognóstico.

Uma classificação histológica de hipertensão pulmonar secundária a cardiopatias congênitas foi proposta no final da década de 1950, nos primórdios da cirurgia cardíaca, por Heath-Edwards<sup>18</sup>, tendo como objetivo descrever lesões e identificar os casos reversíveis. Baseava-se em aspectos qualitativos: Grau 1- hipertrofia da camada média de artérias e arteríolas; 2- hiperplasia da túnica média com proliferação da íntima; 3- hiperplasia e fibrose da íntima com estreitamento progressivo do lume vascular; 4- dilatação de vasos com formação sacular e lesões do tipo plexiforme; 5- dilatação de vasos pulmonares sob forma de lesões angiomatóides associadas à hemossiderose pulmonar; 6- necrose fibrinóide da túnica média arterial. Atualmente esta classificação é aplicada na avaliação de hipertensão em todos os tipos de cardiopatias, embora haja restrições ao seu uso pelo fato de ser um método muito simplista na identificação das lesões histológicas<sup>58</sup>. No final dos anos 1970, foi idealizado por Rabinovitch e cols<sup>43</sup> um sistema de classificação correlacionando padrões hemodinâmicos em cada fase da evolução da doença vascular com características quantitativas, compreendendo: A - muscularização distal precoce de arteríolas periféricas; B- hipertrofia da túnica média (B leve- porcentagem de espessura da média menor que 2 vezes o valor normal e B severo- porcentagem de espessura da média maior que 2 vezes o valor normal); C- Alterações de A e B, associadas a uma elevação na relação alvéolo/artéria acima do normal para a idade.

Ambas as classificações apresentam limitações. Todavia, a avaliação morfométrica de Rabinovitch e cols demonstrou algumas

vantagens em relação ao sistema qualitativo de Heath-Edwards. Destas, a principal baseia-se na tese de que o estudo morfométrico sistemático torna representativa uma biópsia de 1cm<sup>2</sup> de área, enquanto as lesões que permitem a classificação qualitativa são esparsas pelo parênquima, o que torna uma única amostra pulmonar de tamanho usual não suficiente para o diagnóstico. Outra limitação do exame qualitativo ficou evidente a partir do reconhecimento de que alterações qualitativamente pouco graves podem estar associadas à evolução desfavorável dos pacientes.

### **1.3. Patogenia das lesões vasculares na hipertensão pulmonar**

Os achados morfológicos e mecanismos patogénéticos atuantes na hipertensão pulmonar são, em linhas gerais, muito semelhantes aos encontrados em diferentes processos que acometem artérias, como, por exemplo, o fechamento fisiológico do canal arterial, a aterosclerose, o estado pós-angioplastia e a arteriopatia dos transplantes<sup>37</sup>. De todos eles, a aterosclerose é o mais comum e tem sido objeto de incontáveis estudos por representar a maior causa de morbi-mortalidade nos países desenvolvidos.

Admite-se que os estímulos injuriantes atuando sobre a parede arterial e especificamente sobre o endotélio vascular, promovam reações das células de todas as camadas do vaso, gerando o aparecimento de lesões proliferativas da túnica íntima, caracterizadas pela presença de células musculares lisas migradas a partir da média. As células que migram

sofrem um processo de desdiferenciação, passando a apresentar um fenótipo secretor e redução na quantidade de filamentos contráteis no sarcoplasma. A passagem de células para o espaço sub-endotelial (íntima) é possibilitada pela presença de soluções de continuidade na lâmina limitante elástica interna arterial, as quais aparecem por ação de enzimas elastolíticas. Recentes achados evidenciaram experimentalmente que a inibição de elastases<sup>55</sup> após lesão arterial inibe a inflamação da parede vascular e também a formação de lesões proliferativas da túnica íntima.

Em particular na aterosclerose, desde as primeiras descrições do processo, tem sido relatada inflamação na parede das artérias acometidas, tanto nas lesões propriamente ditas (dentro das placas) como na túnica adventícia, mas apenas mais recentemente o papel das células inflamatórias foi reconhecido como importante na patogênese das lesões<sup>25</sup>. Para corroborar, nos últimos anos vêm se acumulando fortes evidências da existência de agentes infecciosos na parede das artérias com placas de ateroma e de sua participação na gênese do processo<sup>14,20</sup>.

Na arteriopatia dos transplantes, os mecanismos responsáveis pela formação das lesões oclusivas da túnica íntima também incluem a inflamação da parede arterial, explicada como conseqüente ao processo de rejeição celular ao enxerto<sup>45</sup>. As citocinas envolvidas nesse processo ativam a produção de elementos da matriz extracelular pelas células musculares lisas, contribuindo para a expansão das lesões oclusivas.

Algumas vezes, na descrição de lesões arteriais da hipertensão pulmonar dita primária<sup>4</sup>, aparece a inflamação da parede vascular<sup>59</sup> sob

forma de arterite linfocitária ou neutrofílica, esta última em geral associada a apresentações do tipo necrose fibrinóide. Nas ocasiões em que a hipertensão pulmonar se associa a doenças do tipo auto-imune ou do tecido conectivo, como, por exemplo, na esclerodermia, a ocorrência de vasculite pulmonar não é infreqüente<sup>57</sup>.

Em artérias pulmonares centrais de pacientes com hipertensão pulmonar primária, documentou-se a co-localização de macrófagos em áreas onde havia grande expressão de síntese de proteínas da matriz extracelular, sugerindo-se que talvez as citocinas produzidas pelas células inflamatórias infiltrantes contribuam para a manutenção da resposta proliferativa na parede das artérias<sup>28</sup>.

Também em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida, foram relatadas lesões vasculares oclusivas em artérias pulmonares periféricas. Processos inflamatórios intersticiais pulmonares são achados freqüentes nesse grupo de pacientes, mostrando também relação, embora controversa, entre hipertensão pulmonar e inflamação<sup>41</sup>.

Diferentemente da fisiopatologia do desenvolvimento da hipertensão pulmonar em quadros como doenças do colágeno e infecções repetidas em pacientes portadores de HIV<sup>53</sup>, onde ocorre fibrose no parênquima, na hipertensão pulmonar secundária em pacientes cardiopatas com hiperfluxo, o parênquima encontra-se preservado, ficando as alterações restritas a alterações na parede vascular arterial.

Existem ainda evidências experimentais de que estímulos inflamatórios resultem em aumento da pressão arterial pulmonar<sup>19</sup>.

Observou-se que a inflamação pulmonar induzida por uma endotoxina promoveu não apenas aumento da reatividade vascular, como também algumas alterações morfológicas de hipertensão pulmonar<sup>31</sup>.

Outros fatores indicativos de um papel fundamental da inflamação em algumas formas de hipertensão pulmonar são:

- 1) Uma grande proporção de pacientes com hipertensão arterial primária apresenta evidências de autoimunidade e/ou inflamação ativa, inclusive com detecção de anticorpos circulantes, elevado nível sérico de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão pulmonar do fator de crescimento derivado de plaquetas<sup>3</sup>.
- 2) uso de antiinflamatórios hormonais, como corticosteróides e imunossupressores, tem melhorado de modo importante a condição de alguns pacientes com hipertensão pulmonar<sup>3</sup>.

Em lesões da hipertensão pulmonar secundária a cardiopatias congênitas, a inflamação na parede das artérias não é uma característica relevante, porém pode aparecer como achado isolado, não apenas em presença de necrose fibrinóide.

#### **1.4. Resposta Inflamatória**

A inflamação é uma resposta fisiológica a uma variedade de estímulos, tais como a lesão tissular e a infecção. Uma resposta inflamatória aguda envolve tanto efeitos localizados como efeitos sistêmicos. Já a inflamação crônica resulta da persistência do antígeno por uma infecção com determinados microorganismos resistentes ou a várias condições patológicas.

O endotélio vascular serve como um regulador do movimento das moléculas originárias do sangue e dos leucócitos nos tecidos. Para circularem, os linfócitos entram nos tecidos inflamados ou nos órgãos linfóides periféricos. As células inflamatórias devem aderir e passar entre as células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos, no processo de extravasamento.

Com o desenvolvimento da resposta inflamatória, diversas citocinas e outros mediadores atuam nos vasos sanguíneos locais, induzindo a um aumento da expressão das moléculas de adesão em células endoteliais. Geralmente são neutrófilos os primeiros a se ligarem ao endotélio inflamado e extravasar em direção aos tecidos. Os monócitos e os eosinófilos extravasam por meio de um processo similar.

Vários subgrupos de linfócitos extravasam nos sítios inflamatórios e nos órgãos linfóides secundários. A recirculação dos linfócitos é controlada para assegurar que as populações de células T e B apropriadas sejam recrutadas em diferentes tecidos. Como ocorre com os neutrófilos, o

extravasamento de linfócitos envolve interações entre diversas moléculas de adesão celular e compreende as etapas de contato e rolamento, ativação, aprisionamento, adesão e, finalmente, a migração endotelial. Várias citocinas desempenham um papel significativo no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda ou crônica como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 entre outras.

As citocinas são proteínas reguladoras de baixo peso molecular ou glicoproteínas secretadas pelas células sanguíneas brancas e várias outras células no organismo, em resposta a inúmeros estímulos. Constituem uma família de mediadores proteicos, tanto da imunidade inata como da específica, atuando ainda como mensageiros do sistema imune. Têm uma ação local (autócrina e parácrina) e em poucos casos uma ação endócrina. Estão envolvidas em cada estágio do desenvolvimento dos leucócitos. Linfócitos, por exemplo, diferenciam-se em T e B sob a influência das citocinas secretadas primariamente dentro do tecido linfóide. Após a maturação, a movimentação dos leucócitos pelo organismo é influenciada pela produção local de citocinas. Depois de ativados por antígenos, sua diferenciação e proliferação em células efetoras é controlada por citocinas liberadas por outras células, principalmente macrófagos e linfócitos T auxiliares.

As citocinas podem ser classificadas de acordo com as suas principais ações, em 3 grupos:

1. As que medeiam a imunidade inata, incluindo as citocinas antivirais (exemplos: interferon tipo1, interleucina-15,



interleucina-12), as citocinas pró-inflamatórias (exemplos: fator de necrose tumoral, interleucina-1, interleucina-6 e quimiocinas) e citocinas regulatórias (exemplo: interleucina-10). Os fagócitos mononucleares são a fonte celular predominante destas moléculas.

2. As derivadas dos linfócitos T estimulados por antígenos que medeiam e regulam a imunidade específica. São exemplos deste grupo as interleucinas 2, 4 e 5, o fator de crescimento transformador  $\beta$ , interferon- $\gamma$  e a linfotoxina.
3. As que são agrupadas como fatores estimuladores de colônias, consistindo nas derivadas das células do estroma da medula óssea e das células T, que estimulam o crescimento dos precursores da medula óssea, proporcionando, assim, uma fonte adicional de leucócitos inflamatórios.

Além da função de defesa contra patógenos e de regulação do sistema imune, as citocinas atuam como moléculas mensageiras intercelulares que provocam determinadas atividades biológicas após a ligação com um receptor em uma célula alvo responsivo. Os dois principais produtores são as células T auxiliaadoras e os macrófagos. As citocinas liberadas por estas células ativam uma rede completa de células que estão interagindo.

## 1.5. Inflamação e Doenças Vasculares

A aterosclerose é o exemplo do processo patológico mais comum que envolve expansão das células musculares lisas, freqüentemente acompanhadas de espessamento da média das artérias. Isto ocorre juntamente com a infiltração de células inflamatórias, como macrófagos, células T e outros leucócitos.

Há muito se tem investigado a relação da inflamação e infecções como fatores relacionados à aterosclerose e ao infarto agudo do miocárdio. Em 1988, Munro e Cotran<sup>35</sup> chamavam atenção para a diversidade de fatores envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose, entre eles, a inflamação. Estudos como os de Kovanen e cols<sup>25</sup> e Laine e cols<sup>27</sup>, demonstram a presença de células inflamatórias no processo aterosclerótico, quantificando o número de macrófagos e células T em sítios de erosão ou ruptura de placas em pacientes que sofreram infarto do miocárdio, como também caracterizaram a presença dessas células na adventícia de artérias relacionadas com a área infartada. Foi encontrada maior incidência de macrófagos que linfócitos T. Nos segmentos coronarianos com ruptura de placa, o número médio de linfócitos T na adventícia foi  $201 \pm 107/\text{mm}^2$ , e o de macrófagos  $474 \pm 273/\text{mm}^2$ . Nos segmentos sem ruptura, os valores das mesmas células foram  $126 \pm 71/\text{mm}^2$  e  $308 \pm 223/\text{mm}^2$ , respectivamente.

Ross chega a afirmar em suas pesquisas que o processo aterosclerótico, embora relacionado a dislipidemias, é essencialmente uma

doença inflamatória<sup>50</sup>. Outros estudos, como de Higuchi e cols, demonstram incisivamente a associação de *Chlamydia pneumoniae* e processo inflamatório, levando à ruptura da placa aterosclerótica e ao infarto do miocárdio<sup>20</sup>.

### **1.6. Infecções Pulmonares em Cardiopatias Congênitas**

É clássica a associação entre hiperfluxo pulmonar e maior incidência de infecções da árvore respiratória em crianças portadoras de defeitos cardíacos congênitos<sup>38</sup>. Pneumonias de repetição em geral comprometem o prognóstico dessas crianças, principalmente dentro do primeiro ano de vida. Com o desenvolvimento das lesões arteriais oclusivas ao longo da evolução desses pacientes, a exsudação pulmonar diminui, assim como a ocorrência de episódios infecciosos.

Não está esclarecido se os mediadores inflamatórios presentes no tecido pulmonar inflamado como um todo, poderiam também estar atuando sobre a parede das artérias e potencialmente agravar a evolução da doença vaso-oclusiva.

Estimulados pelas evidências da presença de processo inflamatório na fisiopatologia de algumas formas de hipertensão arterial pulmonar, questionou-se se as infecções pulmonares de repetição seriam um fator predisponente indutivo das lesões arteriais oclusivas em pacientes com hiperfluxo secundário a cardiopatias congênitas.

***Objetivos***

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Substrato da hipótese**

Inflamação na parede de artérias tem sido relacionada ao desenvolvimento de lesões oclusivas em diversos tipos de doenças vasculares.

### **2.2. Hipótese**

Pacientes com hipertensão pulmonar secundária a cardiopatias congênitas, teriam maior número de células inflamatórias na parede de artérias pulmonares periféricas do que indivíduos controles. Casos com lesões arteriais histologicamente mais avançadas, mostrariam diferenças quantitativas e/ou qualitativas, quando comparados aos com lesões menos acentuadas.

### **2.3. Objetivos propriamente ditos**

Em tecido pulmonar de pacientes com hipertensão pulmonar secundária a cardiopatias congênitas e no grupo controle:

1. Identificar e quantificar as células inflamatórias na parede de artérias pulmonares periféricas (túnicas íntima, média e adventícia)
2. Relacionar os achados acima com o tipo histológico de lesão vaso-oclusiva (hipertrofia isolada da média versus lesões proliferativas da íntima)
3. Verificar possível relação dos achados acima com a idade dos pacientes.

***Casuística e Métodos***

---

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

A partir dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (HC-FMUSP), foram selecionados casos consecutivos de biópsias pulmonares realizadas entre janeiro de 1998 e dezembro de 1999 (tecido emblocado em parafina), provenientes de pacientes portadores de hipertensão pulmonar secundária a cardiopatias congênitas causadoras de hiperfluxo pulmonar. O número dessas biópsias no período foi 40.

Além do período de realização do exame, foram considerados critérios de inclusão na amostra, após análise cuidadosa das lâminas arquivadas:

- a) ausência de artefatos de fixação e/ou coleta do tecido pulmonar;
- b) ausência de hemorragia parenquimatosa maciça;
- c) disponibilidade de blocos de parafina nos arquivos para preparação de novas lâminas;
- d) ausência de evidências de infecção pulmonar no tecido analisado.



O número final de casos selecionados foi 26.

As biópsias foram colhidas com o propósito de estabelecer diagnóstico para conduta ou então para correlação anatomoclínica. Todas foram realizadas obedecendo-se à técnica de coleta sob insuflação, descrita por Rabinovitch e cols<sup>44</sup>. Resumidamente, a via aérea dos pacientes foi inflada com pressão entre 22 e 34 cm de água. Duas pinças de Satinsky foram colocadas na porção medial superior do pulmão direito para isolar um fragmento medindo ao redor de 2cm no maior eixo. O tecido entre as pinças foi incisado, e a pinça distal com o fragmento de tecido insuflado foi submersa por 12 a 24 horas em solução de formalina tamponada a 10%. A seguir, o material foi submetido a processamento histológico convencional e embocado em parafina. Cortes de 4µm de espessura foram obtidos e corados pela hematoxilina-eosina e pela técnica de Miller para fibras elásticas. As lâminas foram, então, rotineiramente analisadas para determinação do grau histológico de doença vascular pulmonar. Outros cortes seqüenciais foram submetidos a reações de imunohistoquímica, conforme descrito mais abaixo.

### **3.1. Análise Histopatológica**

Como procedimento de rotina do laboratório e Anatomia Patológica, foi avaliado o grau qualitativo de lesão da doença vaso-oclusiva de acordo com o sistema de Heath-Edwards<sup>18</sup>, em cada caso.

Para o presente trabalho, os casos foram separados em apenas duas categorias, assim denominadas de acordo com o tipo de lesões histopatológicas presentes:

G1- presença apenas de lesões do tipo hipertrofia da túnica média

GN1- presença de lesões proliferativas da íntima de qualquer intensidade (graus 2 a 6 de Heath-Edwards).

Calculou-se também o diâmetro externo e a porcentagem de espessura da túnica média arterial em artérias que acompanham bronquíolos terminais e respiratórios, conforme estudos prévios<sup>43</sup> comparando os resultados com valores normais obtidos na literatura<sup>15</sup>. As medidas foram efetuadas com auxílio do sistema Quantimet Q500IW (Leica-Cambridge, Ld).

### **3.2. Reações de Imunohistoquímica**

Cortes histológicos de 4µm de espessura foram submetidos a reações de imunohistoquímica, de acordo com o protocolo de rotina usado na Seção de Imunopatologia do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor (sistema avidina-biotina-peroxidase)<sup>21</sup>.

Lâminas tratadas com organossilano e contendo cortes de tecido foram desparafinadas em 3 banhos de xilol, hidratadas e submetidas a diferentes técnicas de recuperação de antígenos dependendo do anticorpo

primário usado, com a finalidade de expor os epitopos teciduais para as reações imunohistoquímicas.

Os anticorpos primários usados foram:

- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra antígeno mielóide/histiócito humano, clone MAC387, fabricante DAKO, Grostrup, Dinamarca
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra antígeno de célula B - CD20, clone L-26, fabricante DAKO, Grostrup, Dinamarca
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra antígeno CD15 de granulócitos, clone C3d-1, fabricante DAKO, Grostrup, Dinamarca
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo, contra antígeno CD3, clone PS1, fabricante NOVOCASTRA Laboratoies Ltda, Benton Lane, Newcastle, Inglaterra
- Anticorpo Monoclonal produzido em camundongo, anti-antígeno CD68, Clone PG-M1, DAKO, Grostrup, Dinamarca

As técnicas de recuperação utilizadas foram:

- Para MAC387: digestão enzimática dos cortes em 1,9 ml de solução de cloreto de cálcio 0,1% pH 7,8 com 100µl de tripsina 2% pH 7,8 em estufa a 37°C, durante 10 minutos.
- Para CD20 e CD15: lâminas imersas em citrato de sódio 100MM pH 6, em forno microondas, durante 15 minutos.

- Para CD3: lâminas imersas em tampão TRIS 0,1 M pH 9,5, em banho-maria a 95°C, durante 40 minutos.
- Para CD68: digestão enzimática dos cortes em 1,9 ml de solução de cloreto de cálcio 0,1% pH 7,8 com 100µl de tripsina 2% pH 7,8 em estufa a 37°C, durante 10 minutos.

Depois de feita a recuperação de antígenos, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de PBS (tampão salina fosfato 1M pH 7,4) e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena pelo tratamento com peróxido de hidrogênio 130 volumes a 3% em PBS. As lâminas foram então colocadas numa câmara úmida e submetidas ao soro fetal bovino por uma hora, em estufa a 37 °C. A seguir, foram secas e submetidas ao anticorpo primário.

Os anticorpos primários foram diluídos em BSA (soroalbumina bovina) 1% em PBS.

As diluições de anticorpos usadas neste trabalho foram:

Anti-Mielóide/Histiócito (MAC387) – diluição 1/500

CD20(L-26) – diluição 1/800

CD15(C3d-1) – diluição 1/25

CD3(PS1) – diluição 1/50

CD68(PG-M1) – diluição 1/200

Após a aplicação do anticorpo primário, as lâminas foram deixadas em câmara úmida a 4 °C na geladeira durante a noite. Após 18 a 20 h de incubação, foram então lavadas em 3 banhos de PBS pH 7,4 e

incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário diluído em PBS por uma hora em estufa a 37 °C.

Para as reações com anticorpos primários CD20, anti-Mielóide/Histiócito e CD68, foi usado anticorpo secundário anti-camundongo IgG biotinilado produzido em coelho, código E0354 da DAKO, diluído 1/200 em PBS, para marcação de linfócitos B, macrófagos jovens (recentemente recrutados) e macrófagos maduros, respectivamente. De acordo com dados do fabricante, o anticorpo MAC387 (mielóide/histiócito) marca também granulócitos além dos macrófagos jovens.

Para as reações com anticorpo primário CD15, foi usado anticorpo secundário anti-camundongo IgM biotinilado produzido em coelho, código E0465 da DAKO diluído 1/300 em PBS, para marcação de granulócitos.

Para reações com anticorpo primário CD3, foi usado o kit EnVision, código K4001 da DAKO, pronto para uso, para marcação de linfócitos T.

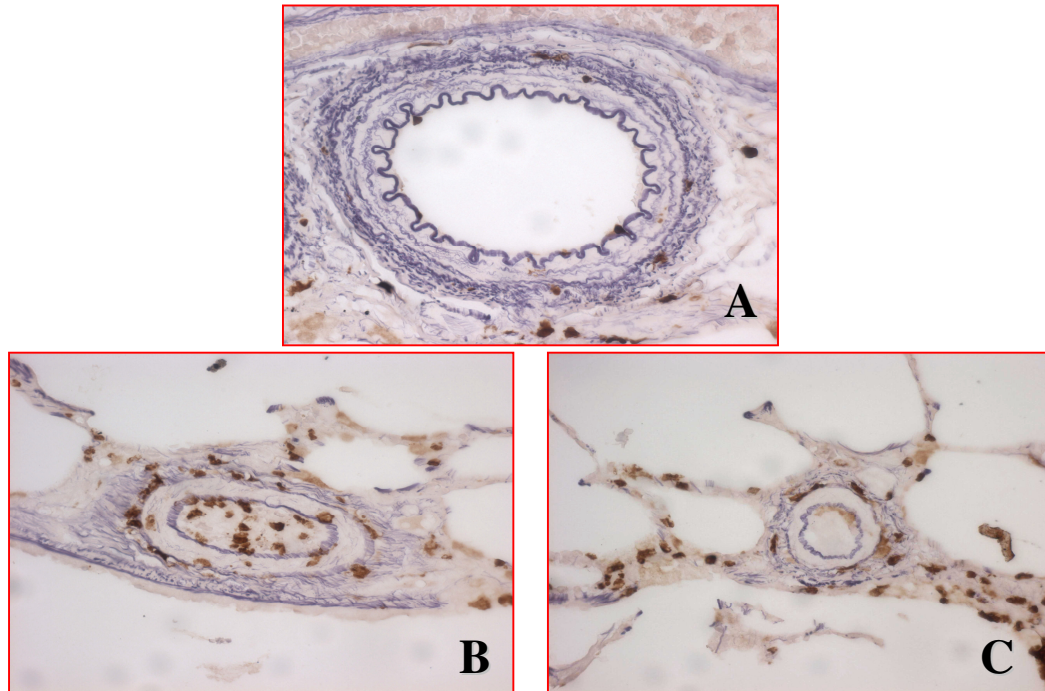
Seguiu-se passagem em 3 banhos de PBS e incubação com estreptoavidina conjugada com peroxidase na diluição 1/100 em PBS por 1 h em estufa a 37°C, com exceção das lâminas de CD3, nas quais foi usado o kit EnVision.

As lâminas foram novamente lavadas em 3 banhos de PBS, seguindo-se a revelação da reação, quando se usou 3,0 tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) 5637 - Sigma 40%, por 5 minutos, em banho-maria a 37°C.

Após passagem em água corrente, os cortes foram contracorados pela técnica de Miller para fibras elásticas. A seguir foram desidratados em banhos sucessivos de água corrente, álcool a 70%, álcool a 95%, álcool a 100%, xilol e cobertos com lamínula usando-se resina sintética.

### **3.3. Medidas Morfométricas**

Ao microscópio óptico acoplado a um sistema de análise de imagens Quantimet Q500IW (Leica-Cambridge, Ld), foram avaliadas artérias pulmonares periféricas maiores que 50 $\mu$ m de diâmetro que não apresentavam artefatos de pinçamento (Figura 1).

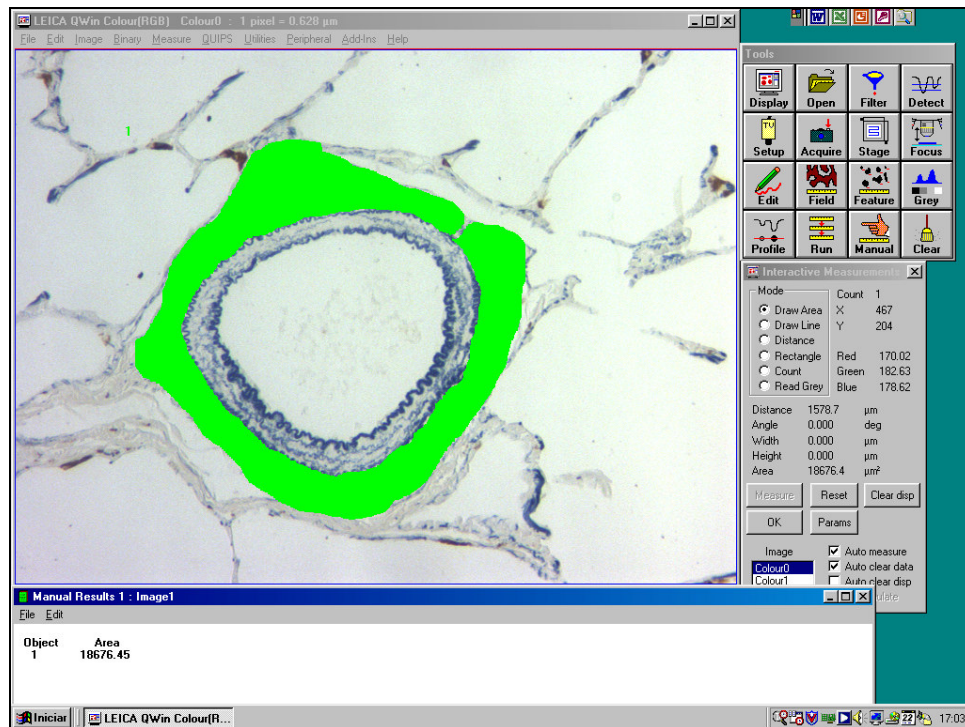


**Figura 1.** Fotomicrografias de arteríolas de bronquíolos terminal (A), respiratório (B) e de ducto alveolar (C), em casos de hipertensão pulmonar. Cortes submetidos à marcação pelo anticorpo MAC387 e anticoloração pela técnica de Miller. Objetiva = 40 vezes

### **3.4. Quantificação de Células Inflamatórias na Adventícia e na Média**

Definiram-se os limites da túnica adventícia como o tecido conjuntivo concêntricamente arranjado ao redor do vaso (Figura 2), ou situado até a estrutura alveolar mais próxima. Nas proximidades de bronquíolos ou brônquios maiores, em trechos onde o tecido conjuntivo não

apresentava arranjo concêntrico, padronizou-se uma área delimitada por uma linha imaginária paralela à limitante elástica externa e com largura igual a uma vez a espessura da túnica média arterial.



**Figura 2.** Tela de analisador de imagens, mostrando o cálculo da área da adventícia

Ainda utilizando o mesmo sistema de análise de imagens, mensurou-se a área da camada adventícia de cada artéria avaliada (em  $\mu\text{m}^2$ ).

Realizou-se a contagem do número de cada tipo de célula inflamatória marcada por meio das reações de imunohistoquímica, na túnica adventícia, média e íntima.



Calculou-se ainda a densidade de células inflamatórias na adventícia, dividindo-se o nº de células encontradas pela área da adventícia e multiplicando-se por  $10^6$ , para se obter o resultado em  $\text{mm}^2$ , já que a área fora medida originariamente em  $\mu\text{m}^2$ .

$$\text{Densidade de céls. Inflam. na adventícia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de céls. na adventícia}}{\text{Área da adventícia}} \times 10^6 \quad (\text{cels/ mm}^2)$$

Em cada caso, foi calculada a densidade média de cada tipo celular, marcado a partir da soma das densidades de artérias individuais, pelo número de artérias adequadas para análise.

Já para as células que infiltravam as túnica média e íntima, foi determinado apenas o seu número absoluto e calculado um índice que compreende o produto do número total de células na parede, pela proporção entre artérias com células infiltrantes, dividido pelo número total de artérias analisadas – índice de células infiltrantes (ICI).

$$\text{Índice} = \text{n}^\circ \text{ total de céls. na parede} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de artérias com céls. infiltrantes}}{\text{n}^\circ \text{ total de artérias analisadas}}$$

### 3.5. Grupo Controle

Como grupo controle, foram utilizados fragmentos de pulmão obtidos no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, de nove necrópsias realizadas com tempo inferior a seis horas após o óbito, e fragmentos de

biópsia de dois pacientes sem doença cardiovascular, mas com afecção pulmonar que exigiu pneumectomia, estes últimos obtidos no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração. Os pulmões de necrópsia foram fixados por injeção intra-traqueal de solução a 10% de formalina tamponada. Os demais fragmentos de controle foram colhidos de local não acometido pelo processo patológico principal.

Todos os cortes dos controles foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para o grupo de estudo em relação às técnicas de imunohistoquímica.

### **3.6. Diagnóstico Principal, Idade e Sexo de Pacientes e Controles**

Dados referentes ao sexo, idade, diagnóstico da cardiopatia e pressões na artéria pulmonar estão listados na Tabela 1. As características dos indivíduos do grupo controle constam da Tabela 2. A análise descritiva dessas características consta do capítulo Resultados.

O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa SDC – 1876/01/64 em 11/06/01) e na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 11/07/01 (protocolo de pesquisa nº 447/01).

**Tabela 1. Pacientes:** Dados clínicos, hemodinâmicos e histológicos (grau de HP)

	Caso	Sexo	Idade (meses)	PmAP (mmHg)	Grav HP	Diagnóstico
1	B9852	F	43	49	1	tga + civ + epv
2	B98237	M	6	37	1	dveve + dvsve + tga + fo patente
3	B98615	F	34	65	N1	civ
4	B98713	M	63	n	1	civ + banda anômala de vd
5	B98759	F	31	47	N1	civ múltipla
6	B98785	F	38	65	1	datvpc/o + dvsvd+ civ+ am + iso.esq
7	B98834	F	13	52	N1	dsav-t tipo A + sind Down
8	B981259	F	20	45	N1	dsav-t-tipo A + pca + coao leve
9	B981310	M	23	41	N1	civ
10	B981325	M	25	45	N1	dsav-t tipo C
11	B981443	F	35	?	1	dsav-t + sind.Down
12	B981587	F	19	83	1	civ + coao
13	B981604	F	96	n	1	Não disponível
14	B981718	M	12	69	N1	civ + pca + coao
15	B981802	M	15	n	N1	civ + pca + sind.Down
16	B981827	M	19	44	N1	truncus tipo1 + cia
17	B981897	M	19	71	1	sind.Shone (vm para quedas + esvm + coao + civ)
18	B982115	M	38	33	1	vutipo e. + tga + esvao + pca + vm para quedas
19	B982267	F	7	47	N1	cia + civ + im + pca
20	B982417	M	61	n	N1	cia fo
21	B9942	F	13	43	N1	vcse + dvsvd + aao à d+ civ não relacionada
22	B99318	F	19	n	N1	dsav-t +pca
23	B991033	F	9	n	N1	iaao tipo B + civ
24	B991121	M	81	55	1	civ + cia + pca
25	B991145	F	83	61	N1	pca
26	B991565	F	17	60	N1	dsav-p + iso. e. + im + civ

**Legenda:** aao = arco aórtico; am = atresia mitral; B = biópsia; cia = comunicação interatrial; civ = comunicação interventricular; coao = coarctação da aorta; datvpc/o = drenagem anômala de veias pulmonares com obstrução; dsav-t = defeito do septo atrioventricular total; dsav-p = defeito septal atrioventricular parcial; dvsvd = dupla via de saída de ventrículo direito; dveve = dupla via de entrada de ventrículo esquerdo; dvsve = dupla via de saída de ventrículo esquerdo; epv = estenose pulmonar valvar; esvao = estenose supravalvar aórtica; esvm = estenose supravalvar mitral; F = feminino; fo = forame oval; HP = hipertensão pulmonar; iaao = interrupção do arco aórtico; im = insuficiência mitral; iso.esq = isomerismo esquerdo; M = masculino; N1 = não 1; pca = persistência do canal arterial; PmAP = pressão média na artéria pulmonar; sind = síndrome; tga = transposição das grandes artérias; vcse = veia cava superior esquerda; vd = ventrículo direito; vm = valva mitral; vu = ventrículo único

**Tabela 2. Grupo Controle:** Sexo, idade, “causa mortis” nas autópsias e diagnóstico clínico nas biópsias

**Autópsias**

	<b>Caso</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Causa mortis</b>
<b>1</b>	<b>A1</b>	M	6	Morte súbita
<b>2</b>	<b>A2</b>	M	7	Geca
<b>3</b>	<b>A3</b>	M	10	Geca
<b>4</b>	<b>A4</b>	M	9	BCP*
<b>5</b>	<b>A5</b>	M	3	Desidratação
<b>6</b>	<b>A6</b>	F	16	Insuficiência Hepática
<b>7</b>	<b>A7</b>	F	3	BCP*
<b>8</b>	<b>A8</b>	F	47	Anemia aguda
<b>9</b>	<b>A9</b>	F	11	Toxemia
	<b>Biópsias</b>			
<b>10</b>	<b>B10</b>	M	74	Pseudo tumor inflamatório hilar pulmonar
<b>11</b>	<b>B11</b>	M	72	Fibrohistiocitoma pulmonar

**Legenda:** BCP = Broncopneumonia\*; F = feminino; Geca = gastroenterocolite aguda; M = masculino \* Dado de atestado de óbito (exame macroscópico) não confirmado ao exame histológico

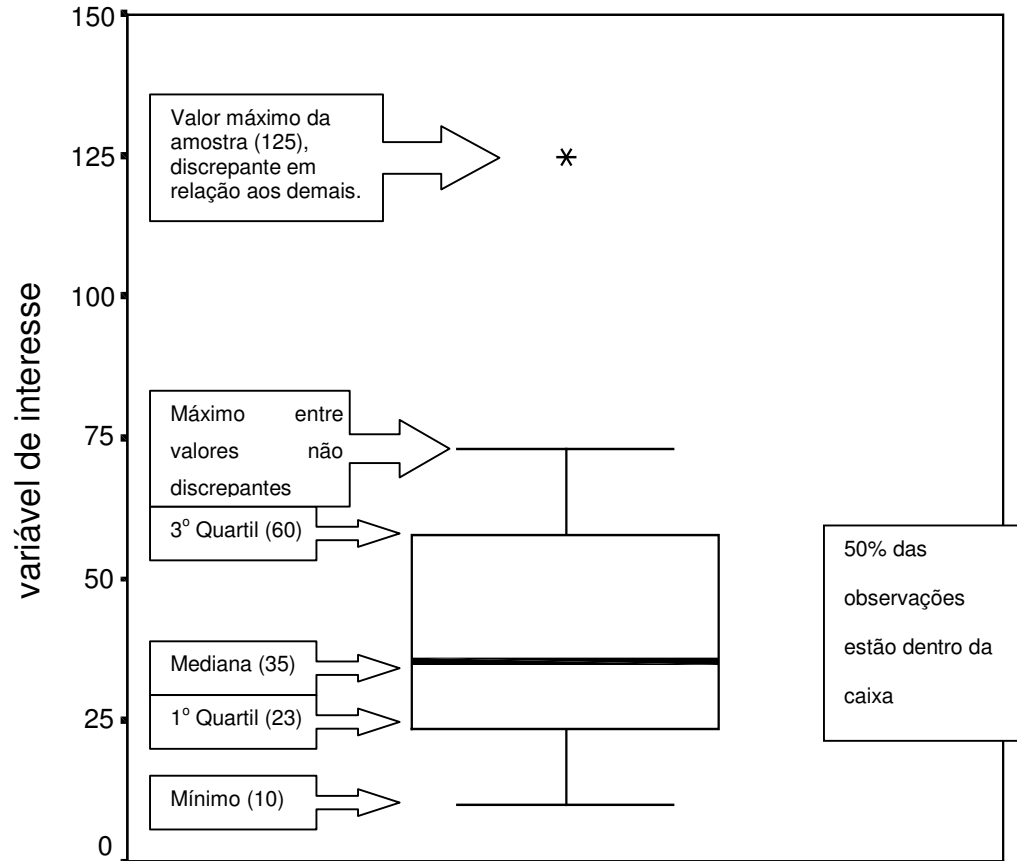
### 3.7. Metodologia Estatística

#### 3.7.1. Análise Descritiva e Diferencial

Para atingir todos os objetivos propostos na tese, foi necessária a aplicação de diversas técnicas de análise estatística.

Na análise descritiva das variáveis quantitativas, foram apresentadas estatísticas descritivas (média, desvio padrão, mínimo,

mediana e máximo) e gráficos do tipo Box Plot, de dispersão e de médias<sup>6</sup>. O gráfico tipo Box Plot é muito utilizado para o estudo da distribuição da variável de interesse (principalmente assimetria e dispersão). Na Figura 3, segue uma ilustração desse gráfico, e os demais apresentados no decorrer deste trabalho têm interpretação similar. Para as variáveis qualitativas, essa análise foi realizada por meio de tabelas e gráficos de frequências para o estudo de sua distribuição.



**Figura 3.** Ilustração de um gráfico tipo Box Plot

Sempre que necessário, a comparação da distribuição dos dados com a distribuição teórica normal (curva de Gauss) foi realizada pelo teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov<sup>52</sup>, além da verificação descritiva da simetria dos dados no gráfico tipo Box Plot, já citado acima.

O teste t de Student<sup>6</sup> foi utilizado para a comparação dos resultados médios dos grupos de pacientes controle e HP estudo quanto a uma variável quantitativa (por exemplo, a idade ou as densidades). No caso da comparação de mais de duas médias (por exemplo, a comparação de densidades dos grupos controle e subgrupos G1 e GN1), aplicou-se a técnica ANOVA<sup>36</sup> e, quando necessário, realizaram-se comparações múltiplas pelo método de Tukey<sup>60</sup>. Quando a hipótese de normalidade dos dados (distribuição de Gauss) não foi satisfeita, essas análises foram realizadas por testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis<sup>52</sup>, respectivamente.

O teste Qui-Quadrado<sup>6</sup>, Qui-quadrado exato ou de Fisher<sup>6</sup> foram utilizados para avaliar a existência de uma possível associação (dependência) entre duas variáveis qualitativas (por exemplo, grupo e sexo).

O teste t de Student pareado<sup>6</sup> foi utilizado para a comparação de médias de duas variáveis quantitativas mensuradas no mesmo paciente (por exemplo, a densidade de macrófagos, linfócitos T e linfócitos B). Nesses casos, têm-se dados com medidas repetidas, ou seja, diferentes medidas que foram obtidas no mesmo paciente. No caso da comparação de mais de duas médias, aplicou-se a técnica ANOVA com medidas repetidas<sup>60</sup> e, quando necessário, realizaram-se comparações múltiplas pelo método de

Tukey<sup>60</sup>. Quando a hipótese de normalidade dos dados (distribuição de Gauss) não foi satisfeita, essas análises foram realizadas pelos testes não paramétricos de Wilcoxon e Friedman<sup>52</sup>, respectivamente.

A análise de associação linear entre duas variáveis quantitativas foi realizada por meio de gráficos de dispersão e do coeficiente de correlação de Pearson<sup>6</sup>. Por definição, os valores do coeficiente de correlação de Pearson<sup>6</sup> estão entre -1 e 1, e o sinal do coeficiente indica a direção da associação. Alto valor absoluto do coeficiente indica uma forte associação entre as variáveis, e valores próximos de zero indicam independência entre as variáveis. Realizou-se um teste para verificar se o coeficiente poderia ser considerado diferente de zero, ou seja, se havia indícios de associação entre as variáveis.

O nível de significância considerado foi 5%.

***Resultados***

---



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da Amostra

A distribuição dos pacientes em estudo quanto às variáveis qualitativas grupo e grau histológico estão apresentadas na Tabela 3. Esses resultados mostram que a maioria dos pacientes em estudo é do grupo HP (70,3%), e dentro desse grupo a maioria dos pacientes apresenta grau histológico GN1 (61,8%).

**Tabela 3.** Distribuição das variáveis grupo e grau histológico

Variáveis	Frequência	
	Absoluta(n)	Relativa(%)
<b>Grupo</b>		
Controle	11	29,7
HP	26	70,3
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>100</b>
<b>Grau Histológico</b>		
G1	10	38,5
GN1	6	61,5
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100</b>

---

A análise descritiva das variáveis quantitativas idade (em meses) e pressão da artéria pulmonar (em mmHg) estão apresentadas na Tabela 4. Esses resultados mostram que o grupo HP apresenta maior média da idade que o grupo controle, mas com grande variabilidade. Vale destacar que ambos os grupos apresentam pacientes com idades bem maiores que os demais. Para a comparação da idade média desses dois grupos, foi utilizado o teste t-Student<sup>6</sup>, pelo fato de essa variável apresentar a suposição de normalidade satisfeita ( $p=0,07$  no teste de Kolmogorov-Smirnov). Assim, pode-se dizer que a idade média do grupo controle não difere da idade média do grupo HP ( $p=0,35$ ), concluindo, então, que a amostra é significativamente homogênea quanto à idade. Avaliando a idade quanto ao grau histológico dos pacientes do grupo HP, observou-se que os pacientes GN1 apresentam menor média da idade que os pacientes com G1, com grande variabilidade e presença de *outliers* entre os pacientes com GN1. Com isso, concluiu-se que existe uma diferença marginalmente significativa ( $p=0,06$ ) entre essas médias, destacando que os pacientes GN1 apresentam os menores resultados. Essa mesma análise foi realizada para a pressão arterial média dos pacientes com G1 e GN1, onde se concluiu pelo teste t-Student ( $p=0,73$  no teste de Kolmogorov-Smirnov) que não existe diferença significativa entre esses resultados ( $p=0,48$ ), apesar de os pacientes com GN1 apresentarem menores valores da pressão arterial pulmonar que os pacientes com G1.

**Tabela 4.** Estatísticas descritivas das variáveis idade e pressão da artéria pulmonar

Variáveis		n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p
Idade (meses)	Controle	11	23,45	27,35	3	10,0	74	0,35
	HP	26	32,27	24,92	6	21,5	96	
Idade (meses)	G1	10	43,80	28,44	6	38,0	96	0,06
	GN1	16	25,06	20,13	7	19,0	83	
Pressão da artéria pulmonar (mmHg)	G1	7	56,14	18,14	33	55,0	83	0,48
	GN1	12	51,58	9,61	41	47,0	69	

A distribuição da variável sexo quanto aos grupos em estudo e ao grau histológico do grupo HP está apresentada na Tabela 5. Nela, observa-se que a maioria dos pacientes do grupo controle é do sexo masculino, enquanto no grupo HP a maioria é do sexo feminino, destacando que essa distribuição está muito próxima de 50%. Para avaliar se existe uma associação significativa entre as variáveis qualitativas sexo e grupo, foi feito o teste de homogeneidade Qui-Quadrado<sup>6</sup>, que apresentou “p” igual a 0,235, indicando que não há dependência significativa entre elas, ou seja, os grupos controle e HP podem ser considerados homogêneos quanto ao sexo.

**Tabela 5.** Distribuição de freqüências da variável sexo em relação aos grupos em estudo

Sexo	Grupo				Total	
	Controle		HP		N	%
	n	%	n	%		
Masculino	7	63,6	11	42,3	18	48,6
Feminino	4	36,4	15	57,7	19	51,4
Total	11	100	26	100	37	100

Teste Qui-quadrado: p=0,235

Pela Tabela 6, observa-se um perfeito equilíbrio no subgrupo de pacientes com G1 quanto ao sexo, e a maioria do sexo feminino no subgrupo GN1, destacando que a distribuição é também próxima de 50%. Da mesma forma, para avaliar se existe uma associação significativa entre as variáveis qualitativas sexo e grau histológico, foi feito o teste de homogeneidade Qui-Quadrado<sup>6</sup>, que apresentou “p” igual a 0,530, indicando que não há dependência significativa entre elas, ou seja, os subgrupos G1 e GN1 do HP podem ser considerados homogêneos quanto ao sexo.

**Tabela 6.** Distribuição de freqüências da variável sexo em relação ao grau histológico do grupo HP

Sexo	Grau Histológico				Total	
	G1		GN1		n	%
	n	%	n	%		
Masculino	5	50	6	37,5	11	42,3
Feminino	5	50	10	62,5	15	57,7
Total	10	100	16	100	26	100

Assim, de uma forma geral, a amostra em estudo pode ser considerada homogênea quanto à idade, pressão da artéria pulmonar e sexo, em relação aos grupos controle e HP e os graus 1 e não 1 dentro do grupo HP, destacando que os dados apresentam grande variabilidade.

A Tabela 7 apresenta estatísticas descritivas das variáveis relacionadas aos marcadores de células inflamatórias nos grupos HP e controle.

**Tabela 7.** Estatísticas descritivas das variáveis relacionadas aos marcadores de células inflamatórias nos grupos HP e controle

Marcadores	Variáveis	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
MAC387	Número de artérias analisáveis	HP	13,4	7,5	4,0	34,0
		Controle	13,8	7,5	4,0	26,0
	Número de artérias com células infiltrantes na média e íntima	HP	1,0	1,4	0,0	5,0
		Controle	0,3	0,6	0,0	2,0
	Área de adventícia por artéria (mm <sup>2</sup> )	HP	13547,6	5001,2	7440,5	30907,8
		Controle	22619,8	13122,5	7821,6	50335,9
CD15	Número de artérias analisáveis	HP	15,0	9,8	2,0	40,0
		Controle	19,2	11,3	8,0	36,0
	Número de artérias com células infiltrantes na média e íntima	HP	0,3	0,6	0,0	2,0
		Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
	Área de adventícia por artéria (mm <sup>2</sup> )	HP	10461,5	4327,4	3847,3	21488,2
		Controle	13762,6	8075,5	5127,6	32559,4
CD20	Número de artérias analisáveis	HP	13,2	8,1	2,0	31,0
		Controle	16,7	6,1	8,0	26,0
	Número de artérias com células infiltrantes na média e íntima	HP	0,1	0,3	0,0	1,0
		Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
	Área de adventícia por artéria (mm <sup>2</sup> )	HP	12640,2	4832,0	6311,4	22912,1
		Controle	16698,8	11870,7	6206,6	49470,2
CD3	Número de artérias analisáveis	HP	11,4	8,3	3,0	39,0
		Controle	19,4	9,3	5,0	34,0
	Número de artérias com células infiltrantes na média e íntima	HP	0,0	0,0	0,0	0,0
		Controle	0,2	0,4	0,0	1,0
	Área de adventícia por artéria (mm <sup>2</sup> )	HP	11399,1	5508,1	4598,3	26383,6
		Controle	11474,2	6906,7	2527,4	22890,6
CD68	Número de artérias analisáveis	HP	9,9615	7,0398	1,0	36,0
		Controle	16,0909	7,6479	5,0	27,0
	Número de artérias com células infiltrantes na média e íntima	HP	1,0385	2,9864	0,0	15,00
		Controle	0,2727	0,4671	0,0	1,00
	Área de adventícia por artéria (mm <sup>2</sup> )	HP	17863,30	10075,96	6806,20	42102,50
		Controle	19126,89	6967,689	3884,50	25729,80

## **4.2. Célula Inflamatória Prevalente nos Grupos HP, Controle e Subgrupos G1, GN1 e Comparações de Densidades Entre os Grupos**

### **4.2.1. Células inflamatórias prevalentes dentro de cada grupo**

#### **4.2.1.1. Grupos HP e Controle considerando marcador MAC387 para macrófagos**

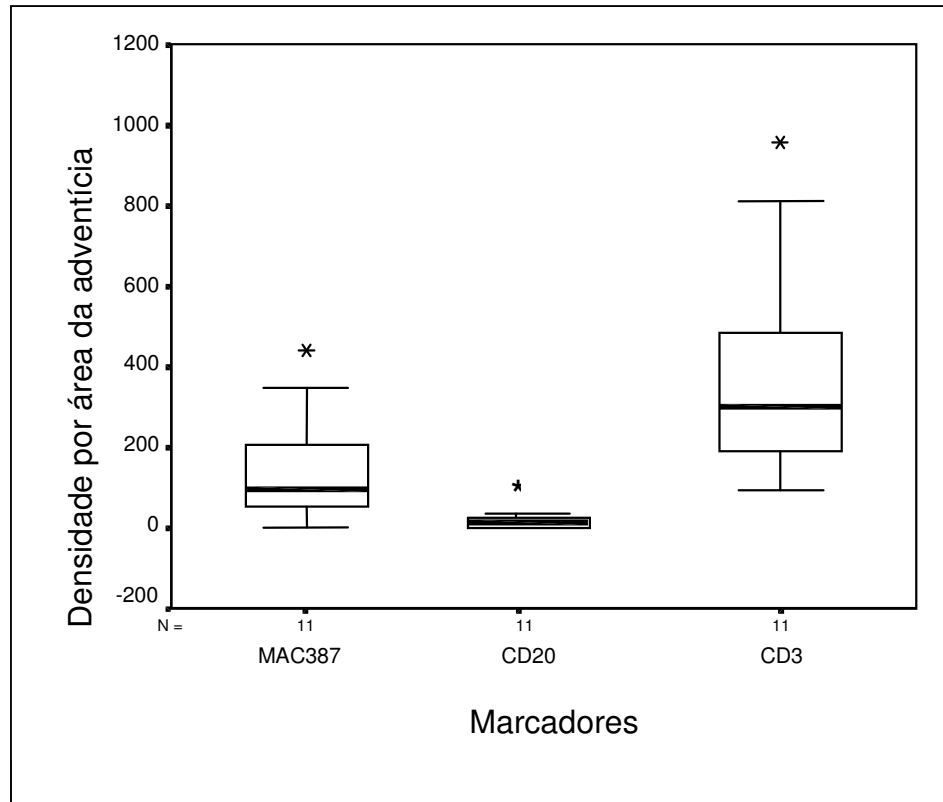
No grupo controle, observa-se maior prevalência de linfócitos T (Tabela 8). As células marcadas pelo MAC387 apresentam a segunda maior densidade média, seguidas pelos linfócitos B. Esse resultado está ilustrado na Figura 4. Pela avaliação da Quadro 1, observa-se que existe diferença significativa entre todas as médias das densidades de três tipos de células inflamatórias em estudo ( $p < 0,040$ ), o que permite concluir que, no grupo controle, as células inflamatórias prevalentes são os linfócitos T, seguidos por células MAC387 positivas.

**Quadro 1.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo controle, considerando MAC387** como marcador de macrófagos.

H <sub>0</sub>	p=0,001	Existe pelo menos uma diferença entre as médias das densidades das células MAC, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
MAC x CD3	p=0,009	A média do MAC é menor que a média do CD3.
MAC x CD20	p=0,016	A média do MAC é maior que a média do CD20.
CD 20 x CD3	p=0,002	A média do CD20 é menor que a média do CD3.

**Tabela 8.** Estatísticas descritivas da média de densidades de células inflamatórias (todos os marcadores) por área da adventícia nos grupos controle e HP (células/mm<sup>2</sup>)

Grupo	Marcadores	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle (n=11)	CD68	110,8	105,7	0	86	339
	MAC387	145,2	147,0	0	96	439
	CD15	56,8	50,5	1	36	160
	CD20	17,7	19,3	0	14	64
	CD3	376,9	285,9	95	300	957
	CD20 + CD3	394,6	290,0	109	300	991
	Média Geral	141,5	80,9	63	98	304
HP (n=26)	CD68	130,0	212,8	0	60	1054
	MAC387	248,8	323,6	0	124	1125
	CD15	54,4	63,5	0	35,5	283
	CD20	48,0	81,2	0	12	306
	CD3	51,0	68,5	0	19,5	197
	CD20 + CD3	99,0	105,083	0	37	333
	Média Geral	106,4	101,9	15	80	478



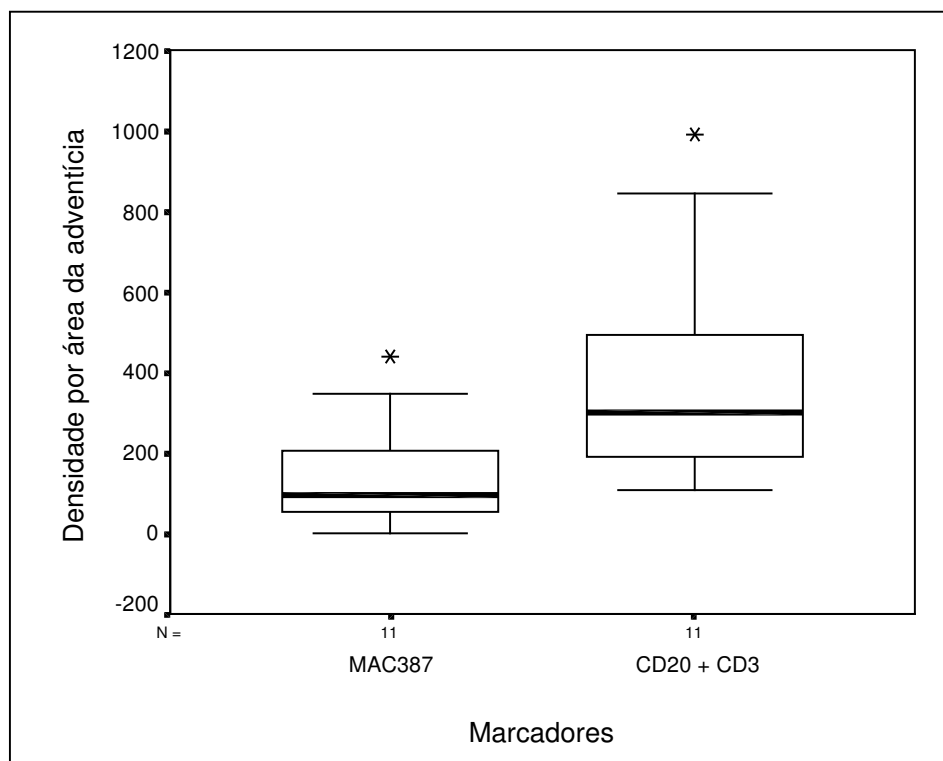
**Figura 4.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo controle (células/mm<sup>2</sup>), **considerando MAC387** como marcador de macrófagos.

Mesmo quando se avaliam conjuntamente os linfócitos B e T, conclui-se que esse tipo de célula inflamatória apresenta prevalência significativamente maior que os demais no grupo controle, revelando o grande domínio dos linfócitos T em relação aos linfócitos B nesse grupo de pacientes (Quadro 2 e Figura 5).



**Quadro 2.** Resultados do teste t-pareado para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo controle, considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,006	Existe diferença entre as médias das densidades das células MAC e CD20+CD3.
MAC x CD20+CD3		A média do MAC é menor que a média do CD20+CD3.



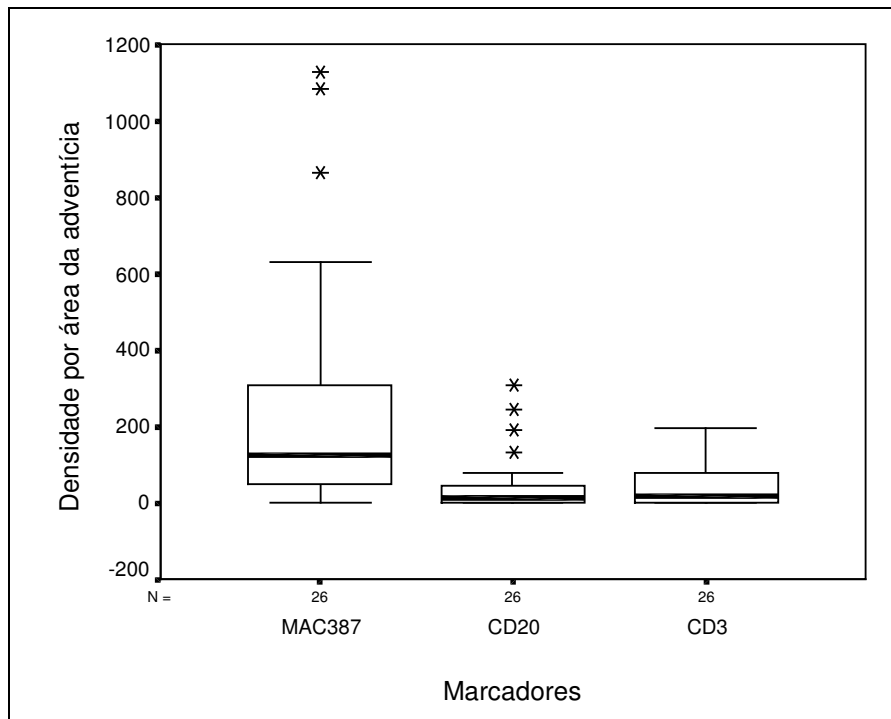
**Figura 5.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20 + CD3 - MAC como marcador de macrófagos**

Já no grupo de pacientes com HP, observa-se maior prevalência de células inflamatórias marcadas pelo MAC387, onde se tem a média da densidade igual a 248,8 células/mm<sup>2</sup>, com grande variabilidade. Os demais tipos de células inflamatórias em estudo apresentam menores médias de densidades, com resultados muito próximos e em torno de 52 células/mm<sup>2</sup>.

Esse resultado está ilustrado na Figura 6. Pela avaliação do Quadro 3, observa-se que existe diferença significativa entre a média da densidade dos macrófagos e todas os demais ( $p < 0,01$ ), enquanto, como esperado, os linfócitos B e T não apresentam densidades médias significativamente diferentes ( $p > 0,70$ ), o que permite concluir que, no grupo HP, as células inflamatórias prevalentes são os macrófagos.

**Quadro 3.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP, considerando MAC387 como marcador de macrófagos

$H_0$	$p=0,004$	Existe pelo menos uma diferença entre as médias das densidades das células MAC, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
MAC x CD3	$p=0,005$	A média do MAC é maior que a média do CD3.
MAC x CD20	$p=0,005$	A média do MAC é maior que a média do CD20.
CD 20 x CD3	$p=0,885$	A média do CD20 não difere da média do CD3.

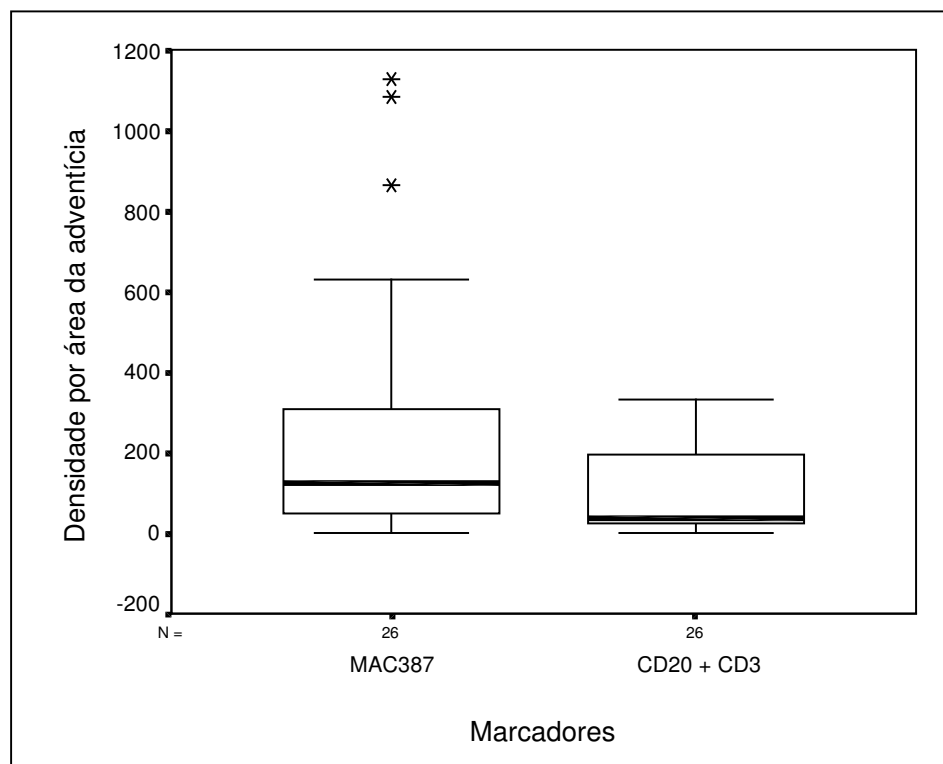


**Figura 6.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da área da adventícia no **grupo HP** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

Quando se avalia os linfócitos B e T conjuntamente, conclui-se que esse tipo de célula inflamatória apresenta prevalência significativamente menor que os macrófagos ( $p < 0,01$ ), mas a maior prevalência dos macrófagos ainda é destaque em relação às demais células inflamatórias. (Quadro 4 e Figura 7).

**Quadro 4.** Resultados do teste t-pareado para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP, considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,034	Existe diferença entre as médias das densidades das células MAC e CD20+CD3.
MAC x CD20+CD3		A média do MAC é maior que a média do CD20+CD3.



**Figura 7.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo HP** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20 + CD3 - MAC como marcador de macrófagos**

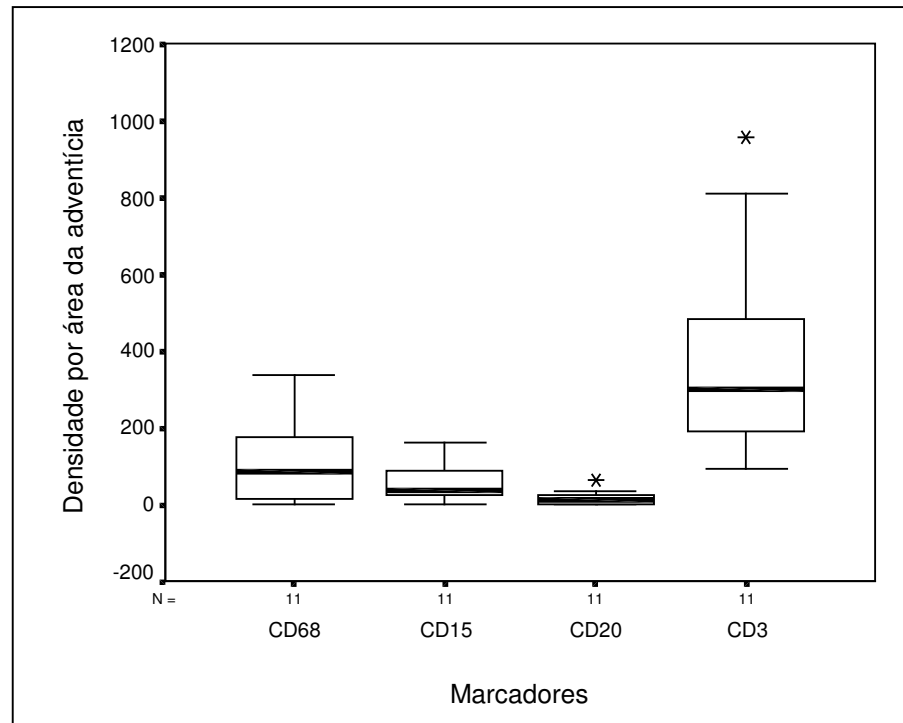
#### 4.2.1.2. Grupos HP e Controle, considerando marcador CD68 para macrófagos

Para verificação do tipo de célula prevalente nos grupos HP total, G1, GN1 e controle e a comparação desses grupos entre si, em relação às células marcadas com CD68 e os demais marcadores, a metodologia estatística foi semelhante à utilizada anteriormente e descrita no item 4.2.1.1 (Tabela 8).

Nos pacientes do grupo controle, houve prevalência de linfócitos T, seguidos de células marcadas por CD68 (Figura 8). Com exceção da comparação entre CD68 e CD15 onde não se encontra diferença, houve diferença estatística significativa entre CD68 e CD20 com prevalência de macrófagos ( $p=0,018$ ) e entre CD68 e CD3 com predomínio de linfócitos T ( $p=0,025$ ) (Quadro 5).

**Quadro 5:** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo controle, considerando CD68 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,003$	Existe pelo menos uma diferença entre as médias das densidades das células CD68, CD15, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
CD68 x CD15	$p=0,196$	A média do CD68 não difere da média do CD15.
CD68 x CD20	$p=0,018$	A média do CD68 é maior que a média do CD20.
CD68 x CD3	$p=0,025$	A média do CD68 é menor que a média do CD3.
CD15 x CD20	$p=0,020$	A média do CD15 é maior que a média do CD20.
CD15 x CD3	$p=0,003$	A média do CD15 é menor que a média do CD3.
CD 20 x CD3	$p=0,002$	A média do CD20 é menor que a média do CD3.

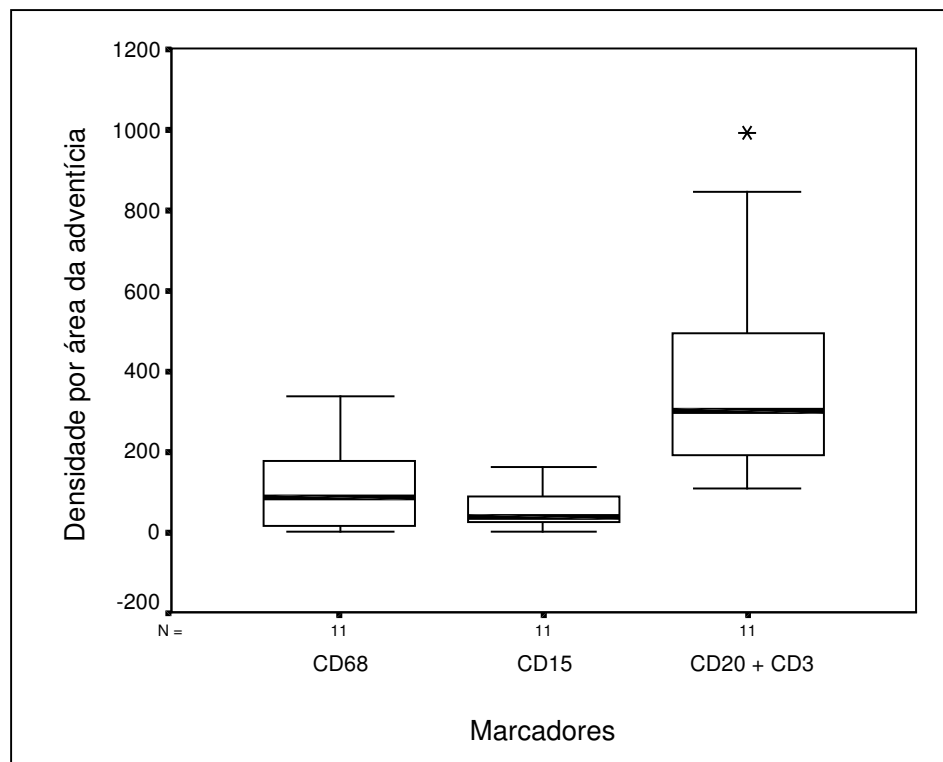


**Figura 8.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo controle** (células /mm<sup>2</sup>), considerando **CD68 como marcador de macrófagos**

Avaliando-se os linfócitos B e T conjuntamente confirma-se que esse tipo celular apresenta prevalência em relação às demais (p=0,020) (Quadro 6 e Figura 9).

**Quadro 6.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo controle, considerando o somatório CD20+CD3 – CD68 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,006	Existe pelo menos uma diferença entre as médias das densidades das células CD68, CD15 e CD20+CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
CD68 x CD15	p=0,196	A média do CD68 não difere da média do CD15.
CD68 x CD20+CD3	p=0,020	A média do CD68 é menor que a média do CD20+CD3.
CD15 x CD20+CD3	p=0,002	A média do CD15 é menor que a média do CD20+CD3.

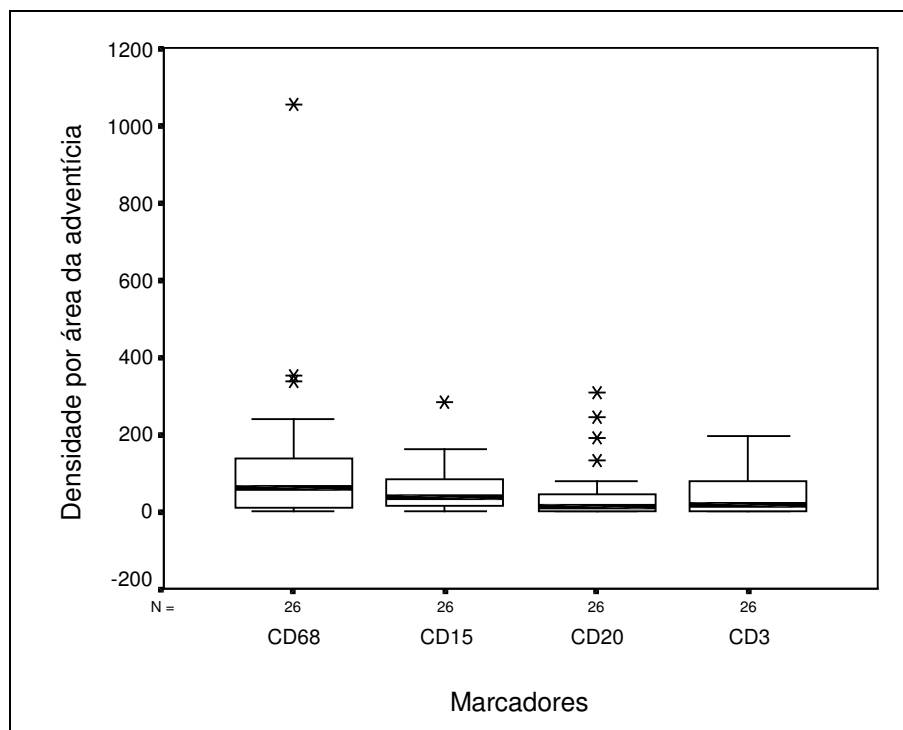


**Figura 9.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20 + CD3 - CD68 como marcador de macrófagos**

Já no grupo HP, houve predomínio das células marcadas por CD68 (Figura 10), mas sem diferença estatística ( $p=0.082$ ) como se observa no Quadro 7.

**Quadro 7.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades no **grupo controle, considerando CD68 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,082$	Não existe diferença entre as médias das densidades das células CD68, CD15, CD20 e CD3.
-------	-----------	---



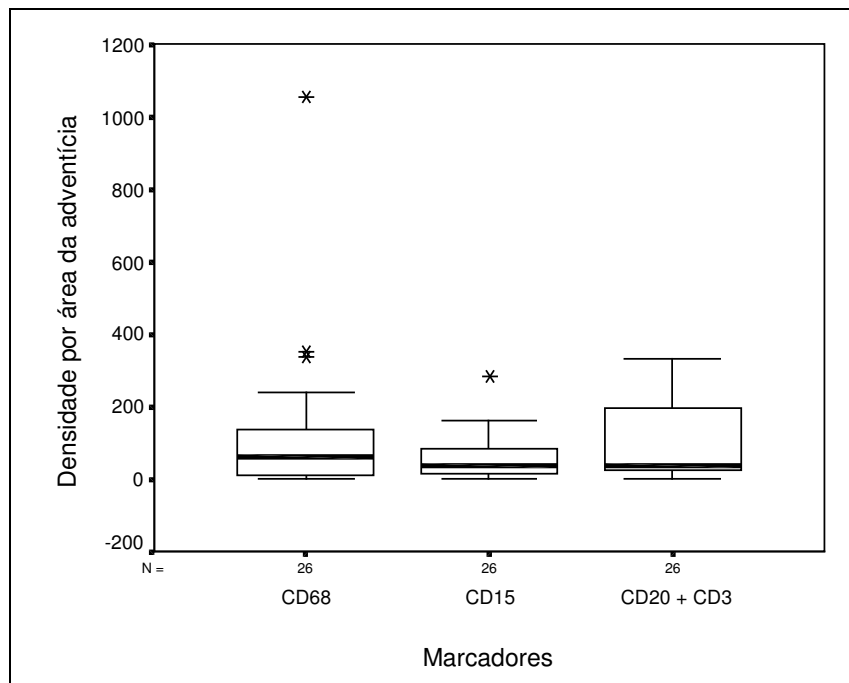
**Figura 10.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo HP** (células /mm<sup>2</sup>), **considerando CD68 como marcador de macrófagos**



Mesmo quando se comparam conjuntamente os linfócitos B e T, constatou-se não haver diferença entre os tipos celulares ( $p=0,156$ ) (Quadro 8 e Figura 11).

**Quadro 8.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades no **grupo HP, considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,156$	Não existe diferença entre as médias das densidades das células CD68, CD15 e CD20+CD3.
-------	-----------	--



**Figura 11.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área de adventícia no **grupo HP** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20 + CD3 - CD68 como marcador de macrófagos.**

#### 4.2.1.3. Grupo HP Quanto ao Grau Histológico (Subgrupos G1 e GN1)

A Tabela 9 mostra as estatísticas descritivas da quantidade de células por área de adventícia vascular nos subgrupos de HP.

**Tabela 9.** Estatísticas descritivas da média de densidades de células inflamatórias na adventícia no **grupo HP** quanto ao grau histológico (células/mm<sup>2</sup>)

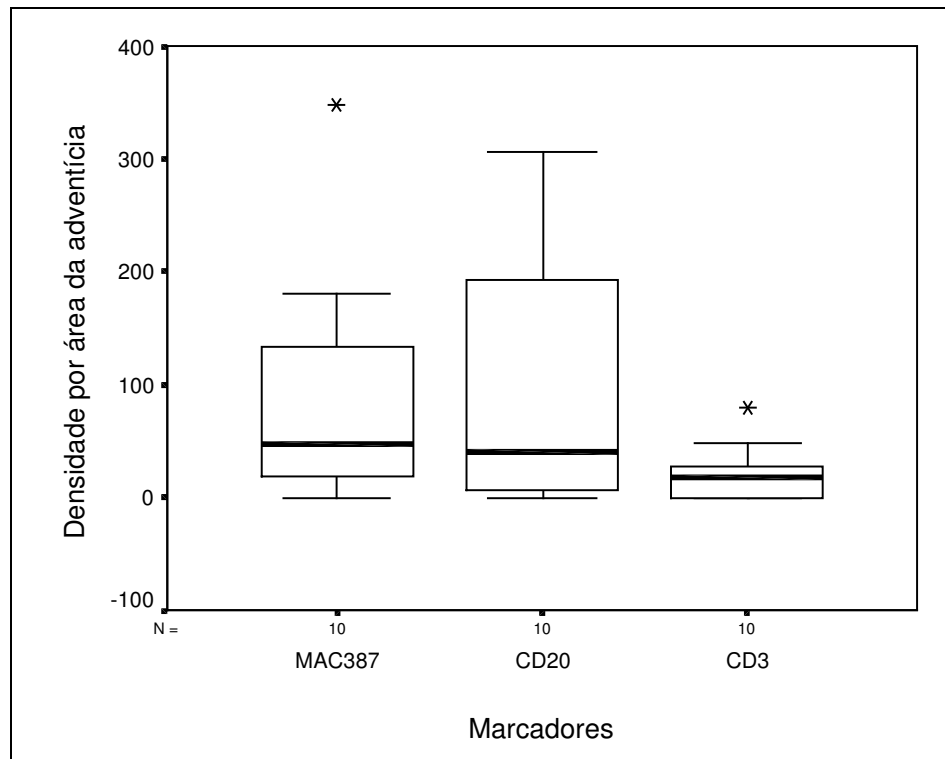
Grau Histológico	Marcadores	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
G1 (n=10)	CD68	83,9	104,2	0	52	349
	MAC387	90,6	108,6	0	46,5	348
	CD15	40,8	39,5	0	35,5	104
	CD20	92,0	113,8	0	39,5	306
	CD3	22,5	25,4	0	17	80
	CD20+CD3	114,5	131,5	8	50,5	333
GN1 (n=16)	CD68	158,8	258,1	0	69	1054
	MAC387	347,6	374,6	28	172	1125
	CD15	62,9	74,7	0	35,5	283
	CD20	20,4	33,3	0	10,5	131
	CD3	68,9	80,9	0	26	197
	CD20+CD3	89,3	88,1	0	37	237

#### 4.2.1.4. Célula prevalente em cada sub-grupo de HP, considerando marcador MAC387 para macrófagos

No grupo de pacientes G1, observa-se densidades médias maiores e semelhantes para as células do tipo macrófagos (MAC387) e linfócitos B e menores para linfócitos T, mas com grande variabilidade. Assim, não se observa nenhum destaque quanto à maior prevalência de um tipo de célula inflamatória em especial, como mostra a Quadro 9 e Figura 12.

**Quadro 9.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis) para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo G1, considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,225$	Não existe diferença significativa entre as médias das densidades das células MAC, CD20 e CD3 no grupo G1.
-------	-----------	--

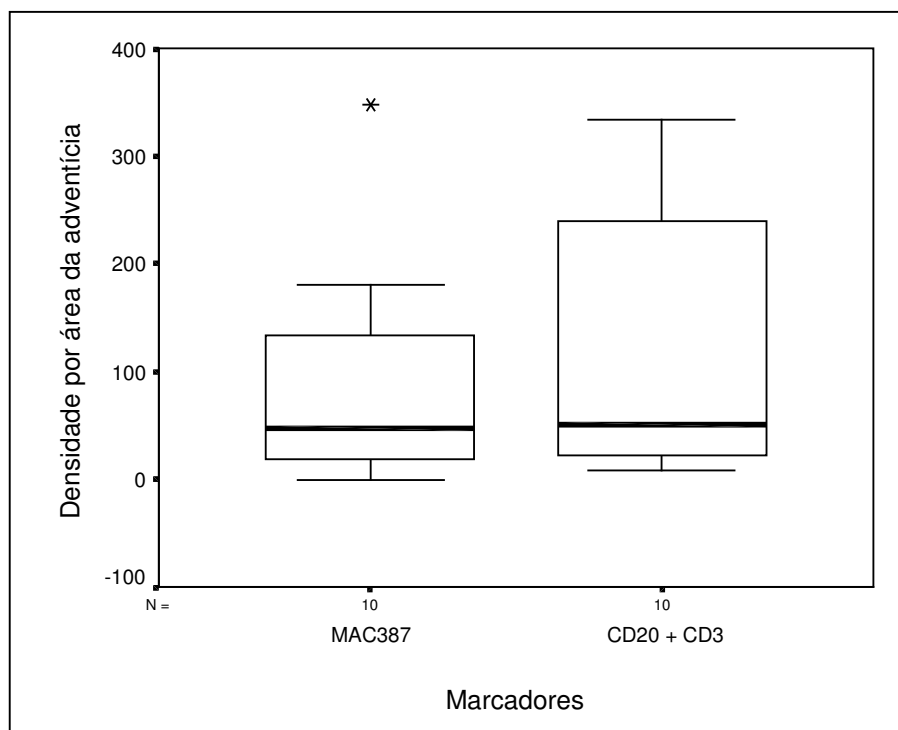


**Figura 12.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo HP – subgrupo G1 (células/mm<sup>2</sup>)**, considerando **MAC387** como marcador de macrófagos

Mesmo avaliando os linfócitos B e T conjuntamente, conclui-se que esse tipo de célula inflamatória não apresenta prevalência significativamente diferente das demais (Quadro 10 e Figura 13) no subgrupo G1( $p=0,707$ ).

**Quadro 10.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo G1, considerando o somatório CD20+CD3 - MAC387 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,707	Não existe diferença significativa entre as médias das densidades das células MAC e CD20 + CD3 no grupo G1.
----------------	---------	---



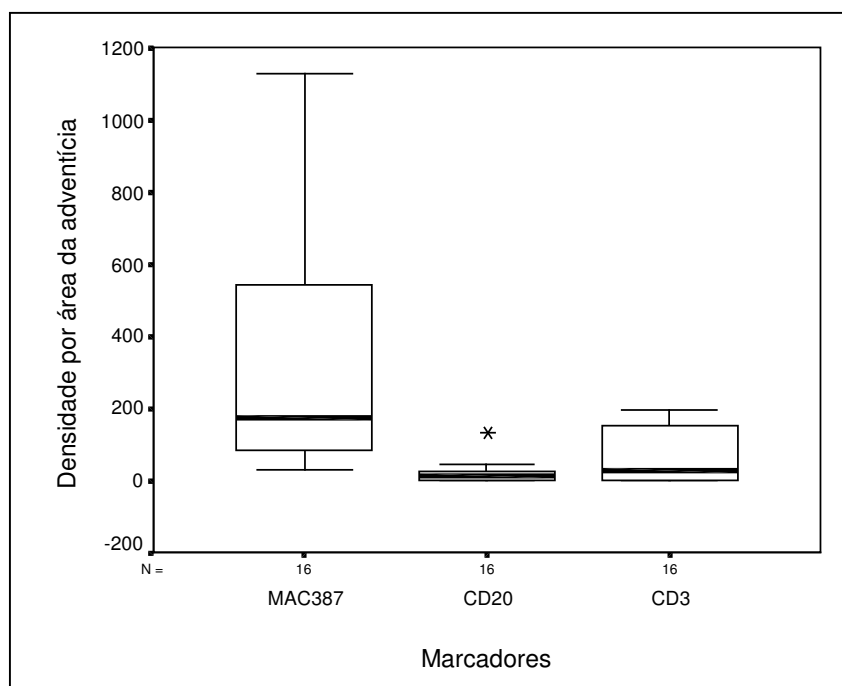
**Figura 13.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo HP - subgrupo G1** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20+CD3 – MAC387 como marcador de macrófagos**

Já no grupo de pacientes GN1, observa-se maior prevalência de células inflamatórias do tipo macrófago. Esse resultado está ilustrado na Figura 14. Pela avaliação do Quadro 11, observa-se que existe diferença

significativa entre a média da densidade dos macrófagos e todas as demais células ( $p=0,005$ ). Esse resultado permite concluir que, no grupo GN1, as células inflamatórias prevalentes são os macrófagos.

**Quadro 11.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo GN1, considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,005$	Existe pelo menos uma diferença entre as médias das densidades das células MAC, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
MAC x CD3	$p=0,012$	A média do MAC é maior que a média do CD3.
MAC x CD20	$p=0,002$	A média do MAC é maior que a média do CD20.
CD 20 x CD3	$p=0,041$	A média do CD20 é menor que a média do CD3.

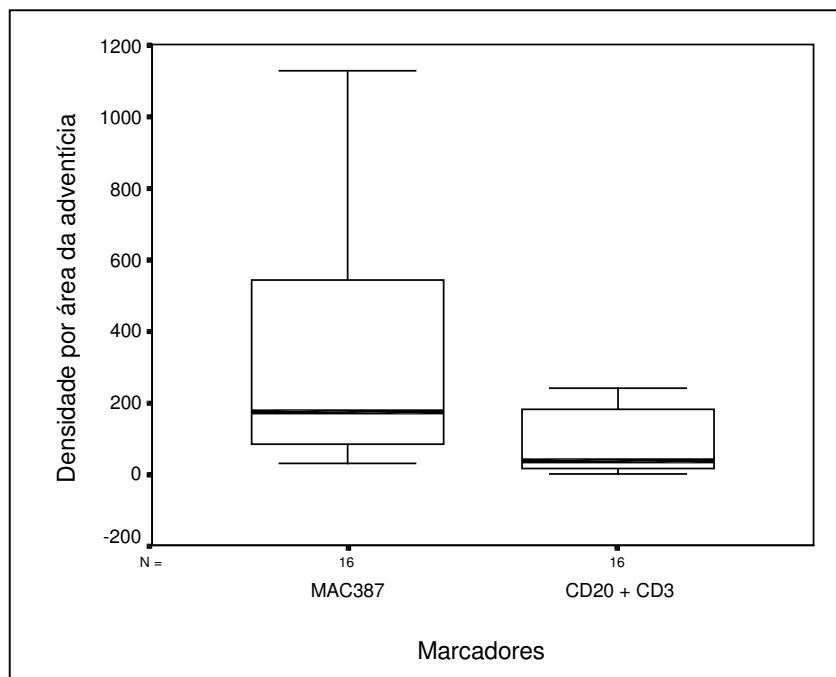


**Figura 14.** Distribuição da variável densidades de células inflamatórias por área da adventícia no **grupo HP - subgrupo GN1** (células/mm<sup>2</sup>), considerando **MAC387 como marcador de macrófagos**

Quando se avaliam os macrófagos em relação aos linfócitos B e T conjuntamente (Quadro 12 e Figura 15), conclui-se que esse tipo de célula inflamatória também apresenta prevalência significativamente maior que as demais ( $p=0,014$ ), com maior predomínio dos linfócitos T em relação aos linfócitos B ( $p=0,041$ ).

**Quadro 12.** Resultados da análise de variância com medidas repetidas (análise de perfis), para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no grupo HP - subgrupo GN1, considerando o somatório CD20+CD3 - MAC387 como marcador de macrófagos

$H_0$	$p=0,014$	Existe diferença entre as médias das densidades das células MAC e CD20+CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
MAC x CD20+CD3		A média do MAC é maior que a média do CD20+CD3.



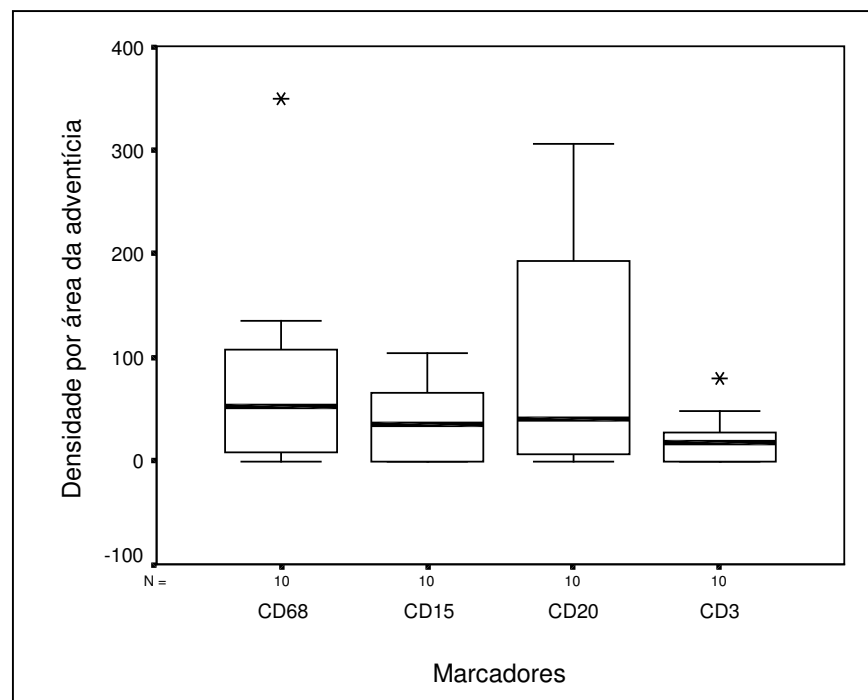
**Figura 15.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP (celulas/mm<sup>2</sup>) no grupo HP - subgrupo GN1, considerando o somatório CD20+CD3 - MAC387 como marcador de macrófagos

#### 4.2.1.5. Célula prevalente em cada subgrupo de HP, considerando marcador CD68 para macrófagos

Subdividindo o grupo HP em subgrupos G1 e GN1, pode-se observar que no G1 não há diferença entre os diversos tipos celulares marcados como demonstra a Quadro 13 e Figura 16 ( $p=0,166$ ).

**Quadro 13.** Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo G1, considerando CD68 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,166$	Não existe diferença significativa entre as médias das densidades das células CD68, CD15, CD20 e CD3 no subgrupo G1.
-------	-----------	--



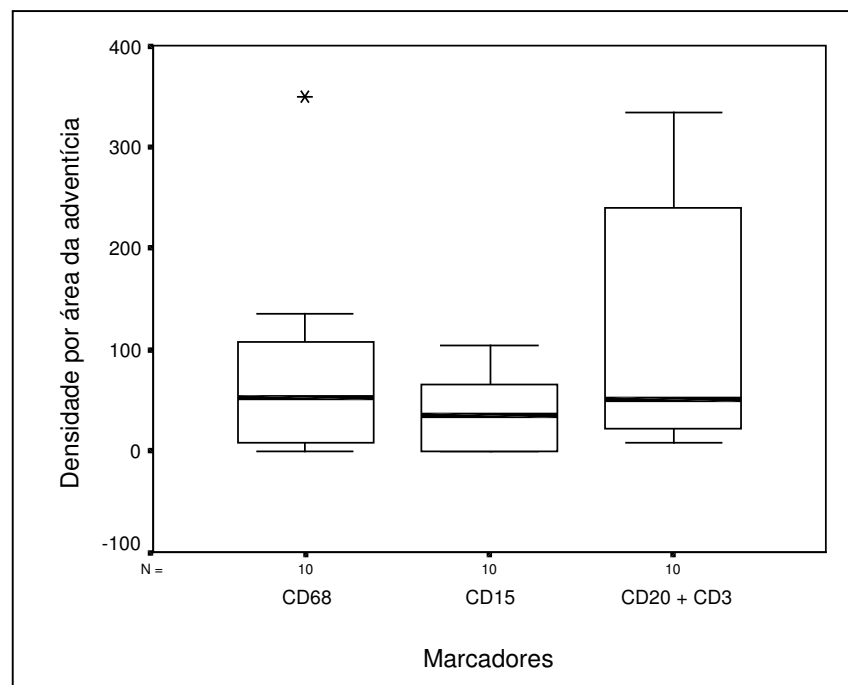
**Figura 16.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área de adventícia no **grupo HP - subgrupo G1 (células/mm<sup>2</sup>) - considerando CD68 como marcador de macrófagos**



Mesmo quando se compara a soma dos linfócitos B e T, não se observa predomínio de nenhum tipo celular ( $p=0,243$ ) (Quadro 14 e Figura 17).

**Quadro 14.** Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo G1 - considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,243$	Não existe diferença significativa entre as médias das densidades das células CD68, CD15, CD20 + CD3 no subgrupo G1.
-------	-----------	--

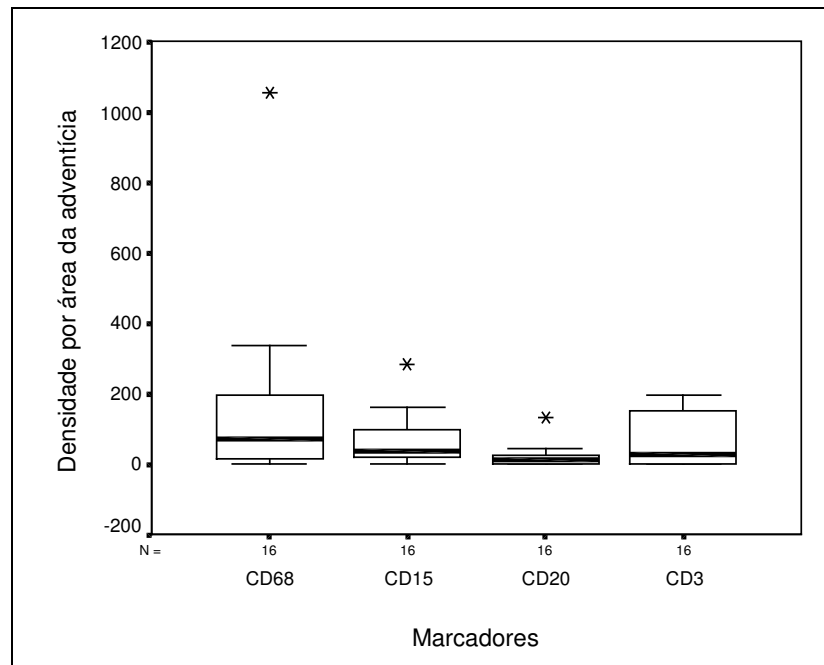


**Figura 17.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP (celulas/mm<sup>2</sup>) no **grupo HP - subgrupo G1, considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos**

Já no GN1, pode-se observar que a média de CD68 é maior em relação à média de CD20 que, por sua vez, é menor que CD15 ( $p=0,046$  e  $0,021$  respectivamente) (Quadro 15 e Figura 18).

**Quadro 15.** Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo GN1, considerando CD68 como marcador de macrófagos**

$H_0$	$p=0,046$	Existe pelo menos uma diferença entre as médias das densidades das células CD68, CD15, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
CD68 x CD15	$p=0,189$	A média do CD68 não difere da média do CD15.
CD68 x CD20	$p=0,046$	A média do CD68 é maior que a média do CD20.
CD68 x CD3	$p=0,165$	A média do CD68 não difere do CD3.
CD15 x CD20	$p=0,021$	A média do CD15 é maior que a média do CD20.
CD15 x CD3	$p=0,817$	A média do CD15 não difere da média do CD3.
CD 20 x CD3	$p=0,041$	A média do CD20 é menor que a média do CD3.

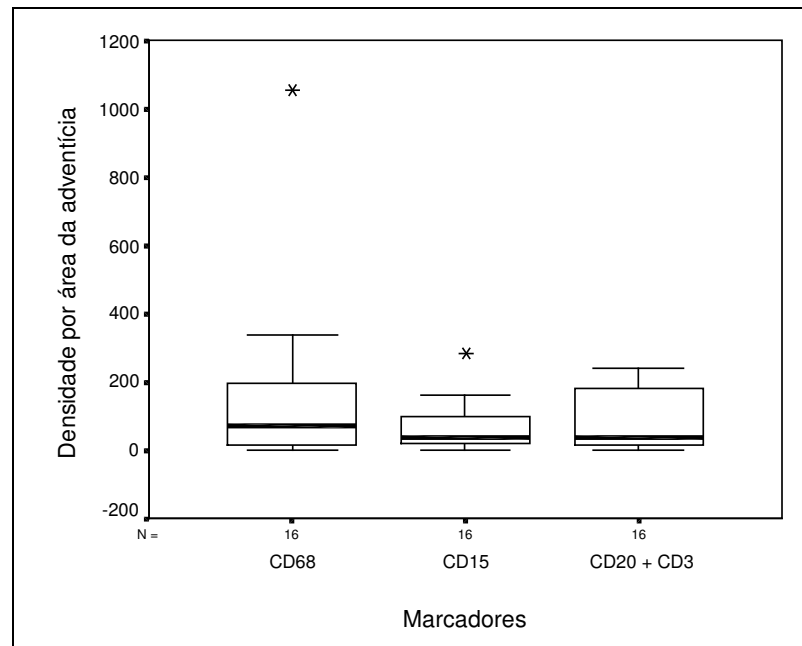


**Figura 18.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área de adventícia no **grupo HP - subgrupo GN1** (células/mm<sup>2</sup>), considerando **CD68** como marcador de macrófagos

Quando se somam as densidades de CD20 e CD3, não se observa diferença em relação às densidades de CD15 e CD68 ( $p=0,224$ ) (Quadro 16 e Figura 19).

**Quadro 16.** Resultados de análise de variância com medidas repetidas, para avaliar a prevalência de diferentes tipos de células inflamatórias pelas densidades médias no **grupo HP - subgrupo GN1**, considerando o somatório **CD20+CD3 - CD68** como marcador de macrófagos

$H_0$	$p=0,224$	Não existe diferença significativa entre as médias das densidades das células CD68, CD15, CD20 e CD3 no subgrupo GN1.
-------	-----------	---



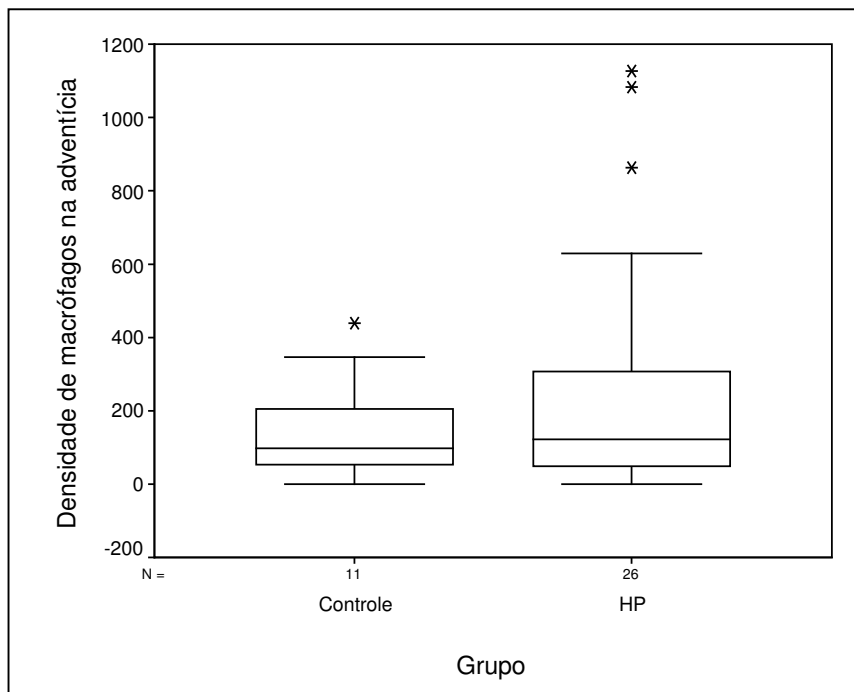
**Figura 19.** Distribuição da variável densidade de células inflamatórias por área da adventícia no grupo HP (celulas/mm<sup>2</sup>) no **grupo HP - subgrupo GN1, considerando o somatório CD20+CD3 - CD68 como marcador de macrófagos**

#### 4.2.2. Comparações de Densidades Entre Grupos

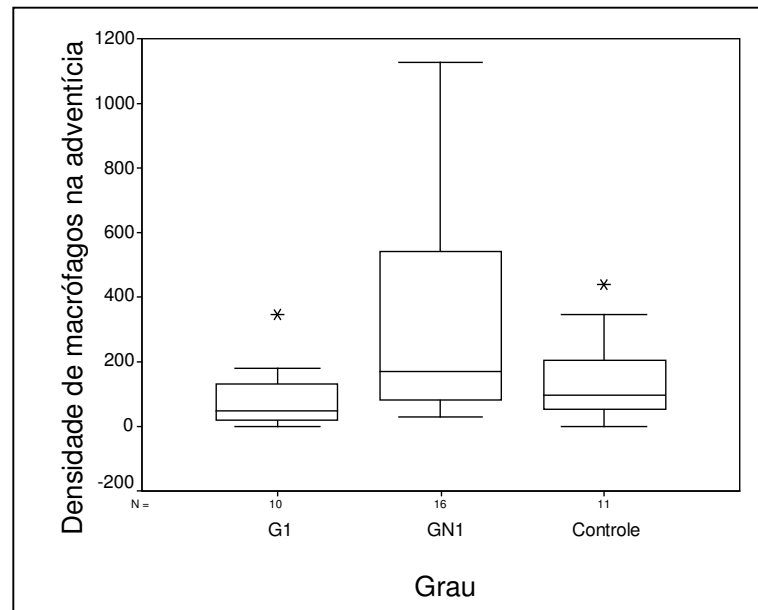
**Quadro 17.** Resultados das comparações dos grupos HP x Controle (testes t) e dos subgrupos G1 x GN1 x Controle (análise de variância) quanto à densidade de cada tipo de célula inflamatória em estudo.

Densidade média	Comparações	p
Macrófagos(CD68)	HP x Controle	0,779
	G1 x GN1 x Controle	0,597
Macrófagos(MAC387)	HP x Controle	0,318
	G1 x GN1 x Controle	0,064
Granulócitos(CD15)	HP x Controle	0,911
	G1 x GN1 x Controle	0,660
Linfócitos B (CD20)	HP x Controle	0,084
	G1 x GN1 x Controle	<b>0,015</b>
	G1 x GN1	<b>0,022</b>
	G1 x Controle	<b>0,030</b>
Linfócitos T (CD3)	GN1 x Controle	0,993
	HP x Controle	<b>0,004</b>
	G1 x GN1 x Controle	<b>&lt;0,001</b>
Linfócitos B e T (CD20+CD3)	G1 x GN1	0,766
	G1 x Controle	<b>&lt;0,001</b>
	GN1 x Controle	<b>&lt;0,001</b>
	HP x Controle	<b>0,007</b>
Total	G1 x GN1 x Controle	<b>&lt;0,001</b>
	G1 x GN1	0,937
	G1 x Controle	<b>0,003</b>
CD68+CD15+CD20+CD3	GN1 x Controle	<b>&lt;0,001</b>
	HP x Controle	<b>0,008</b>
	G1 x GN1 x Controle	<b>0,024</b>
Total	G1 x GN1	0,999
	G1 x Controle	<b>0,034</b>
	GN1 x Controle	<b>0,079</b>
	HP x Controle	0,142
MAC387+CD20+CD3	G1 x GN1 x Controle	0,092

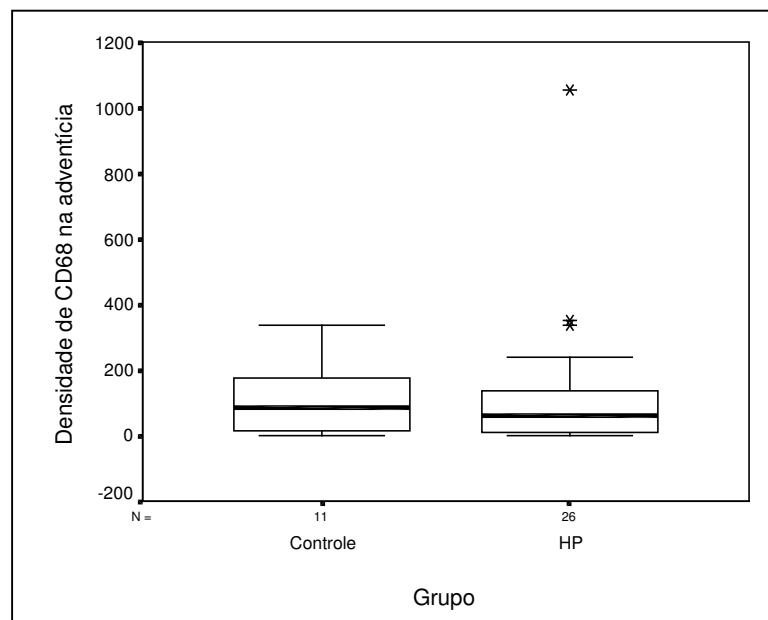
Quanto à densidade média de macrófagos (marcador MAC387), não se observa diferença significativa entre os grupos controle e HP ( $p=0,318$ ), mas observa-se de forma descritiva no Quadro 17, que o grupo HP apresenta maiores valores que o controle. Quando se avalia essa comparação entre os subgrupos G1, GN1 e controle, nota-se uma diferença apenas marginal entre eles ( $p=0,064$ ), onde o subgrupo GN1 se destaca por apresentar maiores valores (Quadro 17). Comparando a densidade das células macrofágicas marcadas com CD68 nos grupos HP e controle e entre os grupos G1, GN1 e controle, não foi observada nenhuma diferença significativa, tanto entre o grupo HP e controle ( $p=0,779$ ) quanto entre G1, GN1 e controle ( $p=0,597$ ) (Quadro 17 e Figuras 20,21,22 e 23).



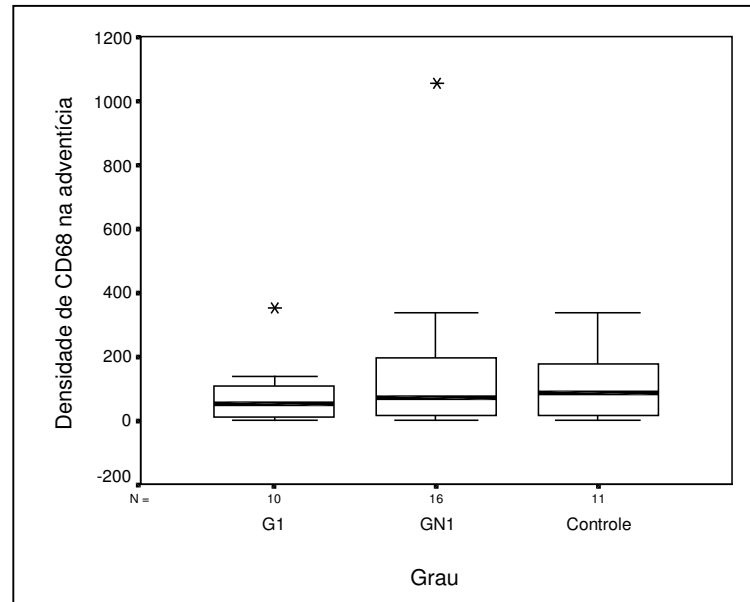
**Figura 20.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos grupos HP e controle (células/mm<sup>2</sup>), considerando MAC387 como marcador de macrófagos



**Figura 21.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos grupos **G1**, **GN1** e **controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**



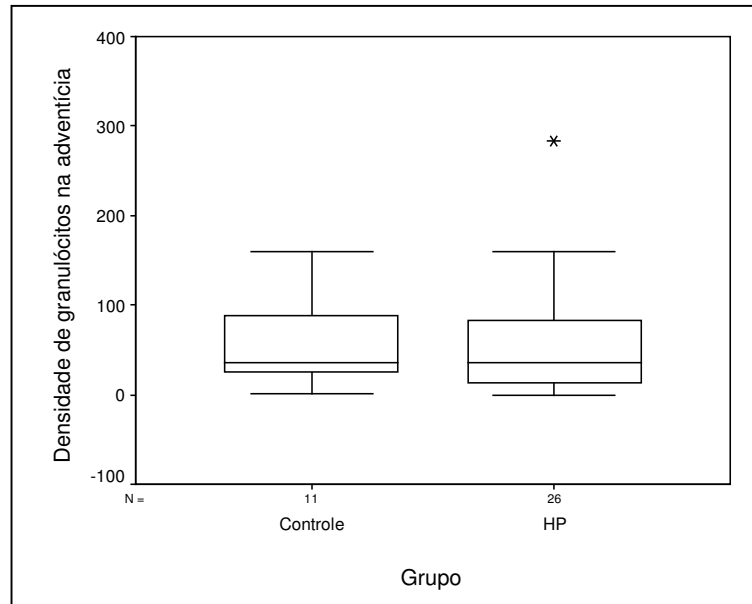
**Figura 22.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos **grupos HP e Controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando CD68 como marcador de macrófagos**



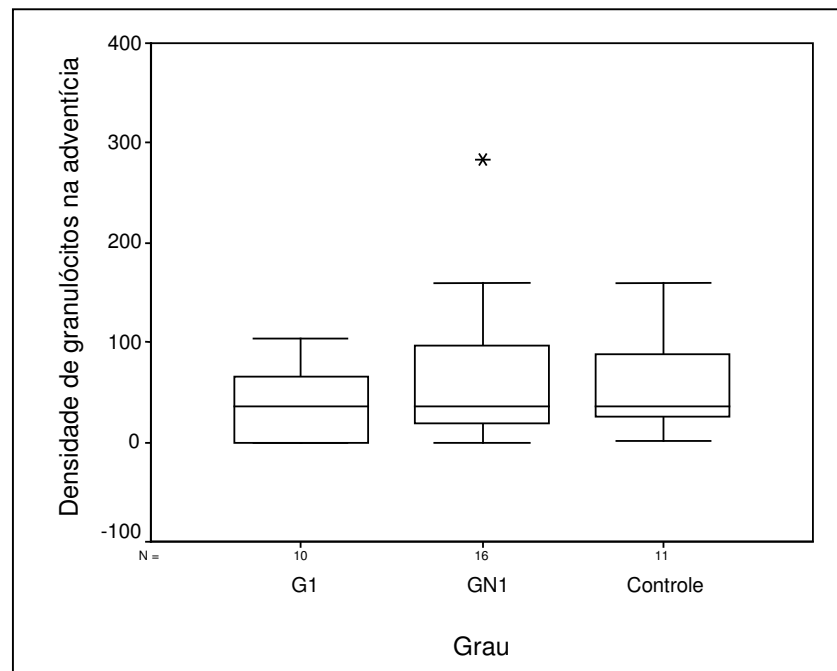
**Figura 23.** Distribuição da variável densidade de macrófagos por área da adventícia quanto aos grupos **G1**, **GN1** e **controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando CD68 como marcador de macrófagos**

Para os granulócitos, também não se observa diferença significativa entre a densidade média dos grupos controle e HP ( $p=0,911$ ), com resultados descritivos muito semelhantes (Quadro 17). Quando se avalia essa comparação entre os subgrupos G1, GN1 e controle, não se nota diferença significativa entre eles ( $p=0,660$ ), mas de forma descritiva têm-se que os pacientes do subgrupo G1 apresentam menores resultados que os demais grupos (Quadro 17 e Figuras 24 e 25).



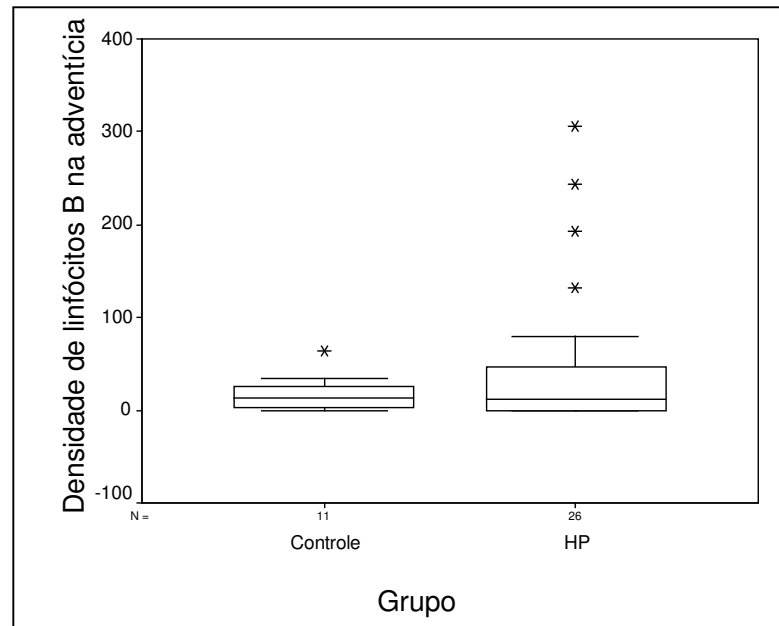


**Figura 24.** Distribuição da variável densidade de granulócitos por área da adventícia quanto aos **grupos HP e controle** (células/mm<sup>2</sup>), considerando **MAC387** como marcador de macrófagos



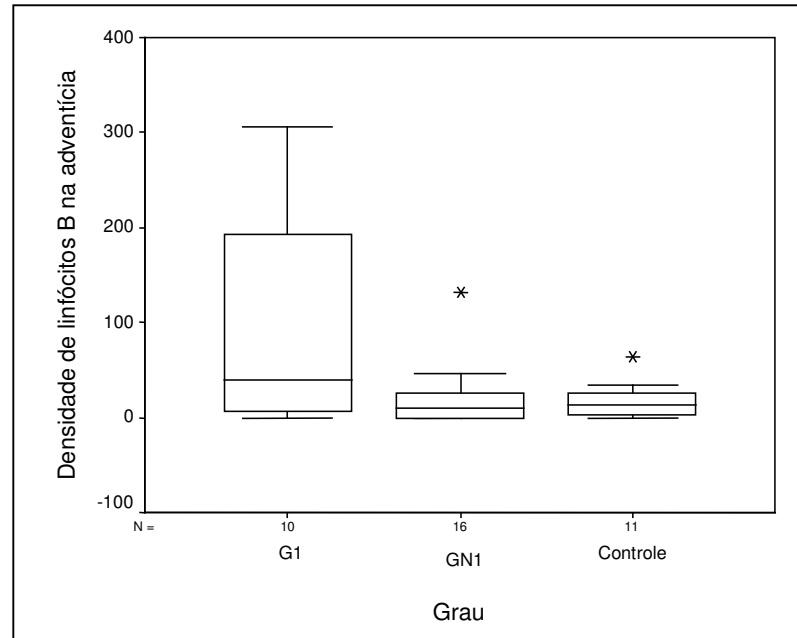
**Figura 25.** Distribuição da variável densidade de granulócitos por área da adventícia quanto aos **subgrupos G1, GN1 e grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>).

Quando se analisam os dados referentes aos linfócitos B, observa-se uma diferença marginalmente significativa entre a densidade média dos grupos controle e HP ( $p=0,084$ ), sendo a primeira menor que a segunda (Quadro 17 e Figura 26).



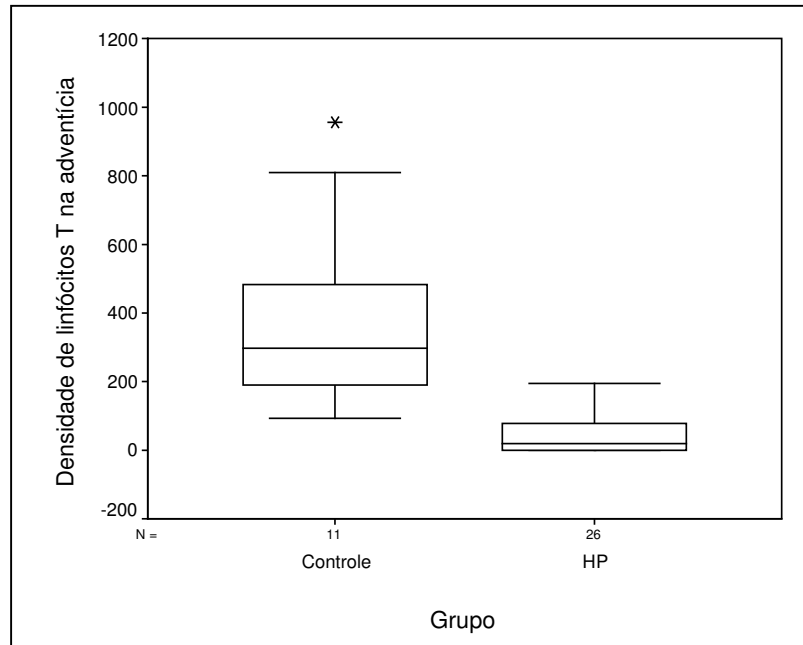
**Figura 26.** Distribuição da variável densidade de linfócitos B por área da adventícia quanto aos **grupos HP e controle** (células/mm<sup>2</sup>).

Quando se avalia essa comparação entre os subgrupos G1, GN1 e controle, nota-se diferença significativa entre eles ( $p=0,015$ ), onde o subgrupo G1 apresenta maior média de densidade que os demais ( $p<0,04$ ) enquanto os subgrupos GN1 e controle não mostram diferença significativa entre si ( $p=0,993$ ) (Quadro 17). Esse resultado está ilustrado na Figura 27.



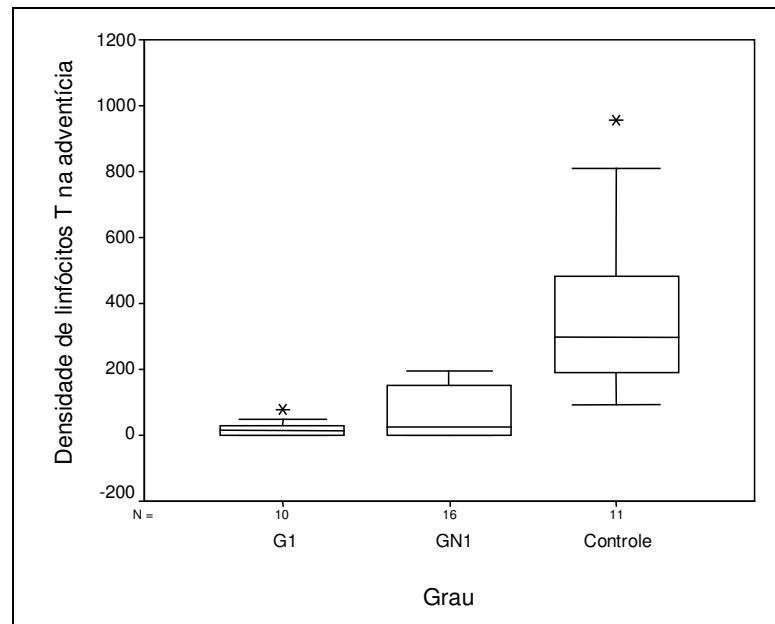
**Figura 27.** Distribuição da variável densidade de linfócitos B por área da adventícia quanto aos **subgrupos G1, GN1 e grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>).

Para os linfócitos T, observa-se que a densidade média do grupo controle é significativamente maior que a do grupo HP ( $p=0,004$ ), como mostra o Quadro 17 e a Figura 28.



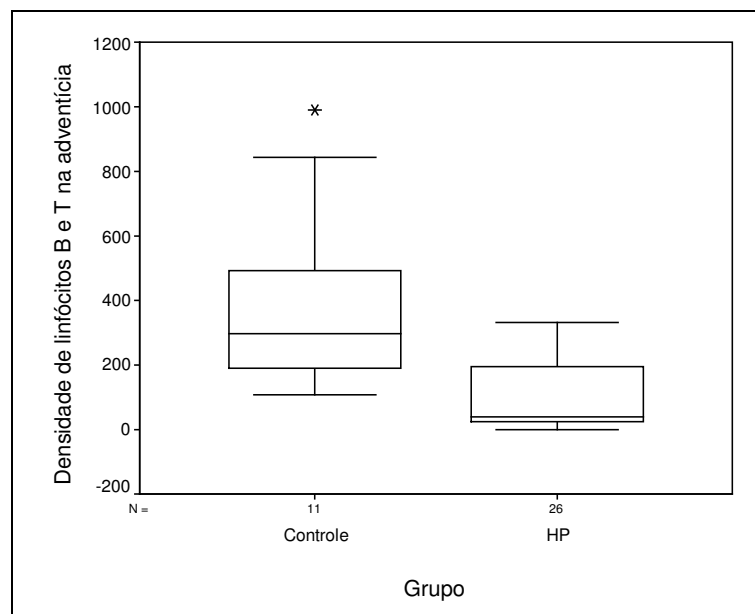
**Figura 28.** Distribuição da variável densidade de linfócitos T por área da adventícia quanto aos **grupos HP e controle**. (células/mm<sup>2</sup>).

Quando se avalia essa comparação entre os subgrupos G1, GN1 e controle, também se observa diferença significativa entre eles ( $p < 0,001$ ), onde o grupo controle apresenta maior média de densidade que os demais ( $p < 0,001$ ) enquanto os subgrupos G1 e GN1 não mostram diferença significativa entre si ( $p = 0,766$ ) (Quadro 17 e Figura 29).



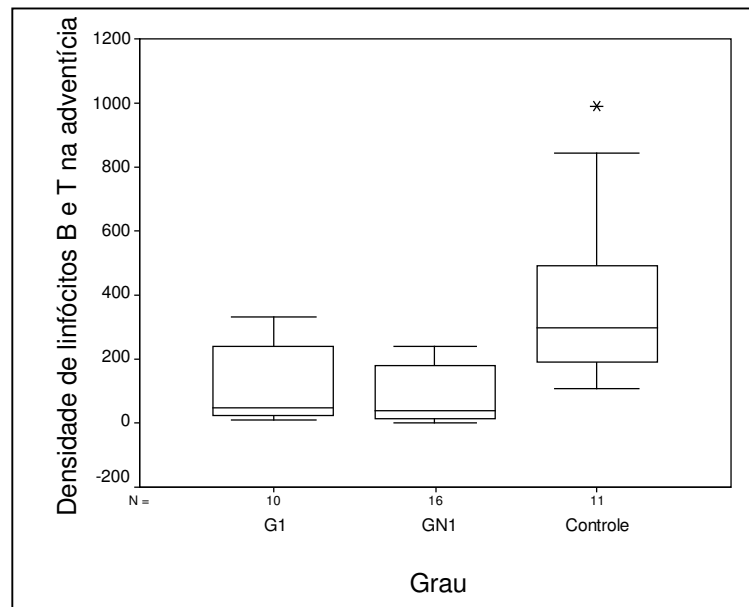
**Figura 29.** Distribuição da variável densidade de linfócitos T por área da adventícia quanto aos **subgrupos G1, GN1 e grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>)

Quando se avaliam conjuntamente as densidades de linfócitos B e T, observa-se que a média do grupo controle é significativamente maior que a do grupo HP ( $p=0,007$ ), como mostra o Quadro 17 e a Figura 30.



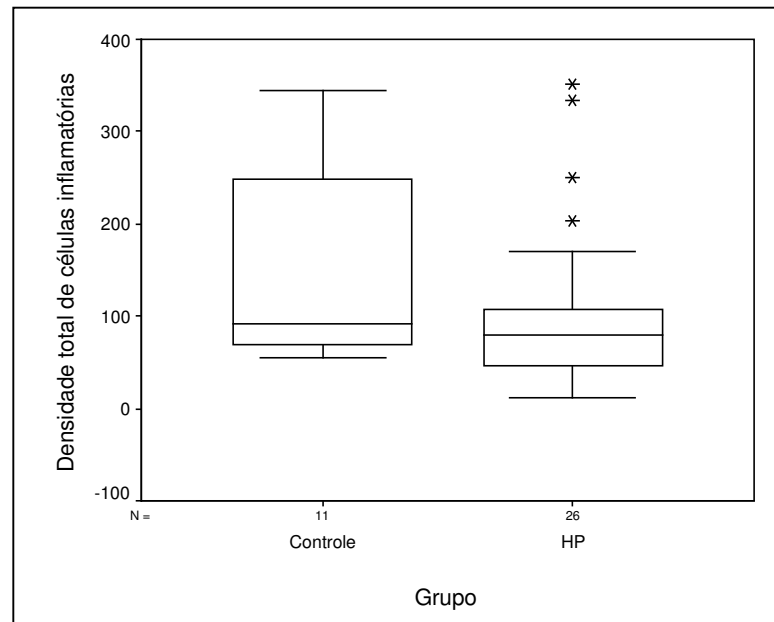
**Figura 30.** Distribuição da variável densidade por área da adventícia quanto aos **grupos HP e controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20+CD3**

Fazendo essa comparação entre os subgrupos G1, GN1 e controle, também se observa diferença significativa entre eles ( $p < 0,001$ ), onde o grupo controle apresenta maior média de densidade que os demais ( $p < 0,01$ ), enquanto os subgrupos G1 e GN1 não mostram diferença significativa entre si ( $p = 0,937$ ) (Quadro 17 e Figura 31).



**Figura 31.** Distribuição da variável densidade de por área da adventícia quanto aos subgrupos G1, GN1 e controle (células/mm<sup>2</sup>), **considerando o somatório CD20+CD3**

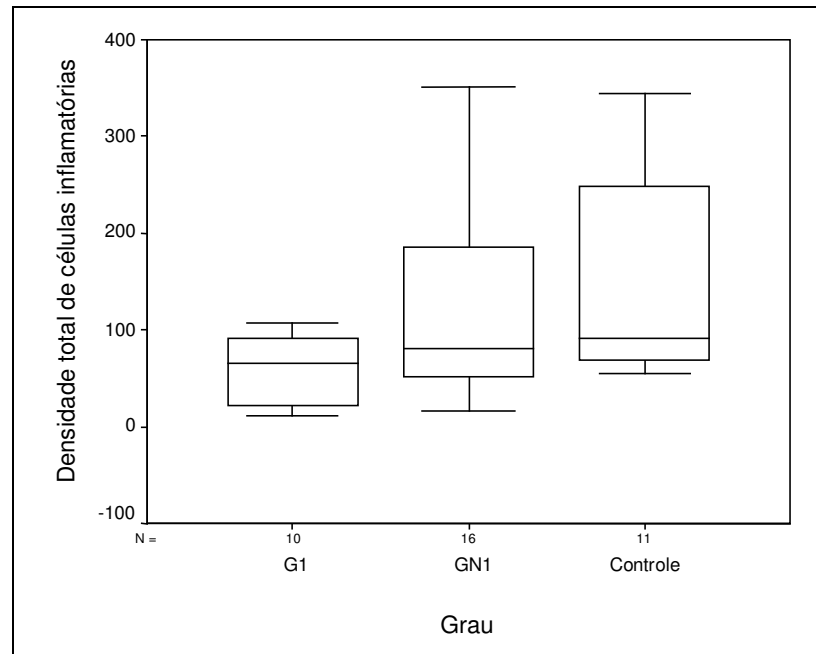
Por fim, quando se avaliam todas as células inflamatórias em estudo pela média das densidades dos macrófagos (marcador MAC387), granulócitos, linfócitos B e linfócitos T (densidade total), não se observa diferença significativa entre a densidade média dos grupos controle e HP ( $p=0,142$ ), destacando que, pelos resultados descritivos, o grupo controle apresenta maiores valores que o HP (Quadro 17 e Figura 32).



**Figura 32.** Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos **grupos HP e controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

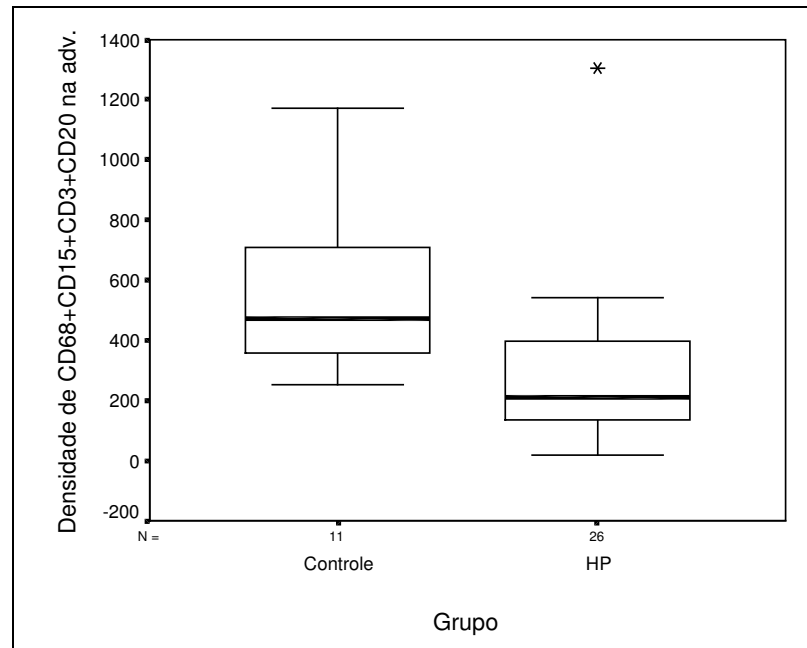
Quando se avalia essa comparação entre os subgrupos G1, GN1 e controle, observa-se uma diferença apenas marginal entre eles ( $p=0,092$ ), onde o subgrupo de pacientes GN1 se destaca por apresentar menores valores que os demais (Quadro 17 e Figura 33).





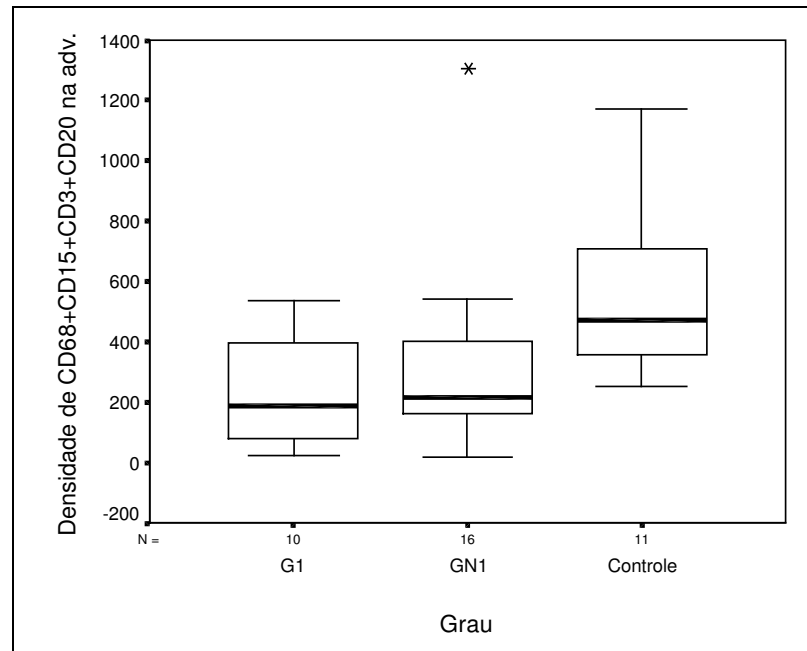
**Figura 33.** Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos **subgrupos G1, GN1 e grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

Quando se avalia a densidade total de células considerando o CD68 como marcador de macrófagos, observa-se uma diferença significativa entre a densidade média do grupo controle e HP ( $p=0,008$ ), destacando a presença de maior número de células no grupo controle (Quadro 17 e Figura 34).



**Figura 34.** Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos **grupos HP e controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando CD68 como marcador de macrófagos**

Quando se compara entre os grupos G1, GN1 e controle observa-se diferença significativa entre o grupo controle e o G1( $p=0,034$ ) e uma diferença marginal em relação ao GN1( $p=0,079$ ), não havendo diferença entre os grupos G1 e GN1( $p=0,999$ ) (Quadro 17 e Figura 35).



**Figura 35.** Distribuição da variável densidade total de células inflamatórias por área da adventícia quanto aos **subgrupos G1, GN1 e grupo controle** (células/mm<sup>2</sup>), **considerando CD68 como marcador de macrófagos**

Vale destacar que todos os objetivos apresentados nessa seção também foram avaliados pelo total de células dividido pelo total de áreas observadas (e não pela densidade média, o que foi denominado simplesmente densidade no decorrer deste trabalho), e os resultados observados foram muito semelhantes aos apresentados acima, levando às mesmas conclusões. Esse fato parece claro, quando se observa a alta correlação entre essas duas variáveis analisadas.

### **4.3. Correlação Entre as Densidades dos Diferentes Tipos de Células Inflamatórias nos Grupos HP, Controle e Subgrupos G1, GN1, e Controle**

#### **4.3.1. Considerando o MAC387 como marcador de macrófagos**

Para verificar possíveis correlações entre as densidades dos tipos de células inflamatórias macrófagos, granulócitos, linfócitos B e linfócitos T nos grupos HP, G1, GN1 e controle, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson dessas densidades duas a duas.

Na Tabela 10, têm-se os resultados desse estudo no grupo controle, onde observa-se associação linear significativa positiva entre a densidade de macrófagos e granulócitos com coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,623 ( $p=0,041$ ), ou seja, pode-se dizer que, quanto maior a densidade de macrófagos em pacientes do grupo controle, maior a densidade de granulócitos, e vice-versa. Da mesma forma pode-se dizer que, de forma significativa, quanto maior a densidade de linfócitos T, maior a densidade de linfócitos B e T nesse grupo (CC de Pearson igual a 0,998 e  $p<0,001$ ), como era esperado. Por outro lado, vale destacar que não existe associação significativa entre os linfócitos B e a avaliação conjunta dos linfócitos B e T (CC de Pearson igual a 0,247 e  $p=0,464$ ), mostrando, mais uma vez, o domínio dos linfócitos T nessa análise conjunta de linfócitos. Associação linear positiva marginalmente significativa foi observada entre as

densidades de macrófagos e linfócitos T (CC de Pearson igual a 0,563 e  $p=0,071$ ) e macrófagos e linfócitos B e T (CC de Pearson igual a 0,560 e  $p=0,073$ ). Nas demais associações entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias, duas a duas, não se observa nenhuma correlação linear significativa.

**Tabela 10.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo  $p$ ) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo controle** ( $n=11$ ), **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

Correlação		MAC387	CD15	CD20	CD3
CD15	CC	<b>0,623</b>			
	$p$	<b>0,041</b>			
CD20	CC	0,067	0,382		
	$p$	0,845	0,246		
CD3	CC	0,563	0,368	0,183	
	$p$	0,071	0,265	0,590	
CD20-+CD3	CC	0,560	0,388	0,247	<b>0,998</b>
	$p$	0,073	0,238	0,464	<b>&lt;0,001</b>

Na Tabela 11, têm-se os resultados desse estudo no grupo HP, onde se observa associação linear significativa positiva somente entre cada um dos linfócitos B e T e os linfócitos B e T avaliados conjuntamente ( $p<0,001$ ), como naturalmente é de se esperar, uma vez que a segunda variável é a soma das primeiras. Nas demais associações entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias, duas a duas, não se observa nenhuma correlação linear significativa.

**Tabela 11.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo HP (n=26)**, considerando **MAC387 como marcador de macrófagos**

Correlação		MAC387	CD15	CD20	CD3
CD15	CC	0,303			
	p	0,133			
CD20	CC	-0,027	0,069		
	p	0,896	0,737		
CD3	CC	0,029	0,129	-0,021	
	p	0,888	0,529	0,919	
CD20-+CD3	CC	-0,002	0,138	<b>0,759</b>	<b>0,635</b>
	p	0,993	0,502	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

Dentro do grupo HP, de acordo com o grau histológico, obteve-se os resultados que constam das Tabelas 12 e 13.

**Tabela 12.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo HP - subgrupo G1 (n=10)**, considerando **MAC387 como marcador de macrófagos**

Correlação		MAC387	CD15	CD20	CD3
CD15	CC	-0,027			
	p	0,940			
CD20	CC	-0,348	0,021		
	p	0,324	0,954		
CD3	CC	-0,064	-0,557	<b>0,641</b>	
	p	0,860	0,095	<b>0,046</b>	
CD20-+CD3	CC	-0,314	-0,089	<b>0,989</b>	<b>0,748</b>
	p	0,377	0,807	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,013</b>

**Tabela 13.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo HP - subgrupo GN1** (n=16), **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

Correlação		MAC387	CD15	CD20	CD3
CD15	CC	0,290			
	p	0,276			
CD20	CC	<b>0,717</b>	0,477		
	p	<b>0,002</b>	0,062		
CD3	CC	-0,122	0,141	0,020	
	p	0,652	0,603	0,940	
CD20-+CD3	CC	0,159	0,310	0,397	<b>0,926</b>
	p	0,557	0,243	0,128	<b>&lt;0,001</b>

Para avaliar a existência de associação entre as densidades e a idade na sua forma contínua, realizou-se uma análise de correlação como descrito inicialmente e na seção anterior. Os coeficientes de correlação de Pearson e respectivo “p” da análise de associação de cada uma das densidades de células inflamatórias e a idade estão apresentados na Tabela 14, onde se observa associação negativa significativa entre idade e linfócitos T no grupo HP e entre idade e linfócitos B e T no grupo GN1, ou seja, nesses casos temos que, quanto maior a idade menor a densidade de linfócitos T e linfócitos B e T nos grupos HP e GN1, respectivamente. Nos demais casos, não se observa associações significativas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 14.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre diferentes tipos de células inflamatórias e a idade (em meses) em cada um dos grupos controle, HP, G1 e GN1

Grupo	Correlação da Idade com densidades de células inflamatórias	Mac387	CD68	CD15	CD20	CD3	CD20+ CD3
Controle (n=11)	CC	-0,201	-0,540	0,048	0,077	0,157	0,160
	P	0,554	0,086	0,888	0,822	0,644	0,638
HP (n=26)	CC	-0,295	-0,241	-0,323	-0,088	<b>-0,388</b>	-0,320
	P	0,144	0,237	0,108	0,671	<b>0,050</b>	0,111
G1 (n=10)	CC	0,065	-0,575	-0,457	-0,325	-0,105	-0,301
	P	0,859	0,082	0,184	0,359	0,774	0,397
GNI (n=16)	CC	-0,279	-0,101	-0,248	-0,319	-0,430	<b>-0,515</b>
	P	0,295	0,708	0,355	0,229	0,097	<b>0,041</b>

#### 4.3.2. Considerando o CD68 como marcador de macrófagos

Com a mesma metodologia estatística utilizada anteriormente, nota-se nas Tabelas 15 e 16, tanto no grupo controle como no grupo HP, que não houve correlação significativa entre os diversos tipos celulares.



**Tabela 15.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades de macrófagos marcados pelo CD68 e os diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo controle** (n=11)

Correlação		CD68
MAC387	CC	-0,035
	P	0,919
CD15	CC	-0,280
	P	0,405
CD20	CC	-0,119
	P	0,728
CD3	CC	-0,328
	P	0,325

**Tabela 16.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades de macrófagos marcados pelo CD68 e os diferentes tipos de células inflamatórias no grupo no **grupo HP** (n=26)

Correlação		CD68
MAC387	CC	<b>0,522</b>
	P	<b>0,006</b>
CD15	CC	-0,020
	P	0,921
CD20	CC	0,015
	P	0,941
CD3	CC	0,293
	P	0,146

Quando se subdivide em subgrupos G1 e GN1, nota-se correlação entre CD68 e CD15 no subgrupo G1 ( $p=0,048$ ); no subgrupo GN1, não se observa correlação entre os diversos marcadores. (Tabelas 17 e 18).

**Tabela 17.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no **subgrupo G1** (n=10)

Correlação		Mac387	CD68	CD15	CD20	CD3
CD68	CC	0,130				
	P	0,721				
CD15	CC	-0,027	<b>0,637</b>			
	P	0,940	<b>0,048</b>			
CD20	CC	-0,348	0,169	0,021		
	P	0,324	0,641	0,954		
CD3	CC	-0,064	-0,314	-0,557	<b>0,641</b>	
	P	0,860	0,378	0,095	<b>0,046</b>	
CD3 + CD20	CC	-0,314	0,086	-0,089	<b>0,989</b>	<b>0,748</b>
	P	0,377	0,814	0,807	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,013</b>

**Tabela 18.** Coeficiente de correlação (CC) de Pearson (e respectivo p) entre as densidades dos diferentes tipos de células inflamatórias no **subgrupo GN1** (n=26)

Correlação		MAC387	CD68	CD15	CD20	CD3
CD68	CC	<b>0,529</b>				
	P	<b>0,035</b>				
CD15	CC	0,290	-0,141			
	P	0,276	0,604			
CD20	CC	<b>0,717</b>	0,167	<i>0,477</i>		
	P	<b>0,002</b>	0,536	<i>0,062</i>		
CD3	CC	-0,122	0,296	0,141	0,020	
	P	0,652	0,265	0,603	0,940	
CD3 + CD20	CC	0,159	0,335	0,310	0,397	<b>0,926</b>
	P	0,557	0,204	0,243	0,128	<b>&lt;0,001</b>

#### 4.4. Células Inflamatórias na Parede (túnicas média e íntima)

##### 4.4.1. Comparações dentro de cada grupo

##### 4.4.1.1. Considerando MAC387 como marcador de macrófagos

Os Quadros 18 e 19 mostram, respectivamente, os resultados das comparações entre os índices de diferentes tipos de células inflamatórias, infiltrando a parede nos grupos controle e HP.

**Quadro 18.** Resultados do teste não paramétrico de Friedman para comparar a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo controle, considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,264	Não existe diferença nas distribuições dos índices das células MAC, CD20 e CD3.
----------------	---------	---

No grupo HP, o índice de macrófagos infiltrantes marcados pelo MAC387 foi maior que o das células marcadas com CD20 (p=0,003) e CD3 (p=0,001) (Quadro 19).

**Quadro 19.** Resultados do teste não paramétrico de Friedman para comparar a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo HP, considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p<0,001	Existe pelo menos uma diferença entre as distribuições dos índices das células MAC, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
MAC x CD3	p=0,001	O índice MAC apresenta maiores valores que o índice CD3.
MAC x CD20	p=0,003	O índice MAC apresenta maiores valores que o índice CD20.
CD 20 x CD3	p=0,083	Os índices CD20 e CD3 apresentam valores semelhantes.

#### 4.4.1.2. Considerando CD68 como marcador de macrófagos

Utilizando CD68 como marcador de macrófagos, aplicou-se a mesma metodologia descrita anteriormente. Testou-se a diferença de índices dentro de cada grupo (Quadro 20 e Figura 36).

**Quadro 20.** Resultado do teste não paramétrico de Friedman para a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo controle, considerando CD68 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,087	Não existe diferença nas distribuições dos índices das células CD68, CD15, CD20 e CD3.
----------------	---------	--

No grupo HP, o índice de macrófagos infiltrantes marcados pelo CD68 foi semelhante ao das células marcadas com CD15 (p=0,209), e maior que as marcadas com CD20 (p=0,003) e linfócitos T(p=0,022) (Quadro 21 e Figura 36).

**Quadro 21.** Resultado do teste não paramétrico de Friedman para a distribuição do índice de diferentes tipos de células inflamatórias no **grupo HP, considerando CD68 como marcador de macrófagos**

H <sub>0</sub>	p=0,001	Existe pelo menos uma diferença entre as distribuições dos índices das células CD68, CD15, CD20 e CD3.
<b>Comparações 2 a 2 – Tipo de célula inflamatória</b>		
CD68 x CD15	p=0,209	Os índices CD68 e CD15 apresentam valores semelhantes.
CD68 x CD3	p=0,022	O índice CD68 apresenta maiores valores que o índice CD3.
CD68 x CD20	p=0,003	O índice CD68 apresenta maiores valores que o índice CD20.
CD15 x CD20	p=0,096	Os índices CD20 e CD15 apresentam valores semelhantes.
CD15 x CD3	p=0,005	O índice CD15 apresenta maiores valores que o índice CD3.
CD 20 x CD3	p=0,083	Os índices CD20 e CD3 apresentam valores semelhantes.

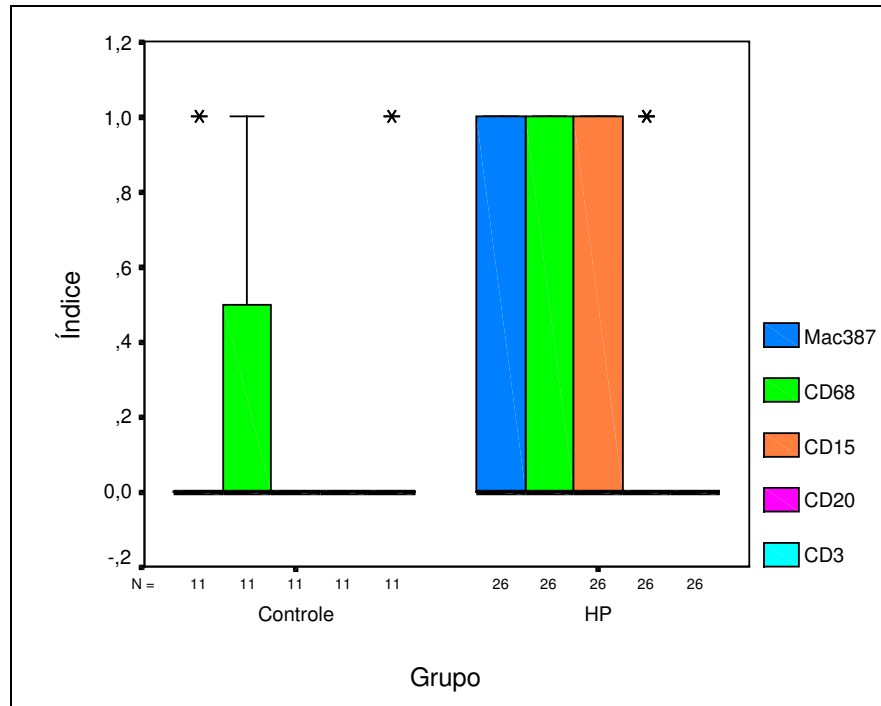
#### 4.4.2. Comparações entre grupos

Quando se comparam os índices de cada célula entre grupos HP e controle, não se observam diferenças significativas entre os dois, o mesmo ocorrendo quando se comparam os subgrupos G1, GN1 e controle (Quadro 22).

**Quadro 22.** Resultados das comparações dos grupos HP x Controle (testes de Mann-Whitney) e dos grupos GI x GNI x Controle (Kruskal-Wallis), quanto ao índice de cada tipo de célula inflamatória em estudo.

Índice	Comparações	p
MAC387	HP x Controle	0,170
	GI x GNI x Controle	0,156
CD68	HP x Controle	0,501
	GI x GNI x Controle	0,355
CD15	HP x Controle	0,150
	GI x GNI x Controle	0,096
CD20	HP x Controle	0,589
	GI x GNI x Controle	0,125
CD3	HP x Controle	0,402
	GI x GNI x Controle	0,088
MAC387+CD20+CD3	HP x Controle	0,270
	GI x GNI x Controle	0,245
CD68+CD15+CD20+CD3	HP x Controle	0,216
	GI x GNI x Controle	0,174

A Figura 36 mostra a distribuição do número de artérias positivas para células infiltrantes na camada média nos grupos HP e controle, e a distribuição do índice proposto para os diferentes tipos de células inflamatórias presentes na parede. O índice total foi definido pela soma dos índices de todos os tipos de células inflamatórias.



**Figura 36.** Box Plots dos índices das células inflamatórias (ICI) quanto aos grupos HP e controle

Pela grande concentração de valores iguais a zero nesses índices, avaliou-se o índice geral de forma qualitativa considerando as categorias “iguais a zero” ou “maior que zero”. A distribuição desse índice quanto aos grupos está apresentada na Tabela 19.

**Tabela 19.** Distribuição das freqüências do índice geral (soma de índices) em relação ao grupo, **considerando MAC387 como marcador de macrófagos**

Índice Geral	Grupo				Total	
	Controle		HP			
	N	%	n	%	n	%
<b>igual ao</b>	8	72,7	14	53,8	22	56,8
<b>maior que zero</b>	3	27,3	12	46,2	15	43,2
<b>Total</b>	11	100	26	100	37	100

Teste exato de Fisher:  $p=0,465$

Na Tabela 19, observa-se que, no grupo controle, a maioria dos pacientes apresentam esse índice nulo (72,7%) e que no grupo HP, existe um equilíbrio entre pacientes com esse índice nulo ou positivo. No entanto, quando é testada essa associação pelo teste exato de Fisher, conclui-se que não existe associação significativa.

Da mesma forma, pela grande concentração de valores iguais a zero nesses índices, avaliou-se o índice geral de forma qualitativa, considerando as categorias “iguais a zero” ou “maior que zero”. A distribuição desse índice quanto aos grupos está apresentada na Tabela 20.



**Tabela 20.** Distribuição de freqüências do índice geral em relação ao grupo, considerando CD68 como marcador de macrófagos

Índice Geral	Grupo				Total	
	Controle		HP			
	n	%	n	%	n	%
<b>igual a 0</b>	7	63,6	12	46,2	19	51,4
<b>maior que 0</b>	4	36,4	14	53,8	18	48,6
<b>Total</b>	11	100	26	100	37	100

Teste exato de Fisher:  $p=0,476$

Na Tabela 20, observa-se que, no grupo controle, a maioria dos pacientes apresentam esse índice nulo (63,6%) e que no grupo HP existe um equilíbrio entre pacientes com índice nulo e positivo (46,2% e 53,8% respectivamente). No entanto, quando se aplica o teste exato de Fisher, conclui-se que não existe associação significativa entre o índice geral categórico e os grupos controle e HP ( $p=0,476$ ).

#### 4.5. Análise de células na presença de lesões plexiformes

Foram identificadas artérias com presença de lesões plexiformes em 5 casos, e nelas quantificaram-se as células inflamatórias presentes. Em 2 casos (40%), não se observa a presença de macrófagos, granulócitos ou linfócitos. Vale ressaltar que, em determinados casos, as lesões plexiformes foram encontradas em uma determinada lâmina e não em outra. Isto se deve ou a artefatos técnicos (corte dobrado, por exemplo) ou então ao caráter

focal desse tipo de lesão no tecido pulmonar, aparecendo em um nível, mas não nos demais (Tabela 21).

**Tabela 21.** Análise dos casos com presença de artérias com lesões plexiformes em relação ao número de células inflamatórias marcadas

Marcadores	Casos				
	B98515	B98759	B981259	B982417	B991565
<b>MAC387</b> n <sup>o</sup> art	0	1	1	3	2
n <sup>o</sup> cél	0	0	3	15	6
<b>CD20</b> n <sup>o</sup> art	3	1	3	7	1
n <sup>o</sup> cél	0	0	0	2	3
<b>CD15</b> n <sup>o</sup> art	2	1	2	3	2
n <sup>o</sup> cél	0	0	0	1	2
<b>CD3</b> n <sup>o</sup> art	2	1	2	1	2
n <sup>o</sup> cél	1	0	0	0	12
<b>CD68</b> n <sup>o</sup> art	3	0	0	1	4
n <sup>o</sup> cél	0	0	0	1	5

n<sup>o</sup>art = número de artérias com lesões plexiformes; n<sup>o</sup> cel = número total de células inflamatórias dentro de lesões plexiformes

***Discussão***

---

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Introdução**

A hipertensão pulmonar secundária a cardiopatias congênitas é uma doença de origem multifatorial, cuja patogenia não está completamente esclarecida. Enquanto a associação entre processo inflamatório e alteração vascular na aterosclerose já se encontra bem estabelecida, na hipertensão pulmonar também foi descrita a presença de células inflamatórias na parede dos vasos, mas sem um papel completamente definido. Descreveu-se particularmente a presença delas nas lesões plexiformes<sup>56</sup>. Quando a hipertensão pulmonar é secundária a defeitos cardíacos congênitos que exibem hiperfluxo pulmonar, apresenta algumas peculiaridades decorrentes da congestão parenquimatosa. As crianças são mais propícias a infecções pulmonares de repetição. A sugestiva relação entre a trinômia infecção pulmonar de repetição-processo inflamatório-hipertensão pulmonar é que nos estimulou a desenvolver este estudo.

## 5.2. Considerações Gerais Sobre a Amostra

Observando-se a característica da amostra podemos classificar este estudo como retrospectivo. Nota-se a presença de casos de cardiopatias simples e complexas, apresentando defeitos que podem levar a hipertensão pulmonar por aumento da pré-carga ou pós-carga. Em um caso não foi encontrado o prontuário para confirmação diagnóstica, por ser uma solicitação de biópsia externa pertencente a outro serviço (caso 13). Pelo mesmo motivo, em dois casos não foram encontrados os dados hemodinâmicos (casos 11 e 13). Outros não foram submetidos a estudo hemodinâmico (casos 4, 15, 20, 22 e 23).

Três casos eram portadores de Síndrome de Down (casos 7, 11 e 15). Nove casos eram portadores de defeitos na formação conotruncal e anomalias do arco aórtico (casos 1, 2, 8, 12, 14, 16, 17, 18 e 23).

Nota-se um grupo controle mais jovem que o grupo HP, devido à dificuldade de obtenção de tecido pulmonar, seja de biópsias ou necropsias, de crianças sem doença cardiovascular. Mesmo assim, não houve diferença estatística entre eles no que se refere às idades, o que os torna comparáveis. Outro fator que torna os grupos comparáveis foi a qualidade do material quanto à coleta e fixação, tanto nos pacientes como nos controles. A escolha de casos bem fixados e com pouco tempo de óbito (no caso dos controles), revelou-se pela adequada marcação imunohistoquímica de antígenos de superfície de células inflamatórias nos dois grupos.

Ainda quanto à idade, pode-se observar que, dentro do grupo HP, a média de idade dos pacientes de GN1 foi menor que a média do G1. Isto pode ser interpretado como um viés da amostragem, uma vez que se esperaria que os pacientes mais jovens apresentassem lesões consideradas menos graves. Todavia, acredita-se que este achado seja porque os casos mais graves são biopsiados mais precocemente, enquanto os casos que aparentemente, apesar da idade, não apresentam sinais clínicos de HP grave, são biopsiados para confirmação diagnóstica.

Poderia-se também considerar um viés de amostragem a presença em nosso estudo de pressão na artéria pulmonar mais elevada no G1 em relação ao GN1, já que se esperaria encontrar pressão mais elevada nos pacientes com graus mais avançado de hipertensão pulmonar, embora estatisticamente não tenha sido relevante ( $p=0,48$ ).

### **5.3. Inflamação e Doenças Vasculares – discussão dos resultados**

Em determinados locais da parede arterial, como ramos, bifurcações e curvaturas, existem alterações características no fluxo do sangue, incluindo decréscimo no estresse de parede e aumento da turbulência. Há nesses sítios fatores específicos no endotélio que são responsáveis pela aderência, migração e acúmulo de monócitos e células T.

A resposta inflamatória em cada tecido ou órgão depende da sua própria característica celular e arquitetura, do suprimento linfático e

sanguíneo e dos agentes naturais que o agridem. No processo aterosclerótico, descreveu-se em trabalhos como de Kovanen e cols<sup>25</sup> que nos locais de erosão da placa há um aumento de macrófagos e linfócitos T em números absolutos, tanto no local da lesão como no tecido adjacente representado pela adventícia desses vasos. Analogamente ao observado na nesta casuística, a incidência de macrófagos foi maior que a de linfócitos T na adventícia vascular dos indivíduos com doença vaso-oclusiva pulmonar. As densidades celulares descritas por Laine e cols<sup>27</sup>, estudando adventícia de artérias coronárias com aterosclerose, foram da ordem de 200 linfócitos T/mm<sup>2</sup> e 474 macrófagos/mm<sup>2</sup>. Essas quantidades são maiores que as observadas no presente estudo (248 macrófagos/mm<sup>2</sup> e 51 linfócitos T/mm<sup>2</sup>).

No território vascular pulmonar, estudos imunohistoquímicos como de Botney e cols<sup>5</sup> confirmaram a presença de macrófagos na neoíntima de placas ateroscleróticas de artérias pulmonares lobares de pacientes com hipertensão pulmonar, porém sem quantificação celular objetiva, o que torna impossível a comparação com nossos resultados.

Vários fatores secretados pelos macrófagos são capazes de estimular a produção da matriz extracelular presente na neoíntima, como TGF- $\beta$ 1, fatores de crescimento e citocinas entre outros. Trabalhos como de Balabanian e cols<sup>3</sup> e Dorfmueller e cols<sup>11</sup> sugerem ter o processo inflamatório um importante papel na gênese na hipertensão pulmonar, principalmente na forma conhecida como “primária”. Além do encontro de células inflamatórias nas paredes vasculares, foi detectado um maior recrutamento delas pela ação local de citocinas derivadas de células endoteliais.

Não se pode afirmar ou descartar definitivamente que o simples achado dessas células na adventícia possa estar relacionado ao desenvolvimento da hipertensão pulmonar, nem que as quantidades ali encontradas reflitam a realidade dos leucócitos do sangue periférico. Assim, se acha necessária a comparação com um grupo controle.

Os achados apontam, no geral, para a não ocorrência de inflamação na parede de artérias pulmonares periféricas nesse tipo de hipertensão pulmonar, uma vez que a comparação com os controles revelou, pelo contrário, número menor de células adventiciais nos pacientes hipertensos. Esse achado pode refletir uma resposta inflamatória deficiente nos pacientes com cardiopatias congênitas, como será discutido mais adiante.

Encontrou-se, além disso, diferenças relativas aos tipos celulares presentes, e talvez esses aspectos possam de alguma forma estar ligados à doença ou às conseqüências do hiperfluxo pulmonar.

Pode-se observar, na coleta de dados em prontuários, que no período da realização das biópsias, os pacientes não apresentavam quadro infeccioso, justificável por ser um procedimento invasivo e eletivo. Assim, o risco de pacientes com infecção concomitante com o procedimento é praticamente nulo. Por outro lado, não foi possível avaliar, devido à ausência de informação específica disponível, sobre o período de tempo decorrido desde o último episódio infeccioso, o que varia de caso a caso.

Tentou-se ainda avaliar, em nossa casuística, a presença de BALT (“bronchial associated lymphoid tissue”), e a possível associação entre



a quantidade de células inflamatórias na parede dos brônquios, no parênquima pulmonar propriamente dito e na parede das artérias. Houve limitações técnicas que impossibilitaram esta análise, principalmente relacionadas ao grau de insuflação do parênquima pulmonar, variável de um caso para outro e à falta de delimitação precisa do tecido conjuntivo peri-brônquico e o parênquima adjacente. Além disso, nos espécimes de biópsias de pacientes com hipertensão pulmonar, o tamanho dos bronquíolos amostrados era pequeno, e apenas raramente se encontrou em suas paredes nódulos ou tecido linfóide bem estruturado que atendesse à definição de BALT.

### **5.3.1. Macrófagos**

#### **5.3.1.1. Marcadores imunohistoquímicos de macrófagos e sua especificidade**

Durante o desenvolvimento do trabalho, utilizou-se primeiramente o marcador MAC387 para macrófagos. Todavia, ao verificou-se a não especificidade completa do anticorpo para esse tipo celular, uma vez que outras células mielóides também são coradas, buscou-se um marcador mais específico. Dentre vários disponíveis no mercado, o CD68 (clone PGM1) é descrito como o mais específico e que potencialmente marcaria todos os

macrófagos teciduais<sup>12</sup>. Dados disponíveis na literatura, entretanto, são controversos a respeito dessa afirmação. Luciano e cols<sup>29</sup>, em trabalho experimental, demonstraram que o clone PGM1 do CD68 marcou macrófagos residentes, maduros, enquanto o MAC387 foi encontrado em macrófagos teciduais recentemente recrutados do sangue circulante. Outros autores<sup>51</sup> já haviam destacado que o antígeno leucocitário L1 (ou calprotectina) reconhecido pelo anticorpo MAC387, é expresso em um estágio precoce da diferenciação macrofágica, reforçando a idéia de que as células MAC387 positivas são mais jovens que os macrófagos residentes. O'Laughlin e cols<sup>39</sup> também já tinham demonstrado que macrófagos em diferentes situações de inflamação tecidual (recente, granulomatosa, etc.) demonstram diferenças antigênicas consideráveis.

A opção de mostrar os resultados de quantificação com dois tipos de marcador de macrófagos justifica-se pela não existência de consenso sobre especificidade dos anticorpos, além de ter propiciado a oportunidade de discriminação de células dessa linhagem recentemente recrutadas. A nosso ver, esse último aspecto tem grande importância no contexto da doença que estamos estudando, uma vez que infecções pulmonares de repetição levariam ao recrutamento contínuo de células a partir do sangue circulante.

### 5.3.1.2. Quantificação de macrófagos adventiciais e na parede

No grupo controle do presente estudo, os macrófagos foram o segundo tipo celular mais prevalente após os linfócitos. Já no grupo HP, houve um predomínio estatisticamente significativo de células marcadas pelo MAC387 (macrófagos recentemente recrutados), com uma densidade maior que todos os outros tipos celulares.

Quando se rotulou os macrófagos pelo anticorpo CD68, por outro lado, não se observou no grupo de pacientes hipertensos nenhuma diferença estatística entre as células quantificadas.

É possível que essa diferença de resultados, de acordo com o marcador utilizado, reflita diferentes estados de maturação desse tipo celular na parede de artérias pulmonares de pacientes do grupo HP.

Outra hipótese para a diferença detectada é a possível inclusão de algumas células mielóides na quantificação de preparados marcados pelo MAC387. Por este motivo, não se incluiu nas comparações intra-grupo os resultados da quantificação com o marcador CD15.

Os polimorfonucleares claramente identificados não foram contados, e a maioria das células positivas apresentou morfologia de macrófagos nas lâminas submetidas ao anticorpo MAC387.

De qualquer forma, ambos os tipos celulares rotulados por esse anticorpo (macrófagos jovens e polimorfonucleares) são aqueles primeiramente recrutados em processos inflamatórios.

Os macrófagos, juntamente com os linfócitos T auxiliares, são os tipos celulares que mais produzem citocinas. Estes ativam uma rede de células e, entre as numerosas respostas fisiológicas, está a indução à resposta inflamatória e à proliferação celular <sup>26</sup>.

Não é possível determinar, em bases morfológicas, a razão do predomínio de macrófagos no grupo HP. Poderia-se supor que esse predomínio se deu apenas por uma redução numérica de linfócitos T conseqüente a uma deficiência própria desses pacientes, ou a um real aumento deste tipo celular. Todavia, a comparação da densidade média entre os grupos não revelou diferença estatística, mas uma significância “limítrofe” ( $p=0,064$ ) quando se utilizou o marcador MAC387, refletindo uma tendência a um maior número de macrófagos justamente no grupo com lesões proliferativas da íntima.

Outra opção para explicar um maior acúmulo desse tipo celular, seria uma falha no mecanismo pelo qual macrófagos usualmente induzem à proliferação e diferenciação de linfócitos T.

Com os achados de que se dispõe, não é possível concluir se os macrófagos presentes no grupo HP estão ou não ativados, e se sua produção de citocinas é comparável à encontrada no controles.

Estudos com outros marcadores seriam úteis para o esclarecimento dessas questões.

Outro achado digno de nota foi a prevalência, no grupo hipertenso apenas, de macrófagos e granulócitos infiltrando as túnicas média e íntima.

Esse processo de migração é conseqüência de recrutamento celular para áreas de inflamação.

É ainda possível especular sobre a possível influência de infecções respiratórias recorrentes sobre os achados em questão.

### **5.3.2. Linfócitos B**

Sabe-se que esse tipo celular está envolvido na imunidade humoral, mediando a produção de anticorpos em resposta a diferentes antígenos. Linfócitos B são células produzidas na medula óssea e necessitam de citocinas provenientes das células estromais medulares para sua maturação. A ativação dos linfócitos B primitivos pode ser dependente ou não de interação com linfócitos T. Antígenos capazes de ativar linfócitos B diretamente incluem polissacárides da parte externa da parede de bactérias Gram-negativas, além de ácidos nucléicos bacterianos.

Uma possível associação da prevalência desse tipo de célula inflamatória com lesões vasculares menos graves do ponto de vista histológico (só hipertrofia), como encontrado neste estudo, necessita de esclarecimento.

### **5.3.3. Linfócitos T**

Tanto a proporção como a densidade celular total foram maiores no grupo controle. Também não se conseguiu explicar definitivamente a razão para este predomínio. Uma possibilidade para a diminuição desses linfócitos no grupo com HP seriam as anormalidades imunológicas descritas em certos grupos de pacientes com cardiopatias congênitas (ver discussão abaixo).

### **5.3.4. Granulócitos**

Os granulócitos são células que, quando presentes, caracterizam um processo inflamatório agudo.

Nesta casuística, quando rotulados individualmente (CD15), esses elementos celulares não estiveram presentes em quantidades significativamente diferentes na adventícia arterial dos indivíduos com hipertensão pulmonar. Todavia, juntamente com os macrófagos, como já discutido anteriormente, foram encontrados atravessando a túnica média arterial em número maior que os outros tipos celulares.

#### **5.4. Relação das Células Inflamatórias e Grau de Lesão Vaso-oclusiva**

Não se detectou prevalência estatisticamente significativa entre as células inflamatórias no grupo com hipertrofia isolada da média (G1), apesar de haver maior densidade de macrófagos e linfócitos B.

Já no grupo com lesões proliferativas da íntima (GN1), houve predominância estatística de macrófagos jovens, fazendo supor que talvez esse tipo celular tenha algum papel na evolução da doença vaso-oclusiva, possivelmente relacionado à produção de citocinas que atuariam como estimuladoras da proliferação celular como um todo.

Outra característica que se observa no grupo HP, diferentemente do grupo controle, foi uma correlação negativa entre as densidades dos diferentes tipos de células em relação à idade (embora mostrando coeficientes com significância estatística apenas quanto a linfócitos T para o grupo como um todo e para a soma de linfócitos B e T no subgrupo com hipertrofia isolada da túnica média (G1). A interpretação desse achado é totalmente especulativa. Especula-se se uma diminuição das infecções respiratórias, com o passar da idade, pela redução do hiperfluxo decorrente do próprio estabelecimento das lesões oclusivas mais graves, seria uma possibilidade. Alternativamente, este fato poderia ser explicado por uma progressão temporal no déficit de linfócitos T nesse grupo de doentes.

### **5.5. Células Inflamatórias no Interior de Lesões Plexiformes**

Diferentemente dos achados de Tuder e cols<sup>56</sup> em casos de hipertensão pulmonar primária, nos pacientes deste estudo a incidência de células inflamatórias no interior de lesões plexiformes foi muito baixa. Acredita-se que o motivo seja o tempo de evolução dessas lesões nos nossos pacientes, e possivelmente um quadro mais florido e mais “agudo” de lesão vascular nos pacientes com hipertensão primária. Além disso, o número de casos com esse tipo de lesão dilatada foi muito pequeno, impedindo qualquer comparação com outros pacientes.

### **5.6. Correlações entre densidades de células inflamatórias**

Na resposta inflamatória habitual, a diferenciação e maturação linfocitária é induzida por citocinas produzidas pelos macrófagos, e portanto as quantidades dessas células estariam relacionadas quantitativamente no tempo<sup>26</sup>. Os resultados não apontam para correlações significativas entre tipos celulares diferentes, a não ser entre células MAC387 e CD15 positivo no grupo controle.



### 5.7. Perfil Imunológico nas Cardiopatias Congênitas

Crianças portadoras de defeitos cardíacos congênitos com imunodeficiência associada foram primeiramente observadas na Síndrome de DiGeorge, que é caracterizada principalmente por ausência ou hipoplasia do timo e da glândula paratireóide, dimorfismo facial e defeitos cardiovasculares, particularmente envolvendo o arco aórtico e a conexão ventrículo-arterial. Posteriormente, foi detectada alteração no perfil imunológico de pacientes portadores de defeitos cardíacos derivados de falhas no desenvolvimento da crista neural<sup>48</sup>. Recentemente, estudos evidenciaram comprometimento da resposta imune em pacientes com alterações em regiões do cromossomo 22q11.2<sup>54</sup>. Esse cromossomo é responsável pelas manifestações da Síndrome de DiGeorge/Síndrome Velocardiofacial. Por outro lado, Sullivan e cols demonstraram também uma alteração em uma região do mesmo cromossomo na Tetralogia de Fallot<sup>22</sup>. As alterações imunológicas foram encontradas nos níveis de imunoglobulinas séricas, complementos (C3 e C4), células B e células T no sangue periférico. Ficou bem caracterizada a diminuição da porcentagem de células T totais e T auxiliaadoras, o que não foi visto e células T supressoras.

Khalil e cols<sup>23</sup>, analisando o comportamento do sistema imunológico de portadores de cardiopatia congênitas, dividiram os pacientes em 2 grupos: acianóticos e cianóticos, separando no primeiro (cianóticos), aqueles com defeitos conotrunciais, e no segundo (acianóticos) aqueles com “shunt” de esquerda para direita. Verificaram uma significativa redução da

porcentagem de células T em sangue periférico ( $p < 0,05$ ) nos grupos de cianóticos e cianóticos com defeito conotruncal em relação aos controles, além de diminuição não significativa destas células nos acianóticos e no subgrupo de portadores de cardiopatias com fluxo esquerda-direita ( $p > 0,5$ ).

Em outro estudo, Radford e cols<sup>42,61</sup> compararam pacientes portadores de malformações conotruncais e crianças com fluxo esquerda-direita e grupo controle. Concluíram que, no grupo com alterações conotruncais, houve diminuição significativa de linfócitos T no sangue periférico ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais ( $p > 0,01$ ). Embora no grupo com fluxo esquerda-direita as porcentagens de linfócitos T tenham sido menores, a diferença em relação aos controles ( $p > 0,1$ ) não foi significativa. Encontraram ainda, em ambos os grupos, níveis significativamente reduzidos de IgG e IgA e de frações do complemento. Isso explicaria uma suscetibilidade maior a infecções em geral, sendo as mais freqüentes as de vias respiratórias.

Os trabalhos citados acima não podem ter seus resultados comparados entre si, nem diretamente aos achados deste trabalho. Tanto a forma diferente de divisão dos pacientes, quanto os tipos de defeitos daquelas casuísticas, impedem essas comparações.

No presente estudo, todos os pacientes mostraram hiperfluxo pulmonar, e nove deles (36,4%) apresentaram anomalias dependentes do desenvolvimento conotruncal, ou seja, da conexão ventrículo-arterial (casos 1, 2, 8, 12, 14, 16, 17, 18 e 23).

Apesar de não haver nenhum caso da clássica Síndrome de Di George, não se pode afastar a possibilidade de que, pelo menos, alguma disfunção tímica esteja presente nesses indivíduos, dada a natureza dos seus defeitos e variedade de manifestações, já que a Síndrome de Di George pode apresentar apenas o espectro sem todas as manifestações sindrômicas e, portanto, especular sobre a causa do déficit de linfócitos T no grupo hipertenso.

Outro aspecto que merece discussão é a possível disfunção imune em pacientes com Síndrome de Down. Na literatura, autores como Cuadrado e Barrena<sup>9</sup>, apesar de terem demonstrado deficiências no sistema imunológico dos pacientes com a Síndrome, acreditam que as alterações sejam devidas mais a uma senescência precoce do sistema imunológico, do que a uma anormalidade relacionada diretamente com a doença.

Neste trabalho, houve três pacientes portadores desta síndrome, aparentemente sem diferenças significativas com o restante do grupo. Todavia, o pequeno número desses casos não permitiu comparação adequada, nem impacto significativo nos resultados do grupo como um todo.

***Conclusões***

---

## 6. CONCLUSÕES

1. Embora a densidade total de células inflamatórias na adventícia tenha sido menor nos pacientes com hipertensão pulmonar em relação aos controles, a predominância de macrófagos jovens no primeiro mostra um padrão particular de reação celular neste grupo. As mesmas células foram mais freqüentemente encontradas atravessando as túnicas média e íntima vascular. Tais achados podem estar relacionados ao maior número de infecções respiratórias verificadas nas crianças com hiperfluxo pulmonar.
2. A deficiência numérica de linfócitos T no grupo HP, quando comparada aos controles, sugere duas possibilidades: a) Redução do estímulo dependente de macrófagos para diferenciação e maturação de linfócitos T; b) Deficiência imunológica primária dos pacientes com cardiopatias congênitas e hiperfluxo pulmonar.

3. Casos com lesões morfológicas mais avançadas mostraram na adventícia vascular, maior densidade de células inflamatórias recentemente recrutadas (macrófagos e granulócitos). Já aqueles com hipertrofia isolada da média, apresentaram predomínio de linfócitos B.
4. A baixa freqüência de células inflamatórias marcadas em lesões plexiformes difere do quadro descrito na hipertensão pulmonar primária.
5. A correlação negativa entre linfócitos T e idade no grupo com hipertensão pulmonar, sugere uma redução progressiva desse tipo celular na parede arterial.

## ***Referências Bibliográficas***

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L.; GUTIERREZ, P.S.; EBAID, M.; SESSO, A. Adventitial layer enlargement correlates with the percentage of medial thickness in peripheral pulmonary arteries from patients with congenital heart defects. **Cardiovasc. Pathol.**, v.6, p. 213-217, 1997.
2. AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L.; LOPES, A.E.; LOPES, A.A.B.; MARCIAL, M.B.; EBAID M. An immunohistochemical study of arterial lesions due to pulmonary hypertension in patients with congenital heart defects. **Cardiol. Young**, v.4, p. 37-43, 1994.
3. BALABANIAN, K.; FOUSSAT, A.; DORFMÜLLER, P.; DURAND-GASSELIN, I.; CAPEL, F.; BOUCHET-DELBOS, L.; PORTIER, A.; MARFAING-KOKA, A.; KRZYSIRK, R.; RIMANIOL, A.C.; SIMONNEAU, G.; EMILIE, D.; HUMBERT, M. CX<sub>3</sub>C Chemokine



- Fractalkine in Pulmonary Arterial Hypertension. **Am. J. Respir., Crit. Care Med.**; v.165, p.1-8, 2002.
4. BJORNSSON, J.; EDWARDS, W.D. Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. **Mayo Clin. Proc.**, v.60, p.16-25, 1985.
  5. BOTNEY, M.D.; LIPTAY, M.J.; KAISE, R L.R.; COOPER, J.D.; PARKS, W.C.; MECHAM, R.P. Active collagen synthesis by pulmonary arteries in human primary pulmonary hypertension. **Am. J. Path.**, v. 143, p.121-129, 1993.
  6. BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica – Métodos Quantitativos**. 4. ed. São Paulo: Atual., p. 321, 1987.
  7. BUSSAB, W.O. **Análise de variância e de regressão – Métodos Quantitativos**. 2.ed. São Paulo: Atual., p.147, 1988.
  8. CHRISTGAU, M.; CAFFESSE, R.G.; NEWLAND, R.; SCHMALZ, G.; D`SOUZA, R.N. Characterization of immunocompetent cells in diseased canine periodontium. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 46, p.1443-1454, 1998.

9. CUADRADO, E.; BARRENA, M.J. Immune Dysfunction in Down`s Syndrome: Primary Immune deficiency or early senescence of the immune system? **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.78, p.209-214, 1996.
10. CURTIS, J.; KIM, G.; WEHR, N.B.; LEVINE, R.L. Group B streptococcal phospholipids causes pulmonary hypertension. **Proc.Natl.Acad.Sci. USA.**, v.100, p.5087-5090, 2003.
11. DORFMÜLLER, P.; PETROS, F.; BALABANIAN, K.; HUMBERT, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. **Eur. Resp. J.**, v.22, p. 358-363, 2003.
12. FALINI, B.; FLENGHI, L.; PILERI, S.; GAMBACORTA, M.; BIGEINA, B.; DURKOP, H.; EITELBACH, F.; THIELE, J.; PACINI, R.; CAVALIERE, A. PG-M1: A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. **Am.J.Pathol.**, v.142, p.355-372.
13. GRANTON, J.T.; RABINOVITCH, M., Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease. **Cardiol. Clin.**; v. 20, p.441-457, 2002.

14. GRAYSTON, J.T.; KUO, C.C.; CAMPBELL, L.A.; BENDITT, E.P. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR and atherosclerosis. **Eur. Heart J.**, v.14, p.66-71, 1993. Supplement. K.
15. HAWORTH, S.G.; HISLOP, A.A. Pulmonary vascular development: normal values of peripheral vascular structure. **Am. J. Cardiol.**, v.52, p.578-583, 1983.
16. HAWORTH, S.G. THE PULMONARY CIRCULATION. IN: ANDERSON, R.H.; BAKER, E.J.; MARCATNEY, F.J.; RIGBY, M.L.; SHINEBOURNE, E.A.; TYNAN, M., 2.ed. **Paediatric Cardiology**. London, Churchill Livingstone, Harcourt Publishers Limited 2002.p.76.
17. HAWORTH, S.G. Pulmonary hypertension in the young. **Heart**, v.88, p.658-664, 2002.
18. HEATH, D.; EDWARDS, J. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease. A description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. **Circulation**, v.18, p.533-547, 1958.
19. HERGET, J.; PALECEK, F.; PRECLIK, P.; CERMAKOVA, M.; VIZEK, M.; PETROVICKA, M. Pulmonary hypertension induced by repeated

- pulmonary inflammation in the rat. **J. Appl. Physiol.**, v.51, p. 755-761, 1981.
20. HIGUCHI, M.L.; CASTELLI, J.B.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; REIS, M.M.; SAMBIASE, N.V.; FUKASAWA, S.; BEZERRA, H.G.; RAMIRES, J.A. Great amount of *C.pneumoniae* in ruptured plaque vessel segments at autopsy. A comparative study with stable plaques. **Arq. Bras. Cardiol.**, V.74, p.149-151, 2000.
21. HSU, S.M.; RAINE, L.; FNAGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J.Histochem. Cytochem.**, v.29, p. 577-580.
22. KESSLER-ICEKSON, G.; BIRK, E.; WEINTRUB, A.Y.; BARHUM, Y.; KOTLYAR V.; SCLESINGER, H.; ROCKAH, R.; VIDNE, B.A.; FRISCH, A. Association of Tetralogy of Fallot a distinct region of del22q11.2, **Am. J. Med. Genet.**, v.107, p.294-298, 2002.
23. KHALIL, A.; TRECHAN, R.; TIWARI, A.; MALIK, R.; ARORA, R. Immunological profile in congenital heart disease. **Indian Pediatrics**; v.31, p.295-300, 1994.

24. KIRKLIN, J.W.; BARRATT-BOYES, B.G. **Cardiac Surgery Morfology, Diagnostic Criteria, natural History, Techniques, Results, and Indications**, ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.,1986. Cap.20, p.652-653: Ventricular septal defect.
25. KOVANEN, P.T.; KAARTINEN, M.; PAAVONEN, T. Infiltrates of Activated Mast Cells at the Site of Coronary Atheromatous Erosion or Rupture in Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 92, p.1084-1088, 1995.
26. GOLDSBY, R.A.; KIND, T T.J.; OSBORNE, B.A. Kuby Imunologia. Trad. de Solange Cristina Davino. 4. ed. Rio de Janeiro, Livraria e Editora Revinter Ltda., 2002. Cap. 12, p.306-307: Citocinas.
27. LAINE, P.; KAARTINEN, M.; PENTTILA, A.; PANULA, P.; PAAVONEN, T.; KOVANEN, P.T. Association between myocardial infarction and mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. **Circulation**, v.99, p.361-369, 1999.
28. LIPTAY, M.J.; PARKS, W.C.; MECHAM, R.P.; ROBY, J.; KAISER, L.R. Neointimal macrophages colonize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries. **J. Clin Invest.**, V.91, p.588-594, 1993.

29. LUCIANO, L.; GROOS, S.; BUSCHE, W.V.E.; REALE, E. Massive apoptosis of colonocytes induced by butyrate deprivation overloads resident macrophages and promotes the recruitment of circulating monocytes. **Cell Tissue Res.**, v.309, p.393-407, 2002.
30. MESA, R.A.; EDELL, E.S.; DUNN, W.F.; EDWARDS, W.D. Human immunodeficiency virus infection and pulmonary hypertension: two new cases and a review of 86 reported cases. **Mayo Clin. Proc.**, V.73, p.37-45, 1998.
31. MEYRICK, B., BRIGHAM, K.L. Repeated Escherichia coli endotoxin-induced pulmonary inflammation causes chronic pulmonary hypertension in sheep. Structural and functional changes. **Lab. Invest.**, v.55, p.164-176, 1986.
32. MEYRICK, B.; REID, L. Ultrastructural findings in lung biopsy material from children with congenital heart defects. **Am J Pathol.**, v.101, p. 527-542, 1980.
33. MILLER, P.J. An elastin stain. **Med. Lab. Tech.**, v.28, p.148-149, 1971.
34. RABINOVITCH, M. Pulmonary Hypertension. In: Adams, F.H.; Emmanouilides, G.C.; Riemenschneider, T.A., 4. ed. **Moss' Heart**

- Disease in Infants, Children, and Adolescents.** Baltimore, The Williams & Wilkins CO., 1989, p.856.
35. MUNRO, J.M.; COTRAN, R.S. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. **Lab. Invest.**, v.58, p.249-261, 1988.
36. NETER, J.; KUTNER, M.H.; NASCHSTHEIM, C. **Applied Linear Statistical Models**, 4. ed. IE McGraw Hill, 1996,p. 1265.
37. NEWBY, A.C.; ZALSTSMAN, A.B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. **J. Pathol**; v.190, p. 300-309, 2000.
38. NUGENT, E.W.; PLAUTH, W.H.; EDWARDS, J.E.; WILLIAMS, W.H. The pathology, pathophysiology, recognition and treatment of congenital heart disease. In: Schlant, R.C.; Alexander, R.W.; O'Rourke, R.A.; Roberts, R.; Sonnerblick, E.H., 8. ed. **Hurst's the heart: arteries and veins**. New York, McGraw-Hill, Inc., 1994. p. 1765.
39. O'LAUGHLIN, S.; BRAVERMAN, M.; SMITH-JEFFERIES, M.; BUCKLEY, P. Macrophages (Histiocytes) in various reative and inflammatory conditions express different antigenic phenotypes. **Hum.Pathol.**, v.23, p. 1410-1418, 1992.

40. PARK, M.K. **Pediatric Cardiology for practitioners**, 3. ed. St.Louis, Mosby Year Book, Inc., 1996. Cap. 32, p. 420: Pulmonary Hypertension.
41. PELLICELI, A.M.; PALMIERI, F.; CICALINI, S.; PETROSILLO, N. Pathogenesis of HIV – related pulmonary hypertension. **Ann. N. Y. Acad. Science.**, v.946, p.82-94, 2001.
42. RADFORD, D.J.; LACHMAN, R.; THONG, Y.H. The immunocompetenc of children with congenital heart disease. **Int.Archs. Allergy appl. Immun.**, v. 81, p. 331-336, 1986.
43. RABINOVITCH, M.; HAWORTH, S.G.; CASTANEDA, A.R.; NADAS A.S.; REID L. Lung biopsy in congenital heart disease: a morphometric approach to pulmonary vascular disease. **Circulation**;v. 58, p.1107-1122, 1978.
44. RABINOVITCH, M.; HAWORTH, S.G.; VANCE, Z.; VAWTER, G.; CASTANEDA, A.R.; NADAS, A.S.; REID, L.M. Early pulmonary vascular changes in congenital heart disease studied in biopsy tissue. **Human Pathology**; v.11, p. 500, 1980. Supplement.



45. RABINOVITCH, M.; MOLOSSI, S.; CLAUSELL, N. Cytokine-mediated fibronectin production and transendothelial migration of lymphocytes in the mechanism of cardiac allograft vascular disease: efficacy of novel therapeutic approaches. **J. Heart Lung Transplant.**, v.14, S116-123, 1995.
46. RABINOVITCH, M. Structure and function of the pulmonary vascular bed: an update. **Cardiol. Clin.**; v.7, p. 895-914, 1989.
47. RABINOVITCH, M. Insights into the pathogenesis of primary pulmonary hypertension form animal models. In.: Rubin L.J.; Rich S., ed. **Primary pulmonary hypertension** New York, Marcel Dekker, Inc., 1997. p. 63-82.
48. RHODEN, D.K.; LEATHERBURY, L.; HELMAN, S.; GAFFNEY, M.; STRONG, W.B.; GUILL, M.F. Abnormalities in lymphocyte populations in infants with neural crest cardiovascular defects. **Pediatr. Cardiol.**, v.17,p.143-149, 1996.
49. ROJAS, J.; GREEN, R.S.; HELLERTQVIST, C.G.; OLEGARD, R.; BRIGHAM, K.L.; STAHLMAN, M.T. Studies on group B  $\beta$ -Hemolytic streptococcus.II. Effects on pulmonary hemodynamics and vascular permeability in unanesthetized sheep. **Pediatr. Res.**; v.15, p.899-904, 1981.

50. ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N. Eng. J. Med.**, v.340, p.115-126, 1999.
51. RUGTVEIT, J.; SCOTT, H.; HALSTENSEN, T.S.; NORSTEIN, J.; BRANDTZAEG, P. Expression of the L1 antigen (calprotectin) by tissue macrophages reflects recent recruitment from peripheral blood rather than upregulation of local synthesis: implications for rejection diagnosis in formalin-fixed kidney specimens. **J. Pathol.**, v.180, 194-199, 1996.
52. SIEGEL, S. **Nonparametric Statistics for the behavioral Sciences.** Kogakusha: MacGraw Hill; p.312., 1956.
53. SILVIA-CARDOSO, J.; MOURA, B.; FERREIRA, A.; MARTINS, L.; BRAVO-FARIA, D.; MOTA-MIRANDA, A.; ROCHA-GONÇALVES, F.; LECOUR, H.; CERQUEIRA-GOMES, M. Predictors of myocardial dysfunction in human immunodeficiency vírus-infected patients. , v.4, p.19-26, 1998.
54. SULLIVAN, K. E.; JAWAD, A.; RANDALL, P.; DRISCOLL, D.A.; EMANUEL, B.S.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; ZACKAI, E.H. Lack of correlation impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion

- syndromes (DiGeorge syndrome/ Velocardiofacial syndrome). **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.86, p.141-146, 1998.
55. TODOROVICH-HUNTER, L.; DODO, H.; YE, C.; MCCREADY, L.; KEELEY, F.W.; RABINOVITCH, M. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. **Am. Ver. Respi. Dis.**, v.146, p. 213-223, 1992.
56. TUDER, M.R.; GROVES, B.; BADESCH, D.B.; VOELKEL, N.F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. **Am. J. Pathol.**,v. 144, p.275-285, 1994.
57. TRAVIS, W.D.; KOSS, M.N. VASCULITIS. IN: DAIL, D.H.; HAMMAR, S.P. 2. ed. **Pulmonary Pathology**. New York, Springer-Verlag, 1994.
58. VOELKEL, N.F.; TUDER, R.M. Severe pulmonary hipertensive diseases: a perspective. **Eur. Respir. J.**, v.14, p.1246-1250, 1999.
59. WILCOX, J.N.; SCOTT, N.A. Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. **Int. J. Cardiol.** , v.54, 1996. Supplement 21-35.

60. WINNER, B.J. **Statistical Principles in experimental Design**. 2.ed.  
New York, Mc Graw-Hill, 1971, p.907.
  
61. YU, J.; GONZALEZ, S.; RODRIGUES, J.I.; DIEZ-PARDO, J.A.;  
TOVAR, J.A. Neural crest-derived defects in experimental congenital  
diaphragmatic hernia **Pediatr. Surg. Int.**, v.17, p.1443-1454, 1998.
  
62. ZAIDI, SHE; YOU, X.M; CIURA, S; O'BLENES, S; HUSAIN, M;  
RABINOVITCH, M. Suppressed smooth muscle proliferation and  
inflammatory cell invasion after arterial injury in elafin-overexpressing  
mice. **J Clin Invest**; v.105, p.1687-1695, 2000.