MAINA MARIA BARBOSA MORALES

**Caracterização das alterações estruturais e de matriz
extracelular de pequenas vias aéreas em pacientes
com síndrome do desconforto respiratório agudo**

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

Programa de: Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Morales, Maina Maria Barbosa

Caracterização das alterações estruturais e de matriz extracelular de pequenas vias aéreas em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo / Maina Maria Barbosa Morales. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Marisa Dolhnikoff.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório agudo 2.Lesão pulmonar aguda
3.Matriz extracelular 4.Remodelação das pequenas vias aéreas

USP/FM/DBD-135/10

MENSAGEM

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa
(Ricardo Reis)

1888-1939

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus amores e grandes exemplos na
minha vida.

À minha querida irmã, Ana Paula, sempre brilhante.

Ao meu amado marido, Vinícius, que alegra minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Professora Marisa Dolhnikoff, doutora na arte de orientar, agradeço pela dedicação e confiança.

À Professora Thais Mauad, sempre disposta a discutir ideias e a ajudar no que for preciso.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, “onipresente” e brilhante.

À Professora Elnara Márcia Negri, pelo carinho e suporte no ingresso, e ao longo, dessa jornada.

À amiga Tatiana Lanças, pelo apoio incondicional.

À Ângela e Cristina, pelas longas manhãs de reações imuno-histoquímicas.

Aos funcionários do Museu e Sala de Imagem, do Laboratório de histopatologia e da Sala dos Residentes do Departamento de Patologia, pelo auxílio.

Aos integrantes do nosso grupo de pesquisa: Ana Laura Nicoletti Carvalho, Aletéa Senhorini, Bianca Bérghamo de Araújo, Denise Simão Carnieli, Diógenes Seraphim Ferreira, Ellen Caroline Toledo do Nascimento, George Castro Figueira de Mello, Luiz Fernando Ferraz da Silva (Burns), Raquel Annoni, Ruy de Camargo Pires Neto e Tatiana Lanças de Camargo Pires.

Aos grandes amigos que fiz neste grupo.

MUITO OBRIGADA!

NORMAS

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.....	2
1.2 Fisiopatologia	4
1.3 Etiologia	5
1.4 Histologia e Remodelamento tecidual	7
1.5 Mecânica e ventilação pulmonar	9
1.6 As pequenas vias aéreas	12
1.7 Vias aéreas na SDRA	16
 2. OBJETIVOS	 20
2.1 Objetivo primário	21
2.2 Objetivos secundários	21
 3. MÉTODOS.....	 22
3.1 Casuística	23
3.1.1 Grupo SDRA.....	23
3.1.2 Grupo controle	24
3.1.3 Caracterização da população estudada	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Processamento Tecidual	25
3.2.2 Análise morfológica	27
3.2.3 Correlações clínico-morfológicas.....	31
3.2.4 Análise estatística.....	32

4. RESULTADOS	34
4.1 Caracterização da população estudada	35
4.2 Análise morfológica	38
4.3 Correlações clínico-morfológicas	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO.....	57
7. ANEXOS.....	59
Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética para a condução da pesquisa: Protocolo de pesquisa número 506/06	60
Anexo B. Dados individuais dos pacientes.....	61
8. REFERÊNCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AECC	Comitê Americano-Europeu para consenso
CE	Camada externa
CI	Camada interna
COLI	Colágeno tipo I
COLIII	Colágeno tipo III
CTRL	Controle
DAD	Dano Alveolar Difuso
et al.	e outros
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
LBA	Lavado bronco-alveolar
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extracelular
ML	Músculo liso
MMP	Metaloproteinase
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PEEP	Pressão positiva expiratória final
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDRAextp	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo de origem extrapulmonar
SDRAp	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo de origem pulmonar
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VM	Ventilação mecânica

LISTA DE TABELAS

MÉTODOS

Tabela 1. Anticorpos padronizados para a análise imuno-histoquímica 27

Tabela 2. Variáveis analisadas na via aérea pequena 29

RESULTADOS

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos e parâmetros ventilatórios dos pacientes do grupo SDRA 36

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos dos pacientes do grupo controle 38

Tabela 5. Dados estruturais e índice inflamatório dos grupos SDRA e controle 40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas de uma via aérea normal	16
Figura 2. Sistema de análise de imagem contendo um computador conectado a uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico	28
Figura 3. Fotomicrografias representativas de pequenas vias aéreas coradas por H&E, ilustrando a análise de imagem.	30
Figura 4. Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica da matriz extracelular (exemplo: colágeno tipo 1) nas camadas interna (A) e externa (B) da parede da via aérea pequena, ilustrando a análise quantitativa por análise de imagem.....	31
Figura 5. Fotomicrografias representativas da pequena via aérea e tecido alveolar de pacientes com SDRA (A e C) e controles (B e D).	39
Figura 6. Fotomicrografias de pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA e controles coradas com anti-colágeno I, anti-fibronectina, anti-versicam e anti-MMP-9.....	41
Figura 7. Fotomicrografias de pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA e controles coradas com Resorcina-fucsina de Weigert, anti-colágeno III e anti-MMP-2	42
Figura 8. Os gráficos mostram o conteúdo de colágeno I, colágeno III, fibras elásticas, fibronectina, versicam e MMP- 2 e -9 nas pequenas vias aéreas nos grupos SDRA e controle.....	44
Figura 9. Os gráficos mostram a correlação entre alterações morfológicas (porcentagem de epitélio normal) e a PaO_2/FiO_2 (A) e a pressão de platô nos pacientes que morreram em até 2 dias depois do diagnóstico da síndrome (n= 16).....	45

RESUMO

Morales MMB. *Caracterização das alterações estruturais e de matriz extracelular de pequenas vias aéreas em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 76p.

A disfunção de vias aéreas em pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é caracterizada por limitação do fluxo expiratório e hiperinsuflação dinâmica. As alterações morfológicas possivelmente associadas com tais alterações funcionais têm sido investigadas em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda, que mostram necrose e descamação epitelial em vias aéreas distais. Entretanto, até o momento, essa avaliação não foi realizada em humanos. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações estruturais e inflamatórias nas pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA. Com este propósito, estudamos, retrospectivamente, o tecido pulmonar de 31 pacientes com SDRA (A: $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$, 45 ± 14 anos, 16 homens) e 11 controles (C: 52 ± 16 anos, 7 homens) submetidos à autópsia. Por meio de análise de imagem, quantificamos a extensão das alterações epiteliais, a inflamação bronquiolar, a espessura da parede da via aérea e o conteúdo de proteínas da matriz extracelular (MEC) nas pequenas vias aéreas. As vias aéreas dos pacientes com SDRA apresentaram menor extensão de epitélio normal (A: $32,9 \pm 27,2\%$, C: $76,7 \pm 32,7\%$, $p < 0,001$), maior extensão de descamação epitelial (A: $52,6 \pm 35,2\%$, C: $21,8 \pm 32,1\%$, $p < 0,01$), maior índice de inflamação [A: 1(3), C: 0(1), $p = 0,03$], maior espessura da parede da via aérea (A: $138,7 \pm 54,3 \mu\text{m}$, C: $86,4 \pm 33,3 \mu\text{m}$, $p < 0,01$) e maior conteúdo de colágeno I, fibronectina, versicam e MMP-9 comparado aos controles ($p \leq 0,03$). Nos pacientes com SDRA, a extensão de epitélio normal apresentou correlação positiva com a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = 0,58$; $p = 0,02$) e correlação negativa com a pressão de platô utilizada ($r = -0,52$; $p = 0,04$). A extensão de epitélio descamado apresentou correlação negativa com a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = -0,52$; $p = 0,04$). Nossos dados mostram que as pequenas vias aéreas dos pacientes com SDRA apresentam alterações estruturais caracterizadas por descamação epitelial, inflamação e espessamento da parede com deposição de MEC. Estas alterações podem contribuir para as alterações funcionais observadas em pacientes com SDRA.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório agudo 2.Lesão pulmonar aguda 3.Matriz extracelular 4.Remodelação de pequenas vias aéreas

SUMMARY

Morales MMB. *Characterization of structural and extracellular matrix alterations in small airways of Acute Respiratory Distress Syndrome patients* [thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 76p.

Airway dysfunction in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) is evidenced by expiratory flow limitation and dynamic hyperinflation. The morphological alterations potentially associated with these functional changes have been investigated in experimental models of Acute Lung Injury, which show epithelial necrosis and denudation in distal airways. To date, however, no study has focused on the morphological airway changes in lungs from human subjects with ARDS. **Objective:** To evaluate structural and inflammatory changes in distal airways in ARDS patients. **Methods and Results:** We retrospectively studied autopsy lung tissue from 31 ARDS patients (A: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$, 45 ± 14 years, 16 males) and 11 controls (C: 52 ± 16 years, 7 males). Using image analysis, we quantified the extension of epithelial changes, bronchiolar inflammation, airway wall thickness, and extracellular matrix (ECM) protein content in distal airways. ARDS airways showed a shorter extension of normal epithelium (A: $32.9 \pm 27.2\%$, C: $76.7 \pm 32.7\%$, $p < 0.001$), a larger extension of epithelium denudation (A: $52.6 \pm 35.2\%$, C: $21.8 \pm 32.1\%$, $p < 0.01$), increased airway inflammation ($p = 0.03$), higher airway wall thickness (A: $138.7 \pm 54.3 \mu\text{m}$, C: $86.4 \pm 33.3 \mu\text{m}$, $p < 0.01$), and higher airway content of collagen I, fibronectin, versican and MMP-9 compared to controls ($p \leq 0.03$). The extension of normal epithelium showed a positive correlation with $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = 0.58$; $p = 0.02$) and a negative correlation with plateau pressure ($r = -0.52$; $p = 0.04$). The extension of denuded epithelium showed a negative correlation with $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = -0.52$; $p = 0.04$). **Conclusion:** Structural changes in small airways of patients with ARDS were characterized by epithelial denudation, inflammation and airway wall thickening with ECM remodeling. These changes are likely to contribute to functional airway changes in patients with ARDS.

Descriptors: 1.Acute respiratory distress syndrome 2.Acute lung injury
3.Extracellular matrix 4.Small airways, remodeling

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é definida como a insuficiência respiratória de instalação aguda caracterizada por infiltrado pulmonar bilateral, compatível com edema pulmonar, não consequente à elevação pressórica da câmara cardíaca esquerda (Ware e Matthay, 2000). Em 1994, o Comitê Americano-Europeu para o consenso em SDRA (AECC) (Bernard et al., 1994) padronizou os critérios para o diagnóstico da síndrome, baseando-se em quatro fatores principais: (1) insuficiência respiratória com instalação aguda, (2) hipoxemia (relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e a fração inspirada de oxigênio – $PaO_2/FiO_2 \leq 200$), (3) infiltrado bilateral na radiografia de tórax frontal e (4) pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg, quando medida, ou ausência de sinais de falência ventricular cardíaca esquerda.

A SDRA foi descrita pela primeira vez em 1967, a partir da avaliação de 12 casos clínicos nos quais os pacientes apresentavam hipoxemia grave refratária à oferta de oxigênio associada à diminuição da complacência do sistema respiratório (Ashbaugh et al., 1967). Ashbaugh, Bigelow, Petty e Levine (1967) chamaram essa nova síndrome de "desconforto respiratório em adultos". Este artigo reconheceu, pela primeira vez, uma unidade fisiopatológica de etiologia variada caracterizada clinicamente por infiltrado

pulmonar difuso e necessidade de altos níveis pressóricos para ventilação pulmonar e, histologicamente, por pulmões colapsados com presença de membrana hialina e debris intra-alveolares. Posteriormente, sua terminologia foi alterada para SDRA, por ocorrer também em crianças.

Após 40 anos, apesar de todo empenho da classe científica em estudar os mecanismos envolvidos na síndrome e desenvolver terapias para o tratamento eficiente, o estudo da SDRA continua complexo principalmente devido à etiopatogenia variada e à sua definição estritamente clínica. Estudos epidemiológicos mostram que a incidência da SDRA é variável em diferentes países e populações, oscilando de 1,5 a 75 casos por 100.000 habitantes. Porém a taxa de mortalidade é consistente e permanece alta, de 25 a 40%, apesar da aparente queda nos últimos 10 a 15 anos (Wheeler e Bernard, 2007). Estima-se que a incidência de SDRA nos Estados Unidos seja em torno de 60 casos por 100.000 habitantes. A incidência aumenta com a faixa etária e a mortalidade é significativamente maior quando ajustada para a idade, atingindo 60% em pacientes com 85 anos ou mais (Rubenfeld et al., 2005). No Brasil, não há grandes estudos populacionais até o momento. Os dados existentes refletem características específicas de hospitais das regiões sul e sudeste do país. Na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, a incidência de SDRA foi de 2,3% e a mortalidade hospitalar de 47% na década de 90 (Fialkow et al., 2002). No estado de São Paulo, um estudo mostrou incidência de 2,2% de SDRA na UTI do Hospital Sírio-Libanês (Oliveira et al., 2002).

1.2 Fisiopatologia

A SDRA é a manifestação mais grave da Lesão Pulmonar Aguda (LPA), na qual há uma resposta inflamatória exacerbada no pulmão, de diferentes etiologias, em decorrência do desequilíbrio entre agentes pró e anti-inflamatórios, havendo comprometimento da membrana alvéolo-capilar com consequente aumento da permeabilidade capilar pulmonar (Ware e Matthay, 2000). De acordo com a relação PaO_2/FiO_2 foi estabelecido um critério de gravidade da lesão pulmonar, sendo diagnosticada LPA quando a $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ e SDRA quando a $PaO_2/FiO_2 \leq 200$ (Bernard et al., 1994).

A ação complexa de citocinas e outros agentes pró-inflamatórios iniciam e amplificam a lesão pulmonar. Neutrófilos migram ao espaço alveolar atraídos por citocinas produzidas por macrófagos alveolares. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α estão envolvidos no estímulo de produção de matriz extracelular por fibroblastos, quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Já os neutrófilos ativados, podem produzir agentes oxidantes, proteases, leucotrienos e outras moléculas pró-inflamatórias. No entanto, também há ação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-11, além inibidores de citocinas inflamatórias como o antagonista do receptor de IL-1, anticorpos contra IL-8 e o bloqueador do receptor do TNF (Ware e Matthay, 2000).

As agressões iniciais atingem as células endoteliais e epiteliais da barreira alvéolo-capilar, com consequente aumento da permeabilidade da barreira e extravasamento de plasma e proteínas, inicialmente para o espaço intersticial e, em seguida, para a luz alveolar. O infiltrado inflamatório

presente no exsudato pulmonar apresenta atividade oxidante e proteolítica com capacidade de lesar as células de revestimento epitelial e inativar o surfactante existente. A perda da integridade epitelial, além de permitir o extravasamento de líquido para o espaço alveolar, torna ineficiente a reabsorção hídrica pelos pneumócitos tipo II. Além disso, resulta em redução da produção e alteração da funcionalidade do surfactante, com consequente aumento da tensão superficial alveolar favorecendo a tendência ao colapso pulmonar. A presença de edema no espaço extravascular e o colapso alveolar resultam em troca gasosa ineficiente, consequente hipoxemia e, mecanicamente, em diminuição da complacência pulmonar. Além das alterações ventilatórias, são descritos distúrbios de perfusão pulmonar, como a formação de trombos microvasculares devido ao aumento da expressão de proteínas pró-coagulantes e antifibrinolíticas e queda da concentração de proteínas anticoagulantes. Tais alterações associadas resultam em um desequilíbrio de ventilação e perfusão, culminando em necessidade de suporte ventilatório e de suplementação de oxigênio (Wheele e Bernard, 2007).

1.3 Etiologia

Várias desordens clínicas são consideradas fatores desencadeantes para o processo inflamatório que culminará na SDRA. As principais patologias de base são a pneumonia, a sepse e o trauma seguido de choque hipovolêmico e necessidade de transfusões sanguíneas. Além destas, a

aspiração do conteúdo gástrico e a pancreatite também são fatores predisponentes à SDRA (Ware e Matthay, 2000). As doenças de base podem ser ainda subdivididas em dois grandes grupos, de acordo com seu local de origem. Causas primárias ou pulmonares, quando o fator desencadeante atinge diretamente o parênquima pulmonar lesando o epitélio alveolar, e secundárias ou extrapulmonares, quando o insulto resulta de uma reação inflamatória sistêmica que agride o endotélio vascular pulmonar (Bernard et al., 1994).

A literatura é controversa em relação à utilidade de se classificar a SDRA nos dois grandes grupos [pulmonar (SDRAp) ou extrapulmonar (SDRAextp)], pois não se sabe a real importância desta diferenciação em relação ao curso da doença (Pelosi et al., 2003). A busca por uma resposta adequada vem sendo investigada através do melhor entendimento do processo fisiopatológico da doença. Modelos experimentais de LPA de origem pulmonar e extrapulmonar são usados para investigar este comportamento fisiopatológico e histológico dos dois padrões da doença (Dos Santos, 2006; Menezes et al., 2005). O lavado broncoalveolar (LBA) dos grupos de LPA induzida por agressão pulmonar apresentam maiores concentrações de IL-6, de interleucina animal homóloga a IL-8 humana e IL-10, além de maior densidade de neutrófilos em comparação ao grupo de indução extrapulmonar (Menezes et al., 2005). Histologicamente, o tecido pulmonar deste grupo apresenta maior grau de lesão epitelial, sinais de fibrose com deposição de colágeno e de elástica e barreira endotelial preservada, enquanto a LPA de origem extrapulmonar não resulta em lesão epitelial, porém em formação de edema intersticial difuso (Dos Santos, 2006; Menezes et al., 2005).

1.4 Histologia e Remodelamento tecidual

A manifestação histológica característica na SDRA é o Dano Alveolar Difuso (DAD) (Katzenstein, 2006). O DAD é descrito como a lesão difusa do tecido alveolar, comprometendo o compartimento epitelial, endotelial e intersticial, que pode resultar em remodelamento tecidual. Três fases sequenciais e sobrepostas caracterizam o DAD: exsudativa, proliferativa e de fibrose. A fase exsudativa é caracterizada por ser aguda, apresentar edema e hemorragia alveolares, infiltrado inflamatório rico em neutrófilos e presença de membrana hialina. A fase proliferativa é predominantemente de organização e reparação, sendo observada inflamação com predomínio de células mononucleares, neovascularização, regeneração de células epiteliais e fibrogênese em organização com presença aumentada de fatores pró-colágeno, fibroblastos e miofibroblastos. A resposta fibroproliferativa pode favorecer a deposição tecidual, resultando em remodelamento pulmonar por tecido colagênico, caracterizando a fase de fibrose.

Apesar de serem descritas três fases histológicas da SDRA, a atividade fibroproliferativa ocorre precocemente na patogênese da doença, podendo ser observada associada ao processo inflamatório inicial nas primeiras 24 a 48 horas após o diagnóstico, além de estar associada à maior mortalidade (Chesnutt et al., 1997; Pugin et al., 1999; Marshall et al., 2000; Budinger et al., 2005). Marshall et al. (2000) analisaram a atividade fibroproliferativa do LBA de 44 pacientes com SDRA em comparação com indivíduos em ventilação mecânica sem SDRA. Foram observadas elevação na atividade mitótica de

fibroblastos e maior concentração de proteínas pró-colágeno tipo III nas primeiras 24 horas da doença em relação ao grupo controle. Mesmo em comparação com indivíduos que desenvolvem edema pulmonar, porém de origem cardiogênica, os indivíduos com SDRA apresentam maior concentração de pró-colágeno tipo III na análise do edema pulmonar já nas primeiras 24 horas de após o diagnóstico (Chesnutt et al., 1997; Pugin et al., 1999). Os autores observaram, ainda, taxa de mortalidade aumentada naqueles pacientes que apresentaram maior atividade mitótica para fibroblastos e/ou maior concentração de pró-colágeno tipo III no LBA desde o início da doença (Chesnutt et al., 1997; Marshall et al., 2000). Budinger et al. (2005) analisaram a presença de fatores relacionados com a fibrose pulmonar no LBA de pacientes com SDRA no segundo dia de ventilação mecânica. Os autores observaram aumento da atividade de pró-colágeno tipo I no grupo SDRA em relação ao grupo controle, a qual apresentou correlação positiva com a atividade do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$).

A intensa atividade fibroproliferativa na SDRA também foi observada devido à presença de remodelamento do tecido pulmonar de pacientes que morreram com SDRA (Krein et al., 2003). A fibrose tecidual foi considerada fator prognóstico ruim e está associada à maior taxa de mortalidade (Martin et al., 1995). Além da fibrose intersticial, alterações de outros componentes da matriz extracelular têm sido descritas no processo de remodelamento do tecido alveolar na SDRA. A deposição aumentada e desorganizada de fibras elásticas no parênquima pulmonar de pacientes que foram a óbito por SDRA foi descrita por Negri et al., 2000. Limper e Roman (1992) constataram

aumento da glicoproteína fibronectina em diferentes situações de lesão pulmonar, dentre elas na SDRA. Bensadoun et al. (1996) observaram a deposição do proteoglicano versican nas regiões de espessamento do interstício alveolar na fase fibroproliferativa da SDRA. Tais processos de reparo e de remodelamento aos quais o tecido pulmonar está sujeito determinam alterações da mecânica pulmonar com consequente dificuldade na ventilação pulmonar (Demoule et al., 2006).

1.5 Mecânica e ventilação pulmonar

As alterações histológicas decorrentes do processo inflamatório pulmonar da SDRA, tais como a presença de líquido na região extravascular e o remodelamento tecidual, resultam na principal alteração mecânica da doença: a diminuição da complacência pulmonar (Wheeler e Bernard, 2007). A diminuição da complacência pulmonar culminou na utilização de pressões inspiratórias e volumes correntes elevados para garantir a ventilação mecânica (VM) dos pacientes hospitalizados com a SDRA. No entanto, mais recentemente, observou-se que a utilização inadvertida dos parâmetros ventilatórios elevados está relacionada com diversos mecanismos exacerbadores dos danos pulmonares na LPA (Tremblay e Slutsky, 2006).

Os principais mecanismos de lesão pulmonar associados à VM são a exposição pulmonar a altas pressões inspiratórias e a altos volumes correntes, a abertura e fechamento cíclico dos espaços aéreos distais e a

liberação de mediadores inflamatórios decorrentes do estresse mecânico tecidual (Tremblay e Slutsky, 2006). Tais descobertas geraram maior preocupação com os parâmetros empregados no suporte ventilatório dos pacientes com LPA e possibilitaram os maiores avanços em relação ao tratamento da SDRA até hoje (Matthay e Zimmerman, 2005).

Atualmente, é bem estabelecido que o uso da VM utilizando-se baixos volumes correntes (<6 ml/Kg) e baixas pressões de platô (<30 cmH₂O), chamada de ventilação protetora, diminui a mortalidade em pacientes com LPA/SDRA em relação ao uso dos altos volumes (12 ml/Kg) e pressões (50 cmH₂O) convencionalmente utilizados (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000). Além disso, em 1998, Amato et al. mostraram queda na mortalidade hospitalar de pacientes com SDRA ao utilizar valores elevados de pressão positiva expiratória final (PEEP) (16 cmH₂O) associados a baixos volumes, justificando que a utilização da PEEP elevada evitaria a reabertura cíclica dos alvéolos e vias aéreas colapsados, fenômeno sabidamente crítico para a exacerbação do processo inflamatório pulmonar. No entanto, há discordância em relação aos valores de PEEP a ser aplicada. Grandes estudos clínicos multicêntricos e randomizados não conseguiram demonstrar a superioridade, em relação à sobrevida, do uso de ventilação protetora com PEEP alta (14 a 15 cmH₂O) em comparação com PEEP mais baixa (7 a 10 cmH₂O) (Meade et al., 2008; Mercat et al., 2008). Entretanto, meta-análises recentes mostraram redução da mortalidade hospitalar de pacientes com SDRA ventilados com valores de PEEP mais altas, principalmente naqueles pacientes com doença mais grave (Briel et al., 2010; Oba et al., 2009).

Alterações de mecânica pulmonar relacionadas com a disfunção de pequenas vias aéreas também foram observadas em pacientes com SDRA (Jain e Sznajder, 2008). Alguns estudos verificaram que a presença de limitação do fluxo expiratório e hiperinsulflação dinâmica, com consequente distribuição heterogênea da ventilação pulmonar, são comuns nestes pacientes, principalmente quando submetidos à ventilação mecânica com baixos valores de PEEP (Kondili et al., 2002; Koutsoukou et al., 2000; Rylander et al., 2005).

Kondili et al. (2002) e Koutsoukou et al. (2000, 2002) investigaram a presença de alteração funcional de pequenas vias aéreas em pacientes com SDRA através da análise da fase expiratória da curva pressão-volume do sistema respiratório. Os autores observaram que 50 a 100% dos pacientes apresentaram algum grau de limitação do fluxo expiratório quando ventilados na ausência ou com baixos valores de PEEP (5 cmH₂O). Além disso, a limitação do fluxo expiratório apresentou correlação positiva com a presença de PEEP intrínseco. As disfunções mecânicas observadas desapareceram quando foi aplicada PEEP de 10 cmH₂O e não foram associadas com a presença de alterações pulmonares prévias ou com tabagismo.

Rylander et al. (2005) também observaram que as alterações mecânicas presentes em pacientes com SDRA resultam em ventilação pulmonar inadequada. Os autores investigaram o padrão de ventilação pulmonar em 25 pacientes com SDRA submetidos à ventilação mecânica com PEEP de 5 cmH₂O e verificaram que 96% destes pacientes apresentaram um volume de gás ventilado de 66% do volume total de gás

pulmonar, o que correspondeu a uma diferença média de 0,71L. Os autores atribuíram o aprisionamento de ar ao fechamento ou colapso cíclico de vias aéreas distais (Kondili et al., 2002; Koutsoukou et al., 2000, 2002; Rylander et al., 2005; Milic-Emili et al., 2007; Jain e Sznajder, 2008).

As poucas investigações existentes sobre o comportamento das pequenas vias aéreas na SDRA apontam, portanto, para o envolvimento destas vias aéreas tanto no mecanismo fisiopatológico da síndrome (Jain e Sznajder, 2008) quanto na disfunção da mecânica pulmonar presente nestes pacientes (Kondili et al., 2002; Koutsoukou et al., 2000; Rylander et al., 2005).

1.6 As pequenas vias aéreas

A divisão dicotômica da árvore brônquica pulmonar confere às vias aéreas distais um menor calibre individual, porém de grande relevância funcional devido à sua extensa área transversa total (Crystal et al., 1997). No entanto, estas vias aéreas representam apenas 10% da resistência pulmonar total, de modo que as alterações morfológicas são funcionalmente silenciosas até estarem muito evoluídas (Macklem, 1998). Podemos inferir, portanto, que os achados de disfunção mecânica de vias aéreas distais em pacientes com SDRA indicam que as mesmas apresentem alterações estruturais consideráveis no processo fisiopatológico da LPA.

As vias aéreas que apresentam perímetro de membrana basal $\leq 6\text{mm}$ são chamadas de pequenas vias aéreas e caracterizam-se por sua estrutura diferenciada em relação às vias aéreas maiores (Macklem, 1998). Estas vias aéreas são constituídas por células (epiteliais de revestimento, musculares lisas, do sistema imune) ancoradas pela matriz extracelular, não apresentando glândulas submucosas ou cartilagem na sua estrutura. Tais características conferem maior flexibilidade e maior tendência ao colapso, além de grande interdependência mecânica com o parênquima pulmonar adjacente (Macklem, 1998; Mauad et al., 2004). Consequentemente, a estabilidade mecânica das pequenas vias aéreas é garantida, em parte, pela presença dos acoplamentos alveolares e do filme líquido formado pelo surfactante pulmonar (Mauad et al., 2004; Bilek et al., 2003). Em situações de lesão pulmonar, nas quais o tecido pulmonar está predisposto à lesão dos acoplamentos alveolares ou à insuficiência de surfactante, as pequenas vias aéreas tendem ao colapso, sendo sua estabilidade mantida apenas pelas propriedades mecânicas da parede bronquiolar.

As propriedades mecânicas da parede das pequenas vias aéreas são resultantes da atividade muscular lisa e da sua estrutura protéica, a MEC. A MEC é formada por uma série de macromoléculas e água. Os principais elementos protéicos da MEC pulmonar são as fibras colágenas, as fibras elásticas, os proteoglicanos e as glicoproteínas (Crystal et al., 1997). Os colágenos tipos I (COLI) e III (COLIII) são as proteínas mais abundantes na MEC e, consequentemente, as principais proteínas estruturais do tecido pulmonar. Têm como função conferir força tênsil a todas as superfícies

distensoras do pulmão (Suki e Bates, 2008). As fibras elásticas localizam-se difusamente no pulmão, normalmente mecanicamente conectadas ao colágeno. Sua estrutura, composta de elastina envolta por microfibrilas, confere as propriedades de recolhimento elástico pulmonar e patência das vias aéreas (Crystal et al., 1997; Mauad et al., 2004). Os proteoglicanos são estruturas formadas por uma proteína central ligada a cadeias de glicosaminoglicanos ionicamente carregadas, estando envolvidos em mecanismos de regulação hídrica tecidual e estrutura organizacional (Crystal et al., 1997). O versicam é um dos proteoglicanos mais presente no pulmão e apresenta a importante função de estabilização da trama de fibras colágeno-elástica (Crystal et al., 1997; Cavalcante et al., 2005). As proteínas citadas acima são determinantes das propriedades mecânicas da MEC (Suki e Bates, 2008), já a fibronectina é uma glicoproteína altamente expressa em tecidos lesados, tendo implicação no processo de reparo tecidual (Limper e Roman, 1992).

A MEC é um tecido dinâmico que pode sofrer alterações e modificar as propriedades mecânicas da parede brônquica em diversas situações, como no desenvolvimento embrionário, morfogênese, inflamação, dentre outros (Crystal et al., 1997). As alterações estruturais e da composição do tecido das vias aéreas em resposta a um insulto inflamatório é chamada de remodelamento brônquico. Duas vias constituem o processo de remodelamento (vias de produção e degradação de tecido) resultando na reconstrução tecidual normal, quando ambas as vias estiverem equilibradas, ou em um processo patológico, quando houver desequilíbrio.

As principais proteinases envolvidas no processo de remodelamento brônquico são as metaloproteinases (MMPs). MMPs são enzimas proteolíticas produzidas por células estruturais da árvore brônquica, como fibroblastos e células epiteliais, e por células inflamatórias, participando de processos fisiológicos e fisiopatológicos no organismo (Gueders et al., 2006). Estas enzimas são capazes de degradar os componentes da MEC sendo responsáveis em grande parte pelo *turnover* da mesma. MMPs podem também influenciar a migração celular liberando quimoquinas a partir da MEC, além de degradar componentes da membrana basal endotelial, facilitando o extravasamento de células inflamatórias para o tecido. Existem pelo menos 28 tipos de MMPs, agrupados de acordo com a especificidade de seu substrato e similaridade de seus aminoácidos. O grupo das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) é responsável pela degradação da maioria dos componentes da membrana basal e é frequentemente envolvida no processo de remodelamento brônquico (Gueders et al., 2006).

Todos os compartimentos das vias aéreas podem ser estruturalmente alterados no processo de remodelamento, com possíveis repercussões funcionais. A Figura 1 mostra os diferentes compartimentos de uma via aérea pequena normal.

Figura1. Camadas de uma via aérea normal (modificado de SIMÕES, 2005, com permissão)

Não existem investigações prévias em relação às alterações da MEC na parede brônquica na SDRA, porém o remodelamento bronquiolar é bem documentado em doenças pulmonares obstrutivas e indica que o comportamento mecânico das vias aéreas está diretamente relacionado com a constituição da MEC (James e Wenzel, 2007).

1.7 Vias aéreas na SDRA

Considerando que o comportamento mecânico da via aérea é resultado da interação entre a própria estrutura da via aérea, a composição e distribuição da MEC e as forças de interdependência da via aérea com o parênquima

pulmonar, as alterações funcionais destas vias aéreas estão associadas com alterações morfológicas das mesmas (James e Wenzel, 2007). Katzenstein (2006) descreve algumas destas alterações histológicas comumente encontradas em vias aéreas de pacientes com SDRA. A fase inicial é caracterizada por necrose de células mucosas no epitélio bronquiolar, evoluindo com reepitelização na fase tardia. O epitélio renovado pode apresentar metaplasia escamosa, sendo comum a presença de atipia citológica. Porém não há análises quantitativas destas descrições.

Estudos experimentais foram, então, realizados com o objetivo de descrever o comportamento morfológico e funcional das vias aéreas distais na lesão pulmonar aguda. Estes estudos mostraram tanto alterações histológicas quanto funcionais de pequenas vias aéreas e sugerem que as lesões estruturais estejam relacionadas com o comprometimento da função respiratória na LPA (D'Angelo et al., 2002, 2007; Jain e Sznajder, 2008; Muscedere et al., 1994; Tsuchida et al., 2006). Tais alterações morfológicas e funcionais têm sido atribuídas principalmente à força de cisalhamento causado pela abertura e fechamento cíclico das vias aéreas periféricas vulneráveis durante o ciclo respiratório (Milic-Emili et al; Jain e Sznajder, 2008).

Muscedere et al. (1994) investigaram alterações pulmonares em um modelo experimental de SDRA realizado em pulmões isolados de ratos. Após a indução da lesão pulmonar por depleção de surfactante, os pulmões foram submetidos a estratégias ventilatórias com diferentes valores de PEEP (abaixo ou acima do ponto de inflexão inferior da curva pressão-volume inspiratória do sistema respiratório) e comparados ao grupo controle

(ventilado em pressão contínua de 4 cmH₂O). O grupo de PEEP baixa apresentou maiores índices de lesão histológica de vias aéreas comparado aos outros dois grupos, os quais apresentaram índices mais baixos e semelhantes entre si. Foram observados lesões de bronquíolos membranosos e respiratórios, caracterizadas por necrose e descamação do epitélio, além de lesões de ducto alveolar, caracterizada por formação de membranas hialinas. Os autores associam tais lesões com a presença de colapso e reabertura cíclica dos alvéolos e pequenas vias aéreas.

D'Angelo et al. (2002, 2007) realizaram uma série de experimentos de indução à LPA em pulmões de coelhos normais ou previamente induzidos à diminuição de tensão superficial. Animais sadios submetidos a períodos de ventilação mecânica com baixos volumes expiratórios (PEEP= 0 cmH₂O) apresentaram evidências histológicas de lesão de vias aéreas concomitante ao aumento dos valores de resistência destas vias aéreas. Quando o animal foi previamente submetido à desnaturação do surfactante pulmonar, a ventilação com PEEP=0 induziu à maior deterioração dos parâmetros funcionais, lesão epitelial de vias aéreas, formação de edema e presença de infiltrado inflamatório com polimorfonucleares. Em ambos os grupos de animais, as alterações mecânicas observadas mantiveram-se mesmo após a reintrodução da PEEP.

Tsuchida et al. (2006) avaliaram o papel de regiões atelectáticas na LPA através de um modelo experimental em ratos. Após a indução da lesão pulmonar por depleção de surfactante, os animais foram ventilados com ventilação protetora (baixos volumes correntes e PEEP alta) ou com

ventilação convencional (altos volumes e PEEP baixa). O grupo de ventilação convencional apresentou aumento dos índices histológicos de lesão alveolar (representada por presença de membrana hialina) e de vias aéreas (representada por lesão epitelial), enquanto na ventilação protetora não foram observadas alterações em relação ao grupo controle. A lesão de vias aéreas foi difusa, comprometendo ambas as regiões pulmonares, dependentes e não dependentes. Os autores sugerem que a atelectasia pulmonar está relacionada com a lesão de pequenas vias aéreas, talvez pelo mecanismo de atelectrauma.

Embora ambos os estudos clínicos e os experimentais sugiram que as alterações de vias aéreas contribuam para a disfunção pulmonar na LPA, nenhum estudo até hoje avaliou detalhadamente as alterações morfológicas das pequenas vias aéreas na SDRA em humanos. Não se sabe também se essas vias aéreas podem sofrer um processo de remodelamento à semelhança do que ocorre no tecido alveolar. A melhor caracterização das lesões das pequenas vias aéreas na SDRA traria contribuições para o estudo da fisiopatologia da doença assim como para a compreensão de alterações funcionais e mecano-ventilatórias desses pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Caracterizar as alterações estruturais e inflamatórias das pequenas vias aéreas na SDRA.

2.2 Objetivos secundários

Correlacionar as alterações morfológicas com as características clínicas e parâmetros ventilatórios.

Comparar as alterações morfológicas e da MEC entre os pacientes com SDRA de origem pulmonar e extrapulmonar.

3. MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 27 de julho de 2006 (CAPPesq-HCFMUSP - processo nº 506/06) (Anexo A).

3.1 Casuística

Os pacientes participantes deste estudo foram selecionados a partir de uma pesquisa retrospectiva do arquivo de autópsias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os pacientes incluídos no estudo morreram nos anos de 2001 a 2007 na cidade de São Paulo e foram submetidos à autópsia no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), ligado ao Departamento de Patologia da FMUSP, com finalidade diagnóstica.

3.1.1 Grupo SDRA

Foram incluídos no grupo SDRA pacientes provenientes do HCFMUSP que apresentaram:

- 1) diagnóstico clínico de SDRA de acordo com o Consenso Americano-Europeu para SDRA (Bernard et al, 1994);
- 2) alterações histológicas consistentes com SDRA em fase exsudativa e/ou fibro-proliferativa: evidências de alteração de permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (hemorragia, edema, membrana hialina), infiltrado inflamatório (neutrófilos e células mononucleares), alterações consistentes com processo de reparação (tecido de granulação, fibrose) (Katzenstein, 2006);
- 3) ausência de patologia pulmonar crônica prévia;
- 4) arquivo com amostra tecidual pulmonar satisfatória para análise: mínimo de 3 vias aéreas por caso.

3.1.2 Grupo controle

Indivíduos da cidade de São Paulo que faleceram de causas não-pulmonares, não apresentavam história prévia de doenças pulmonares ou de tabagismo e sem evidências macroscópicas ou histológicas de alterações pulmonares foram incluídos no grupo controle (CTRL).

3.1.3 Caracterização da população estudada

Os dados dos pacientes do grupo SDRA foram registrados a partir da análise dos prontuários médicos. Foram registrados: idade, sexo, causa predisponente da SDRA, tempo de SDRA (tempo de evolução desde o

diagnóstico de SDRA até o óbito), parâmetros da ventilação mecânica [pressão de platô, pressão positiva expiratória final (PEEP) e fração inspirada de oxigênio (FiO_2)] e o valor da relação pressão arterial parcial de oxigênio (PaO_2)/ FiO_2 no momento do diagnóstico clínico de SDRA.

Os indivíduos do grupo CTRL foram caracterizados a partir da análise do prontuário médico, quando o óbito ocorreu no HCFMUSP, ou a partir das informações contidas em um questionário respondido por familiares no SVOC quando o óbito ocorreu em outras localidades da cidade de São Paulo. Foram registrados: idade, sexo e causa do óbito.

3.2 Métodos

3.2.1 Processamento Tecidual

O tecido pulmonar dos pacientes foi coletado de maneira padronizada na rotina de autópsias do Departamento de Patologia da FMUSP. O tecido foi coletado a fresco, fixado em formaldeído tamponado a 10% por 24 a 48 horas e submetido a processamento histológico habitual, sendo armazenado em blocos de parafina.

A partir dos blocos de parafina, realizamos cortes de 5 μm de espessura que foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) para a análise morfológica e com coloração de Resorcina-fucsina de Weigert para quantificação de fibras elásticas (Weigert, 1898).

A técnica de imuno-histoquímica (IHC) foi utilizada para identificação das proteínas COL I, COL III, fibronectina, versican, metaloproteinase (MMP)-2 e MMP-9. A padronização final das reações imuno-histoquímicas é apresentada na Tabela 1. Para as reações, os cortes de tecido pulmonar foram desparafinizados através de imersão em xilol quente (estufa a 60°C) durante 20 minutos, seguido de três banhos de 1 minuto em xilol frio (temperatura ambiente) e a hidratação do tecido foi realizada através de banhos subsequentes em álcool absoluto, álcool a 95% e álcool a 70%, todos por 1 minuto. A recuperação antigênica foi obtida através do pré-tratamento com tripsina (Sigma, código T7409) em estufa a 37°C por 10 minutos nas lâminas para Col III e versican ou em solução de citrato em alta temperatura nas lâminas para Col I, fibronectina, MMP-2 e MMP-9. A fim de inibir a peroxidase endógena foi aplicada solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 volumes por 7 vezes de 4 minutos. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado por meio de banho com leite desnatado a 2% por 10 minutos. Os anticorpos primários foram, então, pipetados sobre os cortes e as lâminas foram incubadas por 20 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavadas com PBS por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem, e o anticorpo secundário foi aplicado por 1 hora em estufa a 37°C [kit LSAB[®] (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) nas lâminas para Col III, fibronectina, versican, MMP-2 e MMP-9 e Kit Vector anti-cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) nas lâminas para Col I]. A revelação do complexo antígeno-anticorpo formado foi marcada com a aplicação do cromógeno DAB (diaminobenzidina; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) por 5 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente,

desidratadas com banhos sucessivos de álcool a 70%, álcool a 95%, álcool absoluto e xilol e contra-coradas com hematoxilina de Harris.

Tabela 1. Anticorpos padronizados para a análise imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Pre-tratamento	Diluição	Origem
Colágeno I	Policlonal	Citrato	1:1000	USBiological; Massachusetts/EUA Cód. C7510-12A
Colágeno III	III-53	Tripsina	1:100	Oncogene&Calbiochem; Darmstadt/Alemanha Cód CP19L
Fibronectina	Policlonal	Citrato	1:6000	Dako; Glostrup/Dinamarca Cód. A0245
Versicam	2-B-1	Tripsina	1:100	Seikagaku CO; Tokyo/Japão Cód. 270428
MMP-2	A-Gel VC2	Citrato	1:3000	LabVision; Fremont/EUA Cód. MS-806-P
MMP-9	56-2A4	Citrato	1:50	Calbiochem; Darmstadt/Alemanha Cód. IM37L

MMP=metaloproteinase

3.2.2 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada com Análise de Imagem, utilizando-se o software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), instalado em um computador PC, o qual está conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 Color Video Camera, Victor Company of Japan Limited, Japão) acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Alemanha) (Figura 2).

Três a 6 vias aéreas pequenas, descritas como aquelas que possuem perímetro da membrana basal (MB) $\leq 6\text{mm}$ ao corte transversal, foram analisadas por paciente. As vias aéreas foram divididas em 4 camadas, assim definidas (Figura 3): epitélio de revestimento; camada interna (CI), localizada entre o epitélio e a borda interna do músculo (incluindo a membrana basal e a *lamina própria*); músculo liso (ML); e camada externa (CE), localizada entre a borda externa do músculo e o limite externo da via aérea (parênquima pulmonar) (Matsushita et al., 2005). As variáveis analisadas estão listadas na tabela 2.

Todas as medidas foram feitas em toda a circunferência da via aérea, em um aumento de 400x e realizadas por um investigador cego para os grupos.

Figura 2. Sistema de análise de imagem contendo um computador conectado a uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico

Tabela 2. Variáveis analisadas na via aérea pequena

Variável	Descrição
Epitélio normal, alterado ou descamado	Porcentagem do comprimento da MB revestida por epitélio normal, alterado ou descamado.
Espessura da parede	Relação entre a área da parede da via aérea, excluindo o epitélio de revestimento, e o comprimento da MB correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).
Espessura da camada interna	Relação entre a área da CI e o comprimento da MB correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).
Espessura do músculo	Relação entre a área do ML e o comprimento da MB correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).
Espessura da camada externa	Relação entre a área da CE e o comprimento da MB correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).
Conteúdo das componentes da MEC	Relação entre as áreas positivas para Col I e III, elástica, fibronectina e versican nas camadas da VA e o comprimento da membrana basal correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).
Conteúdo das MMP-2 e -9	Relação entre as áreas positivas para MMP-2 e -9 no epitélio de revestimento ou no restante da parede da VA e o comprimento da membrana basal correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).
Índice de inflamação	Avaliação semiquantitativa do infiltrado inflamatório na parede da via aérea.

A quantificação da espessura da CI, ML e CE e a análise do epitélio foi realizada por análise de imagem em lâminas coradas com H&E, conforme ilustrado na Figura 3. A espessura das camadas das vias aéreas é expressa como a relação entre a área da camada e o comprimento da membrana basal correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). A extensão das alterações epiteliais é expressa como porcentagem (%) do comprimento total da MB correspondente, utilizando-se os seguintes critérios:

- epitélio normal: quando as células epiteliais estavam preservadas;
- epitélio alterado: quando as células epiteliais apresentavam sinais histológicos de necrose ou metaplasia (escamosa ou mucosa);
- epitélio descamado: quando a membrana basal estava exposta.

Figura 3. Fotomicrografias representativas de pequenas vias aéreas coradas por H&E, ilustrando a análise de imagem.

(A) Foto da via aérea pequena (aumento de 100x) mostrando em verde o perímetro da membrana basal. O retângulo delimita as diferentes camadas avaliadas na espessura da via aérea.

(B) Representação esquemática da análise de imagem em um segmento de parede de via aérea (aumento de 400x): MB= comprimento da membrana basal correspondente; EP= epitélio; ACI= área da camada interna; AML= área do músculo liso; ACE= área da camada externa.

Os componentes da MEC foram quantificados nas CI, ML e CE (Figura 4). A expressão das MMP-2 e -9 foi quantificada na camada epitelial e no restante da parede da via aérea (incluindo CI, ML e CE). O conteúdo das diferentes proteínas foi definido como a relação entre área positiva e o comprimento da MB correspondente ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). Fotomicrografias de diferentes casos foram utilizadas para a padronização adequada do intervalo

de cor que representasse a marcação específica de cada proteína, sempre checadas por dois experientes patologistas.

Figura 4. Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica da matriz extracelular (exemplo: colágeno tipo 1) nas camadas interna (A) e externa (B) da parede da via aérea pequena, ilustrando a análise quantitativa por análise de imagem

O índice de inflamação foi determinado por método semiquantitativo, adaptado de Tsuchida et al (2006), baseado na presença de infiltrado inflamatório na parede da via aérea, usando-se uma escala de quatro níveis: ausência de inflamação = 0, inflamação mínima = 1, inflamação moderada = 2 e inflamação intensa = 3.

3.2.3 Correlações clínico-morfológicas

Como objetivos secundários deste trabalho, avaliamos as possíveis correlações entre as características clínicas da nossa população de pacientes com SDRA e os parâmetros morfológicos medidos. Para isto, os

pacientes foram categorizados em subgrupos de acordo com cada objetivo. Dois subgrupos foram formados baseando-se no fator predisponente de SDRA, ou seja, SDRA pulmonar (SDRAp) ou extrapulmonar (SDRAext). Além disso, com a finalidade de investigar os possíveis efeitos da ventilação mecânica e da gravidade da doença nas alterações morfológicas das pequenas vias aéreas, correlacionamos os parâmetros morfológicos com os parâmetros ventilatórios (pressão de platô e PEEP – valores médios nas primeiras 48 horas da doença) e com os valores de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (obtido no momento do diagnóstico). Devido à natureza retrospectiva deste trabalho, e consequente ausência de controle dos parâmetros ventilatórios, utilizamos um subgrupo de pacientes com tempo de SDRA de até 2 dias para a realização desta análise, visando verificar a influência dos parâmetros ventilatórios nos momentos iniciais de desenvolvimento da doença.

3.2.4 Análise estatística

O programa SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) foi utilizado para a análise estatística. Após a realização do teste de normalidade, o teste T de Student e o teste de Mann-Whitney foram usados para comparar os dados estruturais e os dados inflamatórios entre os grupos SDRA e CTRL. Ajustes de Bonferroni foram utilizados para múltiplas comparações. Os testes T de Student e Mann-Whitney foram também usados para comparar os dados dos grupos SDRA pulmonar e extrapulmonar, de acordo com a distribuição dos dados de cada variável. Foram realizadas correlações de

Pearson entre as variáveis clínicas e morfológicas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil). O nível de significância estabelecido para todas as análises foi de 5% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da população estudada

Foram incluídos no estudo 31 pacientes com SDRA e 11 controles. As características demográficas dos grupos SDRA e CTRL estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. A média $\pm$ DP das idades dos pacientes dos grupos SDRA e CTRL foi 45 ± 14 e 52 ± 16 anos, respectivamente ($p= 0,18$). A SDRA foi desencadeada tanto por processos inflamatórios de origem pulmonar como de origem sistêmica. Pneumonia, broncoaspiração e hemorragia alveolar representaram 52% da casuística, enquanto sepse, pancreatite e choque hipovolêmico representaram 48% dos fatores predisponentes ao desenvolvimento da SDRA em nossos pacientes. O tempo de SDRA variou de 1 a 24 dias, porém a maioria dos pacientes (71%) morreu na primeira semana e 52% nas primeiras 48 horas. O suporte ventilatório empregado nos pacientes com SDRA foi baseado na estratégia ventilatória protetora (Tabela 3).

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos e parâmetros ventilatórios dos pacientes do grupo SDRA

Paciente	Idade	Sexo	Causa predisponente para SDRA	Duração da SDRA (dias)	Pressão de platô (cmH ₂ O)	PEEP (cmH ₂ O)	PaO ₂ /FiO ₂
1	28	F	Sepse, hepatite aguda	1	18	08	161
2	38	M	Pneumonia, SIDA	1	35	20	93
3	48	M	Sepse, cirrose	1	12	06	170
4	32	F	Pneumonia, SIDA	1	28	14	82
5	36	F	Choque hipovolêmico, HDA	1	21	9	93
6	58	M	Pneumonia	1	25	10	68
7	56	M	Pneumonia	1	30	0	79
8	52	F	Pneumonia, broncoaspiração	1	40	10	47
9	48	M	Pancreatite	1	40	15	51
10	43	M	Sepse	2	25	10	166
11	31	M	Pneumonia, TMO	2	32	22	137
12	43	M	Sepse, endocardite	2	35	17	104
13	56	F	Pneumonia, broncoaspiração	2	28	13	133
14	57	F	Sepse	2	23	08	130
15	34	M	Sepse	2	27	14	156
16	40	F	Sepse	2	21	11	111
17	19	F	Pancreatite	3	38	18	84
18	75	M	Pneumonia	3	30	14	166
19	58	F	Sepse, HDA	4	25	11	197

Continua...

Conclusão Tabela 3

Paciente	Idade	Sexo	Causa predisponente para SDRA	Duração da SDRA (dias)	Pressão de platô (cmH ₂ O)	PEEP (cmH ₂ O)	PaO ₂ /FiO ₂
20	40	F	Pneumonia	6	21	09	149
21	75	F	Sepse, peritonite	6	25	10	196
22	18	M	Pneumonia	7	21	07	189
23	50	M	Pneumonia, SIDA	8	28	11	126
24	55	F	Sepse, endocardite	9	29	17	119
25	44	M	Choque hipovolêmico, HDA	10	30	14	108
26	40	F	Pneumonia, SIDA	13	22	09	153
27	51	F	Hemorragia alveolar	14	28	17	195
28	26	M	Sepse, peritonite	16	20	10	186
29	45	F	Pneumonia, SIDA	19	39	18	199
30	37	M	Pneumonia, SIDA	22	25	14	182
31	56	M	Pneumonia	24	37	20	173
Média ± DP	45 ± 14	-	-	6 ± 7	28 ± 7	13 ± 5	136 ± 46
Mediana (IQR)	44 (20)	-	-	2 (8)	28 (10)	11 (8)	137 (80)

F= feminino; M= masculino; HDA = hemorragia digestiva alta; SIDA = síndrome da imunodeficiência adquirida; TMO = transplante de medula óssea; PaO₂ = pressão arterial de oxigênio (mmHg); FiO₂ = fração inspirada de oxigênio.

Para cada paciente, os valores de Pressão de Platô e Pressão Positiva Expiratória Final (PEEP) correspondem aos valores médios dos primeiros 2 dias a partir do diagnóstico. Os valores de PaO₂/FiO₂ correspondem aos valores do diagnóstico clínico de SDRA.

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos dos pacientes do grupo controle

Paciente	Idade	Sexo	Causa do óbito
1	81	M	Hemorragia vesical pós-cirúrgica
2	34	M	Fibrilação ventricular
3	70	F	Ruptura de aneurisma de aorta
4	48	F	Infarto Agudo do miocárdio
5	27	M	Hemorragia Digestiva Alta
6	38	M	Infarto Agudo do miocárdio
7	48	M	Miocardiolipatia dilatada
8	63	M	Infarto Agudo do miocárdio
9	51	F	Cardiopatía Hipertrófica
10	62	M	Infarto Agudo do miocárdio
11	46	F	Infarto Agudo do miocárdio

Abreviações: F= feminino; M= masculino.

4.2 Análise morfológica

Foram analisadas 3,6 vias aéreas pequenas/paciente/análise. A mediana (intervalo interquartil) do perímetro das vias aéreas do grupo SDRA foi de 1,94 (1,13) mm e do grupo CTRL foi de 2,06 (1,21) mm, correspondendo a pequenos bronquíolos membranosos (Carroll et al., 1993). Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação ao tamanho das vias aéreas analisadas.

Fotomicrografias ilustrativas do tecido pulmonar dos grupos SDRA e CTRL estão apresentadas na Figura 5. Os dados estruturais e inflamatórios dos grupos SDRA e CTRL estão apresentados na Tabela 5. Os dados individuais de cada paciente estão apresentados no Anexo B. Observamos menor porcentagem de epitélio normal ($p < 0,001$) e maior porcentagem de

epitélio alterado ($p = 0,007$) e descamado ($p = 0,015$) no grupo SDR em relação ao CTRL. O grupo SDR apresentou maior espessura da parede de via aérea e das CI e CE quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,03$). Não houve diferença em relação à espessura do ML. O infiltrado inflamatório foi significativamente maior no grupo ARDS em comparação ao grupo CTRL ($p = 0,03$).

Figura 5. Fotomicrografias representativas da pequena via aérea e tecido alveolar de pacientes com SDR (A e C) e controles (B e D). Pulmões de SDR mostram exsudato intra-alveolar extenso (A) e espessamento de via aérea com inflamação bronquiolar e descamação epitelial (C). VA= via aérea, CE= camada externa, ML=músculo liso, CI= camada interna, EP=epitélio, L=lúmen. Coloração com H&E

Tabela 5. Dados estruturais e índice inflamatório dos grupos SDRA e controle

<i>Variável</i>	<i>SDRA</i>	<i>Controle</i>	<i>P</i>
Epitélio normal	32,9 ± 27,2	76,7 ± 32,7	<0,001
Epitélio descamado	52,6 ± 35,2	21,8 ± 32,1	0,015
Epitélio alterado	14,4 ± 14,8	1,37 ± 3,20	0,007
Espessura da parede	138,7 ± 54,3	86,4 ± 33,3	0,005
Espessura da camada interna	35,2 ± 32,0	17,2 ± 8,14	0,034
Espessura do músculo	14,8 ± 8,20	18,5 ± 22,7	0,427
Espessura da camada externa	88,7 ± 29,9	50,4 ± 17,7	<0,001
Índice de inflamação [mediana(mínimo-máximo)]	1(3)	0(1)	0,027

Valores expressos como média ± DP, a não ser quando especificado. Dados epiteliais expressos como porcentagem do comprimento total da membrana basal (%). Espessuras expressas em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$.

Fotomicrografias representativas da expressão das proteínas na parede da pequena via aérea estão apresentadas nas Figuras 6 e 7. A coloração para as fibras elásticas e a imunorreatividade dos COL I e III, fibronectina, versican e das MMPs apresentaram padrão de distribuição semelhante nos 2 grupos. A marcação de COL I e III, fibronectina e versican foi positiva apenas na matriz extracelular, como era previsto. A marcação das MMP-2 e -9 foi positiva principalmente nas células inflamatórias na parede da via aérea (monócitos/macrófagos e polimorfonucleares), sendo observada fraca expressão nas células epiteliais e no músculo liso.

Figura 6. Fotomicrografias de pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA (A, C, E, G) e controles (B, D, F, H) coradas com anti-colágeno I (A e B), anti-fibronectina (C e D), anti-versicam (E e F) e anti-MMP-9 (G e H). As vias aéreas de pacientes com SDRA apresentam maior conteúdo de colágeno I, fibronectina e versicam e maior expressão de MMP-9. CE=camada externa; ML=músculo liso; CI=camada interna. Barra de escala= 50μm

Figura 7. Fotomicrografias de pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA (A, C, E) e controles (B, D, F) coradas com Resorcina-fucsina de Weigert (A e B), anti-colágeno III (C e D) e anti-MMP-2 (E e F). O conteúdo de fibras elásticas e colágeno III e a expressão de MMP-2 são semelhantes entre os dois grupos. CE=camada externa; ML=músculo liso; CI=camada interna. Barra de escala= 50µm

O conteúdo das proteínas da MEC e a expressão das MMP-2 e -9 na parede das vias aéreas dos grupos SDRA e CTRL está apresentado nas Figuras 5, 6 e 7. Os dados individuais de cada paciente estão apresentados no Anexo B. Observamos maior conteúdo de COL I, fibronectina e versicam na CE da pequena via aérea no grupo SDRA comparado aos controles ($p \leq 0,03$). Além disso, observamos maior conteúdo de versicam na CI do grupo SDRA em comparação ao CTRL ($p < 0,02$). Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos em relação aos conteúdos de fibras elásticas e COL III ou em relação a nenhuma das proteínas analisadas no ML. A expressão de MMP-9 na parede da pequena via aérea foi significativamente maior no grupo SDRA comparado ao CTRL ($p = 0,003$), porém não foram observadas diferenças entre os dois grupos em relação à expressão de MMP-2 na mesma região ou de MMP-2 e -9 no epitélio brônquico.

Figura 8. Os gráficos mostram o conteúdo de colágeno I, colágeno III, fibras elásticas, fibronectina, versicam e MMP- 2 e -9 nas pequenas vias aéreas nos grupos SDRA e controle. CI= camada interna, ML= músculo liso, CE= camada externa. Resultados expressos em $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$. Dados expressos em média $\pm$ DP. Diferença significativa ($\dagger p \leq 0,003$; $*p < 0,03$) comparado aos controles

4.3 Correlações clínico-morfológicas

No subgrupo de pacientes com tempo de SDRA de até 2 dias ($n = 16$) (Tabela 3), a extensão de epitélio normal correlacionou-se positivamente com $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = 0,58$; $p = 0,018$) e negativamente com a pressão de platô ($r = -0,52$; $p = 0,039$). Além disso, a porcentagem da extensão de epitélio descamado apresentou correlação negativa com a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = -0,52$; $p = 0,038$).

Figura 9. Os gráficos mostram a correlação entre alterações morfológicas (porcentagem de epitélio normal) e a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (A) e a pressão de platô nos pacientes que morreram em até 2 dias depois do diagnóstico da síndrome ($n = 16$)

Os subgrupos SDRap e SDRAext são semelhantes em relação ao número de pacientes (SDRAP = 16 e SDRAext = 15), idade (SDRAP = $45,9 \pm 13,6$ e SDRAext = $43,6 \pm 4,3$) e sexo (SDRAP = 7F/9M e SDRAext = 8F/7M). Os subgrupos não apresentaram diferenças em relação ao índice inflamatório e

aos parâmetros estruturais, porém a expressão de MMP-9 foi significativamente maior no grupo SDRAp em comparação ao grupo SDRAext (MMP-9 na parede da via aérea: SDRAp = $2,9 \pm 2,3 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, SDRAext = $1,4 \pm 1,3 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $p = 0,03$; MMP-9 no epitélio brônquico: SDRAp = $2,4 \pm 3,2 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, SDRAext = $1,3 \pm 1,0 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $p = 0,04$).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos, pela primeira vez, a existência de alterações estruturais nas pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA. Nossos resultados mostram que as pequenas vias aéreas dos pacientes com SDRA apresentam alterações estruturais caracterizadas por descamação epitelial, inflamação e espessamento da parede com deposição de colágeno I, fibronectina e versicam, principalmente na camada externa. Sugerimos que estas alterações possam estar relacionadas com as alterações funcionais observadas em pacientes com SDRA.

Estudos recentes sugerem que as vias aéreas distais estão envolvidas na fisiopatologia da LPA/SDRA (Jain e Sznajder, 2008). Entretanto, nenhum estudo havia avaliado sistematicamente as alterações morfológicas das pequenas vias aéreas em pacientes com SDRA. A dificuldade de acesso a esta região pulmonar, fez com que modelos experimentais de LPA fossem utilizados para a investigação do comportamento destas vias aéreas na doença. Estes estudos mostraram necrose e descamação epitelial em vias aéreas distais de animais submetidos à LPA por VM com baixos volumes expiratórios (D'Angelo et al., 2002, 2007; Muscedere et al., 1994; Tsuchida et al., 2006). Além disso, o achado de que os níveis da proteína secretora da célula de Clara CC16 estão aumentados no plasma e edema pulmonar de pacientes com SDRA indica que a lesão de células epiteliais da via aérea distal ocorre também em

humanos (Kropski et al., 2009). Nossos resultados estão de acordo com os achados anteriores, mostrando que a lesão do epitélio bronquiolar ocorre nos pulmões de pacientes com SDRA, e que estas alterações estão relacionadas com a gravidade da doença.

Os mecanismos de lesão epitelial na SDRA ainda não são completamente compreendidos, porém há descrições de sinalização celular para a resposta inflamatória e o remodelamento tecidual em resposta aos estímulos mecânicos aos quais as células epiteliais são expostas durante o ciclo respiratório da VM (Copland et al., 2003; Ghadiali e Gaver, 2008; Milic-Emili et al., 2007). A reabertura cíclica das vias aéreas colapsadas e/ou preenchidas por líquido extravascular, além da hiperdistensão celular decorrente da VM com altos volumes correntes e altas pressões inspiratórias são mecanismos sabidamente lesivos (Tremblay e Slutsky, 2006). O mecanismo mais sugerido é que o estresse hidrodinâmico consequente ao deslocamento de ar sobre a célula epitelial possa causar desde a ruptura reversível da membrana plasmática até a morte celular e descamação epitelial, além de estimular a resposta inflamatória e a alteração das propriedades do surfactante (Bilek et al., 2003; Ghadiali e Gaver, 2000, 2008). Em situações patológicas de insuficiência de surfactante, como na SDRA, há maior tendência de colapso das regiões alveolares e das pequenas vias aéreas no final da expiração favorecendo que, no ciclo ventilatório seguinte, quando a pressão inspiratória atingir os valores de pressão de abertura das vias aéreas colapsadas, a força de cisalhamento resultante sobre as paredes destas vias aéreas possa resultar no

desnudamento e necrose observados neste estudo (D'Angelo et al., 2007). Copland et al. (2003) sugerem, ainda, que o epitélio brônquico possa ser um dos deflagradores da resposta inflamatória e da patogênese da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica.

Além das alterações estruturais, os pulmões dos animais submetidos à LPA induzida por VM apresentam inflamação brônquica difusa e precoce (Copland et al., 2004; Tsuchida et al., 2006). Observamos que a inflamação bronquiolar também está presente em humanos com a SDRA, podendo representar tanto uma resposta primária da via aérea ao estímulo lesivo como ser secundária à inflamação alveolar difusa. Em ambos os casos, acreditamos que o processo inflamatório bronquiolar esteja envolvido na patogênese das alterações estruturais observadas nas vias aéreas desses pacientes.

O componente inflamatório da parede da via aérea apresentou maior expressão de MMP-9 no grupo SDRA quando comparado aos controles, porém o mesmo comportamento não foi observado no epitélio. A maior expressão de MMP-9 no grupo SDRA está de acordo com trabalhos prévios que mostraram o aumento de MMP-9 no LBA de pacientes com SDRA (Fligiel et al., 2006; Pugin et al., 1999). A maior expressão de MMP-9 observada na via aérea se deve provavelmente à grande atividade inflamatória da doença, podendo estar relacionada a um maior *turnover* da MEC. Por outro lado, o aumento de MMP-9 poderia ocorrer em resposta à deposição excessiva de elementos da MEC na tentativa de restabelecimento do equilíbrio entre síntese e degradação da matriz.

Estudos que avaliaram as alterações da MEC no septo alveolar de pacientes com SDRA mostraram presença de fibrose pulmonar (Martin et al., 1995) com aumento do conteúdo de colágeno e de fibras elásticas (Negri et al., 2000; Krein et al., 2003), fibronectina (Fligiel et al., 2006) e versicam (Bensadoun et al., 1996) nas fases exsudativa e fibroproliferativa da síndrome. Na SDRA, o processo fibroproliferativo, caracterizado pela deposição de colágeno, é observado desde as primeiras horas do processo inflamatório e está associado à redução da complacência do sistema respiratório (Armstrong et al., 1999; Chesnutt et al., 1997; Demoule et al., 2006; Marshall et al., 2000). No presente estudo, mostramos, pela primeira vez, que o remodelamento da MEC ocorre também nas vias aéreas distais e sugerimos que estas alterações estruturais possam resultar em alterações funcionais.

As conseqüências funcionais do remodelamento das pequenas vias aéreas são dependentes da composição e das propriedades mecânicas do componente alterado, assim como da localização de acometimento da parede da via aérea (Bai et al., 1994). A camada interna confere resistência tecidual à compressão; o músculo liso é frequentemente alterado em doenças pulmonares caracterizadas por broncoconstricção; e a camada externa é diretamente ligada ao parênquima pulmonar, tendo participação crucial na manutenção da estrutura destas vias aéreas e transmissão de forças elásticas. Portanto, acreditamos que a compartimentalização da parede no estudo da via aérea resulta num melhor entendimento da relação estrutura-função nas doenças pulmonares.

A limitação do fluxo expiratório, o aprisionamento de ar e a distribuição heterogênea da ventilação pulmonar são características de disfunção das vias aéreas observadas em pacientes com SDRA ventilados com baixos valores de PEEP, sintomas os quais podem ser decorrentes do fechamento de vias aéreas durante a expiração (Kondili et al., 2002; Koutsoukou et al., 2000; Milic-Emili et al., 2007; Rylander et al., 2005). Os mecanismos envolvidos no fechamento das vias aéreas incluem a disfunção do surfactante pulmonar e a diminuição ou perda da interdependência via aérea/parênquima pulmonar consequente ao edema intersticial, colapso alveolar e ruptura de acoplamentos alveolares (D'Angelo et al., 2002, 2007; Jain e Sznajder, 2008). Considerando que a CE é a principal região na qual as forças mecânicas são transmitidas do parênquima alveolar para a parede da via aérea, esta região representa um ponto crítico que pode ser alterado tanto pelo processo inflamatório como pelo dano causado pelas alterações de forças consequentes à ventilação mecânica. De forma interessante, observamos neste estudo que o depósito aumentado de colágeno I, fibronectina e versicam no grupo SDRA ocorreu principalmente na CE. Esta alteração tecidual pode contribuir para a diminuição da interdependência via aérea-parênquima pulmonar devido à alteração das forças mecânica entre estes dois compartimentos, com consequente tendência ao colapso de vias aéreas.

Em doenças pulmonares inflamatórias crônicas, o remodelamento das vias aéreas é associado com alterações importantes da mecânica da via aérea e com sintomas relacionados à obstrução destas vias aéreas (James

e Wenzel, 2007). Apesar de a obstrução de vias aéreas não ser característica de pacientes com SDRA, alguns pacientes que sobrevivem à doença podem apresentar disfunção pulmonar leve a moderada evidenciada por diminuição do VEF₁ (volume expiratório forçado no primeiro segundo), CVF (capacidade vital forçada) e/ou VEF₁/CVF avaliados em 1 a 3 anos após a alta hospitalar (Granja et al., 2003; Heyland et al., 2005; Neff et al., 2003). É possível, portanto, que a persistência da disfunção pulmonar nestes pacientes esteja relacionada com o remodelamento das pequenas vias aéreas na fase aguda da doença.

Além de as alterações da MEC serem observadas precocemente no desenvolvimento da SDRA (Armstrong et al., 1999, Chesnutt et al., 1997; Marshall et al., 2000), estudos indicam que tais alterações possam mediar a resposta inflamatória tecidual associada ao manejo inadequado do suporte ventilatório dado a estes pacientes (Tremblay e Slutsky, 2006). A lesão pulmonar na SDRA é distribuída de maneira não uniforme pelo pulmão, resultando em ventilação pulmonar heterogênea e predisposição do tecido pulmonar à lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico (Tremblay e Slutsky, 2006). Portanto, apesar de as alterações estruturais observadas nas vias aéreas dos nossos pacientes serem provavelmente decorrentes do processo fisiopatológico envolvido na LPA, as mesmas podem ser exacerbadas pela estratégia ventilatória utilizada. Grandes estudos clínicos mostraram aumento da mortalidade em grupos de pacientes com LPA que foram submetidos à VM com elevados volumes correntes e pressões de platô inspiratórias (Amato et al., 1998; The Acute Respiratory Distress

Syndrome Network, 2000). Em nossos pacientes, a lesão epitelial das vias aéreas apresentou correlação positiva com a $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ e com os parâmetros ventilatórios, sugerindo que ambos, a lesão pulmonar inflamatória primária e a estratégia ventilatória (principalmente elevados valores pressóricos) estão envolvidos nas alterações estruturais das vias aéreas na SDRA.

Considerando a ampla gama de fatores etiológicos que envolve a fisiopatogênese da SDRA, esperaríamos que os pacientes com SDRAp apresentassem maior lesão histológica de vias aéreas devido ao envolvimento direto das pequenas vias aéreas na fisiopatologia de doenças pulmonares como a pneumonia e a broncoaspiração. Gattinoni et al. (1998) observaram maior dificuldade ventilatória e menor resposta ao recrutamento pulmonar no grupo SDRAp, o que poderia ser explicado pelo predomínio da consolidação pulmonar. Já a SDRAextp apresentou melhor resposta à elevação da PEEP, sugerindo o predomínio de edema e colapso alveolar nesses pulmões. Thille et al. (2007), por sua vez, não observaram diferenças na resposta ao recrutamento pulmonar em pacientes com SDRAp, SDRAext ou de origem mista. Além disso, estudos observacionais e intervencionistas realizados em humanos, nos quais a etiologia da SDRA foi subdividida nos dois grandes grupos de SDRAp e SDRAext, não detectaram diferenças significativas em relação a mortalidade entre os grupos (Agarwal et al., 2008). Nossos dados mostraram apenas maior expressão da MMP-9 pelas vias aéreas dos pacientes do grupo SDRAp em comparação ao grupo SDRAext, sem diferenças significativas no índice de inflamação ou nos

parâmetros estruturais avaliados. Estes dados sugerem que as alterações das vias aéreas observadas nessa população seja resultado da intensa atividade inflamatória presente nesses pulmões, independentemente do insulto primário.

Alguns estudos sugerem que a lesão tecidual na LPA é mais grave nas regiões dependentes do pulmão (Broccard et al., 1997; Takeuchi et al., 2002). No entanto, estudos experimentais mais recentes demonstraram que a lesão brônquica é difusa, acometendo tanto as regiões dependentes como as não dependentes do pulmão (Tsuchida et al., 2006). No presente estudo, não conseguimos acessar as diferenças regionais da lesão pulmonar na SDRA em humanos devido à limitação dada pela coleta retrospectiva do tecido pulmonar analisado. Outra limitação deste estudo refere-se à ausência de informações sobre os hábitos pessoais nos prontuários médicos de alguns dos pacientes estudados. Considerando que algumas das alterações de vias aéreas observadas podem ser relacionadas ao hábito tabágico, esta informação seria de grande importância para a análise dos dados. Porém, apesar de tais limitações, a característica clínico-morfológica deste estudo nos garante que todos os pacientes avaliados realmente foram acometidos pela SDRA. O diagnóstico caracterizado clinicamente (Bernard et al, 1994) e confirmado por alterações histológicas consistentes com a síndrome (Katzenstein, 2006) elimina o viés assumido por estudos clínicos nos quais as definições clínicas utilizadas rotineiramente apresentam sensibilidade e especificidade moderadas, podendo gerar achados falso-negativos e/ou incoerentes (Esteban e col., 2005).

Em resumo, nossos resultados mostram que as pequenas vias aéreas de pacientes que morreram com SDRA apresentam alterações estruturais caracterizadas por descamação epitelial, inflamação e espessamento da parede com remodelamento da MEC. É possível que tais alterações possam contribuir para as alterações funcionais descritas nestes pacientes.

6. CONCLUSÃO

As pequenas vias aéreas de pacientes que morreram com SDRA apresentam alterações estruturais caracterizadas por descamação epitelial, inflamação e espessamento da parede com remodelamento da MEC.

Dentre os parâmetros estudados, a lesão do epitélio respiratório é o que melhor reflete a gravidade da doença e correlaciona-se com os parâmetros ventilatórios utilizados.

Não existem evidências de que as alterações das vias aéreas na SDRA sejam distintas na SDRA de origem pulmonar ou extra-pulmonar.

7. ANEXOS

Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética para a condução da pesquisa:
Protocolo de pesquisa número 506/06

APROVAÇÃO

A 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 sessão de 27.07.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **506/06**, intitulado: **"Caracterização das alterações de pequenas vias aéreas em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff**

Pesquisador (a) Executante: **Sra. Maína Maria Barbosa Morales**

CAPPesq, 27 de Julho de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo B. Dados individuais dos pacientes

Caso	P/ E	Tempo	Epitélio Normal	Epitélio Alterado	Epitélio Descamado	Espessura da Parede	Espessura da CI	LOG da Espessura da CI	Espessura do ML	Espessura da CE	Score de Inflamação
1	E	SDRA1	0,87	0	0,13	133,92	27,75	1,44	14,48	91,69	2
2	P	SDRA1	0	0,07	0,93	62,56	17,95	1,25	4,83	39,78	0
3	E	SDRA1	0,75	0,13	0,13	163,07	32,23	1,51	6,91	123,93	0
4	P	SDRA1	0,58	0,27	0,15	105,28	26,39	1,42	8,31	70,58	2
5	E	SDRA1	0,35	0,25	0,39	90,55	22,14	1,35	5,51	62,91	0
6	P	SDRA1	0	0	0,98	160,4	70,55	1,85	6,31	83,54	0
7	P	SDRA1	0	0	1	252,43	116,04	2,06	8,99	127,4	2
8	P	SDRA1	0,29	0,04	0,67	197,51	68,03	1,83	15,04	114,44	3
9	E	SDRA1	0,29	0,16	0,55	75,22	16,28	1,21	11,37	47,58	1
10	E	SDRA2	0,47	0,3	0,22	164,53	33,49	1,52	33,8	97,24	1
11	P	SDRA2	0,59	0,41	0	186,05	36,15	1,56	19,93	129,97	0
12	E	SDRA2	0	0,33	0,67	123,46	38,67	1,59	10,31	74,47	0
13	P	SDRA2	0,37	0	0,62	118,04	28,34	1,45	8,43	81,28	0
14	E	SDRA2	0,37	0,26	0,37	165,54	29,37	1,47	20,17	116	0
15	E	SDRA2	0,25	0	0,74	161,82	53,49	1,73	10,87	97,46	1
16	E	SDRA2	0,21	0	0,79	121,71	17,91	1,25	9,06	94,74	0
17	E	SDRA2	0,8	0,2	0	161,5	23,88	1,38	17,71	119,92	1
18	P	SDRA2	0,54	0,31	0,15	100,06	13,12	1,12	16,45	70,5	1

Continua...

Conclusão

Caso	P/ E	Tempo	Epitélio Normal	Epitélio Alterado	Epitélio Descamado	Espessura da Parede	Espessura da CI	LOG da Espessura da CI	Espessura do ML	Espessura da CE	Score de Inflamação
19	E	SDRA2	0,19	0,15	0,67	163,98	65,25	1,81	17,51	81,22	0,5
20	P	SDRA3	0	0	1	128,58	16,39	1,21	21,35	90,84	1
21	E	SDRA3	0	0	1	185,17	39,28	1,59	40,73	105,16	1
22	P	SDRA3	0,13	0,27	0,6	43,74	4,69	0,67	15,46	23,59	1
23	P	SDRA3	0	0	1	170,49	15,55	1,19	22,21	132,73	1
24	E	SDRA3	0,73	0,12	0,14	77,16	19,92	1,3	7,93	49,3	0
25	E	SDRA3	0,41	0,12	0,47	88,64	15,92	1,2	9,46	63,27	1
26	P	SDRA3	0,47	0,41	0,12	116,96	17,88	1,25	15,72	83,37	0
27	P	SDRA3	0,64	0,02	0,34	160,65	26,58	1,42	25,33	108,74	0
28	E	SDRA3	0,18	0,19	0,63	157,87	9,47	0,98	15,91	132,5	0,5
29	P	SDRA3	0,14	0	0,86	70,49	17,35	1,24	7,02	46,11	1
30	P	SDRA3	0,54	0,47	0	99,66	16,53	1,22	11,55	71,59	1
31	P	SDRA3	0	0	1	293,62	155,98	2,19	19,16	118,48	0

Caso	P/E	Tempo	Col1CI	Col1ML	Col1CE	Col3CI	Col3ML	Col3CE	FibrCI	FibrML	FibrCE	VersCI	VersML	VersCE	ElastCI	ElastML	ElastCE
1	E	SDRA1	2,76	0,14	7,65	1	0,05	4,04	2,12	0,47	12,61	7,08	0,21	13,38	3,76	0,22	7,43
2	P	SDRA1	6,58	0,38	15,41	1,13	0,17	2,16	7,27	2,65	30,06	6,32	0,18	14,63	2,82	0,15	4,84
3	E	SDRA1	7,48	0,38	31,09	4,84	0,4	12,72	2,17	1,19	18,16	5,87	0,21	13,03	4,03	0,59	13,42
4	P	SDRA1	9,13	0,35	27,87	5,59	0,98	9,79	8,51	3,75	38,13	11,05	0,37	25,66	8,77	2,4	22,76
5	E	SDRA1	7,03	0,24	20,81	3,31	0,3	6,9	5,3	4,72	23,79	7,06	0,14	20,03	4,81	0,72	7,08
6	P	SDRA1	6,19	0,28	22,89	3,07	0,77	9,85	7,86	1,83	28,07	5,44	0,11	18,39	3,47	0,54	10,11
7	P	SDRA1	10,55	0,25	23,48	9,7	1,24	20,11	8,07	3,86	33,14	7,19	0,09	6,94	4,68	0,33	6
8	P	SDRA1	5,58	0,73	29,67	2,24	0,67	11,81	3,75	4,1	12,6	7,32	0,08	15,66	4,16	0,34	5,29
9	E	SDRA1	3,96	0,32	15,51	0,85	0,18	4,65	0,51	0,28	4,5	8,29	0,2	14,1	3,08	0,35	3,35
10	E	SDRA2	3,34	0,3	22,71	0,76	0,1	1,82	3,25	0,98	13,74	4,38	0,17	10,68	2,9	0,36	3,93
11	P	SDRA2	2,65	0,13	8,8	-	-	-	3,99	2,26	13,58	5,03	0,05	8,85	1,78	0,1	3,66
12	E	SDRA2	11,75	0,47	21,87	3,44	0,94	4,84	7,73	3,86	27,43	9,51	0,12	8,52	11,39	0,87	14,61
13	P	SDRA2	5,29	0,46	13,49	4,27	1,68	19,01	11,49	7,14	46,31	9,55	0,24	24,36	5,94	0,43	13,5
14	E	SDRA2	5,3	0,3	21,52	2,14	0,39	9,41	11,29	6,09	52,24	7,39	0,06	20,13	9,82	1,03	11,25
15	E	SDRA2	7,89	0,9	24,5	7,11	1,48	5,52	5,64	8,73	41,32	7,35	0,25	18,54	3,67	0,59	4,32
16	E	SDRA2	5,97	0,51	16,15	2,02	0,78	12,56	5,5	7,15	21,36	6,31	0,12	14,76	2,71	0,14	4,2
17	E	SDRA2	6,42	0,17	20	0,96	0,07	1,33	6,42	5,07	50,75	6,89	0,11	8,6	5,01	0,74	12,23
18	P	SDRA2	8,8	1,22	21,26	8,31	5,03	17,05	11,88	5,12	27,18	9,09	0,19	17,66	6,63	0,76	5,83
19	E	SDRA2	3,88	0,33	13,05	1,12	0,24	4,79	4,23	3,4	20,39	5,44	0,1	11,33	3,11	0,21	5,24
20	P	SDRA3	6,89	0,79	19,27	-	-	-	4,43	5,05	22,43	5,57	0,05	13,82	2,59	0,3	4,27
21	E	SDRA3	6,31	0,31	19,77	3,44	0,38	8,26	7,08	3,42	20,51	0,91	0,05	5,41	6,18	1,17	13,49
22	P	SDRA3	4,48	0,62	32	0,46	0,09	2,08	1,38	2,71	12,78	2,87	0,09	6,36	1,28	0,12	2,6
23	P	SDRA3	7,46	0,1	16,58	1,84	0,61	10,05	9,24	4,12	39,89	7,64	0,19	14,66	2,67	0,42	3,79
24	E	SDRA3	4,16	0,1	10,23	1,08	0,3	13,17	11,66	3,22	64,82	6,02	0,12	11,84	6,13	0,45	9,43
25	E	SDRA3	5,64	0,3	14,06	12,14	1,6	13,84	9,53	2,28	31,62	8,45	0,17	14,49	3,2	0,4	6,49
26	P	SDRA3	2,97	0,31	12,08	3,75	0,67	9,66	3,47	1,3	16,8	3,59	0,11	10,29	2,51	0,5	6,7
27	P	SDRA3	2,67	0,28	10,35	5,14	0,48	24,25	1,64	1,94	16,44	4,56	0,11	21,43	4,17	0,8	14,47
28	E	SDRA3	5,73	0,6	26,06	5,42	1,62	12,16	2,81	3,89	21,8	5,12	0,25	14,17	3,02	0,57	6,82
29	P	SDRA3	5,1	1,43	26,33	0,96	0,56	2,11	7,5	5,75	36,95	3,28	0,1	15,37	2,76	0,21	5
30	P	SDRA3	7,37	0,36	24,82	3,06	0,39	9,28	3,56	0,55	20,1	6	0,11	12,66	2,19	0,12	4,05
31	P	SDRA3	9,79	0,84	26,83	6,01	3,53	14,89	3,96	7,08	23,67	8,6	0,23	25,21	3,81	1,02	7,28

Caso	P / E	Tempo	MMP9 na Parede	MMP9 no Epitélio	MMP2 na Parede	MMP2 no Epitélio
1	E	SDRA1	0,52	0	6,99	1,71
2	P	SDRA1	3,2	-	13,28	-
3	E	SDRA1	0,31	0,1	8,87	1,65
4	P	SDRA1	2,97	2,52	9,13	9,46
5	E	SDRA1	0,72	0,17	10,4	1,84
6	P	SDRA1	1,18	-	8,01	0,47
7	P	SDRA1	1,2	-	4,45	-
8	P	SDRA1	1,93	-	3,46	1,95
9	E	SDRA1	2,62	-	3,1	-
10	E	SDRA2	0,61	0,29	2,39	0,46
11	P	SDRA2	-	-	4,81	0
12	E	SDRA2	0,59	-	6,02	-
13	P	SDRA2	1,86	8,38	10,22	1,14
14	E	SDRA2	5,24	0,96	6,24	0,37
15	E	SDRA2	0,98	0,7	5,46	0,43
16	E	SDRA2	1,15	0,34	8,83	1,77
17	E	SDRA2	2,94	1,39	2,21	0,28
18	P	SDRA2	4,54	5,24	5,14	0,39
19	E	SDRA2	0,43	0,55	4,84	-
20	P	SDRA3	0,37	-	4	-
21	E	SDRA3	0,76	0,04	2,53	-
22	P	SDRA3	1,05	0,43	0,94	1,2
23	P	SDRA3	8,73	-	8,11	-
24	E	SDRA3	1,93	0,1	14,05	2,21
25	E	SDRA3	1,51	1,76	7,32	3,3
26	P	SDRA3	3,56	0,13	5,79	1,25
27	P	SDRA3	1,23	0,29	8,84	1,49
28	E	SDRA3	0,42	0,01	8,61	0,57
29	P	SDRA3	2,92	-	6,57	-
30	P	SDRA3	2,28	0,09	13,37	4,65
31	P	SDRA3	7,08	-	12,34	-

Controle	Epitélio Normal	Epitélio Alterado	Epitélio Descamado	Espessura da Parede	Espessura da CI	LOG da Espessura da CI	Espessura do ML	Espessura da CE	Score de Inflamação
1	1	0	0	71,09	18,16	1,26	10,92	42,01	1
2	1	0	0	139,35	15,18	1,18	85,05	39,12	0
3	1	0	0	159,34	41,95	1,62	23,06	94,33	0
4	0,41	0,1	0,49	63,24	13,54	1,13	7,19	42,51	0
5	0,95	0,05	0	76,88	17,56	1,24	5,53	53,79	0
6	0,83	0	0,13	50,88	10,46	1,02	12,86	27,56	0
7	0,68	0	0,32	73,33	14,02	1,15	6,35	52,96	0
8	1	0	0,02	81,27	19,18	1,28	19,31	42,77	0
9	0	0	1	68,64	13,18	1,12	8,62	46,84	1
10	0,57	0	0,43	70,2	13,85	1,14	11,85	44,49	0
11	1	0	0	95,96	15,2	1,18	13,13	67,63	0

Controle	ColICI	ColIML	ColICE	ColIICI	ColIIIML	ColIIICE	FibrCI	FibrML	FibrCE	VersCI	VersML	VersCE	ElastCI	ElastML	ElastCE
1	13,52	0,5	17,44	1,38	1,53	4,71	4,76	3,02	17,77	2,08	0,04	6,35	3,07	0,2	6,08
2	4,78	0,23	10,83	2,52	0,29	4,62	6,09	2,21	14,7	6,1	0,1	10,42	4,47	0,94	6,87
3	2,74	0,1	11,68	0,36	0,09	1,67	3,02	0,44	8,16	1,02	0,01	3,15	6,23	0,19	8,04
4	9,96	0,29	24,17	15,45	4,63	23,17	20,5	9,26	34,52	4,7	0,04	5,88	5,08	0,47	10,18
5	3,88	0,36	11,63	0,12	0,01	1,4	1,49	0,65	8,05	4,9	0,38	11,83	4,03	0,77	5,96
6	4,1	0,38	12,23	1,21	0,57	2,65	4,06	0,94	6,45	6,62	0,41	8,07	5,33	0,16	2,43
7	2,81	0,32	16,35	3,37	1,43	14,19	3,77	3,6	23,58	5,78	0,26	12,49	3,48	0,61	8,34
8	5,92	0,32	14,74	8,88	3,57	8,57	5,51	2,84	16	3,72	0,29	9,96	5,61	0,92	12,54
9	5,59	0,3	14,5	0,78	0,03	1,39	9,14	5,58	27,96	6,57	0,21	8,97	6,89	1,04	11,32
10	1,55	0,09	7,41	5,47	1,78	14,13	7,7	4,38	17,1	6,27	0,27	7,8	4,52	0,32	7,11
11	8,29	0,43	12,94	5,26	1,4	6,06	5,4	1,35	16,32	2,45	0,2	3,91	4,25	0,18	3,94

Controle	MMP9 na Parede	MMP9 no Epitélio	MMP2 na Parede	MMP2 no Epitélio
1	0,45	1,44	2,42	0,39
2	1,64	2,73	7,74	0,83
3	0,67	0	1,38	0,29
4	0,76	-	8	-
5	2,07	3,53	6,06	1,4
6	0,34	0,15	6,92	0,76
7	0,83	-	3,21	-
8	0,91	0,25	4,95	0,21
9	0,83	-	5,01	4,65
10	0,15	0,2	0,95	0,88
11	0,62	0,06	7,57	2,35

8. REFERÊNCIAS

1. Agarwal R, Srinivas R, Nath A, Jindal SK. Is the Mortality Higher in the Pulmonary vs Extrapulmonary ARDS? A Metaanalysis. *Chest* 2008; 133: 1463 -1473.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2: 319-23.
3. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 347-354.
4. Armstrong L, Thickett DR, Mansell JP, Ionescu M, Hoyle E, Billingham RC, Poole AR, Millar AB. Changes in Collagen Turnover in Early Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1910-1915.
5. Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, Martin J, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M, Rodger JP, Pare PD, Schellenberg RR, Tiddens HAWM, Wagner EM, Yager D. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol* 1994; 77:1011-1014.
6. Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, Roberts CR. Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(6 Pt 1): 1819-28.

7. Bernard GR, Artigas A, Bringham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS: definition, mechanisms, relevant outcomes, and clinical coordination. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 149: 818-824.
8. Bilek AM, Dee KC, Gaver DP, 3rd: Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *J Appl Physiol* 2003; 94: 770-783.
9. Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, Slutsky AS, Pullenayegum E, Zhou Q, Cook D, Brochard L, Richard JC, Lamontagne F, Bhatnagar N, Stewart TE, Guyatt G. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2010, 303:865-73.
10. Broccard AF, Shapiro RS, Schimtz LL, Ravenscraft SA, Marini JJ. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1997; 25: 16-27.
11. Budinger GR, Chandel NS, Donnelly HK, Eisenbart J, Oberoi M, Jain M. Active transforming growth factor-beta1 activates the procollagen I promoter in patients with acute lung injury. *Int Care Med* 2005; 31: 121-128.
12. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airway in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 405-410.
13. Cavalcante FS, Ito S, Brewer K, Sakai H, Alencar AM, Almeida MP, Andrade JS Jr, Majumdar A, Ingenito EP, Suki B. Mechanical interactions between collagen and proteoglycans: implications for the stability of lung tissue. *J Appl Physiol* 2005; 98: 672 - 679.

14. Chesnutt AN, Matthay MA, Tibyan FA, Clark JG. Early detection of type III procollagen peptide in the acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156: 840-845.
15. Copland IB, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J, Post M. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1051-1059.
16. Copland IB, Martinez F, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J, Post M. High tidal volume ventilation causes different inflammatory responses in newborn versus adult lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(6): 739-48.
17. Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. The Lung. 2^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
18. D'Angelo E, Pecchiari M, Baraggia P, Saetta M, Balestro E, Milic-Emili J. Low-volume ventilation causes peripheral airway injury and increased airway resistance in normal rabbits. *J Appl Physiol* 2002; 92: 949-956.
19. D'Angelo E, Pecchiari M, Gentile G. Dependence of lung injury on surface tension during low-volume ventilation in normal open-chest rabbits. *J Appl Physiol* 2007; 102: 174-182.
20. Demoule A, Decailliot F, Jonson B, Christov C, Maitre B, Touqui L, Brochard L, Delclaux C. Relationship between pressure-volume curve and markers for collagen turn-over in early acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2006; 32(3): 413-20.
21. Dos Santos CC. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med* 2008; 34: 619-30.

-
22. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Aramburu JA, Nájera L, Stewart TE. Acute respiratory distress syndrome: underrecognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions. *Crit Care Med*. 2005; 33(10): 2228-34.
 23. Fialkow L, Vieira SRR, Fernandes AK, Silva DR, Bozzetti MC. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. *Int Care Med*. 2002; 28: 1644-8.
 24. Fligiel SEG, Standiford T, Fligiel HM, Tashkin D, Strieter RM, Warner RL, Johnson KJ, Varani J. Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Human Pathology* 2006; 37: 422-430.
 25. Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by Pulmonary and Extrapulmonary Disease: Different Syndromes? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 3-11.
 26. Ghadiali SN, Gaver DP. An investigation of pulmonary surfactant physicochemical behavior under airway reopening conditions. *J Appl Physiol* 2000; 88:493-506.
 27. Ghadiali SN, Gaver DP. Biomechanics of liquid-epithelium interactions in pulmonary airways. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2008; 163: 232-243.
 28. Granja C; Morujão E, Costa-Pereira A. Quality of life in acute respiratory distress syndrome survivors may be no worst than in other ICU survivors. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1744-1750.

-
29. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:133-44.
 30. Heyland DK, Groll D, Caeser M. Survivors of acute respiratory distress syndrome: Relationship between pulmonary dysfunction and long-term health-related quality of life. *Crit Care Med* 2005; 33(7): 1549-1553.
 31. Jain M e Sznajder JI. Peripheral airways injury in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion in Critical Care* 2008; 14: 37-43.
 32. James A e Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J* 2007; 30: 134-155.
 33. Katzenstein A-LA: Katzenstein and Askin's Surgical Pathology of Non-Neoplastic lung disease. Major problems in Pathology. 4^a ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p.17-33.
 34. Kondili E, Prinianakis G, Athanasakis H, Georgopoulos D. Lung emptying in patients with acute respiratory distress syndrome: effects of positive end expiratory pressure. *Eur Respir J* 2002; 19: 811-819.
 35. Koutsoukou A, Armaganidis A, Stavrakaki-Kallergi C, Vassilakopoulos T, Lymberis A, Roussos C, Milic-Emili J. Expiratory flow limitation and intrinsic positive end-expiratory pressure at zero positive end expiratory pressure in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1590-1596.
 36. Koutsoukou A, Bekos, B, Sotiropoulou C, Koulouris NG, Roussos C, Milic-Emili J. Effects of positive end-expiratory pressure on gas exchange

- and expiratory flow limitation in adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2002; 30: 1941 - 1949.
37. Krein PM, Sabatini PJB, Tinmouth W, Green FHY, Winston BW. Localization of Insulin-like Growth Factor-I in Lung Tissues of Patients with Fibroproliferative Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 83-90.
38. Kropski JA; Fremont RD; Calfee CS and Ware LB. Clara Cell Protein (CC16), a Marker of Lung Epithelial Injury, Is Decreased in Plasma and Pulmonary Edema Fluid From Patients With Acute Lung Injury. *Chest* 2009; 135: 1440-1447.
39. Limper AH, Roman J. Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest* 1992 Jun; 101: 1663-73.
40. Macklem PT. The Physiology of Small Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: S181-S183.
41. Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, Laurent GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162: 1783-1788.
42. Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P and Gouin F. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest* 1995; 107: 196-200.
43. Matsushita MM, Silva LFF, Santos MA, Fernezlian S, Schrupf JÁ, Roughley P, Hiemstra OS, Saldiva PHN, Mauad T, Dolhnikoff M. Airway proteoglycans are differentially altered in fatal Asthma. *J Pathol* 2005; 207: 102-110.

-
44. Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Critical Care Med*. 2004; 170:857-62.
 45. Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, Slutsky AS, Arabi YM, Cooper DJ, Davies AR, Hand LE, Zhou Q, Thabane L, Austin P, Lapinsky S, Baxter A, Russell J, Skrobik Y, Ronco JJ, Stewart TE; Lung Open Ventilation Study Investigators. Controlled Trial Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized End-Expiratory Pressure for Acute Lung Injury and Recruitment Maneuvers, and High Positive Ventilation Strategy Using Low Tidal Volumes. *JAMA*. 2008 Feb 13;299(6):637-45.
 46. Menezes SL, Bozza PT, Neto HC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PR. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *J Appl Physiol* 2005; 98: 1777-83.
 47. Mercat A, Richard JC, Vielle B, Jaber S, Osman D, Diehl JL, Lefrant JY, Prat G, Richecoeur J, Nieszkowska A, Gervais C, Baudot J, Bouadma L, Brochard L. Expiratory Pressure (Express) Study Group. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299(6): 646-655.
 48. Milic-Emili J, Torchio R, D'Angelo E. Closing volume: a reappraisal (1967-2007). *Eur J Appl Physiol* 2007; 99: 567-583.
 49. Muscedere JG, Mullen JBM, Gan K, Slutsky AS. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1327-1334.

-
50. Neff TA, Stocker R, Frey HR, Stein S, Russi EW. Long-term Assessment of Lung Function in survivors of Severe ARDS. *Chest* 2003; 123: 845-853.
 51. Negri EM, Montes GS, Saldiva PHN, Capelozzi VL. Architectural remodelling in acute and chronic interstitial lung disease (ILD): fibrosis or fibroelastosis? *Histopathology* 2000; 37(5): 393-401.
 52. Oba Y, Thameem DM, Zaza T. High levels of PEEP may improve survival in acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis. *Respir Med*. 2009; 103: 1174-81.
 53. Oliveira, RHR; Deheizelin, D; Kairalla, RA. Incidência de lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Sírio Libanês. *Rev bras ter intensiva* 2002; 14(1): 44-48.
 54. Pelosi P, D'Onofrio D, Chiumello D, Paolo S, Chiara G, Capelozzi VL, Barbas CS, Chiaranda M, Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. *Eur Respir J* 2003; 22: 48s–56s.
 55. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27: 304-312.
 56. Rylander C, Tylén U, Rossi-Norrlund R, Herrmann P, Quintel M, Bake B. *Critical Care* 2005; 9: R165-R171.
 57. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody P, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. *N Eng J Med* 2005; 353: 1685-9

-
58. Béla Suki and Jason HT Bates. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir Physiol Neurobio*. 2008; 163:33-43.
 59. Takeuchi M, Goddon S, Dolhnikoff M, Shimaoka M, Hess D, Amato MBP, Kacmarek RM. Set positive end-expiratory pressure during protective ventilation affects lung injury. *Anesthesiology* 2002; 97: 682-692.
 60. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342: 1301-1308.
 61. Thille AW, Richard JM, Maggiore SM, Ranieri M, Brochard L. Alveolar Recruitment in Pulmonary and Extrapulmonary Acute Respiratory Distress Syndrome. Comparison Using Pressure–Volume Curve or Static Compliance. *Anesthesiology* 2007; 106(2): 212-217.
 62. Tsuchida S, Engelberts D, Peltekova V, Hopkins N, Frndova H, Babyn P, McKerlie C, Post M, McLoughlin P, Kavanagh BP. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174: 279-289.
 63. Tremblay NL e Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 2006; 32: 24-33.
 64. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342: 1334-49.
 65. Weigert, C. Über eine methode zur farbung elastischer fasern. *Zentralbl Allg Pathol Anat* 1898; 9: 289-292.
 66. Wheele AP e Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 2007; 369: 1553-65.