RUY DE CAMARGO PIRES NETO

Envolvimento das pequenas vias aéreas na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo: papel da inflamação, das alterações do surfactante e da apoptose de células epiteliais

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

Programa de: Patologia Orientadora: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff

SÃO PAULO 2011

RUY DE CAMARGO PIRES NETO

Envolvimento das pequenas vias aéreas na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo: papel da inflamação, das alterações do surfactante e da apoptose de células epiteliais

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

Programa de: Patologia Orientadora: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff

SÃO PAULO 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pires Neto, Ruy de Camargo

Envolvimento das pequenas vias aéreas na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo : papel da inflamação, das alterações do surfactante e da apoptose de células epiteliais / Ruy de Camargo Pires Neto. -- São Paulo, 2011. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Marisa Dolhnikoff.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto respiratório agudo 2.Epitélio respiratório 3. Citocinas 4. Proteínas associadas a surfactantes pulmonares 5. Apoptose

USP/FM/DBD-083/11

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a minha esposa e a minha filha.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo e ensinamentos. Exemplos que são de conduta moral e ética que sempre procurarei seguir.

A minha esposa, pela amizade, pelo amor incondicional, por toda ajuda e por partilhar as vitórias e derrotas nestes últimos anos. Com certeza eu não teria realizado este trabalho se não fosse o seu apoio.

A Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff, por me ensinar que o papel de um orientador vai muito além do que ensinar a arte de escrever um "paper". Muito obrigado por todas as conversas e compartilhar comigo as suas experiências de vida e pelas orientações em relação a vida pessoal e profissional.

A Profa. Dra. Thais Mauad, pelas discussões no trabalho e pelos conselhos na vida profissional.

Aos amigos Luiz (Burns) e Maina que muito contribuíram para que esta Tese fosse realizada.

A amiga e companheira de plantão Adriana Hirota que sempre me ajudou quando era preciso nas trocas de plantão e escalas da UTI.

A todos os amigos da sala 1155. Muito obrigado pelos momentos de descontração e risadas. Pela companhia durante as madrugadas no laboratório para analisar lâminas, escrever "abstracts" ou ainda no plantão do SAMU do porco. É muito bom estar em um grupo onde a alegria em ver o crescimento profissional de um amigo supera o instinto competitivo.

A todos os funcionários e técnicas dos laboratórios de Histologia, Imuno-histoquímica, Museu, Sala dos Residentes e Departamento de Patologia, pelo auxilio.

A todas as pessoas e que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho pudesse ser realizado.

MUITO OBRIGADO!!!

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. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Definição	2
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Fisiopatologia	5
1.4 Etiologia	6
1.5 Hitopatologia	8
1.6 Propriedades mecânicas do sistema respiratório e ventilação mecânica	10
1.7 Pequenas vias aéreas na SDRA	13
1.8 Epitélio respiratório	15
1.8.1 interleucinas	17
1.8.2 surfactante	19
1.8.3 apoptose	21
2. OBJETIVOS	24
3. MÉTODOS	26
3.1 Casuística	27
3.1.1 grupo SDRA	27
3.1.2 grupo controle	28
3.1.3 caracterização da população estudada	28
3.2 Métodos	29
3.2.1 processamento tecidual	29

3.2.2 análise morfológica	32
3.2.3 correlações clínicas	35
3.2.4 análise estatística	36

4. RESULTADOS	37
4.1 Caracterização da população estudada	38
4.2 Análise morfológica	. 41
4.3 Correlações clínico-morfológicas	46

5. DISCUSSÃO	
--------------	--

6 CONCLUSÃO	9 5	8
-------------	-----	---

7 ANEXOS	60
Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética	61
Anexo B – Dados individuais dos pacientes	62

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁ	FICAS	34
-------------------------	-------	----

RESUMO

Pires-Neto RC. Envolvimento das pequenas vias aéreas na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo: papel da inflamação, das alterações do surfactante e da apoptose de células epiteliais [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 79p

Alguns estudos sugerem que as pequenas vias aéreas têm um papel importante na fisiopatologia da lesão pulmonar aguda/ síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA). O epitélio respiratório que reveste as vias aéreas é capaz de liberar mediadores inflamatórios e está relacionado ainda com a produção de surfactante nas vias aéreas. Até o presente momento, existem poucos estudos que avaliaram se estas funções do epitélio que reveste as pequenas vias aéreas encontram-se alteradas na SDRA. No presente estudo, nós mensuramos a expressão da proteína de surfactante (PS) A e PS-B, a expressão de citocinas inflamatórias interleucina (IL)-6 e IL-8, e um índice de apoptose do epitélio que reveste as pequenas vias aéreas de pacientes com SDRA que foram submetidos a autópsia e comparamos estes resultados com os de indivíduos controle. Foram incluídos no estudo pulmões de autópsia de 31 pacientes com SDRA (PaO₂/FiO₂≤200, 45±14 anos, 16 homens) e 11 controles (52±16 anos, 7 homens). A expressão de IL-6, IL-8, PS-A e PS-B no epitélio das pequenas vias aéreas (diâmetro≤2.0mm) foi verificada através de reações de imunohistoquímica e análise de imagem. O índice de apoptose epitelial das vias aéreas foi avaliado através do método de TUNEL e da expressão de FAS/FASL. Avaliou-se ainda a densidade de células inflamatórias positivas para IL-6 e IL-8 na parede das pequenas vias aéreas. As vias aéreas dos pacientes com SDRA apresentaram maior expressão epitelial de IL-8 (p=0.006) e maior densidade de células inflamatórias expressando IL-6 (p=0.004) e IL-8 (p<0.001) guando comparadas com o grupo controle. Não houve diferenças na expressão epitelial de PS-A e PS-B ou no índice de apoptose epitelial entre os grupos SDRA e controle. Nossos resultados mostram que as pequenas vias aéreas participam da inflamação pulmonar de pacientes com SDRA, caracterizada pelo aumento na expressão de interleucinas pró-inflamatórias tanto em células inflamatórias da parede da via aérea quanto no epitélio. Nossos resultados sugerem ainda que a apoptose não é um mecanismo importante de morte de células epiteliais das vias aéreas de pacientes com SDRA.

Descritores: 1. Síndrome do desconforto respiratório agudo 2. Epitélio respiratório 3. Citocinas 4. Proteínas associadas a surfactantes pulmonares 5. Apoptose

SUMMARY

Pires-Neto RC. Expression of acute phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human ARDS [thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 79p

Recent studies suggest a role for distal airway injury in the pathophysiology of human ALI/ARDS. The epithelium lining the airways modulates airway function secreting a large number of molecules such as surfactant components and inflammatory mediators. So far, there is little information on how these secretory functions of the small airways are altered in ARDS. In the present study we assessed the airway expression of surfactant protein (SP) A and SP B, the expression of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, and an index of airway epithelial apoptosis of patients with ARDS submitted to autopsy and compared the results with those of control subjects. We studied autopsy lungs of 31 ARDS patients (PaO₂/FiO₂≤200, 45±14 years, 16 males) and 11 controls (52±16 years, 7 males). Using immunohistochemistry and image analysis, we quantified the expression of IL-6, IL-8 and SP-A and SP-B in the epithelium of small airways (diameter≤2.0mm). Airway epithelial apoptosis index was obtained with the TUNEL assay and FAS/FASL expression. We also quantified the density of inflammatory cells expressing IL-6 and IL-8 within the small airway walls. ARDS airways showed an increase in the epithelial expression of IL-8 (p=0.006) and an increased density of inflammatory cells expressing IL-6 (p=0.004) and IL-8 (p<0.001) when compared to controls. There were no differences in SP-A and SP-B epithelium expression or in epithelial apoptosis index between ARDS and controls. Our results show that the distal airways are involved in ARDS lung inflammation with higher expression of proinflammatory interleukins in both airway epithelial and inflammatory cells. Our results also suggest that apoptosis is not a major mechanism of airway epithelial cell death in ARDS.

Descriptors: 1. Acute respiratory distress syndrome 2. Respiratory epithelium 3. Cytokines 4. Surfactant protein 5. Apoptosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A primeira descrição oficial da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) data de 1967 quando Ashbaugh et al, descreveram uma série de 12 casos com instalação aguda de dispnéia, taquipnéia, cianose refratária a oxigenioterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso na radiografia de tórax.

A partir de sua primeira descrição, algumas definições foram sugeridas para melhorar a sensibilidade e a especificidade do seu diagnóstico tais como a escala de Murray (Murray et al., 1988) e a definição de Delphi (Ferguson et al., 2005). Em 1994, o Comitê Americano-Europeu para o consenso em SDRA (AECC) procurou padronizar os termos e definições aplicados a esta síndrome. Para o diagnóstico de SDRA o paciente deveria apresentar instalação aguda de insuficiência respiratória, hipoxemia, caracterizada por uma relação entre a pressão arterial de oxigênio (PaO₂) e a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) menor do que 200, infiltrado bilateral na radiografia de tórax frontal e pressão de oclusão da artéria pulmonar menor que 18 mmHg ou ausência de sinais de falência ventricular cardíaca esquerda. Para os pacientes que apresentavam hipoxemia leve instituiu-se o pulmonar aguda (LPA) que representa as mesmas termo lesão características dos pacientes com SDRA, porém com relação PaO₂/FiO₂ menor do que 300 (Bernard et al., 1994).

Embora a acurácia da definição elaborada pelo AECC seja apenas moderada (sensibilidade 75% e especificidade 84%) o seu uso ainda tem sido encorajado devido ao fato de alguns estudos que utilizaram esta definição observarem diferenças no desfecho clínico nos grupos analisados, incluindo diminuição da mortalidade e dias livres de ventilação mecânica (Ardsnet, 2000; Wiedemann *et al.*, 2006).

1.2 Epidemiologia

A SDRA apresenta incidência variável dependendo da definição utilizada e o local onde o estudo é realizado (Maccallum e Evans, 2005) sendo que os estudos epidemiológicos realizados antes da definição criada pelo AECC relatavam uma incidência anual de 1,5 a 8,3 por 100.000 habitantes (Villar e Slutsky, 1989; Lewandowski *et al.*, 1995; Thomsen e Morris, 1995). Após 1994 uma série de publicações verificou que estes números estavam subestimados.

Em um estudo europeu envolvendo 10 países e 78 unidades de terapia intensiva (UTI) verificou-se que de 6.522 pacientes internados na UTI, 6,1% apresentavam SDRA (Brun-Buisson *et al.*, 2004). O continente Australiano apresenta uma incidência de 24 casos de SDRA para cada 100.000 habitantes (Bersten *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos, estudos com coleta de dados até o ano de 2000, mostravam uma incidência variando de 15,3 a 58,7 casos para cada 100.000 habitantes (Arroliga *et al.*, 2002; Rubenfeld *et al.*, 2005). Mais recentemente em uma cidade do estado de Minnesota verificou-se que entre os anos de 2001 a 2008 a incidência da SDRA

atribuíram à diminuição da incidência de SDRA a melhora do suporte clínico ofertada a estes pacientes (Li *et al.*). Finalmente, poucos estudos relatam a incidência de SDRA nas cidades brasileiras. No Hospital das Clínicas de Porto Alegre verificou-se que a incidência de SDRA foi de 2,3% em 1.301 pacientes que foram internados e permaneceram na UTI por mais de 24 horas (Fialkow *et al.*, 2002). No estado de São Paulo, a incidência de SDRA no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto foi de 6,3% em 524 admissões (Oliveira e Basille Filho, 2006) e no Hospital Sirio Libanês em São Paulo a incidência foi de 2,2% das internações na UTI (Oliveira *et al.*, 2002).

Com relação à mortalidade, duas meta-análises recentes mostram resultados conflitantes. Na primeira revisão sistemática, Zambon e Vincent (2008) analisando 72 estudos verificaram uma mortalidade geral de 43% sendo que nos últimos 10 anos (1994 – 2006) a mortalidade por SDRA vem diminuindo a uma taxa de 1,1% ao ano. Na segunda meta-análise, ao analisarem 89 estudos, Phua et al (2009) verificaram uma mortalidade geral constante por SDRA de 44,3% não observando a tendência de queda do estudo anterior. Os autores relatam ainda que a mortalidade em estudos observacionais é maior quando comparada aos ensaios clínicos randomizados controlados (44 e 36,2% respectivamente) (Phua *et al.*, 2009). Apesar das diferenças metodológicas empregadas nestes dois estudos, ambos concordam que a mortalidade permanece muito elevada (Zambon e Vincent, 2009).

1.3 Fisiopatologia

Independente do agente etiológico, a característica inicial da SDRA é o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar desencadeado pelo processo inflamatório. As citocinas e outros agentes pró-inflamatórios iniciam e amplificam a lesão pulmonar. Citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNFα) estão relacionadas com a produção de matriz extracelular por fibroblastos e com a quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Os neutrófilos ativados podem produzir agentes oxidantes, proteases, leucotrienos e outras moléculas pró-inflamatórias potencializando o processo de lesão. Em condições normais, o epitélio alveolar é bem menos permeável do que o endotélio assim, com а quebra da barreira alvéolo capilar е consequentemente com o preenchimento alveolar por líquido, ocorre a destruição tanto de pneumócitos do tipo I quanto do tipo II. A lesão do pneumócito tipo II torna ineficiente a reabsorção hídrica, permitindo que o líquido extravasado continue preenchendo o alvéolo (Ware e Matthay, 2000; Wheeler e Bernard, 2007).

Ocorre ainda a diminuição da produção e inativação do surfactante existente aumentando a tensão superficial alveolar favorecendo a tendência ao colapso. Em relação aos capilares pulmonares, pode haver a formação de trombos microvasculares devido ao aumento da expressão de proteínas pró-coagulantes e antifibrinolíticas e queda da concentração de proteínas anticoagulantes. Todos estes fatores contribuem para o colapso alveolar, hipoxemia, diminuição da complacência pulmonar e distúrbio da relação

ventilação/perfusão. Estas alterações fisiopatológicas tão características na SDRA explicam a necessidade de suporte ventilatório e a pouca resposta a oxigenioterapia tão comumente observadas nestes pacientes (Ware e Matthay, 2000; Wheeler e Bernard, 2007).

1.4 Etiologia

Vários fatores podem ser considerados como desencadeantes da SDRA, porém podemos destacar como principais fatores de risco a sepse, a aspiração de conteúdo gástrico, a pneumonia e o politrauma com choque hipovolêmico seguido de múltiplas transfusões (Ware e Matthay, 2000). Assim, de acordo com a etiologia a SDRA pode ser dividida em dois grupos: SDRA primária, direta ou pulmonar (SDRAp) onde o dano atinge diretamente o parênquima pulmonar (pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, contusão pulmonar, lesão inalatória) e SDRA secundária, indireta ou extrapulmonar (SDRAexp) onde ocorre uma resposta inflamatória sistêmica aguda (sepse, trauma, pancreatite) (Bernard *et al.*, 1994).

Atualmente não se sabe a real importância em se distinguir a SDRAp da SDRAexp pois embora o processo fisiopatológico desencadeante da síndrome seja diferente, tanto o impacto clínico quanto as estratégias terapêuticas parecem ter comportamentos semelhantes nos dois grupos (Pelosi *et al.*, 2003).

Na SDRAp a primeira estrutura a ser danificada é o epitélio alveolar sendo que o endotélio permanece praticamente intacto. Ocorre a ativação

de macrófagos alveolares, neutrófilos e maior liberação de IL-6, IL-8 e IL-10 quando comparada a SDRAexp. A lesão de pneumócitos I e II favorece o preenchimento intra-alveolar por exsudato, colágeno e deposição de fibrina. Tanto o interstício pulmonar como o compartimento sanguíneo inicialmente parecem pouco afetados (Pelosi *et al.*, 2003). Na SDRAexp, a lesão inicial ocorre no endotélio vascular pulmonar aumentando sua permeabilidade acarretando em edema intersticial. A apoptose de células inflamatórias e ativação de ILs ocorre em menor quantidade quando comparadas a SDRAp (Pelosi *et al.*, 2003).

alterações histopatológicas implicariam Estas iniciais OS distintos mecânica comportamentos na do sistema respiratório е consequentemente no ajuste de parâmetros da ventilação mecânica. De fato, ao se avaliar a elastância pulmonar e da caixa torácica e a pressão intra-abdominal de 21 pacientes (12 SDRAp e 9 SDRAexp) em diferentes níveis de PEEP, Gattinoni et al (1998) verificaram que a SDRAp apresentava maior elastância pulmonar, menor elastância de caixa torácica e menor pressão intra-abdominal quando comparada à SDRAexp. Ao se elevar a PEEP para 15 cmH₂O ocorreu um aumento da elastância do sistema respiratório na SDRAp ocorrendo o inverso na SDRAexp. Estes dados seriam compatíveis com a predominância de consolidação na SDRAp e de edema e colapso alveolar na SDRAexp.

Apesar destes resultados favorecerem a divisão da SDRA em dois grupos, estudos subseqüentes não encontraram a mesma diferença. Em uma segunda análise do estudo do grupo ARDSnet que verificou uma

redução de 22% na mortalidade geral ao se usar baixos volumes correntes (6 mL/kg) quando comparado a volumes tradicionais (12mL/kg), Eisner et al (2001) verificaram não haver diferenças na mortalidade entre os grupos SDRAp e SDRAexp usando qualquer um dos tipos de estratégias (6 ou 12 mL/kg) sendo que os dois grupos parecem se beneficiar igualmente de volumes correntes mais baixos (6 mL/kg).

Em estudos mais recentes, verificou-se não haver diferença entre estes dois grupos com relação ao desenvolvimento de falências de órgãos ou o período para desenvolver a primeira disfunção de órgão. O tempo de permanência na UTI bem como a mortalidade hospitalar também foram semelhantes (Agarwal *et al.*, 2006). Por fim, uma meta-análise analisando 34 estudos verificou não haver diferença na mortalidade quando os dois grupos (SDRAp e SDRAexp) são comparados (Agarwal *et al.*, 2008).

1.5 Histopatologia

A manifestação histológica característica na SDRA é o dano alveolar difuso (DAD) (Katzenstein, 2006). O DAD é a lesão difusa do tecido alveolar, comprometendo o compartimento epitelial, endotelial e intersticial podendo resultar em remodelamento tecidual. As alterações histológicas da SDRA podem ser agrupadas em três fases seqüenciais, porém sobrepostas: fase exsudativa, proliferativa e de fibrose (Bellingan, 2002).

A fase exsudativa normalmente compreende os primeiros dias a partir do início dos sintomas. Os pulmões apresentam-se pesados e rígidos

macroscopicamente. Microscopicamente pode se encontrar hemorragia, edema alveolar e presença de membrana hialina. Além disso, a barreira alvéolo-capilar encontra-se danificada. As paredes alveolares apresentam áreas de necrose, edema e descamação epitelial. O endotélio também apresenta áreas de necrose com aglomerados de fibrina. O número de neutrófilos está aumentado e podem ser encontrados no interstício, capilares e espaços aéreos (Kobzik e Sholl, 2009).

A fase proliferativa caracteriza-se pela predominância de organização e reparação e inflamação com predomínio de células mononucleadas. A membrana basal do epitélio alveolar fica exposta e a luz alveolar fica preenchida por leucócitos, hemácias e fibrina. Ocorre ainda a proliferação de pneumócitos tipo II para revestir as áreas descamadas e se diferenciar posteriormente em pneumócitos do tipo I. Os fibroblastos podem ser visualizados no interstício e na luz alveolar resultando em obliteração e diminuição dos espaços alveolares. A substituição de fibrina por tecido colagênico pode levar a formação de fibrose no espaço intra-alveolar, mas podendo ocorrer também no interstício (Bellingan, 2002; Kobzik e Sholl, 2009).

Por fim, a fase de fibrose (resposta fibroproliferativa) caracteriza-se pela deposição de colágeno, diminuição de neutrófilos e aumento de macrófagos e linfócitos. Os ductos alveolares encontram-se dilatados e as paredes alveolares espessas. Ocorre remodelamento pulmonar alterando as características de vasos e ductos alveolares (Bellingan, 2002; Kobzik e Sholl, 2009).

Apesar de serem descritas três fases na SDRA, sabe-se que a deposição de tecido fibrótico pode ocorrer precocemente na patogênese da doença, podendo ser observada nas primeiras 24 a 48 horas após o diagnóstico. A presença de fibrose é considerada fator prognóstico ruim e está associada a maior taxa de mortalidade (Martin *et al.*, 1995; Chesnutt *et al.*, 1997).

1.6 Propriedades mecânicas do sistema respiratório e ventilação mecânica

A diminuição da complacência é uma das principais alterações na mecânica pulmonar observada em pacientes com SDRA. Este fato é conseqüência das alterações inflamatórias e estruturais, tais como a presença de atelectasia, infiltrado inflamatório difuso preenchendo o espaço alveolar e a formação de fibrose (Wheeler e Bernard, 2007).

Inicialmente, o principal objetivo na estratégia ventilatória na SDRA era garantir a normalidade dos gases na gasometria arterial ainda que altos volumes correntes fossem necessários (Wheeler e Bernard, 2007). Acreditava-se que os riscos do uso de altas pressões nas vias aéreas eram baixos, raros e fáceis de tratar (Weg *et al.*, 1998).

Posteriormente, verificou-se que os parâmetros ajustados no ventilador mecânico, quando empregados inadvertidamente, podem contribuir para a ampliação e propagação da lesão pulmonar nestes pacientes (Dreyfuss e Saumon, 1998; Slutsky, 1999). Os principais mecanismos de lesão

pulmonar associados com a ventilação mecânica são o uso de altas pressões inspiratórias, altos volumes correntes e a abertura e fechamento cíclico dos espaços aéreos distais durante os ciclos respiratórios. Associado ao stress mecânico tecidual existe ainda a liberação de mediadores inflamatórios que potencializam a lesão pulmonar (Tremblay e Slutsky, 2006).

Diversas estratégias ventilatórias foram elaboradas para minimizar estes efeitos adversos e otimizar o tratamento destes pacientes.

Amato e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que os pacientes com SDRA se beneficiam de uma estratégia ventilatória utilizando-se baixos volumes correntes (6 mL/kg de peso ideal). Em seu estudo com 53 pacientes comparando o uso de altas PEEPs com baixos volumes correntes (estratégia protetora) com o uso de baixas PEEPs e altos volumes correntes (estratégia convencional) os autores verificaram uma menor mortalidade aos 28 dias no grupo de estratégia protetora (38%) comparada ao grupo de estratégia convencional (71%) (Amato *et al.*, 1998).

Em 2000, um dos maiores estudos multicêntricos em ventilação mecânica demonstrou que o uso isolado de baixos volumes correntes (6 mL/kg de peso ideal) e de valores limitados de pressão de platô (até 30 cmH₂O) diminui a mortalidade destes pacientes quando comparado com o uso de altos volumes correntes (12 mL/kg de peso ideal) (Ardsnet, 2000).

Com relação ao uso da PEEP, ainda não está bem estabelecido qual o melhor valor a ser utilizado ou qual a melhor estratégia para sua titulação. Recentemente, três grandes estudos clínicos multicêntricos randomizados e

controlados não conseguiram demonstrar a superioridade de valores elevados (14-15 cmH₂O) ou baixos de PEEP (7-10 cmH₂O) em relação a sobrevida dos pacientes (Brower *et al.*, 2004; Meade *et al.*, 2008; Mercat *et al.*, 2008). Entretanto, em duas meta-análises recentes, verificou-se que altos valores de PEEP estariam associados a redução da mortalidade hospitalar principalmente nos pacientes mais graves (Oba *et al.*, 2009; Briel *et al.*, 2010).

Além da diminuição da complacência pulmonar, outra alteração da mecânica pulmonar encontrada nos indivíduos com SDRA é a disfunção das vias aéreas. O colapso das pequenas vias aéreas na SDRA pode estar relacionado ao aumento da resistência pulmonar, limitação do fluxo expiratório e hiperinsuflação dinâmica observada em alguns destes pacientes (Koutsoukou *et al.*, 2000; Kondili *et al.*, 2002; Rylander *et al.*, 2005; Jain e Sznajder, 2008).

Koutsoukou et al (2000) verificaram em 10 pacientes com SDRA em ventilação mecânica que a limitação ao fluxo expiratório está associada ao colapso das pequenas vias aéreas ao se medir a mecânica pulmonar na ausência de PEEP (pressão positiva ao final da expiração igual a zero – ZEEP). Além disso, esta limitação não responde ao uso de broncodilatadores.

Em outro estudo, Kondili et al (2002) avaliaram o comportamento do esvaziamento pulmonar em 10 pacientes com SDRA com quatro níveis de PEEP (0, 5, 10 e 15 cmH₂0). Os autores concluíram que a aplicação de PEEP diminui a resistência expiratória ao fluxo pela diminuição de colapso

das vias aéreas quando comparada à condição ZEEP, resultando em um esvaziamento pulmonar mais rápido.

Em 2005, Rylander et al verificaram em 25 pacientes com SDRA ventilados com PEEP de 5 cmH₂O que existe um volume importante de ar aprisionado, 33% da capacidade residual funcional (CRF), que não é ventilado nestes pacientes. Estas alterações também estariam associadas a situações de fechamento/obstrução das pequenas vias aéreas.

1.7 Pequenas vias aéreas na SDRA

As pequenas vias aéreas (ou vias aéreas distais) apresentam diâmetro interno menor ou igual a dois milímetros e possuem parede composta basicamente de epitélio, lâmina própria e tecido muscular não contendo cartilagens ou glândulas submucosas em sua estrutura (Hyde *et al.*, 2009). Além disso, elas estão acopladas ao tecido conectivo do parênquima pulmonar, o que permite a transmissão de forças mecânicas do parênquima para as vis aéreas distais. À medida que o volume pulmonar aumenta durante a inspiração, ocorre o aumento das forças de tensão para as vias aéreas acarretando em aumento do seu diâmetro interno. Qualquer alteração patológica que mude este mecanismo de tração aumenta a tendência ao colapso da via aérea principalmente a baixos volumes pulmonares (Jain e Sznajder, 2007; 2008).

Estudos com modelos experimentais de LPA têm mostrado que o parênquima pulmonar não é o único local afetado na LPA/SDRA. A lesão

das pequenas vias aéreas é caracterizada por necrose de epitélio bronquiolar e descamação e ruptura dos acoplamentos entre alvéolos e bronquíolos (Muscedere *et al.*, 1994; D'angelo *et al.*, 2002).

Em um estudo experimental, Muscedere et al (1994) investigaram as alterações das pequenas vias aéreas em pulmões de ratos com LPA induzida pela depleção de surfactante quando submetidas a diferentes valores de PEEP (controle, ZEEP, abaixo e acima do ponto de inflexão inferior da curva pressão-volume inspiratória) sendo os demais parâmetros ventilatórios iguais para todos os grupos. Os autores verificaram que, comparado aos grupos com PEEP mais alta, os animais que foram ventilados com PEEP baixa apresentaram maior índice de lesão histológica caracterizada por lesões de bronquíolos membranosos e respiratórios, necrose e descamação de epitélio e presença de membrana hialina. Estas alterações estariam relacionadas ao processo de colapso e abertura cíclica dos alvéolos e pequenas vias aéreas.

D'Angelo et al (2007) verificaram que animais submetidos a desnaturação do surfactante pulmonar e posteriormente submetidos a ventilação mecânica com ZEEP apresentam lesão epitelial de vias aéreas, formação de edema, presença de infiltrado inflamatório e aumento da resistência de vias aéreas quando comparados a animais controle. Em outro modelo experimental, verificou-se que ratos com LPA e ventilados com PEEP baixa e altos volumes correntes apresentam lesão epitelial nas vias aéreas comprometendo as regiões pulmonares dependentes e não dependentes (Tsuchida *et al.*, 2006).

Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que indivíduos que morreram com SDRA também apresentam alterações morfológicas das pequenas vias áreas. Analisando-se o tecido pulmonar proveniente de autópsia de 31 pacientes que morreram com SDRA verificou-se que as pequenas vias aéreas apresentavam-se espessadas com aumento na quantidade dos seguintes elementos que compõem a matriz extracelular: colágeno tipo I, fibronectina, versican, e metaloproteinase-9 quando comparadas a indivíduos que morreram de causas não pulmonares. Além disso, verificou-se que os pacientes com SDRA apresentavam maior descamação epitelial das pequenas vias aéreas quando comparados a indivíduos controles sendo que esta descamação apresentou correlação negativa com a relação PaO₂/FIO₂ (Morales et al., 2011). Assim, acredita-se que as alterações funcionais encontradas em alguns pacientes com SDRA relacionadas ao acometimento das pequenas vias aéreas tais como o aumento da resistência pulmonar e a limitação do fluxo expiratório, estejam relacionadas com as alterações morfológicas deste compartimento.

1.8 Epitélio respiratório

Uma das funções impostas ao epitélio respiratório que reveste as vias aéreas é a proteção da mucosa respiratória contra agentes nocivos tais como a poluição, a fumaça de cigarro e a invasão de microorganismos (Thompson *et al.*, 1995).

A célula ciliada é o tipo celular predominante das vias aéreas. Embora seja mais frequentemente encontrada nas regiões mais proximais da zona de condução do sistema respiratório, aproximadamente 50% de todas as células que revestem o território das vias aéreas são do tipo ciliado. Sua principal função é o transporte do muco das regiões pulmonares em direção a orofaringe (Knight e Holgate, 2003).

A célula mucosecretora é responsável pela secreção de mucinas de composição glicoprotéica na luz das vias aéreas. Este material de características viscoelásticas juntamente com as células ciliadas compõe o principal mecanismo de defesa do aparelho respiratório: o transporte mucociliar. Em condições de exposição aguda a fumaça de cigarro ou poluição e em doenças inflamatórias de vias aéreas como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é comum encontrarmos metaplasia e hiperplasia de células mucosecretoras (Knight e Holgate, 2003).

A célula basal é encontrada em toda a extensão das vias aéreas e é a única célula que está firmemente acoplada à membrana basal servindo de sustentação para outras células superficiais através de ligações desmossômicas. Além disso, tem papel na secreção de substâncias bioativas tais como endopeptidases, lipoxigenases e citocinas (Knight e Holgate, 2003).

A célula de Clara caracteriza-se pela presença de retículo endoplasmático liso em sua porção apical e retículo endoplasmático rugoso em sua porção basal. Pode ser encontrada em vias aéreas de grande calibre, mas é mais presente em vias aéreas distais. Sua principal função

está relacionada à metabolização de xenobióticos, porém, possui papel ativo na secreção de proteínas especialmente a CC10, uma proteína de baixo peso molecular com prováveis funções antiinflamatórias e proteínas de surfactante com propriedades imunológicas e de diminuição da tensão superficial, auxiliando na prevenção do colapso das vias aéreas distais (Thompson *et al.*, 1995; Hohlfeld, 2002).

Assim, além da função de barreira mecânica para os agentes nocivos, o epitélio respiratório que reveste as vias aéreas tem papel importante na secreção de substâncias participando de atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antiproteases (Thompson, Robbins *et al.*, 1995).

1.8.1 Interleucinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular (menor que 80 kD de tamanho) que regulam e determinam a natureza de processos como o crescimento e a diferenciação celular, o processo inflamatório, a resposta imunológica e o reparo tecidual (Nicod, 1993). Seu efeito dependerá, entre outros fatores, do local de ação e da fonte de origem (Nicod, 1993; Chung e Barnes, 1999).

Na SDRA, a ação complexa de citocinas e outros agentes próinflamatórios iniciam e amplificam a lesão pulmonar, porém o balanço de agentes inflamatórios e anti-inflamatórios parece ter papel fundamental no curso da doença. Os neutrófilos migram ao espaço alveolar atraídos por

citocinas produzidas por macrófagos alveolares. As citocinas próinflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (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 próinflamatórias. Entretanto, também é descrito a presença de citocinas antiinflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) e a interleucina 11 (IL-11), além de 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).

Estudos utilizando o lavado broncoalveolar (LBA) relatam um aumento nos níveis de IL-6 e IL-8 nos pacientes com SDRA. Em um estudo com 74 pacientes em ventilação mecânica, verificou-se que os níveis de IL-6 e IL-8 no LBA em pacientes com SDRA e pneumonia medidos nos 10 primeiros dias a partir do momento do diagnóstico são muito superiores quando comparados a pacientes com edema pulmonar cardiogênico (Schutte et al., 1996). Em 1995, Meduri et al verificaram em 27 pacientes com SDRA que os níveis de algumas citocinas incluindo a IL-6 e a IL-8 apresentavam-se em maiores concentrações no LBA (realizado no primeiro dia após o diagnóstico da SDRA) de pacientes não sobreviventes quando comparados aos indivíduos que sobreviveram. Além disso, os níveis de IL-6 no LBA dos pacientes que sobreviveram foi diminuindo gradativamente até o décimo dia

da síndrome enquanto que nos pacientes não sobreviventes esses níveis mantiveram-se elevados.

Embora existam estudos evidenciando que os níveis plasmáticos e no LBA das IL-6 e IL-8 tem papel importante na inflamação gerada pela síndrome, na sua fisiopatologia e na relação com o prognóstico do paciente, não encontramos na literatura nenhum relato da contribuição da expressão destas citocinas pelo epitélio respiratório que reveste as pequenas vias aéreas e pelas células inflamatórias presentes nesta região.

1.8.2 Surfactante

Além da função de barreira mecânica e produção de citocinas o epitélio respiratório também pode secretar surfactante (Haagsman e Diemel, 2001).

Dentre as funções do surfactante pulmonar podemos destacar a função imunomodulatória auxiliando na resposta inata e adaptativa, melhora do clearance brônquico e a diminuição da tensão superficial e estabilização das pequenas vias aéreas evitando o colapso e o acúmulo de líquidos (Hohlfeld, 2002).

Existem 4 proteínas associadas ao surfactante: proteína associada ao surfactante (SP) A, SP-B, SP-C e SP-D. As proteínas SP-A e SP-D são oligômeros hidrofílicos da família das colectinas desempenhando importante papel na defesa do organismo, auxiliando na fagocitose de microorganismos e modulando as funções dos leucócitos. Além da função de defesa, a SP-A

está associada à organização estrutural do surfactante, sendo ainda a proteína mais abundante de todas as SPs ao passo que a SP-D está relacionada com a homeostasia do surfactante. A SP-B e SP-C possuem funções sobrepostas e estão relacionadas à diminuição da tensão superficial e estabilidade do filme de fosfolípides que reveste os alvéolos (Haagsman e Diemel, 2001; Stevens e Sinkin, 2007). Excetuando-se a SP-C, o epitélio respiratório revestindo as pequenas vias aéreas produz todas as outras SPs (Haagsman e Diemel, 2001).

Ao se analisar a composição química e atividade biofísica de alguns compostos do surfactante recuperados do LBA de pacientes com SDRA, Gregory et al (1991) verificaram que as concentrações de SP-A e SP-B eram menores quando comparadas a indivíduos normais e pacientes com fatores de risco para desenvolver SDRA. Além disso, o fluído recuperado do LBA dos pacientes com SDRA também apresentou uma tensão superficial aumentada quando comparada aos outros dois grupos.

Em outro estudo, Greene et al (1999) também verificaram que as concentrações de SP-A e SP-B no LBA estão diminuídas durante o curso da doença quando comparadas a indivíduos normais sendo que estes valores permanecem baixos por até 14 dias após a instalação do quadro inicial da síndrome. Neste estudo, verificou-se ainda que a concentração de SP-A no LBA é um bom preditor para a instalação da síndrome (100% de sensibilidade e 57% de especificidade) sendo que nenhum paciente com concentração de SP-A maior que 1,2 µg/mL evoluiu para SDRA. Com relação aos níveis plasmáticos de SP-A a concentração desta proteína

estava elevada quando comparada aos indivíduos normais sendo que esta diferença também foi mantida até o 14º dia de evolução da SDRA.

Considerando-se que a deficiência de surfactante tem papel importante na fisiopatologia da SDRA e que o epitélio respiratório das pequenas vias aéreas encontra-se alterado na síndrome, nossa hipótese é de que a produção de surfactante pelas vias aéreas encontra-se alterada à semelhança do que ocorre no território alveolar, contribuinda para a fisiopatologia da doença.

1.8.3 Apoptose

A morte celular pode ocorrer através de dois mecanismos: a necrose e a apoptose. A morte celular por necrose se caracteriza pela perda dos mecanismos de homeostasia celular levando ao edema e à ruptura da célula em necrose espalhando seu conteúdo celular no meio adjacente. Normalmente ocorre quando o tecido se torna isquêmico com queda abrupta da oxigenação (Matute-Bello e Martin, 2009). A apoptose é uma forma de morte celular programada e controlada sendo essencial para o desenvolvimento e reparo dos tecidos e de grande importância na fisiopatologia de algumas doenças. Através de um estímulo específico o processo ocorre por meio de vias intracelulares levando a diminuição do tamanho da célula, fragmentação do DNA e fagocitose da célula apoptótica (Matute-Bello e Martin, 2009). O ínicio da apoptose pode ocorrer através de duas vias: a via intrínseca e a via extrínseca. Na via intrínseca ou mitocondrial ocorre o aumento da permeabilidade da membrana da mitocôndria e a liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, entre elas o citocromo C, que após ativar uma série de proteínas (caspases) libera sustâncias proteolíticas e DNAses (Kumar *et al.*, 2010). A via extrínseca pode ser iniciada por receptores de morte de superfície de membranas acoplados aos seus domínios ligantes específicos ou a outras células. Incluem-se nesta categoria o receptor TNF-1 (TNFR-1) e seu ligante natural e o receptor Fas com seu ligante natural Fas Ligand (FasL). Quando o receptor de membrana Fas é acoplado ao seu ligante FasL pode ocorrer o recrutamento de caspases ativando endonucleases acarretando na quebra do DNA e consequente morte celular (Martin *et al.*, 2005; Tesfaigzi, 2006).

Lee et al (2008) verificaram em 31 pacientes com quadro agudo de SDRA que o LBA destes pacientes apresentava uma maior concentração nos níveis de indicadores de apoptose (CK-18) quando comparado a indivíduos controle.

Em um modelo experimental de SDRA através da instilação de lipopolissacarídeos (LPS) em camundongos verificou-se que a inibição da ativação da caspase diminuiu o número de células em apoptose verificadas pela histologia pulmonar além de prolongar a sobrevida destes animais quando comparados aos animais em que ocorreu apenas a instilação de LPS (Kawasaki *et al.*, 2000).

A ativação do sistema Fas/FasL (tanto a forma solúvel quanto a ligada à membrana) contribui para o mecanismo de lesão de células alveolares nos pacientes com LPA/SDRA (Galani *et al.*, 2010). A forma solúvel do FasL (sFasL) recuperada de LBA de pacientes com SDRA induz a apoptose de células pulmonares epiteliais distais que expressam Fas sendo que este efeito é inibido ao se bloquear o sistema Fas/FasL (Matute-Bello *et al.*, 1999).

Já está bem estabelecido que a apoptose de células epiteliais alveolares tem papel importante na SDRA (Matute-Bello e Martin, 2003). Com relação ao epitélio que reveste as vias aéreas distais, embora alguns estudos experimentais comentem que existe a ativação da apoptose destas células através do sistema Fas/FasL (Nakamura *et al.*, 2004; Perl *et al.*, 2007), nenhum estudo efetivamente mediu a proporção de células que estão em apoptose e se ela é o principal mecanismo de morte celular que ocorre neste compartimento.

Assim, tendo em vista que as pequenas vias aéreas podem participar de forma importante nas alterações funcionais pulmonares observadas na SDRA, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar as alterações das vias aéreas que pudessem contribuir para a inflamação pulmonar e a disfunção do surfactante em pacientes com SDRA.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar os seguintes componentes das vias aéreas distais de indivíduos que morreram por SDRA:
- Processo inflamatório através da análise da expressão de interleucinas 6 e 8 na parede da via aérea e pelo epitélio respiratório.
- Alterações epiteliais relacionadas a produção de surfactante.
- Avaliar se a apoptose é um mecanismo importante de morte celular no epitélio das vias aéreas de indivíduos que morreram por SDRA
- Correlacionar as alterações encontradas com as características clínicas e parâmetros ventilatórios.
3. MÉTODOS

Métodos 27

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 14 de março de 2007 (CAPPesq-HCFMUSP – processo nº 1308/06) (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). A autópsia destes pacientes foi realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC), ligado ao Departamento de Patologia da FMUSP, com finalidade diagnóstica durante o período de 2004 a 2007.

3.1.1 Grupo SDRA

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

- Diagnóstico de SDRA de acordo com o Consenso Americano-Europeu para SDRA (Bernard *et al.*, 1994);
- 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;
- 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 nãopulmonares, não apresentavam história prévia de doenças pulmonares ou de tabagismo, não foram submetidos a ventilação artificial 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 de SDRA, tempo de SDRA (tempo de evolução desde o diagnóstico até o óbito), parâmetros da ventilação mecânica (pressão de platô, PEEP e FiO₂) e o valor da PaO₂/FiO₂ no momento do diagnóstico clínico de SDRA.

Os indivíduos do grupo CTRL foram caracterizados a partir da análise do prontuário médico e 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 de óbito.

3.2 Métodos

3.2.1 Processamento tecidual

O tecido pulmonar dos pacientes foi coletado na rotina de autópsias do Departamento de Patologia da FMUSP. Fragmentos de tecido coletados nas áreas mais comprometidas do pulmão foram fixados em formaldeído tamponado a 10% por 24 a 48 horas e submetidos a processamento histológico habitual, sendo armazenados 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 o diagnóstico histológico de dano alveolar difuso (DAD) e identificação das pequenas vias aéreas.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada para a identificação das proteínas IL-6, IL-8, SP-A, SP-B, Fas, FasL (Araujo, Dolhnikoff *et al.*, 2008). A padronização final das reações imuno-histoquímicas é apresentada na Tabela 1. Para as reações, os cortes de tecido pulmonar foram desparafinizados através da imersão em xilol quente (estufa a 60°C) durante

Métodos 30

20 minutos, seguido de três banhos de um minuto em xilol frio (temperatura ambiente) e a hidratação do tecido foi realizada através de banhos subseqüentes em álcool absoluto, álcool a 95% e álcool a 70%, todos por um minuto. A recuperação antigênica (exceto para o SP-A) foi obtida através do pré-tratamento com citrato em alta temperatura por 45 minutos. A fim de inibir a peroxidase endógena foi aplicada solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 volumes por sete vezes de cinco 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 4ºC. Posteriormente, foram lavadas com PBS por três vezes, cinco minutos cada lavagem, e o anticorpo secundário (Novolink - Novocastra, Newcastle, UK) foi aplicado por uma hora em estufa a 37 °C. A revelação do complexo antígeno-anticorpo formado foi marcada com a aplicação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) (3,3 diaminobenzidina; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) por cinco 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. Como controle negativo, o anticorpo primário foi trocado por PBS.

Anticorpo	Pré-tratamento	Clone	Diluição	Origem
SP-A	-	32E12	1:1200	Dako, Glostrup/Denmark
SP-B	Citrato	SPB02	1:400	LabVision, Fremont/USA
IL-6	Citrato	Policlonal	1:20	R&D, Minneapolis /USA
IL-8	EDTA	CXCL8	1:100	R&D, Minneapolis /USA
Fas	Citrato	Policlonal	1:1200	Santa Cruz, California-USA
Fas Ligand	Citrato	Policlonal	1:100	Santa Cruz, California-USA

 Tabela 1. Anticorpos padronizados para a análise imuno-histoquímica

SP= proteína associada ao surfactante IL= interleucina

Para a avaliação das células em apoptose, utilzou-se ainda o método de TUNEL (peroxidase terminal deoxynucleotidyl transferasemediated deoxyuridine-triphosphatase nick endlabeling). As lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol de cinco minutos cada (um a 60 °C, e os outros dois à temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e incubadas em Proteinase K por 15-30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida realizou-se lavagem por dois banhos de três minutos em PBS sendo incubadas em H₂O₂ 0,3% em Metanol por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS e foi pipetado 50 µL da mistura de reação TUNEL (5 µL da solução de enzima e 45 µL da solução de marcador, que marca as fitas de DNA por TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) o qual catalisa polimerização de nucleotídeos marcados de extremidades livres 3'-OH de uma maneira independente (reação de TUNEL), por amostra. As lâminas foram incubadas sob parafilme em

Métodos 32

câmara úmida a 37 °C por 60 minutos. Após nova lavagem de PBS (seis vezes) foi pipetado 50 μL do conversor de peroxidase por amostra. Em seguida as lâminas foram incubadas sob parafilme em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos e lavadas em PBS em três banhos de três minutos cada. Após este procedimento, foram pipetados 50 μL de DAB (0,2% e H₂O₂ 0,05% em PBS) para revelar a reação por 10 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram lavadas em PBS por três períodos de três minutos cada, onde as amostras foram contracoradas por verde de metila, lavagem em água destilada, desidratação por etanol e banho em xilol.

3.2.2 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada com análise de imagem utilizandose o software Image-Pro® Plus 4.5 para Windows® (Media Cybernetics-Silver Spring, MD, EUA) e um computador conectado a uma câmera digital acoplados a um microscópio (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) (Figura 1). Para cada marcação de IHQ, as lâminas foram codificadas para que o investigador não soubesse o grupo (SDRA ou CTRL) que estava analisando (análise cega). A imagem fotografada pela câmera que continha o epitélio marcado pela IHQ era então inserida no programa. O sistema foi calibrado para medir a densidade média de coloração da marcação IHQ no epitélio das pequenas vias aéreas.



FONTE: Morales MMB, 2010

Figura 1. Sistema de análise de imagem contendo um computador conectado a uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico

Os seguintes parâmetros foram quantificados nas pequenas vias aéreas: 1) Parâmetros inflamatórios, caracterizados pela expressão de IL-6 e IL-8 pelo epitélio e a densidade de células positivas para essas interleucinas na parede da via aérea; 2) Expressão de surfactante, caracterizado pela expressão de SP-A e SP-B pelo epitélio e; 3) Índice de apoptose, caracterizado pela expressão de Fas e FasL pelo epitélio e número de células epiteliais marcadas pela reação de TUNEL.

A expressão de SP-A, SP-B, IL-6, IL-8, Fas, FasL no epitélio respiratório das pequenas vias aéreas foi calculado como a área positiva de coloração dividida pelo comprimento da membrana basal epitelial correspondente (μm²/μm) (Araujo *et al.*, 2008; Figueira De Mello *et al.*, 2010) (Figura 2).



Figura 2. Fotomicrografias representativas do epitélio das pequenas vias áreas ilustrando a análise de imagem.
(A) Foto do epitélio respiratório de uma via aérea pequena (diâmetro interno < 2 mm). Barra = 50 μm.
(B) Representação esquemática da análise de imagem. — Comprimento da membrana basal; Area positiva de epitélio. Barra = 50 μm

Pelo menos três vias aéreas pequenas (vias aéreas com perímetro de membrana basal (MB) \leq 6 mm ao corte transversal) foram analisadas por paciente. Partindo-se do princípio de que parte do epitélio encontrado estava descamado, todo o epitélio intacto foi avaliado em cada via aérea no aumento de 200x.

Para melhor caracterizar o processo inflamatório, além da expressão de citocinas (IL-6 e IL-8) no epitélio respiratório, verificou-se a densidade de células positivas na parede das pequenas vias aéreas. Esse valor correspondia ao número de células positivas para IL-6 e IL-8 na parede da via aérea dividido pelo comprimento da membrana basal epitelial correspondente. Neste caso, toda a extensão da via aérea foi avaliada (Figura 3A).



Figura 3. Fotomicrografia do epitélio das pequenas vias aéreas ilustrando a análise de imagem.

Em relação ao processo de apoptose, além da expressão de Fas e FasL pelo epitélio, verificou-se o número de células em apoptose marcadas pela reação de TUNEL. Esse valor correspondia ao número de células epiteliais positivas dividido pelo comprimento da membrana basal epitelial correspondente (Figura 3B).

3.2.3 Correlações clínicas

Com a finalidade de investigar os possíveis efeitos da ventilação mecânica e gravidade da síndrome nas alterações morfológicas analisadas, correlacionamos os parâmetros morfológicos analisados com os parâmetros ventilatórios (pressão de platô e PEEP – valores médios nas primeiras 48 horas de diagnóstico da síndrome) e com os valores de PaO₂/FiO₂ (obtido no momento do diagnóstico). Devido à natureza retrospectiva deste trabalho e consequente ausência de controle dos parâmetros ventilatórios, utilizamos

 ⁽A) Setas indicam as células inflamatórias positivas presentes na parede da via aérea analisada; — Comprimento da membrana basal correspondente. Barra = 50 μm.
 (B) Setas indicam as células do epitélio respiratório positiva para a apoptose pelo método TUNEL; — Comprimento da membrana basal correspondente. Barra = 50 μm.

Métodos 36

um subgrupo de pacientes com tempo de SDRA de até dois dias para a realização desta análise, para verificar a influência dos parâmetros ventilatórios nos momentos iniciais de desenvolvimento da síndrome.

3.2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software de estatística SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EUA). De acordo com a distribuição de cada variável, utilizamos os testes "t de Student" ou Mann Whitney para comparar os dados entre os grupos SDRA e Controle. Para analisar as correlações entre as alterações clínicas e análise morfológica, utilizou-se os testes de Pearson ou Spearman. Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão (DP) ou mediana e 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 na tabela 2 e 3 respectivamente. A média ± 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 maior parte de nossos pacientes (71%) morreu na primeira semana e 52% nas primeiras 48 horas. A estratégia para o manejo ventilatório nestes pacientes foi baseada no uso de baixos volumes correntes (menor que 6mL/Kg de peso ideal).

Paciente	Idade	Sexo	Causa predisponente para SDRA	Duração da SDRA (dias)	Pressão de platô (cmH₂O)	PEEP (cmH₂O)	PaO ₂ /FiO ₂
1	28	F	Sepse, hepatite aguda,	1	18	08	161
2	38	М	Pneumonia, SIDA	1	35	20	93
3	48	М	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	М	Pneumonia	1	25	10	68
7	56	М	Pneumonia	1	30	0	79
8	52	F	Pneumonia, broncoaspiração	1	40	10	47
9	48	М	Pancreatite	1	40	15	51
10	43	М	Sepse	2	25	10	166
11	31	М	Pneumonia, TMO	2	32	22	137
12	43	М	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	М	Sepse	2	27	14	156
16	40	F	Sepse	2	21	11	111
17	19	F	Pancreatite	3	38	18	84
18	75	М	Pneumonia	3	30	14	166
19	58	F	Sepse, HDA	4	25	11	197
20	40	F	Pneumonia	6	21	09	149
21	75	F	Sepse, peritonite	6	25	10	196
22	18	М	Pneumonia	7	21	07	189
23	50	М	Pneumonia, SIDA	8	28	11	126
24	55	F	Sepse, endocardite	9	29	17	119
25	44	М	Choque hipovolêmico, HDA	10	30	14	108
26	40	F	Pneumonia, SIDA	13	22	09	153

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos e parâmetros ventilatórios dos pacientes do grupo SDRA

Continua...

Paciente	Idade	Sexo	Causa predisponente para SDRA	Duração da SDRA (dias)	Pressão de platô (cmH₂O)	PEEP (cmH₂O)	PaO ₂ /FiO ₂
27	51	F	Hemorragia alveolar	14	28	17	195
28	26	М	Sepse, peritonite	16	20	10	186
29	45	F	Pneumonia, SIDA	19	39	18	199
30	37	М	Pneumonia, SIDA	22	25	14	182
31	56	Μ	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)

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos e parâmetros ventilatórios dos pacientes do grupo SDRA (CONCLUSÃO)

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; PEEP= pressão expiratória positiva final.

Para cada paciente, os valores de Pressão de platô e PEEP correspondem aos valores médios dos primeiros dois dias a partir do diagnóstico. Os valores de PaO₂/FiO₂ correspondem aos valores do diagnóstico clínico de SDRA.

Paciente	Idade	Sexo	Causa do óbito
1	81	М	Hemorragia vesical pós cirúrgica
2	34	М	Fibrilação ventricular
3	70	F	Ruptura de aneurisma de aorta
4	48	F	Infarto agudo do miocárdio
5	27	М	Hemorragia digestiva alta
6	38	Μ	Infarto agudo do miocárdio
7	48	М	Miocardiopatia dilatada
8	63	М	Infarto agudo do miocárdio
9	51	F	Cardiopatia hipertrófica
10	62	М	Infarto agudo do miocárdio
11	46	F	Infarto agudo do miocárdio

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos dos pacientes do grupo CTRL

F = Feminino; M = masculino

4.2 Análise morfológica

Amostras de tecido pulmonar contendo pelo menos três vias aéreas pequenas em corte transversal estavam disponíveis em 18 a 31 pacientes com SDRA e em 6 a 11 indivíduos controle dependendo da proteína estudada. No total, foram analisadas 1 093 pequenas vias aéreas (média de 5,6 vias aéreas por marcação em cada paciente). O perímetro médio das pequenas vias aéreas para o grupo SDRA e para o grupo CTRL foram respectivamente 1,55 \pm 0.14 mm e 1,45 \pm 0,19 mm, correspondendo a pequenos bronquíolos membranosos (Carroll et al., 1993).

Em relação à IL-6, verificamos que o grupo SDRA apresentou maior densidade de células positivas expressando esta citocina na parede da pequena via aérea quando comparada ao grupo CTRL [25,5 (14,7) x 13,2 (16,7) cel*10³/ μ m, p = 0,004] (Figura 4 e Figura 5).

Em relação à expressão de IL-6 pelo epitélio respiratório que reveste as pequenas vias aéreas, não encontramos diferença significativa entre o grupo SDRA e o grupo CTRL [132,2 (344,5) x 208,9 (514,6) μm²/μm, p = ns] (Figura 4 e Figura 5).



Figura 4. Fotomicrografia ilustrativa representando as pequenas vias aéreas do grupo CTRL (A, C) e SDRA (B,D) coradas com anti-linterleucina 8 (A,B) e 6 (C,D). L = Luz da via aérea, EP = epitélio respiratório, Setas = células positivas. Barra = 50 μ m



Figura 5. Gráfico representando a quantificação da densidade de células IL-6+ na parede das vias aéreas (* p=0,004) (A) e a expressão da IL-6 pelo epitélio respiratório (B).

Em relação à IL-8, verificamos que o grupo SDRA apresentou maior densidade de células positivas expressando esta citocina na parede da pequena via aérea quando comparada ao grupo CTRL [12,7 ± 10,7 x 1,6 ± $1,8 \text{ cel}^{*}10^{3}/\mu\text{m}$, p = 0,004] (Figura 4 e Figura 6).

Em relação à expressão de IL-8 pelo epitélio respiratório que reveste as pequenas vias aéreas, verificamos que houve uma maior expressão de IL-8 pelo epitélio respiratório no grupo ARDS comparado ao grupo controle [152,67 (162,2) x 25,21 (59,02) μ m²/ μ m, p= 0,006] (Figura 4 e Figura 6).



Figura 6. Gráfico representando a quantificação da densidade de células IL-8+ na parede das vias aéreas (A) e a expressão da IL-8 pelo epitélio respiratório (B) (* p<0,05).

A Figura 7 representa a análise quantitativa da expressão de surfactante, SP-A (A) e SP-B (B), pelo epitélio respiratório da pequena via aérea. Em relação a estas duas variáveis, não encontramos diferença entre o grupo SDRA e o grupo controle [SP-A = 211,5 (386,9) x 131,2 (227,5) μ m²/ μ m, p= ns] [SP-B = 29,3 (138,1) x 35,48 (56,5) μ m²/ μ m, p= ns].



Figura 7. Gráfico representando a quantificação da expressão de SP-A (A) e SP-B (B) pelo epitélio respiratório.

A Figura 8 representa a análise quantitativa da expressão de Fas (A) e FasL (B) pelo epitélio respiratório da pequena via aérea e a quantificação das células epiteliais positivas pelo método de TUNEL (C). Podemos observar que não houve diferença estatística entre o grupo SDRA e o grupo controle em nenhuma destas variáveis analisadas [Fas = 523,8 ± 457,9 x 779,5 ± 524,1 μ m²/ μ m, p= ns] [SP-B = 29,3 (138,1) x 35,48 (56,5) μ m²/ μ m, p= ns] [TUNEL = 4,5 ± 4,6 x 8,6 ± 5,2 cel*10⁴/ μ m, p=0,065]. Entretanto, verificamos que o grupo SDRA apresenta uma menor quantidade de células epiteliais positivas pelo método TUNEL e que houve uma tendência à diferença estatisticamente significativa (p=0,065).



Figura 8. Gráfico representando a quantificação da expressão de Fas (A), FasL (B) pelo epitélio respiratório e (C) células epiteliais positivas pelo método TUNEL.

4.3 Correlações clinico-morfológicas

Observando-se o subgrupo de pacientes com tempo de SDRA de até 2 dias (n = 16) (Tabela 2) onde foram realizadas as correlações entre os parâmetros clínicos e ventilatórios (pressão de platô, PEEP e PaO₂/FiO₂) e morfológicos (IL-6, IL-8, SP-A, SP-B, Fas, FasL, TUNEL), verificamos apenas uma única correlação negativa entre a densidade de células inflamatórias expressando IL-8 e PaO₂/FiO₂ (r=-0.56; p=0.024) (Figura 9).



Figura 9. Gráfico mostrando a correlação negative entre a PaO_2/FiO_2 e a densidade de células positivas expressando IL-8 na parede da via aérea em pacientes que morreram em até 2 dias depois do diagnóstico da síndrome (n= 16).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o papel do epitélio que reveste as pequenas vias aéreas na produção de proteínas associadas ao surfactante e de citocinas, além da participação das vias aéreas na expressão de IL-6 e IL-8 por células inflamatórias em pacientes que morreram de SDRA. Verificamos ainda se a apoptose é um mecanismo de morte celular importante para o epitélio das pequenas vias aéreas na SDRA. Nossos achados principais foram o aumento do número de células que expressam IL-6 e IL-8 na parede das vias aéreas de pacientes com SDRA e o aumento na expressão epitelial de IL-8 na via aérea. Além disso, não encontramos diferenças com relação aos marcadores de apoptose no epitélio respiratório das pequenas vias aéreas (Fas, FasL e TUNEL) nos dois grupos.

Em condições normais, as funções do epitélio das vias aéreas pequenas incluem formar uma barreira mecânica a partículas inaláveis do meio ambiente, participação na resposta inflamatória incluindo o recrutamento e a modulação de células inflamatórias e reparo tecidual da via aérea lesada (Thompson *et al.*, 1995). Em algumas doenças pulmonares como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e a asma, as alterações da estrutura e função do epitélio respiratório estão bem descritas (Crystal *et al.*, 2008), porém existem poucos trabalhos que estudaram as alterações do epitélio das vias aéreas na SDRA. Em modelos experimentais, observa-se um aumento da inflamação nas pequenas vias aéreas tanto em modelos de SDRA quanto em modelos de Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica (VILI) (Tsuchida *et al.*, 2006; D'angelo *et al.*, 2008; Matute-Bello *et al.*, 2008). Em um modelo experimental de LPA pela

depleção de surfactante em ratos, Tsuchida e colaboradores mostraram que os danos ao epitélio das vias aéreas associado à inflamação peribrônquica ocorre difusamente no pulmão afetando regiões com e sem atelectasias (Tsuchida *et al.*, 2006). O aumento de células positivas expressando IL-6 e IL-8 nas vias aéreas, bem como o aumento na expressão epitelial de IL-8 encontrado em nossos resultados estão de acordo com estes trabalhos experimentais e evidenciam que as pequenas vias aéreas podem contribuir para o processo inflamatório e liberação de citocinas na SDRA.

Ranieri et al (1999) verificaram que o tipo de estratégia utilizada para ventilar os pacientes com SDRA influenciava na concentração sérica e no lavado broncoalveolar de algumas interleucinas. Os resultados deste estudo foram confirmados posteriormente por Parsons et al (2005) que verificaram em 861 pacientes previamente randomizados para duas estratégias ventilatórias diferentes comparando-se diferentes volumes pulmonares (6 e 12 mL/Kg de peso ideal) que os níveis séricos elevados das interleucinas pro-inflamatórias, IL-6 e IL-8, tem efeito deletério para os pacientes com LPA/SDRA caracterizados pelo aumento de morbidade e mortalidade destes pacientes. Além disso, a IL-6 é considerada uma citocina pro-fibrótica, marcadora e mediadora de sepse e em indivíduos asmáticos está associada ao processo de remodelamento das vias aéreas. Biópsias de pacientes asmáticos após 24 horas de stress mecânico apresentaram aumento na quantidade de IL-6 e versican, um proteoglicano que compõe a matriz extracelular e está relacionado ao processo de fibrose (Le Bellego et al., 2009).

Por outro lado, embora alguns trabalhos tenham mostrado uma relação deletéria entre os níveis de IL-6 e a gravidade da doença, o seu papel ainda não está totalmente esclarecido. Apesar de ser uma citocina liberada precocemente na fase inflamatória aguda e ser um marcador de lesão na SDRA, alguns estudos tem reportado um papel anti-inflamatório desta citocina em alguns modelos experimentais e após atividade física (Xing, et al, 1998; Petersen e Pedersen, 2005; Nandi et al, 2010). Xing et al, (1998) mostraram que camundongos "knockout" para IL-6 apresentavam maior concentração de TNFα e infiltração neutrofílica pulmonar após exposição a endotoxinas do que camundongos com IL-6. Em um modelo de lesão hepática, Nandi et al (2010) relataram que o tratamento com IL-6 antes e após a indução da lesão hepática, diminui a concentração de citocinas pró-inflamatórias e infiltrado neutrofílico bem como elevou a concentração de IL-10, uma citocina com função anti-inflamatória.

A IL-8 é uma citocina quimiotática relacionada com o recrutamento de neutrófilos levando a um dano pulmonar maciço na SDRA. Em um estudo com LBA de pacientes com SDRA, a quantidade de IL-8 correlacionou-se com o número de neutrófilos. Além disso, a IL-8 estava aumentada nos pacientes que morreram (Aggarwal *et al.*, 2000). Nosso grupo demonstrou previamente que os pacientes que morreram com SDRA apresentam inflamação nas vias aéreas e sinais de remodelamento (Morales, *et al.*, 2011). No presente trabalho, verificamos que o aumento da expressão de citocinas pelas células inflamatórias presentes nas pequenas vias aéreas está associado à gravidade da doença. Desta forma, sugerimos que a

expressão acentuada de IL-6 e IL-8 pode estar envolvida no mecanismo de lesão das vias aéreas e do remodelamento observado nestes pacientes.

O surfactante pulmonar é composto de fosfolipídeos (80%), lipídeos (8%) е proteínas (12%). Seu principal componente é 0 dipalmitoilfosfatidilcolina, um fosfolípide anfipático relacionado com a diminuição da tensão superficial pulmonar. Inicialmente acreditava-se que este comportamento biofísico era a única função do surfactante, porém atualmente sabe-se que ele desempenha importantes funções imunomodulatórias (resposta inata e adaptativa), melhora o clearance brônquico, além de contribuir para a estabilização das vias aéreas pequenas evitando o colapso e o acúmulo de líquidos (Hohlfeld, 2002).

O primeiro processo patológico que destacou a importância do surfactante foi a síndrome do desconforto respiratório da infância (doença da membrana hialina) desencadeado pela deficiência do surfactante. Entretanto, atualmente as alterações nas características biofísicas e bioquímicas do surfactante são detectadas em várias outras doenças pulmonares como a asma, a pneumonia, o edema agudo de pulmão e a SDRA (Hohlfeld, 2002).

Quatro tipos de proteínas associadas ao surfactante têm sido descritas sendo que a mais predominante é a SP-A. Esta proteína tem participação importante na resposta inata e regula a secreção de surfactante pelas células do tipo II. A principal função da SP-B é reduzir a tensão superficial (Pryhuber, 1998; Hohlfeld, 2002; Hohlfeld, 2005).

O surfactante das vias aéreas é secretado pelas células de Clara e está relacionado com a estabilidade das vias aéreas prevenindo o acúmulo de líquido na luz, atuando como uma barreira tendo ainda propriedades imunomoduladoras importantes (Hohlfeld, 2005). Nossa hipótese inicial era que a expressão de SP-A e SP-B estivesse diminuída no epitélio das vias aéreas de pacientes com SDRA, o que talvez estivesse relacionado com o mecanismo de colapso de vias aéreas distais observado nestes pacientes. Entretanto, não encontramos nenhuma diferença na expressão epitelial de SP-A e SP-B nas vias aéreas dos pacientes dos dois grupos analisados.

Alguns estudos que analisaram o LBA de pacientes com risco e no momento agudo da SDRA mostraram concentrações diminuídas de SP-A e SP-B (Pison *et al.*, 1989; Gregory *et al.*, 1991; Greene *et al.*, 1999). Greene et al (1999) ao realizarem LBA consecutivos de pacientes com fatores de risco para SDRA e novamente no primeiro, terceiro, sétimo e 14º dia após a instalação da síndrome, mostraram que os níveis de SP-A e SP-B permanecem baixos durante o curso da doença (primeiro ao décimo quarto dia). Entretanto, em um estudo mais recente (Schmidt *et al.*, 2007) analisando-se o líquido do LBA de pacientes com SDRA em três momentos diferentes do curso da doença, verificou-se que ocorre uma melhora considerável na composição de surfactante sendo que os valores de SP-A atingem um nível próximo a normalidade em sete a nove dias da doença. Nossos resultados talvez indiquem que as alterações na expressão do surfactante pelo epitélio das vias aéreas pequenas não contribuem para as alterações locais (presença de colapso) das vias aéreas na SDRA ou, de

forma similar ao que ocorre nos alvéolos, pode haver uma recuperação da produção dessas proteínas nas vias aéreas. Além disso, embora a quantidade de proteínas associadas ao surfactante não tenha sido diferente nos dois grupos analisados, nós não podemos descartar a possibilidade destas proteínas apresentarem alguma disfunção nestes pacientes.

No presente estudo, o índice de apoptose do epitélio das vias aéreas foi verificado tanto pelo sistema Fas/FasL quanto pelo TUNEL. Não encontramos diferenças entre os grupos SDRA e CTRL em nenhuma destas análises. Estes resultados indicam que a apoptose não é o mecanismo principal de morte do epitélio das pequenas vias aéreas, sugerindo que a descamação bronquiolar é secundária principalmente a necrose do epitélio.

Alguns estudos com modelos experimentais de LPA e o uso de ventilação mecânica com baixos volumes correntes tem mostrado que a lesão das pequenas vias aéreas está caracterizada por necrose e descamação do epitélio (Muscedere *et al.*, 1994; D'angelo *et al.*, 2002; D'angelo *et al.*, 2007; D'angelo *et al.*, 2008) sendo que a descamação do epitélio bronquiolar também está presente em humanos com SDRA (Katzenstein, 2006; Morales *et al.*, 2011). Os mecanismos de lesão epitelial e descamação não estão completamente compreendidos, mas parecem resultar da força de cisalhamento que ocorre durante o processo de abertura e fechamento das pequenas vias aéreas ou do preenchimento das mesmas por líquido (Milic-Emili *et al.*, 2007; Ghadiali e Gaver, 2008) ou ainda do estresse mecânico levando a hiperdistensão das células epiteliais (Copland *et al.*, 2003). O aumento destas forças de tensão sobre o epitélio que

reveste as pequenas vias aéreas pode levar a deformidades celulares, a morte e/ou a ruptura das adesões celulares (Ghadiali e Gaver, 2008).

Nossa hipótese era de que a apoptose seria o mecanismo preferencial de morte celular das pequenas vias aéreas na SDRA. Atualmente acreditase que a apoptose está relacionada à fisiopatologia da SDRA por três mecanismos distintos: 1) indução inapropriada da apoptose de células epiteliais; 2) inibição inapropriada da apoptose de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e; 3) distúrbio do processo apoptótico levando a necrose secundária à apoptose, sendo que neste último caso ocorre o extravasamento de conteúdo celular nas áreas adjacentes.

A contribuição relativa de cada processo de morte celular (apoptose ou necrose) no epitélio da SDRA permanece incerta (Albertine *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2005). Tanto em LBA de pacientes com LPA/SDRA quanto nas células epiteliais alveolares em pacientes que morreram de LPA/SDRA verificou-se um aumento nos níveis de Fas e FasL (Matute-Bello *et al.*, 1999; Albertine *et al.*, 2002). A idéia de que o sistema Fas/FasL tem papel importante na apoptose do epitélio das vias aéreas pequenas provem da observação de que o líquido recuperado de LBA de pacientes com SDRA induz a apoptose de células epiteliais distais e que esta apoptose é inibida bloqueando-se o sistema Fas/FasL (Matute-Bello *et al.*, 1999). Entretanto, ao se analisar a ultra-estrutura do tecido pulmonar de modelos animais de VILI o principal mecanismo de morte encontrado nas células epiteliais foi a necrose (Fanelli *et al.*, 2009).

Algumas limitações do presente estudo devem ser abordadas. 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). Devido à limitação da coleta retrospectiva do tecido pulmonar analisado no presente estudo, não foi possível acessar as diferenças regionais da lesão pulmonar na SDRA em humanos. Além disso, nas vias aéreas selecionadas analisamos apenas o epitélio que estava íntegro. Tendo em vista que a descamação epitelial é uma característica da SDRA (Muscedere et al., 1994; Morales et al., 2011), não podemos excluir a possibilidade de que o epitélio apresentando o maior grau de alteração não tenha sido analisado e sendo assim, nossos dados estariam subestimados. Finalmente, não existem 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 importante para a análise dos dados. Apesar de tais limitações, a característica clínico-morfológica deste estudo nos garante que todos os pacientes avaliados realmente foram acometidos por 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 (Ferguson et al., 2005).

Em resumo, nossos resultados mostram que as pequenas vias aéreas participam na inflamação de pacientes com SDRA caracterizada pelo aumento na expressão de interleucinas pro–inflamatórias tanto na via aérea quanto no epitélio. Nossos resultados sugerem ainda que a apoptose não é o principal mecanismo de morte das células epiteliais das vias aéreas de pacientes com SDRA.

6. CONCLUSÃO

As pequenas vias aéreas contribuem com o processo inflamatório pulmonar característico na SDRA com aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias tanto pelo epitélio quanto pelas células inflamatórias presentes nas vias aéreas.

Nossos resultados sugerem que alterações do surfactante produzido localmente nas vias aéreas não contribuem significativamente para as alterações funcionais das vias aéreas encontradas em parte dos pacientes com SDRA.

A apoptose não parece ser o principal mecanismo de morte celular do epitélio respiratório das pequenas vias aéreas em indivíduos com SDRA.

7. ANEXOS

Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética para a condução da pesquisa: Protocolo de pesquisa número 1308/06



Ao Departamento de Patologia

A Comissão de Éfica 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 28.04.10 tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **1308/06** intitulado "ENVOLVIMENTO DAS PEQUENAS VIAS AÉREAS NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO: O PAPEL DA INFLAMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO SURFACTANTE E DA APOPTOSE DE CÉLULAS EPITELIAIS", aprovado em 14.03.07, será <u>tese de doutorado</u> do aluno <u>RUY DE CAMARGO PIRES NETO</u>, tendo como orientadora **PROFA. DRA. MARISA DOLHNIKOFF**, bem como tomou ciência do relatório de andamento da pesquisa.

CAPPesq, 28 de abril de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

8-A-

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br matc
Caso	Grupo	SP-A (μm²/μm)	SP-B (μm²/μm)	IL-6 (μm²/μm)	IL-6 (cel/ μm)	IL-8 (μm²/μm)	IL-8 (cel/ μm)	Fas (µm²/µm)	FasL (µm²/µm)	Tunel (cel/ μm)
1	CTRL	131,25	49,22	208,95	0,0273	12,38	0,0003	1532,16	835,90	2,74
2	CTRL	137,56	17,98	311,08	0,0141	165,89	0,0018	260,11	986,71	2,46
3	CTRL	-	-	-	0,0198	-	0,0018	813,44	-	-
4	CTRL	-	-	-	0,0124	-	0,0010	-	-	-
5	CTRL	110,29	48,94	941,49	0,0340	-	0,0051	1473,09	990,26	12,48
6	CTRL	369,53	0,59	93,46	0,0069	12,06	0,0010	845,19	920,20	-
7	CTRL	299,45	-	-	0,0227	-	0,0047	-	222,99	9,34
8	CTRL	31,61	22,04	129,77	0,0072	39,80	0	394,97	597,89	15,09
9	CTRL	-	-	-	0,0081	-	0,0022	225,96	-	13,33
10	CTRL	-	-	-	0,0068	34,61	0	1192,00	670,11	-
11	CTRL	71,90	133,07	-	-	15,83	0	279,09	-	4,78
12	SDRA	225,22	14,60	24,98	0,0139	35,50	0,0023	1202,95	628,72	0
13	SDRA	33,86	12,91	3,09	0,0145	541,42	0,0439	67,24	500,98	2,81
14	SDRA	352,76	0,02	141,98	0,0289	147,12	0,0154	214,24	500,00	-
15	SDRA	254,24	122,87	260,4	0,0179	83,19	0,0029	601,23	941,56	0
16	SDRA	211,59	29,32	-	0 ,0166	137,30	0,0013	1737,31	868,37	0,00
17	SDRA	-	-	-	0,0289	-	0,0022	-	-	-
18	SDRA	-	1,80	-	0,0230	-	0,0038	-	548,07	-
19	SDRA	59,24	98,63	150,60	0,0241	158,23	0,0105	196,08	943,82	6,18
20	SDRA	-	-	-	0,0163	-	0,0111	-	689,90	-
21	SDRA	24,84	37,20	-	-	-	0,0155	112,86	1127,49	6,27
22	SDRA	-	-	-	0,0601	-	0,0279	-	-	-
23	SDRA	54,50	2,16	-	0,0116	-	0,0044	723,24	1261,34	9,15
24	SDRA	50,40	3,85	45,57	0,0244	41,38	0,0052	123,36	454,08	0,00
25	SDRA	-	-	-	-	-	0,0003	-	-	-

Anexo B. Dados individuais dos pacientes

CONTINUA...

Caso	Grupo	SP-A (μm²/μm)	SP-B (μm²/μm)	IL-6 (μm²/μm)	IL-6 (cel/ μm)	IL-8 (μm²/μm)	IL-8 (cel/ µm)	Fas (μm²/μm)	FasL (µm²/µm)	Tunel (cel/ µm)
26	SDRA	77,71	30,32	59,48	0,0236	220,64	0,0141	373,48	787,59	4,12
27	SDRA	1174,01	17,24	18,70	0,0975	22,37	0,0074	820,26	353,66	11,57
28	SDRA	183,26	248,33	1300,09	0,0238	54,44	0,0045	224,99	1341,48	2,61
29	SDRA	185,47	162,90	3,39	0,0274	-	0,0045	0,35	390,48	1,40
30	SDRA	446,20	185,47	120,23	0,0344	62,91	0,0106	251,82	557,77	0,00
31	SDRA	83,02	15,18	508,99	0,0584	68,69	0,0123	342,15	1324,02	1,19
32	SDRA	-	-	-	0,0727	1171,72	0,0284	-	-	5,98
33	SDRA	-	-	-	0,0558	-	0,0231	-	-	-
34	SDRA	590,33	5,60	131,83	0,0460	230,04	0,0046	832,64	980,46	1,10
35	SDRA	-	-	-	-	-	0,0200	-	-	-
36	SDRA	-	-	-	0,0273	-	0,0275	1260,67	595,72	11,11
37	SDRA	255,83	189,17	617,28	0,0286	160,05	0,0098	529,15	640,80	5,56
38	SDRA	-	-	-	0,0164	-	0,0316	-	-	-
39	SDRA	-	0,81	132,22	0,0267	197,12	0,0182	82,33	327,25	2,49
40	SDRA	755,07	223,95	480,05	0,0284	176,48	0,0034	535,57	517,97	8,75
41	SDRA	-	-	-	0,0229	-	0,0209	-	-	-
42	SDRA	2468,20	67,05	279,52	0,0199	266,33	0,0078	769,61	1147,43	16,20

Anexo B. Dados individuais dos pacientes (CONTINUAÇÃO)

CONCLUSÃO

8. REFERÊNCIAS

Agarwal, R., A. N. Aggarwal, *et al.* Etiology and outcomes of pulmonary and extrapulmonary acute lung injury/ARDS in a respiratory ICU in North India. <u>Chest</u>, v.130, n.3, Sep, p.724-9. 2006.

Agarwal, R., R. Srinivas, *et al.* Is the mortality higher in the pulmonary vs the extrapulmonary ARDS? A meta analysis. <u>Chest</u>, v.133, n.6, Jun, p.1463-73. 2008.

Aggarwal, A., C. S. Baker, et al. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. <u>Eur</u> <u>Respir J</u>, v.15, n.5, May, p.895-901. 2000.

Albertine, K. H., M. F. Soulier, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. <u>Am J Pathol</u>, v.161, n.5, Nov, p.1783-96. 2002.

Amato, M. B., C. S. Barbas, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med, v.338, n.6, Feb 5, p.347-54. 1998.

Araujo, B. B., M. Dolhnikoff, *et al.* Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. <u>Eur Respir J</u>, v.32, n.1, Jul, p.61-9. 2008.

Ardsnet. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. <u>N Engl J Med</u>, v.342, n.18, May 4, p.1301-8. 2000.

Arroliga, A. C., Z. W. Ghamra, *et al.* Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. <u>Chest</u>, v.121, n.6, Jun, p.1972-6. 2002.

Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, *et al.* Acute respiratory distress in adults. <u>Lancet</u>, v.2, n.7511, Aug 12, p.319-23. 1967.

Bellingan, G. J. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. <u>Thorax</u>, v.57, n.6, Jun, p.540-6. 2002.

Bernard, G. R., A. Artigas, *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.149, n.3 Pt 1, Mar, p.818-24. 1994.

Bersten, A. D., C. Edibam, *et al.* Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. <u>Am J Respir</u> <u>Crit Care Med</u>, v.165, n.4, Feb 15, p.443-8. 2002.

Briel, M., M. Meade, *et al.* Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. JAMA, v.303, n.9, Mar 3, p.865-73. 2010.

Brower, R. G., P. N. Lanken, *et al.* Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. <u>N Engl J Med</u>, v.351, n.4, Jul 22, p.327-36. 2004.

Brun-Buisson, C., C. Minelli, *et al.* Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. <u>Intensive Care</u> <u>Med</u>, v.30, n.1, Jan, p.51-61. 2004.

Chesnutt, A. N., M. A. Matthay, *et al.* Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. <u>Am J</u> <u>Respir Crit Care Med</u>, v.156, n.3 Pt 1, Sep, p.840-5. 1997.

Chung, K. F. e P. J. Barnes. Cytokines in asthma. <u>Thorax</u>, v.54, n.9, Sep, p.825-57. 1999.

Copland, I. B., B. P. Kavanagh, et al. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.168, n.9, Nov 1, p.1051-9. 2003.

Crystal, R. G., S. H. Randell, et al. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. <u>Proc Am Thorac Soc</u>, v.5, n.7, Sep 15, p.772-7. 2008.

D'angelo, E., M. Pecchiari, et al. Low-volume ventilation causes peripheral airway injury and increased airway resistance in normal rabbits. <u>J Appl Physiol</u>, v.92, n.3, Mar, p.949-56. 2002.

_____. Dependence of lung injury on surface tension during low-volume ventilation in normal open-chest rabbits. <u>J Appl Physiol</u>, v.102, n.1, Jan, p.174-82. 2007.

_____. Cytokine release, small airway injury, and parenchymal damage during mechanical ventilation in normal open-chest rats. <u>J Appl Physiol</u>, v.104, n.1, Jan, p.41-9. 2008.

Dreyfuss, D. e G. Saumon. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.157, n.1, Jan, p.294-323. 1998.

Eisner, M. D., T. Thompson, *et al.* Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.164, n.2, Jul 15, p.231-6. 2001.

Fanelli, V., L. Mascia, et al. Pulmonary atelectasis during low stretch ventilation: "open lung" versus "lung rest" strategy. <u>Crit Care Med</u>, v.37, n.3, Mar, p.1046-53. 2009.

Ferguson, N. D., A. M. Davis, et al. Development of a clinical definition for acute respiratory distress syndrome using the Delphi technique. J Crit Care, v.20, n.2, Jun, p.147-54. 2005.

Fialkow, L., S. R. Vieira, *et al.* Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. <u>Intensive</u> <u>Care Med</u>, v.28, n.11, Nov, p.1644-8. 2002.

Figueira De Mello, G. C., C. R. Ribeiro Carvalho, *et al.* Small airway remodeling in idiopathic interstitial pneumonias: a pathological study. <u>Respiration</u>, v.79, n.4, p.322-32. 2010.

Galani, V., E. Tatsaki, *et al.* The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. <u>Pathol</u> <u>Res Pract</u>, v.206, n.3, Mar 15, p.145-50. 2010.

Gattinoni, L., P. Pelosi, *et al.* Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes? <u>Am J Respir Crit</u> Care Med, v.158, n.1, Jul, p.3-11. 1998.

Ghadiali, S. N. e D. P. Gaver. Biomechanics of liquid-epithelium interactions in pulmonary airways. <u>Respir Physiol Neurobiol</u>, v.163, n.1-3, Nov 30, p.232-43. 2008.

Greene, K. E., J. R. Wright, et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. Am J Respir Crit<u>Care Med</u>, v.160, n.6, Dec, p.1843-50. 1999.

Gregory, T. J., W. J. Longmore, *et al.* Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. <u>J Clin Invest</u>, v.88, n.6, Dec, p.1976-81. 1991.

Haagsman, H. P. e R. V. Diemel. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. <u>Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol</u>, v.129, n.1, May, p.91-108. 2001.

Hohlfeld, J. M. The role of surfactant in asthma. Respir Res, v.3, p.4. 2002.

______. Pulmonary Surfactant in Asthma and Allergy. In: K. Nag (Ed.). Lung Surfactant Function and Disorder: Taylor & Francis Group, v.201, 2005. Pulmonary Surfactant in Asthma and Allergy, p.383-398. (Lung Biology in health and disease). Hyde, D. M., Q. Hamid, et al. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. J Allergy Clin<u>Immunol</u>, v.124, n.6 Suppl, Dec, p.S72-7. 2009.

Jain, M. e J. I. Sznajder. Bench-to-bedside review: distal airways in acute respiratory distress syndrome. <u>Crit Care</u>, v.11, n.1, p.206. 2007.

_____. Peripheral airways injury in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. <u>Curr Opin Crit Care</u>, v.14, n.1, Feb, p.37-43. 2008.

Katzenstein, A.-L. <u>Katzenstein and Askin's Surgical Pathology of Non-Neoplastic</u> lung disease. <u>Major problems in Pathology</u>. Philadelphia: Saunders. 2006

Kawasaki, M., K. Kuwano, *et al.* Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. <u>Am J</u> <u>Pathol</u>, v.157, n.2, Aug, p.597-603. 2000.

Knight, D. A. e S. T. Holgate. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. <u>Respirology</u>, v.8, n.4, Dec, p.432-46. 2003.

Kobzik, L. e L. Sholl. Pulmonary Pathology of ARDS: Diffuse Alveolar Damage. In:
A. M. K. Choi (Ed.). <u>Acute Respiratory Distress Syndrome</u>. New York, 2009.
Pulmonary Pathology of ARDS: Diffuse Alveolar Damage, p.46-58

Kondili, E., G. Prinianakis, *et al.* Lung emptying in patients with acute respiratory distress syndrome: effects of positive end-expiratory pressure. <u>Eur Respir J</u>, v.19, n.5, May, p.811-9. 2002.

Koutsoukou, A., A. Armaganidis, *et al.* Expiratory flow limitation and intrinsic positive end-expiratory pressure at zero positive end-expiratory pressure in patients with adult respiratory distress syndrome. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.161, n.5, May, p.1590-6. 2000.

Kumar, V., A. K. Abbas*, et al. <u>ROBBINS AND COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF</u> <u>DISEASE</u>. Philadelphia: SAUNDERS ELSEVIER 2010*

Le Bellego, F., H. Perera, et al. Mechanical strain increases cytokine and chemokine production in bronchial fibroblasts from asthmatic patients. <u>Allergy</u>, v.64, n.1, Jan, p.32-9. 2009.

Lee, K. S., Y. H. Choi, et al. Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from ARDS patients with regard to apoptosis. <u>Respir Med</u>, v.102, n.3, Mar, p.464-9. 2008.

Lewandowski, K., J. Metz, *et al.* Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.151, n.4, Apr, p.1121-5. 1995.

Li, G., M. Malinchoc, *et al.* Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. <u>Am J Respir Crit Care</u> <u>Med</u>, v.183, n.1, Jan 1, p.59-66.

Maccallum, N. S. e T. W. Evans. Epidemiology of acute lung injury. <u>Curr Opin Crit</u> <u>Care</u>, v.11, n.1, Feb, p.43-9. 2005.

Martin, C., L. Papazian, *et al.* Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. <u>Chest</u>, v.107, n.1, Jan, p.196-200. 1995.

Martin, T. R., N. Hagimoto, *et al.* Apoptosis and epithelial injury in the lungs. <u>Proc</u> <u>Am Thorac Soc</u>, v.2, n.3, p.214-20. 2005.

Matute-Bello, G., W. C. Liles, *et al.* Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). <u>J Immunol</u>, v.163, n.4, Aug 15, p.2217-25. 1999.

Matute-Bello, G., C. W. Frevert, et al. Animal models of acute lung injury. <u>Am J</u> <u>Physiol Lung Cell Mol Physiol</u>, v.295, n.3, Sep, p.L379-99. 2008.

Matute-Bello, G. e T. R. Martin. Science review: apoptosis in acute lung injury. Crit Care, v.7, n.5, Oct, p.355-8. 2003.

______. Apoptosis in the Pathogenesis and Resolution of Acute Lung Injury. In: A. M. K. Choi (Ed.). <u>Acute Respiratory Distress Syndrome</u>. New York: Informa Healthcare USA, v.233, 2009. Apoptosis in the Pathogenesis and Resolution of Acute Lung Injury, p.93-108. (LUNG BIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE)

Meade, M. O., D. J. Cook, *et al.* Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. JAMA, v.299, n.6, Feb 13, p.637-45. 2008.

Meduri, G. U., G. Kohler, *et al.* Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. <u>Chest</u>, v.108, n.5, Nov, p.1303-14. 1995.

Mercat, A., J. C. Richard, *et al.* Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. JAMA, v.299, n.6, Feb 13, p.646-55. 2008.

Milic-Emili, J., R. Torchio, et al. Closing volume: a reappraisal (1967-2007). <u>Eur J</u> <u>Appl Physiol</u>, v.99, n.6, Apr, p.567-83. 2007.

Morales, M. M., R. C. Pires-Neto, et al. Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue. <u>Crit Care</u>, v.15, n.1, Jan 6, p.R4. 2011.

Murray, J. F., M. A. Matthay, *et al.* An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. <u>Am Rev Respir Dis</u>, v.138, n.3, Sep, p.720-3. 1988.

Muscedere, J. G., J. B. Mullen, *et al.* Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.149, n.5, May, p.1327-34. 1994.

Nakamura, M., G. Matute-Bello, *et al.* Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. <u>Am J Pathol</u>, v.164, n.6, Jun, p.1949-58. 2004.

Nandi, D., M. K. Mishra, et al. Protective effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide (LPS)-induced experimental endotoxemia are linked to alteration in hepatic anti-oxidant enzymes and endogenous cytokines. <u>Immunobiology</u>, v.215, n.6, Jun, p.443-51. 2010.

Nicod, L. P. Cytokines. 1. Overview. Thorax, v.48, n.6, Jun, p.660-7. 1993.

Oba, Y., D. M. Thameem, *et al.* High levels of PEEP may improve survival in acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis. <u>Respir Med</u>, v.103, n.8, Aug, p.1174-81. 2009.

Oliveira, R. H. e A. Basille Filho. Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study. <u>J Bras Pneumol</u>, v.32, n.1, Jan-Feb, p.35-42. 2006.

Oliveira, R. H. R., D. Deheizelin, *et al.* Incidência de Lesão Pulmonar Aguda e Síndrome da Angústia Respiratória Aguda na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Sírio Libanês. <u>Rev Bras Ter Intensiva</u>, v.14, n.1, p.5. 2002.

Parsons, P. E., M. D. Eisner, *et al.* Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. <u>Crit Care Med</u>, v.33, n.1, Jan, p.1-6; discussion 230-2. 2005.

Pelosi, P., D. D'onofrio, *et al.* Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. <u>Eur Respir J Suppl</u>, v.42, Aug, p.48s-56s. 2003.

Perl, M., C. S. Chung, *et al.* Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.176, n.6, Sep 15, p.591-601. 2007.

Petersen, A. M. e B. K. Pedersen. The anti-inflammatory effect of exercise. <u>J Appl</u> <u>Physiol</u>, v.98, n.4, Apr, p.1154-62. 2005.

Pison, U., W. Seeger, et al. Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. <u>Am Rev Respir Dis</u>, v.140, n.4, Oct, p.1033-9. 1989.

Phua, J., J. R. Badia, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. Am J Respir Crit Care Med, v.179, n.3, Feb 1, p.220-7. 2009.

Pryhuber, G. S. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. Mol Genet Metab, v.64, n.4, Aug, p.217-28. 1998.

Ranieri, V. M., P. M. Suter, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. JAMA, v.282, n.1, Jul 7, p.54-61. 1999.

Rubenfeld, G. D., E. Caldwell, *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. <u>N Engl J Med</u>, v.353, n.16, Oct 20, p.1685-93. 2005.

Rylander, C., U. Tylen, *et al.* Uneven distribution of ventilation in acute respiratory distress syndrome. Crit Care, v.9, n.2, Apr, p.R165-71. 2005.

Schmidt, R., P. Markart, et al. Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. Respir Res, v.8, p.55. 2007.

Schutte, H., J. Lohmeyer, et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. <u>Eur</u> <u>Respir J</u>, v.9, n.9, Sep, p.1858-67. 1996.

Slutsky, A. S. Lung injury caused by mechanical ventilation. <u>Chest</u>, v.116, n.1 Suppl, Jul, p.9S-15S. 1999.

Stevens, T. P. e R. A. Sinkin. Surfactant replacement therapy. <u>Chest</u>, v.131, n.5, May, p.1577-82. 2007.

Tesfaigzi, Y. Roles of apoptosis in airway epithelia. <u>Am J Respir Cell Mol Biol</u>, v.34, n.5, May, p.537-47. 2006.

Thompson, A. B., R. A. Robbins, *et al.* Immunological functions of the pulmonary epithelium. <u>Eur Respir J</u>, v.8, n.1, Jan, p.127-49. 1995.

Thomsen, G. E. e A. H. Morris. Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.152, n.3, Sep, p.965-71. 1995.

Tremblay, L. N. e A. S. Slutsky. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. <u>Intensive Care Med</u>, v.32, n.1, Jan, p.24-33. 2006.

Tsuchida, S., D. Engelberts, *et al.* Atelectasis causes alveolar injury in nonatelectatic lung regions. <u>Am J Respir Crit Care Med</u>, v.174, n.3, Aug 1, p.279-89. 2006.

Villar, J. e A. S. Slutsky. The incidence of the adult respiratory distress syndrome. <u>Am Rev Respir Dis</u>, v.140, n.3, Sep, p.814-6. 1989.

Ware, L. B. e M. A. Matthay. The acute respiratory distress syndrome. <u>N Engl J</u> <u>Med</u>, v.342, n.18, May 4, p.1334-49. 2000.

Weg, J. G., A. Anzueto, *et al.* The relation of pneumothorax and other air leaks to mortality in the acute respiratory distress syndrome. <u>N Engl J Med</u>, v.338, n.6, Feb 5, p.341-6. 1998.

Wheeler, A. P. e G. R. Bernard. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. <u>Lancet</u>, v.369, n.9572, May 5, p.1553-64. 2007.

Wiedemann, H. P., A. P. Wheeler, *et al.* Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. <u>N Engl J Med</u>, v.354, n.24, Jun 15, p.2564-75. 2006.

Xing, Z., J. Gauldie, *et al.* IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. <u>J Clin Invest</u>, v.101, n.2, Jan 15, p.311-20. 1998.

Zambon, M. e J. L. Vincent. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. <u>Chest</u>, v.133, n.5, May, p.1120-7. 2008.