YONARA RIVELLE NEVES DAVID

**Quantificação das alterações vasculares
pulmonares na fibrose pulmonar idiopática e
suas implicações prognósticas**

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

Área de concentração: Pneumologia

Orientador: Dr. Ronaldo Adib Kairalla

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

David, Yonara Rivelles Neves

Quantificação das alterações vasculares pulmonares na fibrose pulmonar
idiopática e suas implicações prognósticas / Yonara Rivelles Neves David. --
São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Pneumologia.

Orientador: Ronaldo Adib Kairalla.

Descritores: 1.Circulação pulmonar 2.Fibrose pulmonar/etiologia 3.Prognóstico

USP/FM/SBD-074/07

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Valmir e Marivalna**,
por seu amor incondicional e exemplo
de dedicação aos filhos.
Vocês são a minha vida !*

*Aos meus irmãos, **Éder, Fred e
Grasielle**, por seu carinho, confiança,
compreensão e amizade.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Ronaldo Kairalla**, pelo acolhimento, orientação e suporte durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rogério de Souza**, pela idealização inicial deste projeto, alegria e otimismo contagiantes.

À **Profa. Dra. Vera L. Capellozzi**, pela amizade, estímulo, entusiasmo permanente e exemplo de dedicação à pesquisa científica.

Ao **Dr. Edwin Parra**, pelo minucioso e dedicado trabalho de análise histopatológica, fundamental à realização deste projeto. Seu suporte foi imprescindível.

Ao **Prof. Dr. Carlos R. Ribeiro de Carvalho**, pela atenção, acolhimento, e constante estímulo a todos que se aventuram a desafiar os conhecimentos em pneumologia.

Ao **Prof. Dr. Francisco Vargas**, pela oportunidade de realização deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Mário Terra**, pela orientação e dedicação durante as atividades da pós graduação.

A **Valdecir Marvulli**, pelo ensinamento e apoio quanto à análise estatística.

A **Marcelo Bueno**, pelo suporte pessoal e carinho.

A **Deus**, por ter colocado todas as pessoas que participaram deste projeto, em meu caminho.

Normalização

Esta tese está de acordo com:

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico e classificação das pneumonias intersticiais idiopáticas	3
1.2 Patogênese	8
1.2.1 A inflamação (alveolite) na fibrose pulmonar idiopática	9
1.2.2 Fatores de crescimento	10
1.2.3 Alteração epitélio / mesenquimal	11
1.3 Quadro clínico e funcional	13
1.4 Radiologia	15
1.5 Patologia	16
1.6 Diagnóstico	17
1.7 Fatores prognósticos	18
1.8 Remodelamento vascular na fibrose pulmonar	20
1.9 Disfunção endotelial na fibrose pulmonar	23
1.10 Hipótese do estudo	26
2 OBJETIVOS	27
3 PACIENTES E MÉTODOS	29
3.1 Delineamento do estudo	30
3.2 Critérios de inclusão	30
3.3 Critérios de exclusão	31
3.4 Características clínicas	32
3.5 Prova de função pulmonar	34
3.6 Biópsia pulmonar	35
3.7 Análise histológica	35
3.7.1 Quantificação da atividade fibrinogênica	36
3.7.2 Avaliação da macrocirculação pulmonar (artérias pré- acinares)	38
3.7.2.1 Quantificação do grau de lesão vascular	38

3.7.2.2 Quantificação do grau de oclusão e espessura da parede vascular	38
3.7.2.3 Quantificação das fibras colágenas e elásticas vasculares	40
3.7.3 Avaliação da microcirculação pulmonar	41
3.7.3.1 Quantificação da densidade capilar pulmonar	41
3.7.2.2 Disfunção endotelial	41
3.7.2.3 Técnica de análise da imunoexpressão dos antígenos para CD34, VCAM1, IACM1 e E-selectina	41
3.7.4 Controles	43
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 RESULTADOS	46
5.1 Características clínicas	47
5.2 Avaliação funcional	48
5.3 Avaliação histopatológica	49
5.3.1 Atividade fibrinogênica	50
5.3.2 Microcirculação pulmonar	52
5.3.2.1 Grau de lesão vascular	52
5.3.2.2 Grau de oclusão e espessura da parede vascular	53
5.3.2.3 Fração de área vascular de fibras colágenas e elásticas	54
5.3.3 Microcirculação pulmonar	56
5.3.3.1 Densidade capilar pulmonar	56
5.3.4 Disfunção endotelial capilar	58
5.4 Associações entre parâmetros clínicos, funcionais e histopatológicos	62
5.4.1 Associações entre parâmetros clínicos e funcionais	62
5.4.2 Associações entre parâmetros funcionais e histopatológicos	63
5.4.3 Associações entre parâmetros histopatológicos	64
5.4.3.1 Remodelamento das artérias pré-acinares e grau de atividade fibronogênica	64
5.4.3.2 Densidade capilar pulmonar e remodelamento das artérias pré-acinares	68

5.4.3.3 Densidade capilar pulmonar e grau de atividade fibrinogênica	68
5.4.3.4 Disfunção endotelial capilar e grau de atividade fibrinogênica	71
5.5 Análise da sobrevida	75
5.5.1 Sobrevida e características clínicas	76
5.5.2 Sobrevida e características funcionais	76
5.5.3 Sobrevida e alterações histopatológicas	78
5.5.3.1 Sobrevida e grau de atividade fibrinogênica	78
5.5.3.2 Sobrevida e remodelamento macrovascular	79
5.5.3.3 Sobrevida e remodelamento microvascular	81
5.5.3.4 Sobrevida e disfunção endotelial capilar	83
6 DISCUSSÃO	84
6.1 Considerações gerais	85
6.2 Limitações do estudo	86
6.2.1 Desenho epidemiológico do estudo	86
6.2.2 Local da realização da biópsia pulmonar	86
6.3 Características clínico-funcionais e prognóstico	87
6.4 Remodelamento vascular	89
6.4.1 Remodelamento vascular das artérias pré-acinares	89
6.4.2 Remodelamento capilar pulmonar	90
6.5 Disfunção endotelial capilar	94
6.6 Aplicação clínica	95
6.7 Perspectivas	97
7 CONCLUSÕES	98
8 ANEXOS	101
9 REFERÊNCIAS	108

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro quadrado
AMDGF	Fator de Crescimento Derivado do Macrófago Alveolar
ATS/ERS	American Thoracic Society/European Respiratory Society (Sociedade Americana Torácica/Sociedade Europeia Respiratória)
BOOP	Bronquiolite obliterante com pneumonia em organização
BR-DPI	Bronquiolite Respiratória associada a Doença Pulmonar Intersticial
CAMs	Moléculas de Adesão Celular
CD34	Catepsina D-34
CPT	Capacidade Pulmonar Total
CRF	Capacidade Residual Funcional
CVF	Capacidade Vital Forçada
DAD	Dano Alveolar Difuso
DCO	Fator de Difusão do Monóxido de Carbono
DP	Desvio-padrão
Ed.	Edição
EP	Erro Padrão
Et al.	e colaboradores
FPI	Fibrose Pulmonar Idiopática
G _(A-a) O ₂	Gradiente Alvéolo-Arterial de Oxigênio
H&E	Hematoxilina-Eosina
ICAM-1	Molécula de Adesão Inter Celular-1
IFN-δ	Interferon gama
IL-8	Interleucina oito

LBA	Lavado Bronco Alveolar
NO	Óxido Nítrico
p	Probabilidade de erro alfa
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PDEF	Fator Derivado do Pigmento Endotelial
PECAM-1	Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetária 1
PIA	Pneumonia Intersticial Aguda
PIB	Pneumonia Intersticial Brônquica
PID	Pneumonia Intersticial Descamativa
PIG	Pneumonia Intersticial de Células Gigantes
PII _s	Pneumonias Intersticiais Idiopáticas
PIL	Pneumonia Intersticial Linfóide
PINE	Pneumonia Intersticial Não Específica
PIU	Pneumonia Intersticial Usual
PO	Pneumonia em Organização
POC	Pneumonia organizante criptogênica
SaO ₂	Saturação arterial de oxigênio
SPSS	“Statistical Package for Social Science”
TCAR	Tomografia Computadorizada de Alta Resolução
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular Celular-1
VEF ₁	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
VEF ₁ /CVF	Razão entre Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo e a Capacidade Vital Forçada
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VR	Volume Residual
VR/CPT	Razão entre Volume Residual e a Capacidade Pulmonar Total
vWF	Fator de Von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Histograma da distribuição de frequência das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PII) em 93 biópsias pulmonares a céu aberto com diagnóstico de UIP realizadas de 1983 a 2004 e reclassificadas conforme critérios da ATS/ERS	32
Figura 2 -	Avaliação do corte transversal e medidas utilizadas para o cálculo da espessura arterial	39
Figura 3 -	Pneumonia Intersticial Usual. Classificação da atividade fibrogênica. (A) Visão panorâmica da expressão histológica da atividade fibrogênica leve evidenciada pela predominância de áreas normais (N) e de colapso alveolar. (B) Detalhe das áreas normais e de colapso alveolar. (C e D) Atividade fibrogênica moderada evidenciada pela predominância de colapso alveolar e moderada extensão de fibrose mural organizante. (E e F) Atividade fibrogênica acentuada evidenciada pela predominância de maior quantidade de focos fibroblásticos e maior extensão de fibrose mural organizante e faveolamento H-E: A,C e E x40 ; B,D e F x100	51
Figura 4 -	Pneumonia Intersticial Usual. A- Presença de numerosos focos fibroblásticos. B- Observa-se detalhe do foco fibroblástico composto por tecido de granulação	52
Figura 5 -	Remodelamento Vascular – artérias pré acinares. A - Grau I de lesão vascular: Hipertrofia da camada média. B - Grau II: proliferação da íntima. C – Grau III: Oclusão total do lúmen arterial por tecido fibro celular. D – Grau IV: Lesão plexiforme	53
Figura 6 -	Artérias pré-acinares com diferentes graus de lesão vascular coradas com Picrocílios (A) , para identificação de fibras de colágeno, e com resorcina-fuccina de Wigert (B) para identificação de fibras elástica vasculares	55
Figura 7 -	Pneumonia intersticial usual (PIU): áreas normais (1) , área decolapso alveolar (2) , área de fibrose mural organizante (3) , coradas com Hematoxilina-Eosina (A) e com imunomarcção por CD34 (B)	57

Figura 8 -	Pneumonia intersticial usual (PIU): áreas normais (1), de colapso alveolar (2) e de fibrose mural organizante (3), coradas com Hematoxilina-Eosina (A) e com imunomarcção por VCAM1 (B)	59
Figura 9 -	Pneumonia intersticial usual (PIU): áreas normais (1), de colapso alveolar (2) e de fibrose mural organizante (3) coradas com Hematoxilina-Eosina (A) e com imunomarcção por E-selectina (B)	60
Figura 10 -	Correlação de Sperman e Regressão entre $G_{(A-a)}O_2$ e densidade microvascular nas áreas de parênquima pulmonar normal	63
Figura 11 -	Associação entre grau de lesão vascular e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU $p=0,007$	64
Figura 12 -	Relação entre espessamento vascular e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU. $p = 0,048$	65
Figura 13 -	Relação entre a fração de área vascular de colágeno e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU	66
Figura 14 -	Relação entre a fração de área vascular das fibras elásticas e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU	66
Figura 15 -	Densidade microvascular em áreas de pulmão normal e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU	69
Figura 16 -	Densidade microvascular em áreas de colapso alveolar e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU	69
Figura 17 -	Disfunção endotelial em áreas normais e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU	72
Figura 18 -	Disfunção endotelial em áreas de colapso alveolar e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU	72
Figura 19 -	Disfunção endotelial em áreas fibrose mural organizante e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU .	73
Figura 20 -	Curva de sobrevida geral em 36 pacientes portadores de Fibrose Pulmonar Idiopática	75

Figura 21 - Distribuição das curvas de sobrevida dos pacientes portadores de FPI/PIU de acordo com os valores de VEF1 $\geq$ 70% e VEF1<70%	77
Figura 22 - Distribuição das curvas de sobrevida dos pacientes portadores de de FPI/PIU de acordo com os valores de DCO $\leq$ 40 e DCO>40	77
Figura 23 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU separados por escore de grau de atividade fibrogênica	78
Figura 24 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU separados por escore de grau de lesão vascular. Teste Log Rank: $p=0,17$	79
Figura 25 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme a quantificação de fibra de colágeno vascular	80
Figura 26 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme a quantificação de fibra elástica vascular	80
Figura 27 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme quantificação da densidade microvascular em áreas de parênquima normal. Teste Log Rank: $p=0,038$	81
Figura 28 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme quantificação da densidade microvascular em áreas de colapso alveolar.	82
Figura 29 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme a disfunção endotelial (VCAM1+) nas áreas de fibrose mural organizante	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação histológica das pneumonias intersticiais idiopáticas	7
Tabela 2 -	Classificação clínico radiológico patológica das pneumonias intersticiais idiopáticas: American Thoracic Society / European Respiratory Society 2002	8
Tabela 3 -	Características gerais dos pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática (n=36)	48
Tabela 4 -	Função pulmonar e troca gasosa em pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática (n: 36)	49
Tabela 5 -	Médias e valores de dispersão da área interna, perímetro interno e da espessura da parede das artérias pré acinares na fibrose pulmonar idiopática (n= 36)	54
Tabela 6 -	Médias e valores de dispersão da fração de fibras de colágeno e elástica na parede de artérias pré acinares (n=31)	55
Tabela 7 -	Médias e valores de dispersão da percentagem corrigida de pontos positivos para CD34 em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante de pacientes com Fibrose Pulmonar idiopática e de controles (n= 31)	58
Tabela 8 -	Médias e valores de dispersão da percentagem corrigida de pontos positivos para VCAM1, ICAM e E-Selectina em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante de pacientes com Fibrose Pulmonar idiopática e de controles (n=31)	61
Tabela 9 -	Associação entre características clínicas - funcionais e tabagismo	62
Tabela 10 -	Médias e valores de dispersão da espessura, colágeno vascular e elástica vascular das artérias pré-acinares nos três graus de atividade fibrogênica da pneumonia intersticial usual (PIU). Utilizou-se análise de variância ANOVA one-way pelo teste auxiliar de Tukey para a correlação das diferentes variáveis estudadas	67

Tabela 11 - Médias e valores de dispersão da porcentagem corrigida de pontos positivos para CD34 em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante nos diferentes graus de atividade fibrogênica da pneumonia intersticial usual (PIU). Utilizou-se análise de variância ANOVA one-way pelo teste auxiliar de Tukey para a correlação das diferentes variáveis estudadas (n=31)	70
Tabela 12 - Médias e valores de dispersão da porcentagem corrigida de pontos positivos para VCAM1 em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante nos diferentes graus de atividade fibrogênica da pneumonia intersticial usual (PIU). Utilizou-se análise de variância ANOVA one-way pelo teste auxiliar de Tukey para a correlação das diferentes variáveis estudadas (n=31)	74

RESUMO

David YRN. *Quantificação das alterações vasculares pulmonares na fibrose pulmonar idiopática e suas implicações prognósticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 118 p.

A patogênese da Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI/PIU), doença fibroproliferativa crônica, é caracterizada por um processo de reparação anormal com acentuada deposição de matriz extra celular. Neste contexto, a importância das alterações vasculares na evolução da FPI/PIU permanece controversa. O presente estudo objetiva quantificar as alterações histopatológicas da macro e microcirculação pulmonar na FPI/PIU e seu valor prognóstico. Foram avaliados retrospectivamente as biópsias pulmonares e a sobrevida de 36 pacientes com FPI/PIU. Na biópsia pulmonar, as lesões do parênquima foram analisadas através da quantificação do grau de atividade fibrogênica (leve, moderado e acentuado). A quantificação das alterações vasculares foi feita isoladamente nas áreas normais, de colapso alveolar e de fibrose mural organizante. A macrocirculação foi estudada através da análise semiquantitativa das artérias pré acinares quanto ao grau de lesão vascular, grau de oclusão e da espessura da parede do vaso, e quantificação de fibras elásticas e de colágeno vasculares. No estudo da microcirculação, os capilares foram analisados quanto a densidade capilar, através de imunomarcador endotelial (CD34), e a disfunção endotelial, através do aumento da expressão de moléculas de adesão (VCAM1, ICAM1, E-Selectina). As biópsias de 5 pulmões normais foram utilizadas como controles. À análise da macrocirculação, quanto maior o grau de atividade fibrogênica, mais acentuado foi o grau de lesão vascular ($p=0,007$), da espessura ($p<0,05$) e da quantificação de fibras de colágeno ($p<0,001$) e elástica ($p=0,002$) vasculares. Quanto à microcirculação, a densidade microvascular (CD34) nas áreas de pulmão normal ($p<0,001$) e colapso alveolar ($p<0,01$) foram maiores que no grupo controle. Pacientes com atividade fibrogênica leve ($p=0,2$) e moderada ($p=0,08$) apresentaram tendência a aumento da densidade vascular nas áreas normais comparados aos pacientes com atividade fibrogênica acentuada. A disfunção endotelial (VCAM1, ICAM1 e E-selectina) foi maior em pacientes com FPI/PIU que em controles normais ($p<0,05$), e ocorreu, principalmente, nas áreas de fibrose mural organizante. A disfunção endotelial (VCAM1+) nas áreas normais aumentou conforme maior o grau de atividade fibrogênica ($p=0,01$). Pacientes com maior quantificação de fibras de colágeno e elástica na parede do vaso ($p=0,04$; $p=0,03$; Teste Log Rank) e maior disfunção endotelial (VCAM1+) nas áreas fibrose mural organizante ($p=0,027$) apresentaram menor sobrevida. A maior densidade microvascular nas áreas não fibróticas correlacionou-se com sobrevida maior ($p=0,04$). Observamos a existência de remodelamento vascular na macro e microcirculação pulmonar dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática que ocorre de maneira heterogênea e paralela ao remodelamento parenquimatoso. Essas alterações correlacionam-se com a

sobrevida, permitindo formular uma hipótese de participação dos eventos vasculares na patogênese da FPI/UIP.

Descritores: 1.Circulação pulmonar 2.Fibrose pulmonar/etiologia
3.Prognóstico

SUMMARY

David YRN. *Quantification of pulmonary vascular alterations in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and its prognostic implications* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 118 p.

The Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF/UIP), a chronic fibroproliferative disease, is characterized by a process of impaired wound healing with extracellular matrix deposition. In this context, the importance of the vascular alterations in the evolution of IPF/UIP remains controversial. The present study aims to quantify the histopathological alterations in the pulmonary macro and microcirculation in IPF/UIP and their prognostic value. Pulmonary biopsies and the survival of 36 patients with IPF/UIP were evaluated retrospectively. In the pulmonary biopsy, the parenchyma remodeling was analyzed through the quantification of the fibrogenic activity level (minimal, moderate and severe). The quantification of the vascular alterations was done isolately in the normal, alveolar collapsed and mural-organizing fibrosing areas. The macrocirculation was studied through the semiquantitative analysis of pre acinar artery, according to the degree of vascular lesion, occlusion and thickness of the vessel wall, and quantification of vascular collagen and elastic deposition. Microcirculation analysis was performed measuring capillary density (CD34), and endothelial dysfunction (VCAM1, ICAM1, E-Selectina). The biopsies of 5 normal lungs were used as control. Macrocirculation analysis showed that degree of fibrogenic activity directly correlated with: degree of vascular lesion ($p=0,007$), thickness of vessel wall ($p<0,05$) and quantification of vascular collagen ($p<0,001$) and elastic fibers ($p=0,002$). Regarding microcirculation, the capillary vascular density (CD34) in normal ($p<0,001$) and alveolar collapsed ($p<0,01$) areas were higher than control group. Patients with minimal ($p=0,2$) and moderate ($p=0,08$) fibrogenic activity had a tendency to higher vascular density in normal areas compared to patients with severe fibrogenic activity. The endothelial dysfunction (VCAM1, ICAM1, E-selectina) was more intense in patients with IPF/UIP than normal controls ($p<0,05$), and it occurred, mainly, in mural-organizing fibrosing areas. In normal areas, endothelial dysfunction (VCAM1+) correlated with the degree of fibrogenic activity ($p=0,01$). Shorter survival correlated with collagen and elastic fibers deposition in wall vessels ($p=0,04$; $p=0,03$ Test Log Rank) and endothelial dysfunction (VCAM1+) in mural-organizing fibrosing areas ($p=0,027$), while microvascular density in non-fibrotic areas was related to longer survival ($p=0,04$). We observed the presence of vascular remodeling in pulmonary macro and microcirculation of IPF patients, which occurs in a heterogeneous and parallel way with parenchyma remodeling. These alterations were related to survival, enabling us to formulate a hypothesis of the participation of vascular events on IPF pathogenesis.

Descriptors: 1.Pulmonary circulation 2.Pulmonary fibrosis/ etiology 3.Prognosis

1 INTRODUÇÃO

As pneumonias intersticiais idiopáticas (PII) representam um grupo heterogêneo de doenças pulmonares parenquimatosas difusas resultantes da lesão do parênquima pulmonar por vários graus de inflamação e fibrose (ATS/ERS, 2002). A fibrose pulmonar idiopática (FPI) representa uma das várias pneumonias intersticiais idiopáticas.

A Fibrose Pulmonar Idiopática, segundo a Sociedade Torácica Americana e a Sociedade Respiratória Européia (ATS/ERS, 2000), é definida como uma forma específica de pneumonia intersticial fibrosante crônica, limitada aos pulmões, sem causa aparente, progressiva e de alta morbimortalidade. Caracteriza-se por dispnéia progressiva, anormalidades do interstício à radiografia simples de tórax ou à tomografia computadorizada de alta resolução, associadas a alterações restritivas na função pulmonar e padrão histopatológico de pneumonia intersticial usual (PIU) à biópsia pulmonar cirúrgica.

Nenhum tratamento específico demonstrou um aumento claro da sobrevida dos pacientes com FPI. Assim, o esclarecimento da patogênese da fibrose pulmonar idiopática tornou-se um dos maiores desafios atuais das pesquisas em pneumologia. Vários estudos tentam esclarecer sua

patogênese e comportamento visando estimular o desenvolvimento de novos tratamentos.

1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DAS PNEUMONIAS INTERSTICIAIS IDIOPÁTICAS

HAMMAM & RICH (1944) foram os primeiros a fazer uma descrição clínica, radiológica e patológica de uma doença pulmonar rapidamente progressiva em estudo de 4 casos de autópsia. Os pacientes apresentavam sintomas com duração de 1 a 6 meses e as alterações morfológicas dos pulmões observadas no material de autópsias eram representadas por um tipo de inflamação diferente da observada em pneumonias habituais. Havia uma fibrose intersticial difusa e extensa em ambos os pulmões, além de proliferação de células do revestimento alveolar, necrose, presença de membranas hialinas, edema e deposição de fibrina na parede alveolar. Por várias décadas a Síndrome de Hamman-Rich esteve associada ao conceito de fibrose pulmonar idiopática (FPI). Após revisão dos casos descritos e considerando a reclassificação das pneumonias intersticiais idiopáticas (PII), a Síndrome de Hamman-Rich foi redefinida como pneumonia intersticial aguda (PIA).

RUBIN & LUBINER (1957) revisaram 39 casos descritos na literatura como Síndrome de Hamman-Rich e 15 casos próprios adicionais. Eles

observaram que estas lesões pulmonares também poderiam estar associadas a doenças sistêmicas, especialmente doenças do colágeno e, principalmente, que esta pneumonia fibrosante intersticial difusa nem sempre se apresentava de forma aguda e fatal. Alguns casos descritos neste estudo sobreviveram por mais de 6 anos.

SHERIDAN e colaboradores (1964) observaram que muitos casos descritos como fibrose pulmonar intersticial idiopática apresentavam natureza crônica e com média de sobrevida de 2 a 4 anos. Entretanto, não conseguiram fazer uma distinção histopatológica entre estes e aqueles casos fulminantes descritos por Hamman-Rich (1954). GAENSLER e colaboradores (1964) descreveram uma série de 105 pacientes com doença pulmonar difusa submetidos a biópsia cirúrgica entre 1948 e 1963. Eles estabeleceram que a biópsia pulmonar poderia ser realizada com segurança e que o diagnóstico de fibrose pulmonar intersticial, ainda denominada Síndrome de Hamman-Rich, poderia ser estabelecido antes do óbito. GROSS (1962) foi um dos primeiros a considerar a idéia de que a fibrose pulmonar intersticial aguda, em alguns casos, poderia ser uma fibrose crônica com uma exacerbação aguda superposta, de causa infecciosa ou não infecciosa.

GRACEY e colaboradores avaliaram a membrana alvéolo capilar por microscopia eletrônica em 14 pacientes com fibrose pulmonar intersticial idiopática em 1967. Eles observaram anormalidades no septo alveolar e na membrana alvéolo capilar.

LIEBOW & CARRINGTON (1969) foram os primeiros a classificar estas doenças pulmonares crônicas sem etiologia conhecida nos seguintes cinco subgrupos histopatológicos: pneumonia intersticial usual (PIU), pneumonia intersticial bronquiolítica (PIB), pneumonia intersticial descamativa (PID), pneumonia intersticial de células gigantes (PIG) e pneumonia intersticial linfóide (PIL) (Tabela 1).

Nos vinte anos seguintes, outras doenças classificadas dentre as PII foram descritas. O estudo destas últimas tornou-se mais significativo com o avanço das técnicas diagnósticas, principalmente da tomografia computadorizada, e a classificação de LIEBOW & CARRINGTON (1969) tornou-se insuficiente para a variedade de alterações histopatológicas encontradas. Por outro lado, muitas vezes os diagnósticos eram limitados, referindo-se somente às alterações histológicas, sem levar em conta aspectos clínicos ou radiológicos.

Foram feitas novas tentativas de classificação para integrar aspectos clínicos, radiológicos e histopatológicos. Tal é o caso da classificação de MULLER & COLBY (1997), que classificaram as PII em pneumonia intersticial usual (PIU), pneumonia intersticial descamativa (PID), bronquiolite obliterante com pneumonia em organização (BOOP), pneumonia intersticial aguda (PIA) e pneumonia intersticial não específica (PINE) (Tabela 1). Também KATZENSTEIN & MYERS (1998) propuseram nova classificação que reconheceu cinco entidades: pneumonia intersticial usual (PIU), pneumonia intersticial descamativa (PID), bronquiolite respiratória associada à doença

pulmonar intersticial (BR-DPI), pneumonia intersticial não específica (PINE) e pneumonia intersticial aguda (PIA), conhecida anteriormente como síndrome de Hamman-Rich (Tabela 1).

Todas estas classificações deram contribuições importantes, mas não permitiram um consenso global. Desta maneira, a Sociedade Torácica Americana e a Sociedade Respiratória Européia (ATS/ERS), em 2002, integradas por clínicos, radiologistas e patologistas, criaram uma nova classificação e um guia diagnóstico enfatizando a importância da aproximação destes três profissionais para o diagnóstico das PII. Neste sentido, esta nova classificação compreende sete grandes grupos de doenças: fibrose pulmonar idiopática (FPI), pneumonia intersticial não-específica (PINE), pneumonia intersticial aguda (PIA), pneumonia em organização criptogênica (POC) ou Bronquiolite obliterante com pneumonia em organização (BOOP), bronquiolite respiratória associada à doença pulmonar intersticial (BR-DPI), pneumonia intersticial descamativa (PID) e pneumonia intersticial linfóide (PIL) como é mostrado na Tabela 2.

Tabela 1 - Classificação histológica das pneumonias intersticiais idiopáticas.

Liebow & Carrington 1968	Muller & Colby 1997	Katzenstein & Myers 1998
Pneumonia intersticial usual (PIU)	Pneumonia intersticial usual (PIU)	Pneumonia intersticial usual (PIU)
Pneumonia intersticial descamativa (PID)	Pneumonia intersticial descamativa (PID)	Pneumonia intersticial descamativa (PID)
		Bronquiolite respiratória com doença pulmonar intersticial (BR-DPI)
Pneumonia intersticial bronquiolítica (PIB)	Bronquiolite obliterante com pneumonia em organização (BOOP)	
	Pneumonia intersticial aguda (PIA)	Pneumonia intersticial aguda (PIA)
	Pneumonia intersticial não-específica (PINE)	Pneumonia intersticial não-específica (PINE)
Pneumonia intersticial linfóide (PIL)		
Pneumonia intersticial de células gigantes (PIG)		

Tabela 2 - Classificação clínico-radiológico-patológica das pneumonias intersticiais idiopáticas: American Thoracic Society/European Respiratory Society 2002

Padrão Histológico	Diagnóstico Clínico-Radiológico-Patológico
Pneumonia intersticial usual (PIU)	Fibrose pulmonar idiopática (FPI)
Pneumonia intersticial não-específica (PINE)	Pneumonia intersticial não-específica (PINE)
Dano alveolar difuso (DAD)	Pneumonia intersticial aguda (PIA)
Pneumonia em organização (PO)	Pneumonia em organização criptogênica (POC)
Bronquiolite respiratória (BR)	Bronquiolite respiratória associada à doença pulmonar intersticial (BR-DPI)
Pneumonia intersticial descamativa (PID)	Pneumonia intersticial descamativa (PID)
Pneumonia intersticial linfóide (PIL)	Pneumonia intersticial linfóide (PIL)

1.2 PATOGÊNESE

O melhor esclarecimento da patogênese da fibrose pulmonar idiopática (FPI) é um dos grandes desafios atuais das pesquisas em pneumologia. Uma das principais dificuldades em identificar os mecanismo da patogênese está relacionada à melhor definição do que realmente é a fibrose pulmonar idiopática. Alguns conceitos são importantes para sua melhor compreensão.

1.2.1 A INFLAMAÇÃO (ALVEOLITE) NA FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA

Em 1976, baseado na observação que existia um aumento do número de células inflamatórias no lavado bronco alveolar em pacientes com FPI, CRYSTAL e colaboradores, levantaram a hipótese que a FPI começava como uma “alveolite” e progredia para a fibrose intersticial. A alveolite na FPI foi caracterizada por um excessivo acúmulo de neutrófilos no lavado bronco alveolar (LBA) comparado ao aumento de linfócitos evidenciando em pacientes normais com sarcoidose. Nesta publicação, os autores propuseram o conceito que PID e PIU eram componentes da mesma doença e não duas entidades distintas.

A hipótese inflamatória na FPI perdeu força por várias razões. A principal delas é que um exame minucioso do padrão PIU em pacientes que não pareciam apresentar doença avançada pelos parâmetros clínicos não apresentavam evidência de inflamação alveolar ou intersticial significativa. Esta observação, associado à evidente falta de eficácia do tratamento com corticosteróides em pacientes com FPI/PIU, conduziram à reinterpretação dos achados do LBA na FPI. No momento, acredita-se que o acúmulo de neutrófilos na FPI/PIU, particularmente em estágios avançados da doença, seja devido ao extenso remodelando pulmonar e às bronquiectasias de tração. Assim, o acúmulo de neutrófilos parece ser mais uma consequência e não a causa da FPI/PIU (SELMAN et al., 2001).

1.2.2 FATORES DE CRESCIMENTO

BITERMAM e colaboradores (1983) observaram que a cultura de macrófagos alveolares isolados do LBA de pacientes com FPI promoviam a proliferação de culturas de fibroblastos pulmonares. Os autores denominaram este fator como fator de crescimento derivado do macrófago alveolar (AMDGF). O conceito de que o macrófago alveolar tornava-se ativado na FPI e secretava o fator ou fatores para promover a proliferação de fibroblasto deu início a grande interesse em fatores de crescimento e em possíveis mecanismos que poderiam regular as funções dos macrófagos. BITTERMAN e colaboradores (1986), ROM e colaboradores (1987), MARTINET e colaboradores (1987) e NAGAOKA e colaboradores (1990), trabalharam conjuntamente identificando outros fatores de crescimento. Estes estudos pioneiros foram a base para outros subseqüentes realizados por YAMAUCHI e colaboradores (1988) e BROCKELMANN e colaboradores (1991), que identificaram no tecido pulmonar de pacientes com FPI, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Adicionalmente, outros estudos têm mostrado que células epiteliais alveolares podem ser importantes fontes de fatores de crescimento (ANTONIADES et al., 1990). Estas observações representam uma mudança no paradigma no conceito de patogênese da FPI. A idéia de que a fibrose pode ser resultado de um processo de cicatrização anormal e uma produção inapropriada ou desregulada de fatores de crescimento que estimulam o crescimento fibroblástico e

produção de matriz extra celular tem sido ativamente proposto como objeto de novas pesquisas terapêuticas.

1.2.3 ALTERAÇÃO EPITÉLIO / MESENQUIMAL

Em 1980, WITSCHI e colaboradores apresentaram um modelo animal de lesão epitelial alveolar e sugeriram que a fibrose pulmonar intersticial ocorre se, após uma lesão, a camada de superfície epitelial não é restaurada com sucesso. Se existe um impedimento à reepitelização, os fibroblastos intersticiais irão proliferar de uma maneira irregular. Enquanto os detalhes deste mecanismo potencial não são elucidados, este trabalho, além de outros, tem promovido a emergência da interação epitélio / mesenquimal como uma via patogênica na FPI (SELMAN et al., 2001).

O papel da lesão da célula epitelial na FPI foi potencializado pelos estudos de microscopia eletrônica realizado por KATZENSTEIN & MYERS (1985, 1988). Estes estudos sugeriram que a necrose das células epiteliais alveolares promoveria a exposição da membrana basal com estímulo à proliferação de fibroblastos e colapso alveolar subsequente. Foram realizados estudos de microscopia eletrônica no tecido pulmonar de pacientes com PIA e PIU. Em ambos foi observado necrose epitelial com lesão da membrana basal e colapso alveolar. A necrose epitelial é confinada a pequenos focos que são amplamente espalhados e reconhecidos

histologicamente pela presença de fibroblastos intersticiais agregados frouxamente (focos fibroblásticos). Estas observações propuseram um tema comum de lesão pulmonar para PIU e PIA. A diferença é que na FPI a lesão seria microscópica e ocorreria em sítios onde os focos fibroblásticos estariam presentes, e na PIA, a lesão seria mais difusa. KATZENSTEIN (1988) usou o termo necrose para explicar a ausência de células epiteliais alveolares. Observações recentes sugerem que mais que necrose, as células podem estar submetidas a uma morte celular programada (apoptose) (NOBLE et al., 2004). Embora o mecanismo de morte celular possa ser diferente, a questão fundamental é a conseqüente perda de superfície epitelial. Este conceito da patogênese da FPI como episódios repetidos de lesão pulmonar microscópica foi fortalecido por análise imunohistoquímica em uma variedade de doenças pulmonares fibrosantes evidenciadas por KUHN e colaboradores (1989, 1991). Nestes estudos, focos fibroblásticos foram identificados nas biópsias de PIU como sítios de invasão do espaço aéreo por fibroblastos ativados, produzindo componentes da matriz extra celular. Concluiu-se que esses aglomerados subepiteliais de fibroblastos, sintetizando colágeno, sugerem que a fibrose na FPI seja semelhante à fibrose intra alveolar presente na lesão pulmonar aguda, mas, numa escala menor. Atualmente, o esforço está voltado para esclarecer as vias pelas quais a lesão celular epitelial induz a fibrose e entender a relação entre lesão pulmonar aguda microscópica e reparo cicatricial anormal (NOBLE et al., 2004).

1.3 QUADRO CLÍNICO E FUNCIONAL

A maioria dos estudos mostra uma predominância da FPI no sexo masculino, usualmente entre 40 e 70 anos de idade. Aproximadamente dois terços dos pacientes tem mais de 60 anos durante a manifestação inicial (COUTAS et al., 1993; JOHNSTON et al., 1997). A FPI geralmente se apresenta de forma insidiosa, com início gradual de tosse seca e dispnéia (MICHAELSON et al., 2000). A dispnéia geralmente é progressiva e freqüentemente o sintoma mais proeminente e incapacitante. Sintomas sistêmicos como fadiga e perda de peso são pouco freqüentes (ATS/ERS, 2000).

À ausculta pulmonar, estertores crepitantes, tipo “velcro”, principalmente nas bases, são evidenciados em mais de 80% dos pacientes. Baqueteamento digital é observado em 25-50% dos pacientes (TURNER-WARWICK et al., 1980). Cianose e cor pulmonale podem ser evidenciados numa fase tardia da doença.

Os testes de função pulmonar tipicamente revelam distúrbio ventilatório restritivo, com redução da capacidade pulmonar total (CPT), capacidade residual funcional (CRF) e volume residual (VR) associado à diminuição da complacência pulmonar (NAVA et al., 1999). Da mesma forma, a curva de pressão-volume apresenta-se desviada para a direita e

para baixo, decorrente da diminuição da complacência pulmonar e do aumento da pressão de recolhimento elástico (GIBSON et al., 1979).

Em relação aos fluxos pulmonares, observa-se uma diminuição no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e na capacidade vital forçada (CVF) devido à diminuição dos volumes pulmonares, mas a relação VEF1/CVF é normal ou aumentada. Contudo, devido ao aumento do recolhimento elástico pulmonar, os fluxos pulmonares, quando comparados aos volumes pulmonares, estão freqüentemente aumentados. A diminuição de fluxos é encontrada em pacientes com doenças de vias aéreas associadas (SCHOFIELD et al., 1978)

A medida da difusão através do monóxido de carbono (DCO) está reduzida e pode preceder a diminuição dos volumes pulmonares (MARCINIUK et al., 1994). A redução da DCO é provavelmente causada pela contração do volume capilar pulmonar e por alterações na relação ventilação/perfusão (V/Q). A pressão arterial de O_2 (PaO_2) em repouso encontra-se normal ou diminuída, conforme o estadio da doença, enquanto o gradiente ou diferença alvéolo arterial de O_2 ($G_{(A-a)}O_2$) encontra-se normal ou, nas fases avançadas, alargado. Enquanto no repouso o distúrbio V/Q é o principal responsável pela hipoxemia, durante o exercício, o aumento do $G_{(A-a)}O_2$ ocorre devido a anormalidades na difusão de oxigênio (MARCINIUK et al., 1994).

1.4 RADIOLOGIA

A radiografia de tórax típica da FPI evidencia opacidades reticulares bilaterais, de predominância periférica e em lobos inferiores (MATHIELSON et al., 1989). A fibrose progressiva promove a formação de dilatações císticas das vias aéreas distais, resultando no padrão em “favo de mel”. A diminuição da complacência pulmonar pode induzir a formação de bronquiectasias de tração, visíveis como vias aéreas dilatadas e espessadas. A radiografia simples de tórax nem sempre é capaz de mostrar as alterações presentes nas doenças pulmonares intersticiais. Estudos mostraram que 10–15% dos pacientes com doença pulmonar difusa comprovada histologicamente, apresentavam radiografia de tórax normal (EPLER et al., 1978)

A Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) permite uma avaliação detalhada do parênquima pulmonar até o nível do lóbulo pulmonar e é um dos métodos não invasivos mais importantes na avaliação do estágio e prognóstico da FPI. A TCAR permite um diagnóstico precoce da FPI, ajuda no esclarecimento do diagnóstico diferencial e permite a identificação da extensão da lesão e de outras doenças pulmonares associadas. Também permite aumentar o nível de confiança para o diagnóstico de FPI quando as características clínicas e radiográficas são duvidosas. TUNG e colaboradores (1993) avaliaram radiografias simples e

cortes tomográficos de 86 pacientes (41 com FPI e 45 com outras doenças pulmonares difusas), os pesquisadores diagnosticaram corretamente e sem o conhecimento de informações clínicas, 88% dos casos de FPI através da TCAR e 76% através da radiografia. Os padrões mais típicos encontrados nas TCARs dos pacientes com FPI são: opacidades reticulares, freqüentemente associadas a bronquiectasias de tração, lesões císticas denominadas “favo de mel” com predominância subpleural, e raramente, opacidades em vidro despolido.

1.5 PATOLOGIA

Segundo a ATS/ERS de 2002, as pneumonias intersticiais idiopáticas podem ser classificadas de acordo com seu padrão histopatológico em: Pneumonia Intersticial Usual (PIU), Pneumonia Intersticial Descamativa (PID), Pneumonia Intersticial Não Específica (PINE), Pneumonia Intersticial Aguda (PIA), Pneumonia Organizante Criptogênica (POC), Pneumonia Intersticial Linfóide (PIL) e Bronquiolite respiratória associada a doença pulmonar intersticial (BR-DPI). A Fibrose Pulmonar Idiopática tem como substrato anátomo patológico o padrão de Pneumonia Intersticial Usual. O principal critério diagnóstico e marcador histológico é a heterogeneidade temporal e espacial, com a presença de áreas de pulmão normal alternando-

se com inflamação intersticial, fibrose, e áreas com aspecto em “favo de mel”, que acometem principalmente o parênquima subpleural

A inflamação intersticial consiste da infiltração do septo alveolar por infiltrado de linfócitos e de células plasmáticas associado a hiperplasia de pneumócitos II. Muitos casos mostram um infiltrado inflamatório inespecífico nas áreas de deposição do colágeno, que estão alternadas com áreas de septos alveolares normais e áreas intermediárias de colapso alveolar (KATZENSTEIN et al., 1998).

As zonas fibróticas são caracterizadas por heterogeneidade temporal, com áreas de depósito de colágeno, denominadas fibrose mural organizante (alteração crônica) e conglomerados de fibroblastos jovens e bem circunscritos, chamados de “focos de fibroblastos” (alteração subaguda). Áreas parenquimatosas com remodelamento em “favo de mel” são formadas por áreas císticas fibróticas freqüentemente preenchidas por muco e circundadas por epitélio bronquiolar (ATS/ERS, 2002).

1.6 DIAGNÓSTICO

Não há sinal clínico, radiológico ou patológico patognomônico para a Fibrose Pulmonar Idiopática. Assim, para o seu diagnóstico é necessária uma história clínica compatível, alterações radiológicas, funcionais e histológicas típicas.

Conforme definido pela ATS/ERS (2000), o diagnóstico definitivo da FPI quando disponível uma biópsia pulmonar cirúrgica evidenciando padrão de PIU, inclui:

- Exclusão de outras causas conhecidas de doença pulmonar intersticial como toxicidade por drogas, exposição ambiental e outras doenças vasculares do colágeno
- Provas de função pulmonar alteradas, evidenciando restrição e/ou alteração da troca gasosa (aumento do $G_{(A-a)}O_2$) em repouso ou exercício ou diminuição da DCO
- Alterações compatíveis à radiografia convencional ou TCAR

1.7 FATORES PROGNÓSTICOS

A FPI é uma doença insidiosa e progressiva. Embora 40% dos pacientes eventualmente morram de insuficiência respiratória, em muitos pacientes com FPI a morte é desencadeada por complicações associadas à doença, principalmente infecções e insuficiência cardíaca, doença coronariana e embolia pulmonar (PANOS et al., 1990). A média de sobrevida à partir do diagnóstico é de aproximadamente três anos (BJORAKER et al., 1998).

Vários estudos identificaram fatores de risco para rápida evolução da doença (SCHWARTZ et al., 1994; JOHNSON et al., 1989; TURNER-WARWIK et al., 1980; TUKIAINEN et al., 1983):

- Idade maior que 50 anos
- sexo masculino
- Intensidade maior da dispnéia à apresentação
- Diminuição da função pulmonar à apresentação
- Maior escore de fibrose à avaliação histopatológica
- Ausência de resposta de tratamento.

Estes estudos, entretanto, devem ser interpretados sob várias limitações que incluem: caráter retrospectivo; ausência de confirmação histológica de pneumonia intersticial usual; inexistência de tomografia computadorizada de tórax para avaliar lesões compatíveis com inflamação ou fibrose de maneira semi-quantitativa; amostra pequena de pacientes; tempo de acompanhamento insuficiente.

1.8 REMODELAMENTO VASCULAR NA FIBROSE PULMONAR

A patogênese da FPI apresenta características de reparo anormal e desregulado, com acentuado remodelamento da matriz extra celular, causando fibrose progressiva e perda de função pulmonar. Enquanto numerosos e importantes estudos avaliaram a biologia da proliferação de fibroblastos e deposição da matriz extra celular, poucos avaliaram o papel do remodelamento vascular na FPI. Entretanto, a maioria das doenças fibroproliferativas parece estar associada a angiogênese anormal e ao remodelamento vascular (STRIETER, 2005)

O remodelamento vascular nos pacientes com FPI foi originalmente demonstrado por TURNER-WARWICK (1963). Este estudo evidenciou extensa neovascularização anômala e remodelamento vascular em áreas de fibrose promovendo a formação de anastomoses entre a microvasculatura pulmonar e a sistêmica em pulmões de pacientes com FPI.

O fenômeno de remodelamento vascular foi avaliado em modelo animal de fibrose pulmonar por PEÃO e colaboradores (1994), que perfundiam a árvore vascular de ratos com resina de metacrilato no momento de extensa fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. A análise do tecido pulmonar através da microscopia eletrônica evidenciou a formação de novo sistema de vasos sanguíneos peri bronquiolares, localizados em

área de deposição de tecido conectivo, e distorção da arquitetura dos capilares alveolares que pareciam estar dilatados. A localização da neovascularização esteve também associada a regiões de fibrose pulmonar, semelhante ao encontrado em humanos com FPI.

Posteriormente aos estudos que sustentam a presença de neovascularização na FPI, novas investigações tem descrito fatores que podem estar envolvidos na regulação da atividade angiogênica durante a fibrose pulmonar. Estudos realizados por KEANE e colaboradores (1997, 1999) demonstram um desequilíbrio entre os níveis de quimiocinas angiogênica (IL-8) e angioestática (IFN gama), evidenciado em modelos animais e em amostras de tecido pulmonar de pacientes com FPI, este desequilíbrio favoreceu o aumento da atividade angiogênica.

Contrariamente ao conceito do aumento da angiogênese na fibrose pulmonar, estudos recentes têm considerado o conceito de heterogeneidade vascular regional na fibrose pulmonar idiopática, caracterizada por áreas com aumento da vascularização, e outras, com redução. RENZONI e colaboradores (2003), estudando a fibrose pulmonar idiopática e alveolite fibrosante associada à esclerose sistêmica, evidenciaram, utilizando imunorreatividade com CD34 como marcador de endotélio capilar, uma diminuição e redistribuição da densidade vascular no interstício pulmonar dos pacientes com essas duas patologias. COSGROVE e colaboradores (2004) analisando a expressão do fator derivado de pigmento epitelial (PDEF), um inibidor da formação de novos vasos, e o fator de crescimento

vascular endotelial (VEGF) em amostras de pulmão de pacientes com fibrose pulmonar idiopática, observaram uma maior expressão de PDEF nestes pacientes, particularmente nos focos fibroblásticos, um local de síntese ativa de matriz extra celular. Outro estudo recentemente realizado por EBINA e colaboradores (2004), utilizando CD34 como marcador de endotélio capilar alveolar e expressão de Fator de von Willebrand (vWF), como marcador de células endoteliais em outros vasos, avaliou a vascularização alveolar em relação a graus diferentes de fibrose pulmonar em pacientes com PIU. Eles evidenciaram que a densidade vascular diminuiu com o aumento do grau de fibrose pulmonar e observaram um aumento nos capilares alveolares nas áreas preservadas. Também demonstraram que as vênulas positivas para vWF estabeleciam conexão com os capilares CD34 positivos dentro das lesões fibróticas.

O impacto do remodelamento vascular na fibrose pulmonar pode ser significativo. O remodelamento nas áreas de fibrose pode contribuir para a fibrogênese de uma maneira semelhante àquela que a neovascularização anômala contribui para o crescimento tumoral. Além disso, a formação de anastomoses entre a microvasculatura sistêmica e pulmonar pode aumentar o shunt direito-esquerdo sob condições de hipertensão pulmonar e contribuir para hipoxemia na FPI. Evidência do papel do remodelamento vascular na hipoxemia vem do estudo realizado por GHOFrani e colaboradores (2002) com a utilização de vasodilatadores em pacientes com hipertensão pulmonar secundário à fibrose pulmonar. Os pacientes receberam óxido nítrico inalatório e foram posteriormente randomizados para receber epoprostenol

endovenoso ou sildenafil via oral. Somente aqueles que receberam epoprostenol apresentaram aumento no shunt basal de <5% para 16% que foi associado a significativa hipoxemia. Este resultado sugere que, em resposta a alterações resultantes do tratamento com vasodilatadores, a rede vascular dinâmica pode ser recrutada e perfundida na ausência de ventilação, amplificando a magnitude do shunt que resulta em hipoxemia.

O real papel da heterogeneidade vascular na fibrose pulmonar idiopática é incerto, podendo contribuir para fibroproliferação e inibição dos mecanismos normais de reparo pulmonar ou representar uma tentativa de resolução do processo ou regeneração do epitélio lesado, como sugerido por EBINA e colaboradores (2004).

1.9 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA FIBROSE PULMONAR

O endotélio desempenha função importante na homeostase vascular através da liberação de uma variedade de substâncias autócrinas e parácrinas. Adicionalmente à vasodilatação, o endotélio normal é capaz de inibir a adesão e agregação plaquetária, a proliferação de células musculares lisas e a adesão leucocitária. O equilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio mantém a homeostase vascular. A ruptura deste equilíbrio promove importantes alterações vasculares com a vasoconstrição, aderência leucocitária,

ativação plaquetária, trombose, distúrbios da coagulação e inflamação (LUSCINSKAS et al., 1996).

O óxido nítrico (NO) é um fator vasodilatador derivado do endotélio que desempenha papel fundamental na manutenção do tônus e reatividade vascular, função esta, oposta aos fatores vasoconstrictores derivados do endotélio como a angiotensina II e endotelina I. O óxido nítrico também inibe a ativação plaquetária e leucocitária e mantém o músculo liso em um estado não proliferativo (ANDERSON et al., 1999).

Embora a maioria dos estudos associe a disfunção endotelial à perda da capacidade vasodilatadora (em resposta ao óxido nítrico), sua definição implica um desequilíbrio em todos os mecanismos homeostáticos vasculares. A disfunção endotelial também pode ser expressa pelo aumento das moléculas de adesão e da aderência leucocitária, ativação plaquetária, aumento da permeabilidade celular e proliferação e migração de células do músculo liso (VERMA et al., 2002)

O endotélio normal apresenta importante propriedade antiinflamatória e vários tipos de moléculas de adesão são responsáveis pela interação entre leucócitos e endotélio. As moléculas de adesão orquestram o processo complicado de adesão e migração leucocitária para o espaço sub intimal e são expressas na superfície das células endoteliais e leucócitos em resposta à disfunção endotelial. Inúmeros marcadores sistêmicos e *“in situ”* tem sido avaliados como marcadores de disfunção endotelial e inflamação vascular, como as Moléculas de Adesão Leucocitária (CAMs) estudadas por

ANDERSON e colaboradores (2002). As três principais classes de CAMs incluem as selectinas (P-selectina, L-selectina, E-selectina), β integrinas (CD11/CD18) e imunoglobulinas (molécula de adesão intercelular-1 [ICAM-1], molécula de adesão celular vascular-1 [VCAM-1] e molécula de adesão celular endotelial plaqueatária-1 [PECAM-1]).

CELLA e colaboradores (1999), observaram que pacientes com hipertensão pulmonar apresentaram níveis séricos mais elevados de P-selectina e E-selectina que pacientes controles como reflexo de disfunção endotelial. Existem poucos estudos que avaliaram a disfunção endotelial capilar através das medidas das moléculas de adesão na fibrose pulmonar idiopática e sua relevância sobre o prognóstico da doença. Um aumento dos níveis séricos de E-selectina, P-selectina, VCAM-1, ICAM-1 foi observado em pacientes com FPI quando comparados a controles por ASHITANI e colaboradores (1997). HAYASHI e colaboradores (2004), também evidenciaram um aumento dos níveis séricos de E-selectina em pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática. NAKAO e colaboradores (1995) avaliaram através de imunohistoquímica a expressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 em tecido pulmonar de nove pacientes com FPI e cinco controles, encontraram um aumento da expressão de E-selectina nas células endoteliais restritas às áreas de faveolamento, sem alteração na expressão de VCAM-1.

1.10 HIPÓTESE DO ESTUDO

Toda a fundamentação científica relacionada à FPI e circulação pulmonar encontra-se fragmentada na literatura com poucos estudos analisando o impacto das alterações vasculares na evolução desta doença (COLLETA et al., 2003)

O remodelamento vascular pode ocorrer secundariamente às alterações parenquimatosas ou eventualmente representar um processo primário com influência na patogenia da doença.

Postulamos que o remodelamento vascular presente na FPI/PIU ocorra de maneira heterogênea, dependendo do grau de remodelamento parenquimatoso pulmonar, podendo influenciar no prognóstico da doença.

2 OBJETIVOS

1. Quantificar as alterações histopatológicas vasculares na macro e microcirculação pulmonar e a disfunção endotelial capilar na Fibrose Pulmonar Idiopática.
2. Determinar o valor prognóstico das alterações histopatológicas vasculares e da disfunção do endotélio capilar pulmonar em pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo de coorte retrospectivo com análise de 36 casos de FPI/UIP. Foram revisados, de acordo com a nova classificação ATS/ERS, 93 casos com diagnóstico de pneumonia intersticial usual à biópsia pulmonar cirúrgica, realizadas no período de 1983 a 2004, acompanhados no Ambulatório de Doenças Intersticiais Pulmonares do Hospital das Clínicas/INCOR da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os pacientes que apresentavam características clínicas, radiológicas e funcionais de fibrose pulmonar idiopática, associado ao padrão histopatológico de pneumonia intersticial usual.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos todos os casos com padrões histopatológicos de outras doenças pulmonares intersticiais tais como: pneumonia intersticial não específica (07 casos), fibrose centrolobular (15 casos), pulmão terminal (01 caso), pneumonia de hipersensibilidade (02 casos), pneumonia intersticial aguda (03 casos), pneumonia intersticial linfóide (01 caso), bronquiolite (03 casos), pneumonia organizante (01 caso) e pneumoconiose (02 casos). Também foram excluídos oito casos associados a doenças do colágeno e 04 casos cujo padrão radiológico à tomografia computadorizada de tórax não era compatível com FPI. Em quatro casos não foram encontradas informações precisas no registro médico e outros três foram excluídos por não haver material suficiente para revisão histopatológica. Três casos de FPI que evoluíram para óbito decorrente do procedimento da biópsia também foram excluídos (Figura 1).

Figura 1 - Histograma da distribuição de frequência das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PII) em 93 biópsias pulmonares a céu aberto com diagnóstico de UIP realizadas de 1983 a 2004 e reclassificadas conforme critérios da ATS/ERS

3.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As informações clínicas foram obtidas através da revisão dos prontuários médicos do Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Foram obtidos os seguintes dados:

- a. Sexo.
- b. Idade: avaliada em anos completos.
- c. Tempo de sintomas: avaliado em meses a partir do início dos sintomas até a data da primeira consulta.
- d. A escala de dispnéia: graduada de I a IV (grandes, médios, pequenos esforços e em repouso).
- e. Tabagismo: foram considerados tabagistas os pacientes fumantes na época do diagnóstico e os ex-fumantes.
- f. Tomografia Computadorizada de Tórax: foi avaliada a existência de padrão compatível com IPF, tais como, espessamento septal e faveolamento de predomínio periférico e basal, nas imagens disponíveis de 16 pacientes e observadas a presença de relatos do padrão tomográfico característico nos relatórios médicos dos demais pacientes.
- g. Tratamento utilizado: foram recuperadas as informações sobre os tratamentos com: prednisona, pulsoterapia com metilprednisolona, imunossupressores (azatioprina, ciclofosfamida) e agentes anti-fibróticos (colchicina e D-penicilamida).
- h. Sobrevida: avaliada em meses a partir da data da biópsia até a data de óbito ou para os pacientes que permaneceram vivos, até a data da última consulta ambulatorial ou à data de conclusão deste estudo em novembro de 2006. A ocorrência do óbito foi obtida através do Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas,

contatos telefônicos com familiares e de consulta ao Programa de Aprimoramento das Informações de Mortalidade do Município de São Paulo (PRO-AIM) e à Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE), órgãos oficiais da Prefeitura e Estado de São Paulo, respectivamente.

3.5 PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR

Foi realizada, no período de 3 meses antes ou depois da biópsia pulmonar, em um espirômetro computadorizado (Collins Plus Pulmonary Function Testing System; Warren E. Collins, Inc., Braintree, Mass.). Na avaliação funcional foi realizado: espirometria, medida dos volumes (diluição do Hélio/pletismografia), medida da difusão do monóxido de carbono (DCO) (respiração única) e gasometria arterial. Foram utilizados para análise: Capacidade Vital Forçada (CVF), Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF1), relação VEF1/CVF, Capacidade Pulmonar Total (CPT) e DCO expressos em valor percentual do previsto para a população brasileira (PEREIRA et al., 1992), além da PaO₂.

3.6 BIÓPSIA PULMONAR

As biópsias pulmonares foram realizadas pelo Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas/INCOR da Universidade de São Paulo. Dezoito biópsias foram realizadas em lobos médio e/ou inferior direito e 7 nos demais lobos. Em 11 pacientes não foi possível determinar o local da biópsia.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os fragmentos de pulmão foram levemente insuflados com formalina a 10% e a seguir submetidos às técnicas histológicas de rotina do Departamento de Patologia da FMUSP. As lâminas, contendo cortes histológicos das biópsias pulmonares, coradas pela hematoxilina e eosina (H & E) foram revistas por dois patologistas com experiência na área de patologia pulmonar, sem conhecimento prévio dos dados clínicos ou funcionais.

Inicialmente, os patologistas analisaram qualitativamente as biópsias para constatar os parâmetros morfológicos componentes do padrão de pneumonia intersticial usual (UIP), a saber:

- Heterogeneidade temporal das lesões
- Distribuição acinar periférica
- Alternância de áreas normais, colapso alveolar e faveolamento
- Fibrose mural organizante
- Focos fibroblásticos
- Lesões vasculares

Após análise qualitativa das lâminas, a distribuição dos parâmetros morfológicos característicos da UIP foi avaliada de maneira independente por cada patologista com definição de um escore semiquantitativo para lesões vasculares e atividade fibrogênica ou remodelamento parenquimatoso. Quando ocorreu divergência entre os observadores, foi realizado uma revisão conjunta da lâmina e obtido um consenso.

3.7.1 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE FIBROGÊNICA

Existem vários escores propostos com o objetivo de avaliar as várias alterações histológicas presentes na UIP. Devido à heterogeneidade das lesões encontradas e à difícil reprodutibilidade dos escores já publicados, optamos por avaliar o grau de atividade fibrogênica ou de remodelamento parenquimatoso. O grau de atividade fibrogênica foi classificado em leve, moderado e acentuado baseado num estudo semiquantitativo que incluiu a análise da extensão das áreas normais, colapso e de fibrose mural

organizante e levou em conta a intensidade da presença de focos fibroblásticos. Com a avaliação de todo o espécime da biópsia disponível, essas lesões foram estimadas em: 0- ausente; leve – presentes em menos de 25% amostra ; moderado – presentes em 25-50% da amostra; intenso – presente em mais de 50% da amostra. A classificação final, incluiu:

- **Atividade fibrogênica leve:** ácinos alveolares periféricos substituídos por extensas áreas de colapso alveolar (> 50% da área analisada), porém ainda evidenciando proeminentes áreas de pulmão normal ao lado de escassa fibrose mural organizante e de focos fibroblásticos ocasionais (<25% da área analisada)
- **Atividade fibrogênica moderada:** ácinos alveolares periféricos substituídos em cerca de 2/3 da amostra analisada por áreas de colapso alveolar com igual proporção de áreas normais, mas moderado grau de fibrose mural organizante e de focos fibroblásticos (25-50% da área analisada)
- **Atividade fibrogênica acentuada:** ácinos alveolares periféricos substituídos em mais de 50% da amostra analisada por fibrose mural organizante e áreas de faveolamento e igual proporção de focos fibroblásticos, sendo menos freqüentes (25%) as áreas normais e de colapso alveolar.

3.7.2 AVALIAÇÃO DA MACROCIRCULAÇÃO PULMONAR (ARTÉRIAS PRÉ ACINARES)

3.7.2.1 Quantificação do grau de lesão vascular

Mediante análise semiquantitativa, o remodelamento vascular das artérias dos bronquíolos terminais foi avaliado através de um escore que considerou quatro graus de lesão vascular, conforme segue:

Grau I – Hipertrofia isolada da camada média

Grau II – Lesão intimal proliferativa

Grau III – Oclusão total do lúmen arterial por tecido fibroso

Grau IV – Lesão plexiforme

3.7.2.2. Quantificação do grau de oclusão e espessura da parede vascular

Foram escolhidas 4 a 8 artérias de grande e médio calibre por biópsia analisada, onde foram mensurados: área e perímetro interno do lúmen e a espessura da parede. O sistema utilizado para estas mensurações consistiu de uma câmera JVC TK C1380 acoplada a um microscópio Leica, com visualização das imagens num monitor Sony Trinitron (WIEBE et al., 1998). As imagens foram adquiridas digitalmente (Oculus TCX, Coreco inc; St Laurent, Quebec, Canadá) em um computador Pentium 3 300Mhz, usando o

software Image Pro-Plus. Para análise quantitativa da oclusão vascular foi utilizado um aumento de 200X.

A área interna (A_{INTERNA}), o perímetro interno luminal e a área total (A_{TOTAL}) dos vasos foram determinados por mensuração digital utilizando um aumento de 200X (WIEBE et al., 1998). A espessura da parede arterial (ESPESSURA), que compreende a distância entre a borda externa da camada média arterial e a borda intraluminal (Figura 2), foi medida através da subtração do raio interno (r) do raio total (R), obtidos através das seguintes fórmulas:

$$R = \sqrt{A_{\text{TOTAL}}/\pi}$$

$$r = \sqrt{A_{\text{INTERNA}}/\pi}$$

$$\text{ESPESSURA} = (R - r)$$

Figura 2 - Avaliação do corte transversal e medidas utilizadas para o cálculo da espessura arterial

3.7.2.3 Quantificação das fibras colágenas e elásticas vasculares

A quantificação das fibras de colágeno e elásticas vasculares das artérias pré-acinares, evidenciadas respectivamente pela coloração de Picrossírius sem hematoxilina e pela coloração de Weigert Resorcina-Fucsina modificada, foi realizada através de um analisador de imagens acoplado a um microscópio óptico. O sistema utilizado consistiu de uma câmera JVC TK C1380 acoplada a um microscópio Leica, a partir do qual as imagens foram visualizadas no monitor e capturadas. No caso das fibras colágenas, coradas com Picrossírius, foi utilizado um polarizador de luz na captura das imagens, para evidenciar tais fibras.

Através de um sistema digital, as imagens foram processadas pelo *software* Image Pro-Plus. O cálculo da área das fibras, em micrômetros quadrados, foi dado através do reconhecimento das frequências de luz correspondentes às fibras birrefringentes, no caso do picrossírius; e das frequências correspondentes à cor negra, para a resorcina. O mesmo padrão de frequências foi utilizado para todas as lâminas evitando qualquer tipo de viés. Além das áreas de parede vascular correspondentes às fibras colágenas e elásticas, também foi calculada, utilizando o mesmo *software*, a área total da parede vascular, excluindo o espaço luminal, selecionada com o *mouse*.

A relação entre área de fibras colágenas e elásticas e área total da parede vascular foi denominada de fração de área vascular das fibras.

3.7.3 AVALIAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO PULMONAR

3.7.3.1 Quantificação da densidade capilar pulmonar

O remodelamento capilar pulmonar foi avaliado através da quantificação da densidade capilar obtida através da imunoexpressão do antígeno CD34 pelo endotélio vascular capilar.

3.7.3.2 Disfunção endotelial

Analizada através da imunoexpressão dos antígenos das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina encontradas nos capilares.

3.7.3.3 Técnica de análise da imunoexpressão dos antígenos para CD34, VCAM1, ICAM1 e E-selectina

A análise da imunoexpressão dos antígenos, através de reação imunohistoquímica, foi realizada utilizando anticorpos específicos para cada molécula estudada, segundo rotina do Departamento de Patologia da FMUSP. A coloração castanha no citoplasma celular foi considerada evidência da expressão dos antígenos CD-34, VCAM-1, ICAM-1, ao passo que a coloração vermelha no citoplasma foi considerada evidência da expressão de E-selectina.

Para determinar os índices de expressão dos antígenos, foi usada a técnica do *point-counting*, utilizando retículo contendo 100 pontos e cinquenta retas (Gundersen et al., 1989). Foram analisados dez campos nas áreas normais, dez nas áreas de colapso alveolar e dez campos nas áreas de fibrose mural organizante, totalizando 30 campos correspondentes a 3.000 pontos por lâmina, ou seja, cobrindo uma área de 187.500µm. Áreas do eixo broncovascular foram cuidadosamente evitadas durante as medições.

A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência para cada antígeno estudado foi expressa conforme a fórmula:

$$P = (P_i \times 100)/P_t$$

Onde P_i é o número de pontos que incide sobre a positividade dos marcadores imuno-histoquímicos e P_t é o número total de pontos analisados. A porcentagem (P) de cada antígeno foi calculada a partir da soma dos resultados de todos os campos analisados para cada paciente. Além do cálculo de P global, levando-se em conta os 30 campos analisados por caso, calculou-se também o valor de P para as áreas histológicas normais, de colapso alveolar e de fibrose mural organizante.

3.7.4 CONTROLES

Foram utilizados 5 (cinco) casos controles pulmões obtidos de vítimas de acidentes de morte violenta, com idade entre 45 e 60 anos, não fumantes e sem doença pulmonar prévia conhecida. Os pulmões controles foram utilizados na avaliação do grau de oclusão e espessura vasculares, quantificação do sistema colágeno/elástica e nas avaliações imunohistoquímicas.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas comparações de médias foram utilizados os testes t-student e o ANOVA (teste de Tukey para aqueles pós-ANOVA) respectivamente para dois níveis e para mais de dois níveis dentro dos fatores.

Para avaliar a relação entre variáveis quantitativas foram calculados os coeficientes de correlação linear de Spearman.

Finalmente, nas análises de sobrevivência, utilizamos o modelo Kaplan Meyer juntamente com o teste log-rank para comparações múltiplas.

Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS versão 13.0.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Avaliamos 36 pacientes com diagnóstico de FPI confirmados pelo padrão histopatológico de PIU à biópsia pulmonar cirúrgica no período de 1983 a 2004. Vinte e um pacientes eram do sexo masculino (58%) e 15 do sexo feminino (42%) com idade média de 63 ± 8 anos (variando de 45 a 77 anos).

Quinze dos 26 (58%) pacientes em que se pôde definir o grau de dispnéia, apresentaram-se à primeira consulta com dispnéia aos esforços moderados e 9 (5%) com dispnéia aos pequenos esforços. A mediana de tempo do início dos sintomas à primeira consulta entre 27 pacientes foi de 12 meses variando entre 3 e 48 meses.

Entre 34 pacientes com informações sobre tabagismo, 11 eram fumantes (31%), 10 eram ex-fumantes (28%) e 13 não tinham história tabágica (36%).

Os esquemas terapêuticos mais utilizados foram prednisona (61% dos pacientes) e pulsoterapia com metilprednisolona (53% dos pacientes).

As informações gerais sobre idade, sexo, grau de dispnéia, história de tabagismo, tempo de sintomas em meses são mostrados na tabela 3.

Tabela 3 - Características gerais dos pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática (n: 36)

Características gerais (n)	Valores
Idade em anos (36)	63±8 (45 e 77)
Sexo: feminino / masculino (36)	15 / 21
Grau de dispnéia (26)	2,3±0,6 (1 e 3)
Fumantes ou ex-fumantes / Não fumantes (34)	21/13
Tempo de sintomas em meses (27)	12 (3 e 48)

Idade e grau de dispnéia: média ± desvio padrão (mínima e máxima)

Tempo de sintomas: mediana (mínima e máxima)

n: Número de pacientes

5.2 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Observou-se predomínio de distúrbio ventilatório restritivo (diminuição da CVF e CPT), aumento dos fluxos expiratórios (aumento do VEF1), diminuição da difusão de monóxido de carbono e aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio. Os resultados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Função pulmonar e troca gasosa em pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática (n: 36)

Parâmetro	Média (n)	Mínima e Máxima	Desvio padrão
CV F (%)	70 (34)	37 e 96	15
VEF1 (%)	82 (34)	44 e 115	18
VEF1/CVF (%)	95 (34)	70 e 148	16
CPT (%)	70 (30)	31 e 98	16
DCO (%)	50 (24)	23 e 94	18
G(A-a)O ₂	36 (22)	11 e 64	13

(%) = % do predito
n: número de pacientes

5.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação da lesão do parênquima pulmonar na Fibrose Pulmonar Idiopática foi realizada através da análise semi quantitativa do grau de atividade fibrogênica da doença, descrito anteriormente.

O remodelamento vascular foi dividido em dois grupos, o remodelamento da macrocirculação (artérias pré acinares) e na microcirculação pulmonar. A disfunção endotelial foi avaliada através da expressão das moléculas de adesão VCAM1, ICAM1 e E-selectina no endotélio capilar.

5.3.1 ATIVIDADE FIBROGÊNICA

Sete pacientes apresentaram grau de atividade fibrogênica leve (19%), quatorze atividade fibrogênica moderada (39%), e quinze acentuada (42%). A figura 3 demonstra os três graus de atividade fibrogênica. Todos os pacientes apresentaram focos fibroblásticos à biópsia (figura 4).

Figura 3 - Pneumonia Intersticial Usual. Classificação da atividade fibrogênica. **(A)** Visão panorâmica da expressão histológica da atividade fibrogênica leve evidenciada pela predominância de áreas normais (N) e de colapso alveolar. **(B)** Detalhe das áreas normais e de colapso alveolar. **(C e D)** Atividade fibrogênica moderada evidenciada pela predominância de colapso alveolar e moderada extensão de fibrose mural organizante. **(E e F)** Atividade fibrogênica acentuada evidenciada pela predominância de maior quantidade de focos fibroblásticos e maior extensão de fibrose mural organizante e faveolamento H-E: A,C e E x40 ; B,D e F x100

Figura 4 - Pneumonia Intersticial Usual. **A-** Presença de numerosos focos fibroblásticos. **B-** Observa-se detalhe do foco fibroblástico composto por tecido de granulação.
H-E: x40 (A); x400 (B)

5.3.2 MACROCIRCULAÇÃO PULMONAR

5.3.2.1 Grau de lesão Vascular

Todos os pacientes apresentaram algum grau de lesão das artérias pré acinares. Nove tinham hipertrofia da camada média (25%), doze apresentavam proliferação da íntima (33%), doze oclusão total do lúmen arterial por tecido fibro celular (33%), e 3 tinham lesão plexiforme em seus vasos (9%). A intensidade do remodelamento vascular avaliado através do grau de lesão das artérias pré acinares é ilustrado na figura 5.

Figura 5 - Remodelamento Vascular – artérias pré acinares. **A** - Grau I de lesão vascular: Hipertrofia da camada média. **B** - Grau II: proliferação da íntima. **C** – Grau III: Oclusão total do lúmen arterial por tecido fibro celular. **D** – Grau IV: Lesão plexiforme. H-E: x 200

5.3.2.2 Grau de oclusão e espessura da parede vascular

Os pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentaram maior grau de oclusão das artérias pré acinares, expressa através da presença de uma menor área e perímetro internos, que os pacientes controles ($p < 0,05$).

A espessura da parede vascular foi maior nestes pacientes que nos controles ($p<0,05$). Tabela 5.

Tabela 5 - Médias e valores de dispersão da área interna, perímetro interno e da espessura da parede das artérias pré acinares na fibrose pulmonar idiopática (n 36)

Variável	Estudo das artérias pré acinares (grau de oclusão e espessura)				
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Área interna *	36	1141,5	1048,7	113,3	4563,3
Área interna cont	03	6198,4	1791,4	4558,5	9085,7
Perímetro interno *	36	119,9	51,0	35,7	245,8
Perímetro interno cont	03	284,3	35,5	248,0	334,8
Espessura *	36	52,2	55,6	25,2	94,8
Espessura cont	03	16,7	17,5	14,0	19,3

n=número; DP=Desvio Padrão; cont=controles

área interna = μm^2

perímetro interno e espessura = μm

* $p<0,05$ (FPI x controle)

5.3.2.3 Fração de área vascular de fibras colágenas e elásticas

A figura 6 ilustra a identificação das fibras colágenas e elásticas na parede de artérias pré acinares com diferentes graus de lesão vascular.

Observou-se maior fração de fibras de colágeno e elástica na parede dos vasos das artérias pré acinares dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática que nos controles ($p<0,05$). Tabela 06.

Figura 6 - Artérias pré acinares com diferentes graus de lesão vascular coradas com Picrocínio (**A**), para identificação de fibras de colágeno, e com resorcina-fuccina de Weigert (**B**) para identificação de fibras elásticas vasculares. HE: x 200

Tabela 6 - Médias e valores de dispersão da fração de fibras de colágeno e elástica na parede de artérias pré acinares (n 31)

Variável	Estudo das artérias pré acinares (Fração de fibras colágeno e elástica vascular)				
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Colágeno vascular *	31	0,3	0,08	0,2	0,4
Colágeno vascular cont	03	0,01	0,0	0,01	0,01
Elástica vascular *	31	0,3	0,1	0,02	0,4
Elástica vascular cont	03	0,05	0,02	0,03	0,07

n=número DP=Desvio Padrão cont=controles

* $p < 0,05$ (FPI x controle)

5.3.3 MICROCIRCULAÇÃO PULMONAR

5.3.3.1 Densidade capilar pulmonar

A positividade das células endoteliais capilares para CD34 foi utilizada para determinar a densidade microvascular nas biópsias pulmonares de 31 pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática (figura 7)

Considerando a área total de análise, os pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentaram densidade vascular pulmonar semelhante aos controles ($p=0,9$). Entretanto, ao analisarmos separadamente as áreas normal (parênquima preservado), áreas de colapso alveolar e de fibrose mural organizante, observamos maior densidade vascular nas duas primeiras que nesta última ($p<0,05$). Tabela 07.

Figura 7 - Pneumonia intersticial usual (PIU): áreas normais (1), área de colapso alveolar (2), área de fibrose mural organizante (3), coradas com Hematoxilina-Eosina (A) e com imunomarcção por CD34 (B)

Tabela 7 - Médias e valores de dispersão da percentagem corrigida de pontos positivos para CD34 em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante de pacientes com Fibrose Pulmonar idiopática e de controles (n 31)

CD34	Estudo da densidade microvascular (Porcentagem corrigida de pontos positivos)				
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Área normal *	31	54,6	29,8	9,0	100
Área de colapso ⁺	31	24,7	16,7	1,0	55
Área de fibrose mural	31	9,6	9,2	1,0	47
Área total	31	29,6	16,5	6,7	58
Controles	05	14,9	1,6	13	17

n=número DP=Desvio Padrão

* $p < 0,05$ (x colapso, fibrose mural, total, controles)

⁺ $p < 0,05$ (x fibrose mural)

5.3.4 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL CAPILAR

A positividade das células endoteliais capilares para VCAM1 e E-selectina foi utilizada para determinar a disfunção endotelial capilar nas biópsias pulmonares de 31 pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática (figuras 8 e 9).

Pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentaram um aumento significativo da expressão de VCAM1, ICAM1 e E-selectina comparado aos controles ($p < 0,05$). A expressão dessas moléculas de adesão foi maior nas áreas de fibrose mural organizante que nas áreas normais e de colapso alveolar ($p < 0,05$). Tabela 8.

Figura 08 - Pneumonia intersticial usual (PIU): áreas normais (1), de colapso alveolar (2) e de fibrose mural organizante (3), coradas com Hematoxilina-Eosina (A) e com imunomarcção por VCAM1 (B)

Figura 9 - Pneumonia intersticial usual (PIU): áreas normais (1), de colapso alveolar (2) e de fibrose mural organizante (3) coradas com Hematoxilina-Eosina (A) e com imunomarcação por E-selectina (B)

Tabela 8 - Médias e valores de dispersão da percentagem corrigida de pontos positivos para VCAM1, ICAM e E-Selectina em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante de pacientes com Fibrose Pulmonar idiopática e de controles (n 31)

Variáveis	Estudo da disfunção endotelial (Porcentagem corrigida de pontos positivos)				
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
VCAM1					
Área normal ⁺	31	4,8	4,9	0,0	20
Área de colapso ^{* +}	31	6,8	3,3	3,0	12
Área de fibrose mural [*]	31	14,7	6,5	6,0	25
Área total ^{* +}	31	8,8	3,7	3,7	14
Controles	05	0,4	0,1	0,2	0,5
ICAM1					
Área normal ^{+ °}	31	9,6	9,0	0,0	36
Área de colapso ^{* +}	31	33,7	21,0	3,0	65
Área de fibrose mural [*]	31	82,0	21,2	14,0	100
Área total ^{* +}	31	42,0	14,2	5,7	67
Controles	05	2,6	1,5	0,0	0,1
E-Selectina					
Área normal ^{+ °}	31	2,9	2,7	0,0	11
Área de colapso ^{* +}	31	6,8	5,4	0,0	23
Área de fibrose mural [*]	31	13,5	8,0	1,0	37
Área total ^{* +}	31	7,7	4,5	0,3	18
Controles	05	0,0	0,0	0,0	0,0

n=número DP= Desvio Padrão

^{*} $p < 0,05$ (x controles)

⁺ $p < 0,05$ (x fibrose mural)

[°] $p < 0,05$ (x colapso)

5.4. ASSOCIAÇÕES ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, FUNCIONAIS E HISTOPATOLÓGICOS

5.4.1 ASSOCIAÇÕES ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS E FUNCIONAIS

A média de idade foi semelhante entre as populações feminina (64 ± 8 anos) e masculina (62 ± 8 anos). A história de tabagismo foi mais freqüente entre homens que em mulheres ($p < 0,05$). O tempo de sintomas, grau de dispnéia e medidas de CVF, VEF1, VEF1/CVF não diferiram entre fumantes e não fumantes (tabela 9).

Tabela 9 - Associação entre características clínicas- funcionais e tabagismo

Características clínicas e funcionais	Tabagismo		
	Sim	Não	<i>p</i>
Sexo (feminino e masculino)	4 e 17	9 e 4	0,003
Tempo de sintomas (meses)	22 ± 15	20 ± 13	0,2
Grau de dispnéia	$2,4 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,6$	1,0
CVF (% do predito)	68 ± 16	70 ± 16	0,9
VEF1 (% do predito)	82 ± 20	80 ± 16	0,2
VEF1/CVF (% do predito)	98 ± 18	91 ± 11	0,2

Sintomas, grau de dispnéia, CVF, VEF1 e VEF1/CVF: média $\pm$ desvio padrão

5.4.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE PARÂMETROS FUNCIONAIS E HISTOPATOLÓGICOS

Os valores isolados de CVF, VEF1, VEF1/CVF, CPT e DCO não apresentaram correlação com os escores de grau de lesão vascular e grau de atividade fibrogênica.

Na figura 10 observamos uma tendência a menor alteração do $G_{(A-a)}O_2$ quando há uma maior densidade microvascular (CD34) nas áreas de parênquima pulmonar preservado ($r = -0,389$ e $p=0,09$)

Figura 10 - Correlação de Spearman e Regressão entre $G_{(A-a)}O_2$ e densidade microvascular nas áreas de parênquima pulmonar normal.
 $r = -0,389$ e $p = 0,09$
 $n = 22$

5.4.3 ASSOCIAÇÕES ENTRE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

5.4.3.1 Remodelamento das artérias pré acinares e grau de atividade fibrogênica

O grau de lesão vascular pulmonar apresentou associação positiva com o grau de atividade fibrogênica ($r=0,441$ e $p=0,007$). Assim, as alterações das artérias pré acinares dos pacientes portadores de FPI/PIU ocorreram paralelamente às lesões do parênquima pulmonar (Figura 11). A média do grau de lesão vascular foi diferente entre os graus de atividade fibrogênica (ANOVA $p=0,021$), e significativa, quando comparamos atividade fibrogênica leve e acentuada (Tukey $p=0,037$).

Figura 11 - Associação entre grau de lesão vascular e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU $p=0,007$

O remodelamento vascular também foi demonstrado ao observarmos o aumento da espessura e da maior quantificação das fibras de colágeno e elástica na parede dos vasos, quanto mais acentuado foi o grau de atividade fibrogênica (Figuras 12, 13, 14 / tabela 10). Não houve diferença significativa entre as medidas da área e perímetro internos dos vasos com a atividade fibrogênica.

Figura 12 - Relação entre espessamento vascular e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU. $p = 0,048$

Figura 13 - Relação entre a fração de área vascular de colágeno e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU
 $p < 0,001$

Figura 14 - Relação entre a fração de área vascular das fibras elásticas e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU.
 $p = 0,002$

Tabela 10 - Médias e valores de dispersão da espessura, colágeno vascular e elástica vascular das artérias pré-acinares nos três graus de atividade fibrogênica da pneumonia intersticial usual (PIU). Utilizou-se análise de variância ANOVA one-way pelo teste auxiliar de Tukey para a correlação das diferentes variáveis estudadas

Variáveis	Parâmetros vasculares				
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
Espessura (μm)^a					
A. fibr. leve	07	41,3	13,7	25,2	63,6
A. fibr. moderada	14	50,9	15,2	29,7	81,8
A. fibr. Acentuada	15	58,4	14,4	32,4	94,8
Controles	05	16,6	2,4	13,6	19,7
Colágeno Vascular^{*b}					
A. fibr. leve	07	0,2	0,1	0,02	0,3
A. fibr. moderada	12	0,3	0,04	0,2	0,3
A. fibr. Acentuada	12	0,3	0,03	0,3	0,4
Controles	03	0,01	0,0	0,01	0,01
Elástica Vascular^{*c}					
A. fibr. leve	7	0,2	0,1	0,02	0,4
A. fibr. moderada	12	0,3	0,05	0,3	0,4
A. fibr. Acentuada	12	0,3	1,0	0,04	0,4
Controles	03	0,05	0,02	0,007	0,1

n=número; DP = Desvio Padrão; A. fibr. leve = atividade fibrogênica leve; A. fibr. moderada = atividade fibrogênica moderada; A. fibr. acentuada = atividade fibrogênica acentuada

* Expresso em fração de área vascular

^aA.fibr. leve X A.fibr. moderada $p=0,33$; A.fibr. leve X A.fibr. acentuada $p=0,04$; A.fibr. Leve X controle $p=0,01$; A.fibr. moderada X A.fibr. acentuada $p=0,36$; A.fibr. moderada X controle $p<0,0001$; A.fibr. acentuada X controle $p<0,0001$

^bA.fibr. leve X A.fibr. moderada $p=0,004$; A.fibr. leve X A.fibr. acentuada $p=0,001$; A.fibr. leve X controle $p<0,0001$; A.fibr. moderada X A.fibr. acentuada $p<0,008$; A.fibr. moderada X controle $p<0,0001$; A.fibr. acentuada X controle $p<0,01$

^cA.fibr. leve X A.fibr. moderada $p=0,004$; A.fibr. leve X A.fibr. acentuada $p=0,004$; A.fibr. leve X controle $p=0,17$; A.fibr. moderada X A.fibr. acentuada $p=1$; A.fibr. moderada X controle $p<0,0001$; A.fibr. acentuada X controle $p<0,0001$

5.4.3.2 Densidade capilar pulmonar e remodelamento das artérias pré acinares

Observou-se correlação inversa entre densidade microvascular (expressão CD34) em áreas normais de parênquima pulmonar de pacientes portadores de FPI/PIU com as medidas da espessura do vaso ($r=-0,579$ e $p=0,001$) e da quantificação das fibras de colágeno ($r=-0,493$ e $p=0,005$) e fibras elásticas ($r=-0,546$ e $p=0,001$) vasculares. Paralelamente foi evidenciado correlação positiva entre densidade microvascular em áreas normais e as medidas de área interna ($r=0,568$ e $p=0,001$) e perímetro interno ($r=0,657$ e $p=0,000$) dos vasos.

5.4.3.3 Densidade capilar pulmonar e grau de atividade fibrogênica

A densidade capilar pulmonar esteve aumentada nos pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática, ocorrendo de maneira significativa aqueles pacientes com grau de atividade fibrogênica leve e moderada.

Houve uma tendência de aumento da densidade microvascular nas áreas de pulmão normal de pacientes com grau de atividade fibrogênica leve e moderada ($p = 0,069$ ANOVA) quando comparados àqueles pacientes com grau de atividade fibrogênica acentuada (Figura 15). Na figura 16 observamos uma maior densidade microvascular nas áreas de colapso alveolar quando o grau de atividade fibrogênica foi menor, porém, não significativa ($p = 0,25$). Não houve diferença na densidade microvascular nas

áreas de fibrose mural organizante conforme o grau de atividade fibrogênica (tabela 11).

Figura 15 - Densidade microvascular em áreas de pulmão normais e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU
 $p=0,069$

Figura 16 - Densidade microvascular em áreas de colapso alveolar e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU
 $p=0,25$

Tabela 11 - Médias e valores de dispersão da porcentagem corrigida de pontos positivos para CD34 em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e remodelamento parenquimatoso nos diferentes graus de atividade fibrogênica da pneumonia intersticial usual (PIU). Utilizou-se análise de variância ANOVA one-way pelo teste auxiliar de Tukey para a correlação das diferentes variáveis estudadas (n 31)

Variáveis	Estudo da densidade microvascular (Porcentagem corrigida de pontos positivos)				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
CD34(normal)					
A. fibr. leve	7	62,7	30,7	9	100
A. fibr. moderada	12	65,1	26,8	18	100
A. fibr. acentuada	12	39,2	27,7	13	85
Controles	05	14,9	1,6	13	17
CD34 (colapso)					
A. fibr. leve	7	28,8	20	1	53
A. fibr. moderada	12	28,6	15,2	11	55
A. fibr. acentuada	12	18	15,5	1	52
Controles	05	14,9	1,6	13	17
CD34(fibrose mural)					
A. fibr. leve	7	10,2	8,2	1	22
A. fibr. moderada	12	9,8	5,6	1	21
A. fibr. acentuada	12	8,9	12,8	1	47
Controles	05	14,9	1,6	13	17
CD34(total)					
A. fibr. leve	7	33,9	18	6,7	57,3
A. fibr. moderada	12	34,5	13,8	13	57
A. fibr. acentuada	12	22,2	16,6	7,3	56
Controles	05	14,9	1,6	13	17

N=número DP = Desvio Padrão; A. fibr. leve = atividade fibrogênica leve; A. fibr. moderada = atividade fibrogênica moderada; A. fibr. acentuada = atividade fibrogênica acentuada.

CD34 área normal $p < 0,05$

A. fibr. Leve X A. fibr. moderada $p=0,9$; A. fibr. leve X A. fibr. acentuada $p=0,2$; A. fibr. Leve X controle $p=0,01$; A. fibr. moderada X A. fibr. acentuada $p=0,078$; A. fibr. moderada X controle $p=0,003$; A. fibr acentuada X controle $p=0,19$

CD34 área de colapso $p=0,25$

CD34 área de fibrose mural $p=0,9$

CD34 total $p < 0,05$

A. fibr. Leve X A. fibr. moderada $p=0,3$; A. fibr. leve X A. fibr. acentuada $p=0,2$; A. fibr. Leve X controle $p=0,085$; A. fibr. moderada X A. fibr. acentuada $p=0,7$; A. fibr. moderada X controle $p=0,045$; A. fibr acentuada X controle $p=0,64$

5.4.3.4 Disfunção endotelial capilar e grau de atividade fibrogênica

A disfunção endotelial capilar pulmonar (positividade para VCAM1, ICAM, E-selectina) foi significativa em pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática comparado aos controles normais, e mais acentuada quanto maior o grau de atividade fibrogênica. A figura 17 ilustra uma maior disfunção microvascular VCAM1+ nas áreas de pulmão normal dos pacientes com grau de atividade fibrogênica acentuada comparado aos pacientes com grau leve e moderado de atividade fibrogênica e controles ($p<0,012$). Também se observou uma tendência a aumento da disfunção endotelial capilar VCAM1+ em áreas de colapso e fibrose mural organizante quanto maior o grau de atividade fibrogênica (figuras 18 e 19. Tabela 12).

A disfunção endotelial capilar ICAM1+ e E-Selectina+ foi observada nos pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática comparados aos controles normais ($p=0,05$), entretanto, não houve diferença significativa quando a expressão destas moléculas de adesão nos pacientes com grau de atividade fibrogênica leve, moderado e acentuado foram comparados entre si.

Figura 17 - Disfunção endotelial em áreas normais e grau de atividade fibrogênica em pacientes com FPI/PIU
 $p=0,012$

Figura 18 - Disfunção endotelial em áreas de colapso alveolar e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU
 $p=0,54$

Figura 19 - Disfunção endotelial em áreas fibrose mural organizante e grau de atividade fibrogênica na FPI/PIU
 $p=0,94$

Tabela 12 - Médias e valores de dispersão da porcentagem corrigida de pontos positivos para VCAM1 em áreas de pulmão normal, colapso alveolar e fibrose mural organizante nos diferentes graus de atividade fibrogênica da pneumonia intersticial usual (PIU). Utilizou-se análise de variância ANOVA one-way pelo teste auxiliar de Tukey para a correlação das diferentes variáveis estudadas (n=31)

Variáveis	Estudo da disfunção endotelial (Porcentagem corrigida de pontos positivos)				
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo
VCAM1(normal)					
A. fibr. leve	07	2,6	2,6	0	7,0
A. fibr. moderada	12	3,0	2,2	1,0	7,0
A. fibr. acentuada	12	8,0	6,3	1,0	20,0
Controles	05	0,4	0,1	0,2	0,5
VCAM1 (colapso)					
A. fibr. leve	07	5,7	2,8	3,0	9,0
A. fibr. moderada	12	6,7	3,4	3,0	12,0
A. fibr. acentuada	12	7,5	3,6	3,0	12,0
Controles	05	0,4	0,1	0,2	0,5
VCAM1(fibrose mural)					
A. fibr. leve	07	14,0	6,7	7,0	22,0
A. fibr. moderada	12	15,0	6,9	8,0	25,0
A. fibr. acentuada	12	14,7	6,4	6,0	24,0
Controles	05	0,4	0,14	0,2	0,5
VCAM1(total)					
A. fibr. leve	07	7,4	3,7	4	12,7
A. fibr. moderada	12	8,2	3,9	4,0	14,0
A. fibr. acentuada	12	10,0	3,3	3,7	14,3
Controles	05	0,4	0,1	0,2	0,5

n= número; DP = Desvio Padrão; A. fibr. leve = atividade fibrogênica leve; A. fibr. moderada = atividade fibrogênica moderada; A. fibr. acentuada = atividade fibrogênica acentuada.

VCAM1 área normal $p < 0,05$

A. fibr. Leve X A. fibr. moderada $p=0,9$; A. fibr. leve X A. fibr. acentuada $p=0,03$; A. fibr. Leve X controle $p=0,6$; A. fibr. moderada X A. fibr. acentuada $p=0,02$; A. fibr. moderada X controle $p=0,45$; A. fibr. acentuada X controle $p=0,004$

VCAM1 área de colapso $p=0,54$

VCAM1 área de fibrose mural $p=0,94$

VCAM1 total $p < 0,05$

A. fibr. Leve X A. fibr. moderada $p=0,87$; A. fibr. leve X A. fibr. acentuada $p=0,29$; A. fibr. Leve X controle $p=0,04$; A. fibr. moderada X A. fibr. acentuada $p=0,46$; A. fibr. moderada X controle $p<0,0001$; A. fibr. acentuada X controle $p<0,0001$

5.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA

A média do tempo de acompanhamento foi de 31 meses, variando de 4 a 104 meses. Dos 36 pacientes estudados, 31 (86%) morreram e 3 (8,3%) estavam vivos ao final do estudo. Não foi possível definir a evolução de dois casos que permaneceram na análise da sobrevida até o momento em que foram acompanhados (data da última consulta ambulatorial). Todos os óbitos foram atribuídos direta (insuficiência respiratória) ou indiretamente (infecções pulmonares) à fibrose pulmonar.

A curva geral de sobrevida, estimada pela curva de Kaplan-Meyer, é mostrada na figura 20. A média geral de sobrevida foi de 32 meses.

Figura 20 - Curva de sobrevida geral em 36 pacientes portadores de Fibrose Pulmonar Idiopática

5.5.1 SOBREVIDA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As características relacionadas à idade, sexo, grau de dispnéia, tempo de sintomas e história de tabagismo não interferiram sobre a mortalidade.

5.5.2 SOBREVIDA E CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

Pacientes portadores de FPI/PIU com provas de função pulmonar evidenciando $VEF_1 < 70\%$ e $DCO \leq 40$ apresentaram menor sobrevida (figuras 21 e 22). Pacientes que apresentaram uma $CVF < 70\%$ tiveram uma tendência a maior mortalidade ($p=0,08$). As demais medidas funcionais, tais como VEF_1/CVF , CPT e $G_{(A-a)O_2}$ não apresentaram impacto na sobrevida.

Figura 21 - Distribuição das curvas de sobrevida dos pacientes portadores de FPI/PIU de acordo com os valores de $VEF1 \geq 70\%$ e $VEF1 < 70\%$
 Teste Log Rank: $p = 0,049$

Figura 22 - Distribuição das curvas de sobrevida dos pacientes portadores de de FPI/PIU de acordo com os valores de $DCO \leq 40\%$ e $DCO > 40\%$
 Teste Log Rank: $p = 0,048$

5.5.3 SOBREVIDA E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

5.5.3.1 Sobrevida e grau de atividade fibrogênica

O impacto dos parâmetros histopatológicos na sobrevida isoladamente foi avaliada pela regressão de Cox. A figura 23 ilustra o impacto na sobrevida das modificações fibrogênicas que ocorrem nos ácinos pulmonares de pacientes portadores de FPI/PIU. Ácinos pulmonares levemente modificados por fibrose mural conferem tendência a maior sobrevida dos pacientes quando comparados àqueles com alterações mais acentuadas.

Figura 23 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de PIU separados por escore de grau de atividade fibrogênica. Teste Log Rank: $p = 0,11$

5.5.3.2 Sobrevida e remodelamento macrovascular

Quanto ao grau de lesão vascular, embora não significativas do ponto de vista estatístico, a análise da figura 24 permite visualizar uma tendência para que pacientes portadores de FPI/PIU com alterações vasculares leves (grau 1) sobrevivam mais do que pacientes com lesões vasculares mais acentuadas (graus 2, 3 e 4). Pacientes que apresentaram maior fração de colágeno e elástica na parede dos vasos apresentaram maior mortalidade que aqueles com menor proporção destas fibras (figuras 25 e 26).

Não foram observadas influências significativas entre as medidas da área interna, perímetro interno e espessura do vaso com a sobrevida.

Figura 24 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU separados por escore de grau de lesão vascular.
Teste Log Rank: $p=0,17$

Figura 25 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme a quantificação de fibra de colágeno vascular
 Teste Log Rank: $p = 0,043$

Figura 26 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme a quantificação de fibra elástica vascular.
 Teste Log Rank: $p = 0,05$

5.5.4.3 Sobrevida e remodelamento microvascular

Os pacientes portadores de PIP/PIU com biópsias evidenciando maior densidade microvascular (aumento da expressão do CD 34) nas áreas normais e de colapso alveolar, apresentaram menor taxa de mortalidade quando comparados com pacientes cujas biópsias a densidade microvascular foi menor nestas áreas (figuras 27 e 28).

Figura 27 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme quantificação da densidade microvascular em áreas de parênquima normal.
Teste Log Rank: $p=0,038$

Densidade microvascular (CD34) em áreas de colapso alveolar

Figura 28 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme quantificação da densidade microvascular em áreas de colapso alveolar
Teste Log Rank: $p=0,018$

5.5.4.4 Sobrevida e disfunção endotelial capilar

Imunoexpressão aumentada de VCAM1 nas áreas de fibrose mural organizante nas biópsias pulmonares de pacientes com fibrose pulmonar idiopática despontou como potencial marcador de mortalidade, visto que pacientes com maior disfunção endotelial capilar VCAM1+ nestas áreas apresentaram maior mortalidade (figura 29).

Disfunção endotelial (VCAM1+) em áreas de fibrose mural

Figura 29 - Distribuição das curvas de sobrevida em pacientes portadores de FPI/PIU conforme a disfunção endotelial (VCAM1+) nas áreas de fibrose mural organizante.
Teste Log Rank: $p=0,031$

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A fibrose pulmonar idiopática é uma doença progressiva, de etiologia indefinida e de alta morbimortalidade. Visto que até o momento nenhum tratamento específico demonstrou alterar a evolução da doença, a compreensão de sua patogênese e a determinação de fatores que possam prever o prognóstico podem direcionar novas perspectivas de tratamento e influenciar a maneira de acompanhar os pacientes com FPI. Sua patogênese representa um grande desafio para as pesquisas em pneumologia, atualmente direcionadas para a melhor compreensão do processo fibroproliferativo associado à doença. Existem poucas informações disponíveis sobre o remodelamento vascular na fibrose pulmonar idiopática, principalmente relacionadas ao estudo da microcirculação pulmonar e sua possível implicação na patogênese e prognóstico da doença.

O presente estudo avaliou o remodelamento vascular pulmonar, realizando uma quantificação das alterações histopatológicas nas artérias

pré-acinares, a analisando, através da imunohistoquímica, a densidade e disfunção do endotélio capilar pulmonar na Fibrose Pulmonar Idiopática.

6.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

6.2.1 DESENHO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO

Considerando-se a casuística estudada, a primeira limitação refere-se ao desenho epidemiológico de estudo adotado: retrospectivo de corte transversal. Não foi possível obter informações uniformizadas quanto a sintomas clínicos, funcionais e radiológicos de todos os pacientes estudados. Os pacientes foram submetidos a tratamentos medicamentosos diferentes e por tempos variados, fato que poderia ser controlado em estudos prospectivos. Algumas biópsias não foram submetidas a estudo imunohistoquímico por falta de material suficiente.

6.2.2 LOCAL DA REALIZAÇÃO DA BIÓPSIA PULMONAR

Visto que a PIU se caracteriza principalmente por ser um processo fibrosante não uniforme e heterogêneo, onde se observa áreas de fibrose e

faveolamento alternando com áreas de tecido normal, o local onde a biópsia é realizada pode implicar na análise de uma área que não caracterize o processo com um todo.

Neste estudo a maioria dos pacientes tiveram suas biópsias realizadas em pelo menos dois lobos diferentes, priorizando áreas que expressavam maior atividade da doença ao exame de imagem, obedecendo rotina adotada pelo serviço de pneumologia e cirurgia torácica do HC-FMUSP.

6.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-FUNCIONAIS E PROGNÓSTICO

No presente estudo a seleção dos pacientes portadores de FPI foi realizada de forma criteriosa, com exclusão de outras doenças pulmonares intersticiais associadas a doenças sistêmicas, colagenoses, drogas, exposição ocupacional e outras doenças intersticiais idiopáticas, incluindo, fibrose centro lobular (de CARVALHO et al., 2002)

Diversos autores estudaram fatores relacionados ao prognóstico da fibrose pulmonar idiopática. As conclusões discordantes entre as séries antigas podem ser explicadas por diversos fatores que variam desde a não uniformidade nos métodos de obtenção das biópsias à análise de amostras heterogêneas com inclusão de outras doenças pulmonares intersticiais,

idiopáticas ou de etiologia conhecida. A avaliação histológica padronizada também era diferente. Devido à redefinição de fibrose pulmonar idiopática, os achados do presente estudo foram comparados apenas com aqueles de estudos recentes, que incluíram o padrão de pneumonia intersticial usual para caracterizar a fibrose pulmonar idiopática.

A média geral de sobrevida estimada dos pacientes deste estudo foi de 33 meses, semelhante às relatadas na literatura (BJORAKER et al., 1998; ATS, 2000). Não observamos influência do sexo, idade, tempo de sintomas e grau da dispnéia na sobrevida. Em outra série de estudos, o tabagismo esteve associado a maior risco para o desenvolvimento da fibrose pulmonar idiopática, embora os fumantes pareçam ter maior sobrevida (KING et al., 2001 A, 2001B; FLAHERTY et al., 2002), o que não foi evidenciado no presente estudo.

Ao contrário de uma grande série recente (NICHOLSON et al., 2002), o valor da CVF inicial não se correlacionou com a sobrevida neste estudo. Entretanto, valores iniciais de $VEF1 < 70\%$ e $DCO \leq 40\%$ influenciaram negativamente a sobrevida dos pacientes com fibrose pulmonar idiopática. LATSI e colaboradores (2003) observaram que pacientes com $DCO < 35\%$ também apresentavam maior mortalidade em três anos de acompanhamento.

6.4 REMODELAMENTO VASCULAR

6.4.1 REMODELAMENTO VASCULAR DAS ARTÉRIA PRÉ ACINARES

O remodelamento vascular foi estudado nas artérias pré acinares através da avaliação do grau de lesão vascular, mensuração do grau de oclusão e espessura do vaso e quantificação da fração de fibras colágenas e elásticas na parede vascular.

Observamos que o maior grau de lesão das artérias pré acinares e o aumento da espessura e da quantificação das fibras colágenas e elásticas na parede dos vasos ocorreram paralelamente ao maior grau de lesão do parênquima pulmonar. Assim, o remodelamento vascular mais acentuado esteve associado à maior intensidade do remodelamento parenquimatoso (predominância de fibrose mural organizante, focos de fibroblastos e zonas de faveolamento na biópsia pulmonar). Estes resultados são concordantes com aqueles evidenciados por GOLDEN e colaboradores (1953), TURNER-WARWICK e colaboradores (1963), COALSON e colaboradores (1982), PEÃO e colaboradores (1994) e RENZONI e colaboradores (2003).

O remodelamento macrovascular não correlacionou significativamente com a avaliação funcional dos pacientes. Ao avaliarmos o remodelamento capilar pulmonar, observamos que pacientes com maior densidade

microvascular nas áreas de parênquima preservado apresentaram uma tendência a menor alteração do $G_{(A-a)}O_2$.

O espessamento miointimal na parede dos vasos é um achado comum nas áreas de fibrose pulmonar e extensa obliteração do leito vascular pulmonar resultará em hipertensão pulmonar, reconhecido fator de pior prognóstico em pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática (LETTIERE et al., 2006). Em nosso estudo, o aumento do sistema de fibras colágenas e elásticas vasculares, como parte das alterações do remodelamento vascular, influenciou de maneira negativa e significativa a sobrevida dos pacientes com FPI. Em estudo de KING e colaboradores (2001), não foi observada correlação entre espessamento miointimal vascular e sobrevida, entretanto, estudo realizado por COLLETA e colaboradores (2003) o comprometimento de mais de 50% dos vasos com espessamento miointimal teve alto valor preditivo para maior mortalidade na FPI.

6.4.2 REMODELAMENTO CAPILAR PULMONAR

A microcirculação pulmonar apresenta um papel importante nos processos de reparo e remodelamento parenquimatoso. A quantificação da densidade vascular através da imunoexpressão de CD34 nos capilares foi

utilizada para avaliar o remodelamento da microcirculação pulmonar dos pacientes com FPI.

Nosso estudo evidenciou um aumento significativo, em relação aos controles, de capilares CD34 positivos nas áreas normais e de colapso alveolar e uma tendência a diminuição da densidade capilar nas áreas de remodelamento parenquimatoso nos pacientes com FPI. Também foi encontrado um aumento da densidade capilar alveolar em áreas de parênquima pulmonar normal e de colapso alveolar quando comparada às áreas de fibrose mural organizante nos pacientes com grau de atividade fibrogênica leve e moderada da doença. Observamos assim, um aumento dos capilares alveolares CD34 positivos nas áreas mais preservadas do pulmão e uma tendência a diminuição nas áreas de remodelamento parenquimatoso, configurando uma distribuição heterogênea da densidade vascular nas diferentes áreas da pneumonia intersticial usual, semelhante ao encontrado por EBINA e colaboradores (2004). Em nosso estudo, esta diferença foi mais acentuada nos pacientes com grau de atividade leve e moderada da fibrose pulmonar idiopática.

Este estudo reconcilia aparentemente resultados contraditórios referentes ao remodelamento vascular capilar na fibrose pulmonar idiopática. Vários estudos têm sugerido a importância do aumento dos capilares alveolares na fibrose pulmonar idiopática. GOLDEN e colaboradores (1953) foram os primeiros a relatar que os capilares eram muito mais numerosos e alargados na parede alveolar de pacientes com fibrose pulmonar. TURNER-

WARWICK e colaboradores (1963) identificaram a formação de novos vasos nesta doença, demonstrando anastomoses entre a microvasculatura sistêmica e pulmonar. Um desequilíbrio entre quimiocinas angiogênicas e angioestáticas, favorecendo a atividade angiogênica, têm sido descrita em vários estudos (KEANE et al., 1997, 1999; SIMLER et al., 2004).

Em oposição, estudos realizados por GRACEY e colaboradores (1968), CASSAN e colaboradores (1974) e RENZONI e colaboradores (2003), evidenciaram uma diminuição da densidade vascular na fibrose pulmonar idiopática. Alguns estudos ressaltaram, em particular, a completa ausência de capilares nas áreas de focos fibroblásticos responsáveis pela atividade da doença (COSGROVE et al., 2003; RENZONI et al., 2003; EBINA et al., 2004). COSGROVE e colaboradores (2003) também evidenciaram um aumento importante de fatores angioestáticos em tecidos de biópsia pulmonar de fibrose pulmonar idiopática.

Nossos resultados, de forma semelhante aos de EBINA e colaboradores (2004), evidenciam que tanto um aumento quanto uma diminuição da densidade capilar pulmonar podem ser encontradas na mesma doença, de acordo com a área analisada e o grau de atividade fibrogênica da doença, indicando que a heterogeneidade vascular é também uma característica da fibrose pulmonar idiopática.

De maneira interessante, também observamos que a maior densidade capilar nas áreas normais ocorreu principalmente nas biópsias pulmonares com grau de atividade fibrogênica leve e sem a existência de

remodelamento vascular das artérias pré acinares, que apresentavam seus lúmens e espessuras preservados. Assim, o aumento dos capilares alveolares CD34+ em lesões não fibróticas parece estar presentes precocemente na evolução da fibrose pulmonar idiopática, esse fato nos leva a formular a hipótese de que a angiogênese seria uma resposta à lesão inicial da FPI, possivelmente vascular, representando uma tentativa de regeneração à lesão inicial. Outra possível explicação para o aumento da densidade vascular nas áreas preservadas seria uma tentativa de manter o fluxo sanguíneo preferencialmente nessas regiões. Corroborando essas hipóteses, observarmos que a maior densidade vascular nas áreas de parênquima pulmonar preservado correlacionou com menor alteração do gradiente alvéolo arterial de oxigênio nestes pacientes e que os pacientes que apresentaram maior densidade microvascular nas áreas não fibróticas (áreas normal e de colapso alveolar) apresentaram tempo de sobrevida maior que aqueles com menor expressão de CD34 nestas áreas, ampliando a importância de um possível papel da redistribuição capilar alveolar na tentativa de regeneração precoce do septo alveolar lesado pelo processo fibrótico. Entretanto, estudos adicionais são necessários para tentar esclarecer se o aumento da densidade capilar observada nas áreas de parênquima pulmonares mais preservadas é uma consequência, prevenção ou estão ativamente envolvidas no desenvolvimento da doença. A análise da distribuição da densidade capilar em áreas normais ou próximas do normal adjacentes ao processo fibrótico em outras doenças pulmonares fibrosantes poderia esclarecer se o aumento da densidade capilar observada neste

estudo seria um mecanismo adaptativo comum à fibrose ou uma característica específica da fibrose pulmonar idiopática.

6.5 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL CAPILAR

Existem poucos estudos que avaliam a disfunção do endotélio capilar alveolar através da imunoexpressão das moléculas de adesão VCAM1, ICAM1 e E-selectina na fibrose pulmonar idiopática.

Encontramos uma importante disfunção endotelial da microcirculação pulmonar, determinada pela maior expressão de VCAM1, ICAM1 e E-selectina, nas biópsias pulmonares de pacientes com fibrose pulmonar idiopática quando comparadas aos pulmões de controles normais. A disfunção endotelial foi mais intensa nas áreas de fibrose mural organizante, entretanto, mesmo nas áreas preservadas esse aumento foi significativo.

Observou-se uma maior expressão de VCAM1+ em biópsias com grau mais acentuado de atividade fibrogênica sugerindo maior disfunção endotelial capilar na fibrose pulmonar idiopática avançada. A expressão de ICAM1 e E-Selectina foi semelhante entre os diferentes graus de atividade fibrogênica. Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados por VAN DINTHER-JANSSEN e colaboradores (1993) que observaram uma expressão aumentada de VCAM1 e ICAM1 no endotélio capilar pulmonar de

pacientes com sarcoidose e PIU. Contrariamente a nossos dados, NAKAO e colaboradores (1995) observaram uma maior expressão endotelial de E-selectina, restrita às áreas de faveolamento, e de ICAM, em pulmões de pacientes com FPI, mas sem um aumento correspondente de VCAM-1. Esta discordância pode estar associada à aplicação de técnicas de análise diferentes.

Adicionalmente, observamos que pacientes que apresentavam uma acentuada disfunção endotelial capilar determinada pela expressão de VCAM1 nas áreas de fibrose mural organizante, apresentaram maior mortalidade que aqueles com menor disfunção endotelial nestas áreas. Este é o primeiro estudo a correlacionar disfunção endotelial e sobrevida na FPI.

6.6 APLICAÇÃO CLÍNICA

Nossos resultados demonstram claramente uma participação importante dos fenômenos vasculares, especialmente da microcirculação, na evolução da FPI. Não é possível definir claramente se a anormalidade vascular é a carência ou excesso de novos vasos, tendo a resposta a esta questão, importantes implicações terapêuticas.

O aumento dos capilares poderia ser um participante importante no processo desgovernado do remodelamento da matriz extra-celular observada na FPI, assim, a neutralização de fatores pró angiogênicos

deveria ser adotada. Em modelo animal de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, a inibição de quimiocinas angiogênicas ou administração de quimiocinas angioestáticas reduziram a deposição de colágeno pulmonar (KEANE et al., 1999). Entretanto, resultados obtidos de modelos de fibrose pulmonar induzida por bleomicina podem não se aplicar à doença no homem.

Outra possibilidade é a hipótese vascular, ou seja, a lesão inicial ocorreria nos capilares pulmonares e a atividade angiogênica representaria uma tentativa reparadora do processo. Favorecendo essa hipótese observamos algumas evidências:

- Presença de disfunção endotelial mesmo em áreas normais.
- Aumento de densidade capilar independentemente de alterações na macrocirculação.
- Maior sobrevida naqueles com maior densidade capilar, ou seja, maior atividade angiogênica.
- Pior sobrevida nos pacientes com disfunção endotelial mais intensa.

Assim, a FPI seria causada por um desbalanço entre lesão capilar e capacidade de regeneração. Nesse contexto, sabendo que o endotélio normal apresenta, além de capacidade vasodilatadora, propriedades capazes de inibir a adesão e agregação plaquetária e distúrbios de coagulação, prevenindo conseqüentemente a trombose *in situ*, a anticoagulação crônica ou a utilização de terapêutica antitrombótica poderia

ser uma opção terapêutica na FPI. Estudo inicial, realizado por KUBO e colaboradores (2005), demonstrou um efeito benéfico da terapia anticoagulante na sobrevida de pacientes com fibrose pulmonar idiopática.

6.7 PERSPECTIVAS

Considerando nossos resultados, as hipóteses formuladas e as limitações desse estudo, certamente definiu-se um campo promissor de pesquisa na FPI. Um amplo cenário para pesquisa está aberto. Mais trabalhos são necessários para estabelecer se o remodelamento capilar está associado ao processo de remodelamento anormal da matriz extra-celular da FPI.

7 CONCLUSÕES

1. Remodelamento da macrocirculação pulmonar:

- Presença de graus acentuados de lesão nas artérias pré acinares, com aumento da fração de fibras colágenas e elásticas na parede vascular. Essas alterações correlacionaram-se com o grau de atividade fibrogênica parenquimaosa.

2. Remodelamento da microcirculação pulmonar:

- Observamos uma distribuição heterogênea da densidade microvascular, com um aumento dos capilares nas áreas de pulmão normal e de colapso alveolar comparado às áreas de fibrose mural organizante.
- O aumento da densidade capilar foi mais intenso nos pacientes com atividade fibrogênica leve

3. Disfunção endotelial

- A disfunção endotelial aumentou progressivamente, sendo significativamente maior nas áreas de fibrose mural organizante e colapso em relação às áreas preservadas e aos controles.
- A disfunção endotelial também foi progressivamente mais intensa nas áreas normais, quanto maior o grau de atividade fibrogênica.

4. Influência na sobrevida:

- O aumento da densidade microvascular em áreas de parênquima pulmonar normal e de colapso alveolar correlacionou-se com uma maior sobrevida.
- Fração maior de fibras colágenas/elásticas na parede vascular e disfunção endotelial capilar mais acentuada nas áreas de fibrose mural organizante, correlacionaram-se com pior sobrevida.

8 ANEXOS

Anexo I - Dados clínicos e de função pulmonar

Pc	Sex	Id	Disp	Tempo	Status	Fumo	CVF (%)	VEF1 (%)	VEF1%	CPT (%)	DCO (%)	G(A-a)O ₂
1	1	67	2	24	2	3	86	115	91	81	33	38
2	1	61		12	2	3	57	76	97	59	27	45
3	1	69			2	1	80	106	92	70	43	
4	1	55	3	6	2	1						
5	2	64		36	2		73	94	92	79	62	
6	2	59	3	24	2	3	71	79	91	84	47	
7	1	60	2	4	2	3	72	69	77			28
8	1	58			2	1	52	63	119	56	46	
9	2	74			2	2	54	57	105	31	70	
10	2	64	2	18	1	2	74	80	78	92		25
11	1	52		12	2	1	40	44	108			57
12	2	66	2		2	1						
13	2	77	3	12	2	2	56	78	82			
14	2	52	2	24	2	2	50	64	95	44	40	17
15	1	62	2	4	2	3	68	81	95	66		38
16	2	71	1	3	2	2	66	87	90	67		25
17	2	55	1	24	2		80	94	87	85	94	41
18	1	61			2	2	74	67	90	72	23	64
19	1	69	2	12	2	3	94	106	90	76	24	49
20	1	55	3	36	2	3	87	93	78	98	30	17
21	2	54		8	3	2	70	76	91	69	53	
22	2	66	2	24	1	2	84	87	82	85	51	41
23	2	66	3	12	2	1	79	110	100	91		33
24	2	53	2	24	2	1	50	60	91	49	50	39
25	2	71	2	12	2	2	67	90	119	69		44
26	1	58	3	48	2	2	45	62	100	43	61	25
27	1	73			2	1	78	99	126	70	65	
28	1	54	2	6	2	1	72	62	70	85		43
29	1	73	2		2	2	88	89	79	83	53	
30	1	64	2	36	2	3	78	89	92	67	76	21
31	1	45	3	11	2	1	67	79	120	67	36	
32	1	63	2		2	2	96	114	95	80	64	
33	1	64	2	12	2	3	37	49	94			44
34	2	70	3	24	1	2	90	94	85	76	56	
35	1	76			3	1	60	88	148	50	67	11
36	1	73	3	36	2	3	63	88	94	80	34	43

Disp : Grau de dispnéia
 Tempo: Tempo de sintomas
 Status: óbito / vivo / indefinido
 VEF1% = VEF1/CVF % predito

Pc: paciente
 Sex: sexo
 Id: idade

ANEXO II - Resultados histopatológicos da análise do grau de atividade fibrogênica e avaliação das artérias pré acinares

Pc	Grau Ativ Fibr	Grau vascular	Área interna	Perímetro Interno	Espessura	Colágeno	Elástica
1	3	3	432,88	74,74	54,51	0,31	0,34
2	3	1	1301,18	147,37	32,42	0,31	0,36
3	2	3	368,07	72,89	64,42	0,37	0,29
4	2	1	1743,34	157,46	32,17	0,25	0,33
5	3	3	1091,08	128,92	94,82	0,41	0,31
6	3	3	207,62	56,28	71,33	0,37	0,39
7	2	2	1591,58	153,37	57,66	0,25	0,42
8	3	2	1399,41	149,18	55,58	0,37	0,38
9	2	3	323,01	70,1	59,9	0,36	0,36
10	3	2	1504,75	156,89	55,96	0,44	0,31
11	3	4	416,9	77,6	68,87	0,37	0,35
12	3	4	157,29	35,67	58,08		
13	2	2	1318,43	142,05	64,53	0,25	0,33
14	2	2	304,56	67,09	81,82	0,27	0,35
15	1	3	551,18	94,18	63,61	0,27	0,37
16	3	1	3589,21	209,4	42,54	0,34	0,4
17	3	3	475,94	81,79	58,39	0,35	0,38
18	3	3	155,89	50,32	61,76	0,36	0,39
19	2	2	1008,46	147,45	59,23	0,29	0,43
20	1	3	629,7	87,07	49,97	0,27	0,27
21	2	1	4563,27	245,82	29,71	0,25	0,27
22	1	1	3333,26	209,99	28,04	0,22	0,27
23	1	1	2628,06	191,71	25,21	0,21	0,2
24	2	2	1133,8	121,78	36,74	0,28	0,27
25	2	2	2257,96	180,9	47,92		
26	3	3	518,17	94,52	40,68		
27	2	3	323,01	70,1	59,94	0,36	0,36
28	2	2	837,52	114,06	38,67		
29	3	3	236,3	55,56	62,48		
30	2	1	1033,64	121,72	44,21	0,27	0,31
31	2	2	1133,8	121,78	36,74	0,28	0,27
32	3	2	1399,41	149,18	55,58	0,37	0,38
33	1	1	1164,74	130,42	32,51	0,21	0,2
34	1	1	2045,97	168,12	42,54	0,19	0,22
35	1	2	494,27	103,12	47,33	0,2	0,2
36	3	4	441,8	77,29	63,12	0,34	0,36

Pc: Paciente

Grau Ativ Fib: Grau de Atividade Fibrogênica

Grau vascular : Grau de Lesão vascular

ANEXO III - Resultados da análise imunohistoquímica para CD34 em áreas normais, colapso alveolar, fibrose mural organizante e área total estudada

Paciente	CD34Nor	CD34Colap	CD34 Fibrose	CD34 total
1	13,0	7,0	2,0	8,0
2	70,0	39,0	19,0	45,6
3	35,0	17,0	11,0	22,3
4	90,0	30,0	13,0	48,3
5	24,0	1,0	2,0	9,9
6	21,0	15,0	1,0	13,8
7	43,0	11,0	8,0	22,3
8	69,0	52,0	47,0	57,1
9	58,0	28,0	21,0	37,5
10	85,0	21,0	5,0	41,0
11	23,0	15,0	6,0	15,8
12				
13	93,0	38,0	9,0	51,4
14	66,0	42,0	4,0	41,5
15	9,0	6,0	5,0	6,9
16	80,0	33,0	4,0	43,4
17	18,0	10,0	7,0	12,3
18	20,0	15,0	3,0	13,9
19	55,0	16,0	1,0	26,9
20	37,0	1,0	0,7	14,4
21	92,0	21,0	8,0	44,4
22	78,0	45,0	15,0	49,9
23	84,0	21,0	4,0	40,4
24	46,0	21,0	5,0	26,4
25				
26				
27	18,0	12,0	9,0	13,5
28				
29				
30	100,0	55,0	18,0	62,6
31	86,0	53,0	11,0	54,9
32	29,0	12,0	7,0	17,1
33	61,0	44,0	22,0	44,9
34	100,0	53,0	19,0	62,1
35	70,0	32,0	6,0	39,8
36	19,0	1,0	4,0	8,5

ANEXO IV - Resultados da análise imunohistoquímica para VCAM1, E-Selectina e ICAM1 em áreas normais, colapso alveolar, fibrose mural organizante e área total estudada

Pc	VCAM-1Nor	VCAM-1Colap	VCAM-1 Fibr	VCAM-1Total	E-selec Nor	E-selec Colap	E-selec Fibr	E-Selec Total	ICAM-1Nor	ICAM-1Colap	ICAM-1Fibr	ICAM-1 Total
1	6,0	11,0	21,0	12,7	0,0	1,0	11,0	4,0	3,0	28,0	93,0	41,3
2	1,0	4,0	24,0	9,7	1,0	9,0	37,0	15,7	0,0	48,0	92,0	46,7
3	3,0	4,0	23,0	10,0	2,0	8,0	13,0	7,7	18,0	63,0	98,0	59,7
4	1,0	4,0	8,0	4,3	2,0	8,0	8,0	6,0	8,0	14,0	98,0	40,0
5	5,0	12,0	17,0	11,3	2,0	7,0	16,0	8,3	0,0	3,0	65,0	22,7
6	11,0	10,0	22,0	14,3	1,0	3,0	8,0	4,0	11,0	60,0	100,0	57,0
7	2,0	7,0	12,0	7,0	5,0	23,0	26,0	18,0	1,0	17,0	94,0	37,3
8	20,0	3,0	6,0	9,7	2,0	1,0	13,0	5,3	8,0	21,0	50,0	26,3
9	6,0	11,0	24,0	13,7	2,0	6,0	13,0	7,0	25,0	31,0	97,0	51,0
10	8,0	12,0	11,0	10,3	4,0	6,0	10,0	6,7	36,0	65,0	100,0	67,0
11	18,0	9,0	10,0	12,3	8,0	8,0	10,0	8,7	5,0	41,0	98,0	48,0
12												
13	2,0	12,0	16,0	10,0	0,0	0,0	1,0	0,3	19,0	54,0	94,0	55,7
14	7,0	10,0	25,0	14,0	2,0	6,0	8,0	5,3	16,0	52,0	82,0	50,0
15	5,0	9,0	22,0	12,0	1,0	4,0	33,0	12,7	6,0	61,0	99,0	55,3
16	1,0	3,0	10,0	4,7	3,0	4,0	6,0	4,3	1,0	8,0	41,0	16,7
17	3,0	8,0	12,0	7,7	0,0	1,0	3,0	1,3	25,0	60,0	99,0	61,3
18	11,0	10,0	22,0	14,3	1,0	3,0	8,0	4,0	11,0	60,0	100,0	57,0
19	2,0	5,0	10,0	5,7	7,0	8,0	12,0	9,0	7,0	19,0	63,0	29,7
20	7,0	9,0	22,0	12,7	2,0	2,0	14,0	6,0	12,0	34,0	80,0	42,0

Pc : paciente

continua

continuação

Pc	VCAM-1Nor	VCAM-1Colap	VCAM-1 Fibr	VCAM-1Total	E-selec Nor	E-selec Colap	E-selec Fibr	E-Selec Total	ICAM- 1Nor	ICAM- 1Colap	ICAM- 1Fibr	ICAM-1 Total
21	1,0	4,0	9,0	4,7	0,0	0,0	1,0	0,3	12,0	54,0	76,0	47,3
22	1,0	4,0	7,0	4,0	7,0	13,0	16,0	12,0	0,0	3,0	14,0	5,7
23	0,0	3,0	9,0	4,0	11,0	20,0	24,0	18,3	2,0	14,0	94,0	36,7
24	4,0	7,0	13,0	8,0	4,0	12,0	16,0	10,7	1,0	8,0	74,0	27,7
25												
26												
27	6,0	11,0	24,0	13,7	2,0	6,0	13,0	7,0	25,0	31,0	97,0	51,0
28												
29												
30	1,0	3,0	8,0	4,0	1,0	2,0	19,0	7,3	13,0	20,0	67,0	33,3
31	1,0	3,0	9,0	4,3	5,0	7,0	11,0	7,7	4,0	8,0	98,0	36,7
32	2,0	3,0	6,0	3,7	2,0	10,0	13,0	8,3	8,0	21,0	50,0	26,3
33	1,0	4,0	8,0	4,3	1,0	6,0	9,0	5,3	6,0	63,0	94,0	54,3
34	1,0	3,0	19,0	7,7	7,0	15,0	20,0	14,0	10,0	44,0	94,0	49,3
35	3,0	8,0	11,0	7,3	2,0	6,0	13,0	7,0	1,0	10,0	96,0	35,7
36	10,0	5,0	16,0	10,3	2,0	6,0	14,0	7,3	3,0	31,0	73,0	35,7

Pc: paciente

ANEXO V - Resultados do grupo controle: Histopatologia e imunohistoquímica

Cont	CD34	VCAM-1	E-selec	ICAM-1	Grau vascular	Grau Ativ Fib	Área interna	Perímetro interno	Espessu	Colag	Elast
1	17,1	0,5	0	0,01	0	0	5070,01	255,91	18,28	0.01	0.07
2	13	0,2	0	0,03	0	0	4558,53	248,18	13,99	0.01	0.03
3	16,2	0,5	0	0,02	0	0	5623,72	279,36	19,35	0.01	0.07
4	13,9	0,5	0	0,05	0	0	6654,01	303,46	14,21		
5	14,6	0,3	0	0,02	0	0	9085,68	334,85	17,52		

Cont: Controles

E-Selecc : E-Selectina

Grau Vascular: Grau de Lesão Vascular

Grau Ativ Fib: Grau de Atividade Fibrogênica

Espess: Espessura do Vaso

Colag: Fração de colágeno vascular

Elast: Fração de elástica vascular

9 REFERÊNCIAS

American Thoracic Society / European Respiratory Society. International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.

American Thoracic Society. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: diagnosis and treatment. International Consensus Statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:646-664.

Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *JACC* 1999;34:631-8.

Anderson TJ, Verma S. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.

Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. Platelet derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990; 86: 1055-1064.

Ashitani J, Mukae H, Ihiboshi H, Hiratsuka T, Taniguchi H, Mashimoto H, Matsukura S. Serum-soluble adhesion molecules in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1997;35:942-7.

Bitterman PB, Adelberg S, Crystal RG. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J. Clin Invest* 1983; 72: 1801-1813.

Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Talezaar HD, Schoeder DR, Offord KP. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:199-203.

Brockelmann TJ, Limper AH, Golby TV, McDonald JA. Transforming growth factor-beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6642-6646.

de Carvalho ME, Kairalla RA, Capelozzi VL, Deheinzelin D, do Nascimento Saldiva PH, Carvalho CR. Centrilobular fibrosis (CLF): a novel histological pattern of idiopathic interstitial pneumonia. *Pathol Res Pract* 2002; 198(9): 577-83.

Cassan SM, Divertie MB, Brown AL. Fine structural morphometry on biopsy specimens of human lung 2. Diffuse idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1974; 65: 275-278.

Cella G, Belloto F, Tona F, Sbarai A, Mazzaro G, Motta G, Fareed J. Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 1226-1230.

Coalson JJ. The ultrastructure of human fibrosing alveolitis. *Virchows Archiv* 1982; 395:181-199.

Cosgrove GO, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD, Worthen GS. 2004. Pigment epithelium derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:242-251.

Crystal RG, Fulmer JD, Roberts WC, Hoss ML, Line BR, Reynolds HY. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic, and biochemical aspects. *Ann Intern Med* 1976; 85: 769-788.

Colleta EN, Pereira CA, Ferreira RG, Rubin AS, Villela LS, Malheiros T, Stavale JN. Achados histológicos e sobrevida na fibrose pulmonar idiopática. *J pneumol* 2003;29: 371-378.

Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Semin Respir Med* 1993; 14:181-196.

Epler, G.R, T.C. Maccloud, E.A Gaensler, J.P. Mikus, C.B.Carrington. Normal chest roentgenograms in chronic diffuse infiltrative lung disease. *N. Engl. J. Med.* 1978; 298:934-939.

Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169 (11): 1179-1180.

Flaherty KR, Towes GB, Travis WD, Colby TV, Gross BH. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2002 ; 19:275-83.

Gaensler EA, Moister VB, Hamm J, Open-lung biopsy in diffuse pulmonary disease. *N Engl J Med* 1964; 270: 1319-1331.

Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walrmath D, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:895-900.

Gibson GJ, Pride NB, Davis J, Schroter RC. Exponential description of the static pressure-volume curve of normal and diseased lungs. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120:799-811.

Golden A, Bronk TT. Diffuse interstitial fibrosis of lungs. A form of diffuse interstitial angiosis and reticulosis of the lungs. *Arch of intern med* 1953;92:606-614.

Gross P, The concept of the Hamman–Rich syndrome: a critique. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 828-832.

Gracey DB, Divertie MB, Brown AI Jr. Alveolar–capillary membrane in idiopathic interstitial pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1967; 98: 16-20

Gundersen HJ. Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J microscopy* 1987;147:229-63

Hamman L, Rich AR. Acute diffuse interstitial fibrosis of the lung. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1944; 74: 177.

Hayashi S, Abe K, Matsuoka H, Goya S, Morishita H, Arai T, Kida H, Nishiro K, Takeda Y, Osaki T, Inoue Y. Increased level of soluble E-selectina in the serum from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Inflammation* 2004 ;28: 1-5.

Johnson MA, Kwan S, Snell NJC, Numm AJ, Darbyshire JH, Turner-Warwick M. Randomised controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1989; 44: 280-288.

Johnston ID, Prescott RJ, Chalmers JC, Rudd RM. British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. *Thorax* 1997; 52:38-44.

Katzenstein AL. Pathogenesis of “fibrosis” in interstitial pneumonia: an electron microscopic study. *Hum. Pathol* 1985; 16: 1015-1024.

Katzenstein AL and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1998; 157: 1301-1315.

Keane MP, Arenberg DA., Lynch III JP, Whyte RI, Iannettoni MD, Burdick MD, Wilke CA, Morris SB, Glass MC, DiGiovine B, Kunkel SL, Strieter RM. The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1997; 159: 1437-1443.

Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick ND, Xu Zi, Xure YY, Strieter Rm. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol* 1999; 163:5686-5692.

King TE Jr., Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 1025-1032.

King TE, Tooze JA, Cherniak R.M. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 1171-81.

Kuhn C, Boldt J, king TE Jr, Crouch E, Vartio T, McDonald JA, An Immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *An Rev Respir Dis* 1989; 140: 1693-1703.

Kuhn C. McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991; 138: 1257-1265.

Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, Sasaki H. Anticoagulant Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2005 ;128:1475-1482

Latsi PI, Du Bois M. R, Nicholson AG, Colby TV, Bisirtzoglou D, Nikolakopoulou A, Veeraraghavan S, Hansell DM, Wells AU. Fibrotic Idiopathic Interstitial Pneumonia. The prognostic value of longitudinal functional trends. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 531-537.

Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett SD, Armad S, Shorr AF. Prevalence and outcomes of pulmonary hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2006;129:746-52.

Liebow AA and Carrington CB. The interstitial pneumonias. In *Frontiers of Pulmonary Radiology*. M. Simon, E. J. Potchen, and M. LeMay, editors. Grune and Stratton Inc, New York 1969; pp 102-141.

Luscinskas FW, Gimbrone MA. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med* 1996;47: 413-21.

Marciniuk DD, Gallagher CG. Clinical exercise testing in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* 1994; 15: 287-303.

Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG. Exaggerated spontaneous release of platelet derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1987; 317: 202-209.

Mathielson JR, Mayo JR, Staples CA, Muller NL. Chronic diffuse infiltrative lung disease: comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Radiology* 1989; 171:111-6.

Michaelson JE, Aguayo SM, Roman J. Idiopathic pulmonary fibrosis: a practical approach for diagnosis and management. *Chest* 2000;118:788-94

Muller NL, Colby TV. Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic finding. *Radiographics* 1997; 17: 10016-1022.

Myers JL, Katzeinstein AL. Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia. *Chest* 1988; 94: 1309-1311.

Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Upregulation of platelet –derived growth factor. A and –B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin Invest* 1990; 85:2023-2027.

Nakao A, Hasegawa Y, Tsuchiya Y, Shimokata K. Expression of cell adhesion molecules in the lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1995; 108: 233-39.

Nava S, Rubini H. Lung and chest wall mechanisms in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1999;54:390-5.

Nicholson AG, Fulford LG, Cobby TV, Du Bois RM, Hansell DM, Wells AU. The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis *Am Respir Crit Care Med* 2002; 166: 173-7.

Noble PW, Homer RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis. *Clin Chest Med* 2004; 25: 740-758.

Panos, R.J., R. Mortenson, S A. Nicli, and T. E. King Jr. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.: causes and assessment. *Am J. med* 1990.88:396-404.

Peao MND, Aguas AP, DeSa CM, Grande NR. Neoformation of blood vessels in association with rat lung fibrosis induced by bleomycin. *Anat Rec* 1994; 238: 57-67.

Pereira CAC, Barreto SP, Simões JG, Pereira FWL, Gestler JG, Nakatani J. Valores de referência para espirometria em uma amostra da população brasileira adulta. *J Peumol* 1992;18:10-22.

Rom WN, Bitterman PB, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1429-1434.

Rubin EH, Lubliner R. The Hamman Rich syndrome: review of the literature and analysis of 15 cases. *Medicine* (Baltimore) 1957; 36: 297-463.

Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, Veeraraghaven S, Bishop A E, Romanska HM, Pantelidis P, Black CM, Du Bois RM. Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 438-443.

Selman M, King T, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134:136-151.

Sheridan LA, Harrison JH Jr. Divertie MB. The current status of idiopathic pulmonary fibrosis (Hamman-Rich Syndrome). *Med Clin North Am* 1964; 48: 993 -1010.

Schofield NM, Davies RJ, Cameron IR, Green M. Small airways in fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis*; 113:729-735.

Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J respir Crit Care Med* 1994; 149:450-454.

Simler NR, Brencheley PE, Horrocks AW, Greaves SM, Hasleton PS, Egan JJ. Angiogenic Cytocines in pacientes with idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax* 2004; 59:581-585

Strieter RM. Pathogenesis and Natural History of Usual Interstitial Pneumonia. The Whole Story or the Last Chapter of a Long Novel. *Chest* 2005;128: 526S-532S.

Tung K.T., AU. Wells, M.B. Rubens, J.M. Kirk, R.M. du Bois, D.M. Hansell. Accuracy of the typical computed tomographic appearances of fibrosing alveolitis. *Thorax* 1993;48:334-338.

Tukiainen P. Taskinen E, Hosti P. Korhola O, Valle M. Prognosis of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1983;38:349-355.

Turner-Warwick M. Precapillary systemic–pulmonary anastomoses. *Thorax* 1963; 18: 225-237.

Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A. Cryptogenic fibrosing alveolitis: Clinical features and their influence on survival. *Thorax* 1980; 35: 171-180.

Van Dinther-Hanssen A. C. H. M, Maarsseveen Van T. C. M. TH, Eckert H. Newman W,. and Meijer C. J. L. M. Identical Expression of elam-1, VCAM-1, and ICAM-1 in sarcoidosis and usual interstitial pneumonitis. *Journal of Pathohology* 1993; 170: 157-164.

Verma S, Anderson T. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.

Witschi H, Haschek WM, Meyer KR, Ullrich RI, Dalley WE. A pathogenetic mechanism in lung fibrosis. *Chest* 1980; 78: 395-399.

Wiebe BM, Laursen H. Lung morphometry by unbiased methods in emphysema: bronchial and blood vessel volume, alveolar surface area and capillary length. *APMIS* 1998; 106 (6):651-656.

Yamauchi K, Martinet Y, Basset P, Fells GA, Crystal RG. High levels of transforming growth factor-beta are present in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1360-1363