

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

SABRINA SETEMBRE BATAH

**Perfil transcriptômico das áreas miofibroblásticas
centradas em vias aéreas como potencial biomarcador
das pneumonias intersticiais bronquiocêntricas**

ABORDAGEM TRANSICIONAL PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Ribeirão Preto - SP

2022

SABRINA SETEMBRE BATAH

**Perfil transcriptômico das áreas miofibroblásticas
centradas em vias aéreas como potencial biomarcador
das pneumonias intersticiais bronquiocêntricas**

ABORDAGEM TRANSICIONAL PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Área de concentração: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro

Ribeirão Preto - SP

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Batah, Sabrina Setembre

Perfil transcriptômico das áreas miofibroblásticas centradas em vias aéreas como potencial biomarcador das pneumonias intersticiais bronquiocêntricas: Abordagem Transicional Para Diagnóstico Molecular. Ribeirão Preto, 2022.

95 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia. Orientador: Fabro, Alexandre Todorovic.

1. Pneumonite intersticial bronquiocêntrica. 2. Doença intersticial pulmonar. 3. Omics. 4. Transcriptoma; 5. Biomarcadores.

Nome: BATAH, Sabrina Setembro

Título: Perfil transcriptômico das áreas miofibroblásticas centradas em vias aéreas como potencial biomarcador das pneumonias intersticiais bronquiocêntricas: Abordagem Transicional Para Diagnóstico Molecular.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Pulmonar do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Bolsa N° 2019/19591-5) e (Auxílio Pesquisa N°2019/01517-3); da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Proc. N°1988/2019); e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (agradecimento obrigatório conforme Portaria N° 206, de 4 de setembro de 2018).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes com doença pulmonar intersticial. Espero que os resultados desta pesquisa e de todas as outras publicadas a este respeito, contribuam para uma melhor qualidade de vida desses pacientes.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Karina e Toni por todo o amor que sempre tiveram por mim. Obrigada pelo apoio e suporte em cada decisão da minha vida e pelos sábios conselhos.

Ao meu namorado Lipe, por estar sempre ao meu lado e por me incentivar em todas as minhas escolhas. Obrigada pelos momentos de risada, amor e aprendizado.

À minha família e aos pais do Lipe por todo o amor e suporte; e aos meus queridos avós, que me protegem à distância.

Às minhas irmãs de coração, Marcela e Gabriela, por todas as risadas e momentos que vivemos juntas por todos esses anos. Agradeço também às minhas amigas Lolla e Giulia, por toda a amizade e parceria.

Aos amigos que o Departamento de Patologia me apresentou, em especial à Janaina e Bruna. Obrigada por todas as experiências vividas, momentos compartilhados e pelas trocas de aprendizado profissional e pessoal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Fabro. Muito obrigada por todos os ensinamentos desde a minha primeira Iniciação Científica. Obrigada por sempre me ajudar com disposição e por contribuir na minha formação como pessoa e pesquisadora. Você tem e sempre terá minha admiração.

Aos membros da banca examinadora, que prontamente aceitaram o convite de participar de um momento tão esperado e especial para mim, a defesa do meu trabalho de Mestrado.

À USP, principalmente aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP, por todo o suporte nos momentos em que precisei.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do meu projeto (2019/19591-5).

E por fim, à todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização desta dissertação.

EPÍGRAFE

*“Find your own dream! Keep this dream and take good care of it”, Koichi
Tanaka, ganhador do prêmio Nobel de química, 2002.*

RESUMO

RESUMO

Batah SS. “Perfil transcriptômico das áreas miofibroblásticas centradas em vias aéreas como potencial biomarcador das pneumonias intersticiais bronquiocêntricas: Abordagem Transicional Para Diagnóstico Molecular.” Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2021.

As doenças pulmonares intersticiais são um grande grupo heterogêneo de distúrbios que causam remodelamento do interstício pulmonar com diferentes padrões de lesão. Dentre esses padrões, destaca-se a pneumonite intersticial bronquiocêntrica, a qual é definida por um remodelamento fibrótico predominantemente bronquiocêntrico, relacionado a diferentes etiologias, como microaspiração crônica (ASP) de conteúdo alimentar/gástrico e pneumonite de hipersensibilidade (PH) por antígenos inalados. Apesar da causa inicial da lesão diferir entre estas etiologias, muitas vezes os achados clínicos, radiológicos e histopatológicos não permitem um diagnóstico etiológico preciso, afetando drasticamente no manejo e prognóstico desses pacientes. Desta forma, este projeto estudou o perfil molecular das áreas de lesão, onde o mecanismo específico inicial está presente, afim de validar biomarcadores para o diagnóstico translacional. Para isto, uma minuciosa análise dos dados clínicos e radiológicos e histopatológicos foi realizada, além do transcriptoma do tecido pulmonar de pacientes com ASP e PH. A integração dos dados com o perfil transcriptômico dos pacientes evidenciou alguns clusters gênicos relacionados à específicos processos fisiopatológicos de cada etiologia, destacando uma up-expressão de genes relacionados à colágeno e proteção das células epiteliais bronquiolares no grupo ASP. Ademais, os dados apresentados demonstraram, para estes pacientes, uma maior lesão fibrosante com extenso remodelamento parenquimatoso com quadro pulmonar restritivo e pior prognóstico. Assim, a microaspiração crônica do conteúdo oral/gástrico pode modificar o perfil transcriptômico, sendo responsável pelo pior quadro fibrosante. Estas descobertas possibilitam uma melhor acurácia diagnóstica para o tratamento específico da ASP e PH, possibilitando um melhor manejo clínico.

Palavras chaves: Pneumonite intersticial bronquiocêntrica; Doença intersticial pulmonar; Omics; Transcriptoma; Biomarcadores.

ABSTRACT

Batah SS. "Transcriptomic profile of airway-centered myofibroblast areas as a potential biomarker of bronchiolocentric interstitial pneumonias: Transitional Approach to Molecular Diagnosis." Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School; 2021.

Interstitial lung diseases are a large heterogeneous group of disorders that cause interstitial lung remodeling with different injury patterns. Among these patterns, bronchiolocentric interstitial pneumonitis is defined by a predominantly bronchiolocentric fibrotic remodeling, related to different etiologies, such as chronic microaspiration (ASP) of food/gastric content and hypersensitivity pneumonitis (HP) by inhaled antigens. Although the initial cause of the lesion differs between these etiologies, clinical, radiological, and histopathological findings often do not allow a precise etiological diagnosis, drastically affecting the management and prognosis of these patients. Thus, this project studied the molecular profile of the lesion areas, where the initial specific mechanism is present, in order to validate biomarkers for translational diagnosis. Thus, a detailed analysis of clinical, radiological, and histopathological data was performed, in addition to the transcriptome of lung tissue from patients with ASP and HP. The data integration with the transcriptomic profile of patients evidenced some gene clusters related to specific pathophysiological processes of each etiology, highlighting an up-expression of genes related to collagen and protection of bronchiolar epithelial cells in the ASP group. Furthermore, the data presented demonstrated, for these patients, a greater fibrosing lesion with extensive parenchymal remodeling, with restrictive pulmonary characteristics and worse prognosis. Thus, chronic microaspiration of oral/gastric content can modify the transcriptomic profile, which is responsible for the worst fibrous condition. These findings enable a better diagnostic accuracy for the specific treatment of ASP and PH, improving the clinical management.

Key-words: Bronchiolocentric interstitial pneumonitis; Interstitial lung disease; Omics; Transcriptome; Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação dos componentes celulares de um alvéolo pulmonar.	19
Figura 2 – Representação esquemática do processo fisiopatológico da microaspiração crônica.	25
Figura 3 - Representação esquemática do processo fisiopatológico da pneumonite de hipersensibilidade.	27
Figura 4 - Esquema da etiologia dos biomarcadores diagnósticos.	34
Figura 5 – Atributos histopatológicos observados nas BPCs dos 12 pacientes do trabalho, destacando 9 termos nomeados pelo nosso grupo de pesquisa.	38
Figura 6 - Extração de RNA de amostra parafinada e análise da quantidade e qualidade do RNA extraído.	39
Figura 7 – Construção da biblioteca de RNA.	40
Figura 8 - Sequenciamento de nova geração.	41
Figura 9 - Curva de sobrevida Kaplan-Meier.	45
Figura 10 – Principais atributos histopatológicos observados nos grupos ASP e PH.	51
Figura 11 – Principais atributos histopatológicos observados nos pacientes do grupo ASP.	53
Figura 12 – Principais atributos histopatológicos observados nos pacientes do grupo PH.	54
Figura 13 – Resultados do BioAnalyzer para RNA extraído com análise do RIN e DV200.	55
Figura 14 - Resultados do BioAnalyzer para cDNA amplificado.	56
Figura 15 - Resultados iniciais do RNA-Seq.	58
Figura 16 - Gráfico de vulcão mostrando genes diferencialmente expressos entre os grupos ASP e PH.	61
Figura 17 – Resultados iniciais do RNA-Seq.	62
Figura 18 - Análises adicionais ao RNA-Seq.	64
Figura 19 - Clusterização hierárquica dos dados clínicos e da prova de função pulmonar.	66
Figura 20 - Clusterização hierárquica dos atributos radiológicos.	67
Figura 21- Clusterização hierárquica dos atributos histopatológicos.	68
Figura 22 - Clusterização hierárquica dos atributos rádio e histopatológicos.	69
Figura 23 - Clusterização hierárquica dos atributos histopatológicos com diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos e transcriptoma total.	71
Figura 24 - Clusterização hierárquica dos atributos histopatológicos com diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos e 28 genes selecionados.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atributos histopatológicos da ATS/ERS/JRS/ALAT, modificado(18).	29
Tabela 2 – Principais dados dos 63 pacientes com DPI em padrão PIB.	42
Tabela 3 – Dados demográficos e clínicos dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.	44
Tabela 4 Valores obtidos da prova de função pulmonar dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.	45
Tabela 5 – Atributos avaliados nas TCAR dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.	46
Tabela 6 – Achados histopatológicos dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.	49
Tabela 7- Resultados da análise de quantidade e qualidade do RNA extraído de cada amostra.	55
Tabela 8 – Normalização das amostras para 2nM.	57
Tabela 9 – Top 100 genes diferencialmente expressos entre ASP e PH.	59

LISTA DE ABREVIações

MEC: Matriz extracelular;
DPI: Doença pulmonar intersticial;
AFC: Alveolite fibrosante criptogênica;
PIU: Pneumonia intersticial usual;
BOOP: Bronquiolite obliterante com pneumonia em organização;
PID: Pneumonia intersticial descamativa;
PIL: Pneumonia intersticial linfocítica;
PINE: Pneumonia intersticial não específica;
POC: Pneumonia em organização criptogênica;
FPI: Fibrose pulmonar idiopática;
ATS: *American Thoracic Society*;
ERS: *European Respiratory Society*;
JRS: *Japanese Respiratory Society*;
ALAT: *Latin American Thoracic Society*;
PIB: Pneumonite intersticial bronquiocêntrica;
PH: Pneumonite de hipersensibilidade;
ASP: Microaspiração crônica;
PO: pneumonia organizante;
DRGE: doença do refluxo gastroesofágico;
 α -SMA: Alfa-actina de músculo liso;
TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta;
MHC: Complexo de histocompatibilidade;
MDD: Reunião multidisciplinar;
TCAR: Tomografia computadorizada de alta resolução;
PII: Pneumonia intersticial idiopática;
HCRP: Hospital das Clínicas;
FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;
USP: Universidade de São Paulo;
SERPAT: Serviço de Patologia;
BPC: Biópsia pulmonar cirúrgica;
PFP: Prova de função pulmonar;
CVF: Capacidade vital forçada;

VEF1: Volume expiratório forçado no primeiro segundo;
CPT: Capacidade pulmonar total;
DLCO: Difusão pulmonar para o monóxido de carbono;
RNA-Seq: Sequenciamento de RNA;
SNG: Sequenciamento De Nova Geração;
DAD: Dano alveolar difuso;
FEPP - Fibroelastose pleuroparenquimatosa;
RIN: Número de integridade do RNA;
PB: Pares de base;
PCA: Análise de Componentes Principais;
GO: Gene Ontology;
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

SUMÁRIO

1.1 MORFOLOGIA PULMONAR	18
1.2 AS DOENÇAS PULMONARES INTERSTICIAIS	20
1.3 PRINCIPAIS ETIOLOGIAS RELACIONADAS À PIB.....	23
1.3.1 MICROASPIRAÇÃO CRONICA.....	23
1.3.2 PNEUMONITE DE HIPERSENSIBILIDADE	25
2. INTRODUÇÃO	31
3. HIPÓTESE	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 OBJETIVO GERAL.....	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5. METODOLOGIA.....	35
5.1 Comitê de Ética.....	35
5.2 Desenho do Estudo e Pacientes	35
5.3 Revisão Clínica	35
5.4 Revisão Tomográfica	36
5.5 Avaliação Histológica	36
5.6 Análise Molecular – Transcriptoma.....	38
5.6.1 Extração de RNA.....	39
5.6.2 Sequenciamento de Nova Geração	40
5.6.3 Bioinformática Integrada.....	41
5.7 Análise Estatística	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Revisão Clínica	42
6.2 Revisão Tomográfica	46
6.3 Avaliação Histopatológica	47
6.4 Análise Molecular – Transcriptoma.....	54
6.4.1 Extração de RNA e Sequenciamento de Nova Geração	54
6.4.2 Bioinformática do RNA-Seq	57
6.5 Clusterização dos dados	64
7. DISCUSSÃO.....	73
8. CONCLUSÃO	81
9. PRESPECTIVAS FUTURAS.....	81
10. REFERÊNCIAS.....	81
11. ANEXO A:	92

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 MORFOLOGIA PULMONAR

Em biologia, o conceito de forma e função é altamente difundida. De acordo com este tema, a estrutura de uma proteína, célula ou órgão determina a função que ela irá desempenhar no sistema biológico. Com isto em mente, compreendemos que a morfologia pulmonar, mais especificamente suas células, organizações celulares e estruturas, se dá de maneira bem delimitada para cumprir uma função específica: transporte de moléculas de oxigênio do ar para as células sanguíneas, e moléculas de dióxido de carbono no sentido contrário; em outras palavras, respiração.

A caracterização da morfologia pulmonar começou no século XVII, quando Malpighi demonstrou que a traqueia terminava em filamentos brônquicos (1). Esse começo e juntamente à realização de alguns experimentos, a delicada macro e micro estrutura pulmonar foi tomando forma, resultando no que sabemos hoje. O início da respiração se dá pela traqueia que se bifurca em brônquios primários direito e esquerdo (2). À medida que eles avançam, os brônquios ramificam-se continuamente, dando origem aos brônquios secundários e terciários (2). Partindo do pressuposto que a forma determina a função, essas sucessivas divisões modificam a estrutura e organização celular dos brônquios, dando origem à uma nova estrutura: os bronquíolos, que por sua vez, ramificam-se em bronquíolos terminais e respiratórios. Essas modificações incluem diminuição gradativa de comprimento e diâmetro; ausência de cartilagem, presente também na traqueia, que proporciona suporte e rigidez; ausência de glândulas submucosas; e ausência de células epiteliais ciliadas pseudo-estratificadas com células caliciformes, responsáveis pela liberação de muco, configurando filtragem do ar e proteção (2). Portanto, os bronquíolos que agora possuem mais especificamente a função de transporte de ar e para tanto necessitam de mais mobilidade para expansão e contração durante a respiração, são agora circundados por células do músculo liso e fibras elásticas, e revestidos por células epiteliais simples com células da Clara, as quais secretam proteínas, glicoproteínas, lipídeos e enzimas, que funcionam como um surfactante e impedem o colapamento pulmonar (2, 3).

Por fim, os bronquíolos respiratórios ramificam-se mais distalmente em ductos alveolares, que por sua vez originam os alvéolos pulmonares, que podem estar agrupados em sacos alveolares (1). Essa estrutura está organizada de forma que alvéolos adjacentes são divididos por paredes alveolares, formando o septo intraalveolar. Eles são delicadamente compostos por duas finas camadas de células epiteliais, separadas por uma região de espaço virtual de tecido conjuntivo amorfo composta por uma rede de macromoléculas que foram a matriz extracelular (MEC) (fibras elásticas, feixes de colágeno, proteoglicanos, fibroblastos, dentre outras) sendo amplamente reconhecida por interstício, permeado por inúmeros capilares sanguíneos (Figura 1) (4). Mais especificamente, o septo é composto por 3 principais tipos celulares: 1) capilares sanguíneos, constituído de pequenas células endoteliais; 2) pneumócito tipo I, célula epitelial; e 3) pneumócito tipo II, célula epitelial, que secretam substâncias com função de surfactante (4). Assim, essa fina arquitetura tem a função de realizar as trocas gasosas entre oxigênio e dióxido de carbono.

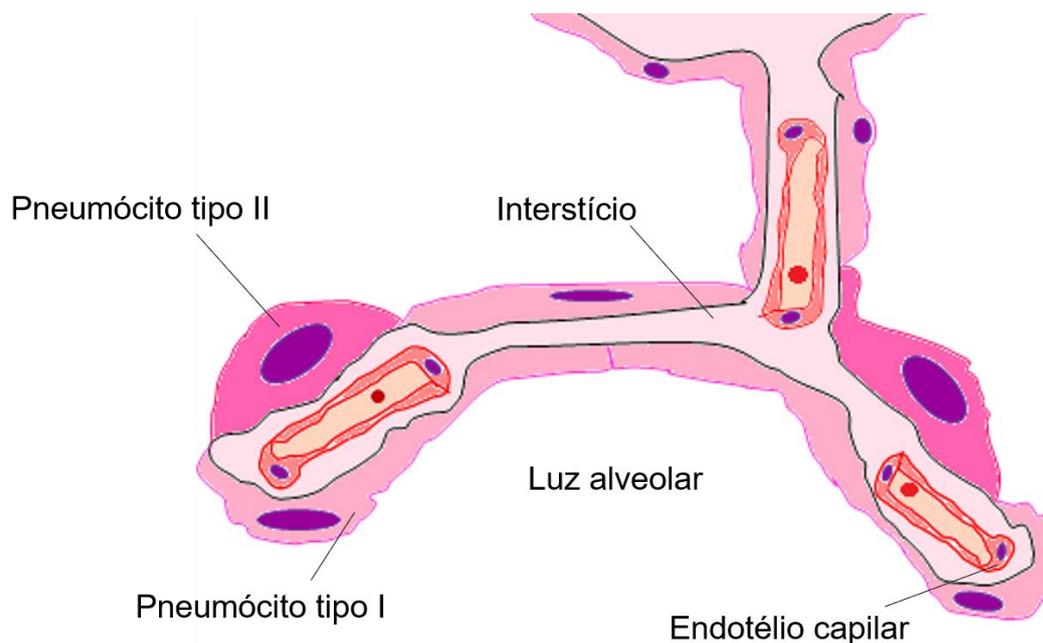


Figura 1 - Representação dos componentes celulares de um alvéolo pulmonar. Os alvéolos são ramificações distais dos bronquíolos respiratórios, constituídos por dois tipos de células epiteliais (pneumócito tipo I e II) que são separados por um tecido conjuntivo amorfo composto por proteínas da matriz extracelular, reconhecido por interstício, com pequenos capilares entremeando o tecido.

Toda essa delicada estrutura distal pulmonar gira em torno do interstício pulmonar, por intermediar a difusão celular. Desta forma, qualquer injúria que promova uma alteração nessa estrutura, prejudica diretamente as trocas gasosas, implicando clinicamente em disfunção da respiração. Mais especificamente, nas patologias pulmonares que envolvem lesão direta do interstício pulmonar, inúmeros processos fisiopatológicos são ativados que em última análise, muitas vezes resultam em cicatrização do tecido pulmonar lesionado. Independente de uma cicatrização bem sucedida ou não, a arquitetura do parênquima pulmonar é alterada pela fibrose, resultando em remodelamento pulmonar (5). Além da lesão direta no interstício pulmonar, as lesões nas células epiteliais bronquiolares também podem afetar as trocas gasosas de forma indireta. Nos casos em que há remodelamento fibrótico subepitelial bronquilar secundário à lesão nessas células, a cicatrização deste tecido muitas vezes o enrijece, causando tração nos septos alveolares e conseqüentemente resultando em alterações. Estas podem ser dilatação dos brônquios, rompimento dos sacos alveolares ou cicatrização intensa dos septos alveolares, muitas vezes resultando em espessamento por fibrose do interstício alveolar. Dessa forma, aquele delicado interstício pulmonar compreendido entre as duas membranas basais do pneumócito e do capilar teve sua estrutura alterada, muitas vezes com espessamento intersticial, refletindo diretamente na difusão gasosa, como é o caso das doenças pulmonares intersticiais (DPI).

1.2 AS DOENÇAS PULMONARES INTERSTICIAIS

As DPIs foram um grande grupo heterogêneo de distúrbios pulmonares caracterizados por lesões no interstício pulmonar. A maioria delas são consideradas lesões fibro-proliferativas com demarcada deposição de componentes da MEC que em última análise resultam na distorção ou remodelamento do parênquima pulmonar por fibrose (6). Diferentes mecanismos fisiopatológicos podem ser ativados para resultar na fibrose pulmonar, a depender da causa desse estímulo injuriante. Portanto, muitas etiologias são classificadas como DPIs.

O que se sabe hoje a respeito dessas doenças foi derivado de inúmeras descrições e descobertas científicas ao longo dos últimos dois séculos. Com isso, diferentes terminologias e classificações foram atribuídas às DPIs, sendo

muitas vezes a causa de mal entendimento ou mal interpretação dessas doenças. Historicamente, a primeira descrição sobre fibrose pulmonar foi, possivelmente, feita por Von Buhl (7) em 1872 em que foi reportado casos de pneumonia descamativa e pneumonia intersticial crônica com células fusiformes e estreladas e excesso de tecido conjuntivo. Deste ano até meados de 1960, outros relatos foram reportados, porém com diferentes termos, como: cirrose do pulmão (8), síndrome de Hamman-Rich (9) e alveolite fibrosante criptogênica (AFC) (8). Simultaneamente às descrições e classificações, pesquisadores da época investigavam possíveis tratamentos farmacológicos. Medicamentos à base de corticoides foram os primeiros a serem recomendados em pacientes com DPIs (8). Contudo muitos estudos na época demonstraram que apenas alguns pacientes apresentavam melhora com o uso deste medicamento (10), a depender da classificação da doença intersticial.

A partir de 1968, as classificações das DPIs que conhecemos hoje começaram a surgir quando Liebow and Carrington (11) introduziram o termo pneumonia intersticial usual (PIU) e descreveram a bronquiolite obliterante com pneumonia em organização (BOOP), dano alveolar difuso, pneumonia intersticial descamativa (PID), pneumonia intersticial linfocítica (PIL) e pneumonia intersticial de células gigantes. Na década de 70, a doença clínica associada à PIU foi chamada de AFC ou idiopática (8). Cerca de 25 anos mais tarde, a primeira classificação radio-patológica foi publicada em 1997, possibilitada pelo uso mais recorrente de tomografias computadorizadas e biópsias transbrônquicas (8), classificando as DPI idiopáticas em: 1) PIU; 2) pneumonia intersticial aguda, PID, pneumonia intersticial não específica (PINE) e BOOP/pneumonia em organização criptogênica (POC) (12). Em 1998, Katzenstein e Myers (13) descreveram atributos patológicos para as classificações propostas no ano anterior, podendo ser um considerado um marco na história das DPIs visto que essa descrição possibilitou a definição da fibrose pulmonar idiopática (FPI), a DPI com maior casuística nos países desenvolvidos (14) e com pior prognóstico, sobrevida de 3 a 5 anos (15). Com isto, no início do século XXI, a *American Thoracic Society* (ATS) e *European Respiratory Society* (ERS) (16) publicaram um consenso internacional classificando as DPIs em padrões histo-radiológicos e determinando diretrizes para o manejo clínico dos pacientes, incluindo possibilidades de tratamento. Ao longo dos anos, outras

classificações e diretrizes foram propostas pela ATS/ERS juntamente com *Japanese Respiratory Society* (JRS) e *Latin American Thoracic Society* (ALAT) (6, 15). Na diretriz mais recente de 2018 (17), atributos radio-histológicos mais específicos foram descritos baseando-se no padrão PIU, sendo: 1) PIU; 2) possível PIU; 3) indeterminado para PIU; 4) diagnóstico alternativo. Além das classificações das DPIs, o tratamento dessas doenças também sofreu atualizações e avanços, como a introdução do uso de fármacos antifibróticos. Diversos trabalhos demonstraram efeitos positivos de antifibróticos como pirfenidona (18-20) e nintedanibe (21, 22) em pacientes com FPI/PIU. Esta eficácia dos antifibróticos favoreceu a recente aprovação, pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos, do nintedanibe para tratamento de DPI fibrosante e associada a esclerose sistêmica (23).

Paralelamente à tradicional classificação das DPIs tendo o padrão PIU como referência, um outro tipo de padrão de lesão foi descrito pela primeira vez em 2002, e desde então tem ganhado destaque na literatura. Chamado pela primeira vez como pneumonia intersticial bronquiocêntrica idiopática, Yousem e Dacic (24) descreveram achados histopatológicos em pacientes com DPI como lesões intersticiais com remodelamento fibrosante de origem central nos lóbulos pulmonares (centrilobular) e em torno do bronquíolo e eixo broncovascular (bronquiocêntrica). No mesmo ano, de Carvalho et al (25) relataram alterações no parênquima pulmonar de maneira bronquiocêntrica em 12 de 49 pacientes com DPI, nomeando como fibrose centrilobular. Dentre os atributos histopatológicos descritos, destacam-se foco fibroblástico e remodelamento do espaço aéreo. Dois anos depois, Churg et al (26) também descreveram achados histopatológicos de remodelamento fibrosante dos bronquíolos e/ou das vias aéreas maiores, atribuindo como causa a deposição de MEC pelos focos fibroblásticos, nomeando-a de fibrose intersticial centrada nas vias aéreas. A partir disso, muitos outros trabalhos foram publicados relatando lesões pulmonares com o mesmo comportamento descrito primeiramente por Yousem e Dacic (24): lesões fibrosantes intersticiais na região do eixo broncoalveolar, com padrão bronquiocêntrico (27-29).

Este padrão histopatológico de lesão, aqui chamado de pneumonite intersticial bronquiocêntrica (PIB), possui um melhor prognóstico comparado a IPF/PIU, com média de 10 anos de sobrevida segundo Kuranishi et al (30). Além

disso, ele pode estar relacionado à algumas das diversas etiologias das DPIs, mas principalmente à pneumonite de hipersensibilidade (PH), microaspiração crônica (ASP), pacientes com diagnóstico clínico de doenças autoimunes e doenças neurológicas, de causa idiopática, entre outras.

1.3 PRINCIPAIS ETIOLOGIAS RELACIONADAS À PIB

O padrão PIB se forma em consequência aos processos fisiopatológicos da lesão inicial. Portanto, a depender do tipo de lesão e dos processos fisiológicos subsequentes, o processo cicatricial de deposição de MEC e futuro remodelamento intersticial se dão em regiões específicas do tecido pulmonar. No momento da biópsia cirúrgica, que muitas vezes acontece mais tardiamente ao início da lesão, o remodelamento pulmonar encontra-se, nesses casos, de maneira bronquiocêntrico e centrilobular. Portanto, encontrar a causa inicial que levou à este fim é de fundamental importância para um manejo e tratamento adequado. Dentre as possíveis etiologias que possam atribuir a um padrão de fibrose centrada nas vias aéreas, duas serão abordadas neste trabalho: 1) Microaspiração crônica (ASP); e 2) Pneumonite de hipersensibilidade (PH).

1.3.1 MICROASPIRAÇÃO CRONICA

O termo aspiração é usado para referir a inalação de conteúdo oral, alimentar ou gástrico (31), variando entre a quantidade de material aspirado e frequência. Quando a aspiração apresenta-se de forma aguda, o quadro é chamado clinicamente por pneumonia aspirativa, caracterizado por uma resposta inflamatória aguda nos pulmões (31). Por outro lado, alguns pacientes podem apresentar um quadro mais crônico devido a uma aspiração assintomática, induzindo uma pneumonia organizante (PO) e uma resposta inflamatória intersticial crônica fibrosante, sendo reconhecida por microaspiração crônica (ASP) (32). Algumas comorbidades podem facilitar a ocorrência de ASP, como doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), hernia de hiato e até mesmo doenças neurológicas e reumatológicas como esclerose sistêmica. Em 56% dos casos de Kuranishi et al (30), a DRGE foi reportada e refluxo anormal em 75% dos pacientes, associados a metaplasia peribronquiolar em padrão de lesão bronquiocêntrico; Sinais e sintomas consistentes com DRGE foram descritos por todos os pacientes clinicamente diagnosticados com ASP pelo nosso grupo

de pesquisa, conforme Fabro et al (27), além da presença histopatológica de focos fibroblásticos, alfa-actina de músculo liso (α -SMA)+ e depósito de fibras de colágeno no eixo broncovascular; Ademais, nosso grupo demonstrou por análise proteômica, proteínas do esôfago e de origem animal e vegetal provenientes do conteúdo basofílico intraluminal de pacientes clinicamente diagnosticados com ASP, reforçando a microaspiração do conteúdo oral/gástrico como causa da lesão de padrão PIB em Batah et al (28); Ademais, pacientes com esclerose sistêmica que apresentavam envolvimento pulmonar demonstraram histologicamente distribuição de lesão bronquioloocêntrica com conteúdo intraluminal bronquiolar, de acordo com Souza et al (33). Nesses casos, a ASP apresenta-se clinicamente de forma lenta e progressiva, de difícil identificação e os sintomas comumente associados à ela são tosse, dispneia e opacidades no pulmão em exames de imagem (31).

Conforme mencionado anteriormente, entender o mecanismo de lesão e seu processo fisiopatológico é fundamental para compreender os achados histopatológicos na biópsia pulmonar cirúrgica. A ASP possui um resultado final de lesão bronquiolocêntrica, ou PIB, devido à lesão direta nas células epiteliais bronquiolares pelas micropartículas aspiradas, muitas vezes sob alterada acidez (34) (Figura 2A). De carvalho et al (25) descreveram dano nas células epiteliais bronquiolares e conteúdo intraluminal basofílico em possível associação com microaspiração crônica. A constante lesão nessas células resulta em necrose de coagulação com consequente liberação de mediadores inflamatórios culminando na quimiotaxia neutrofílica (Figura 2B-C). Em um segundo momento, uma resposta inflamatória crônica é induzida por macrófagos e linfócitos. A longo prazo, uma resposta reparativa começa a se formar com hiperplasia das células epiteliais bronquiolares, neovascularização e o aumento da proliferação fibroblástica (34) (Figura 2D). Assim, a partir do estímulo do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) liberado pelo desarranjo da MEC, fibroblastos são ativados em miofibroblastos para secretar seus componentes resultando em fibrose (Figura 2E). Por tratar-se de uma lesão crônica, todo esse processo fisiopatológico repete-se continuamente, tendo início na região subepitelial bronquiolar, culminando em uma intensa proliferação de miofibroblastos e proeminente deposição de MEC mixóide, reconhecida por foco

fibroblasto, que eventualmente pode estender-se pelo interstício septal (Figura 2F).

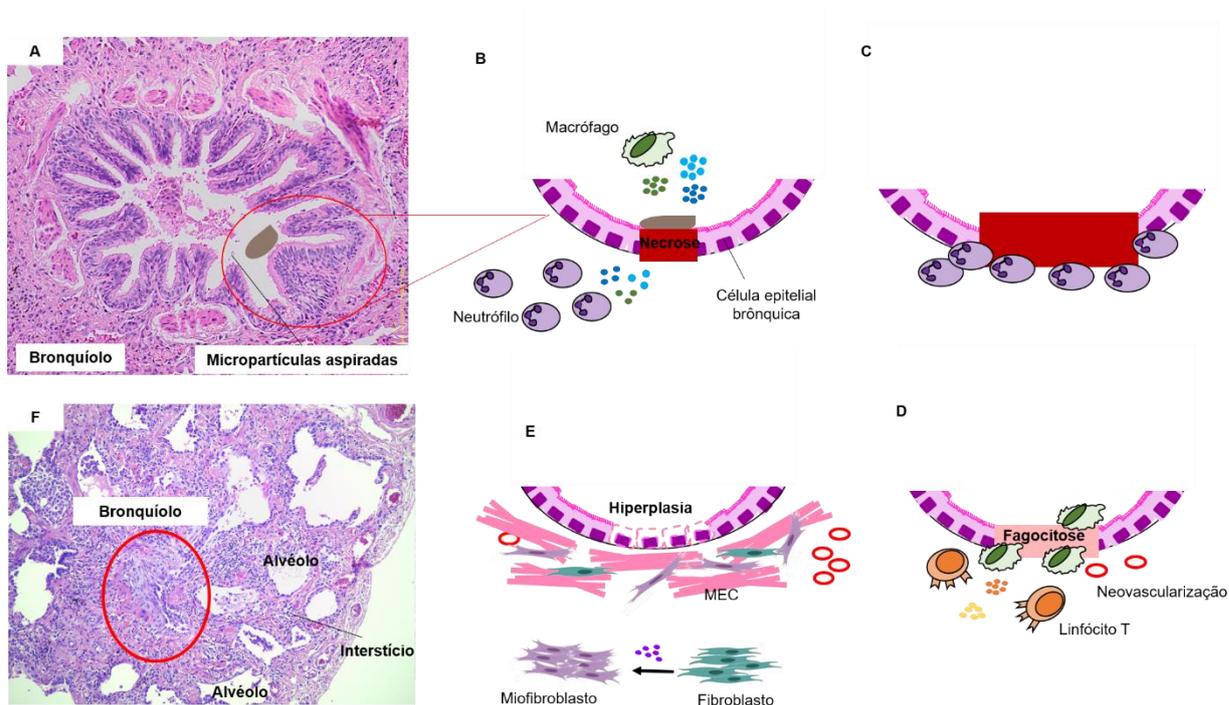


Figura 2 – Representação esquemática do processo fisiopatológico da microaspiração crônica. As micropartículas aspiradas lesionam as células epiteliais bronquiolares (A) desencadeando, em um primeiro momento, uma resposta inflamatória, com liberação de citocinas próinflamatórias (B) e quimiotaxia neutrofílica (C). Subsequentemente, macrófagos e linfócitos participam dessa resposta inflamatória e uma resposta reparativa se inicia com tecido de granulação (D). O TGF- β presente no meio estimula a proliferação miofibroblástica, que por sua vez deposita proteínas da MEC (E), resultando em uma fibrose com remodelamento parenquimatoso a longo prazo, extendendo-se dos bronquíolos ao interstício pulmonar (F).

1.3.2 PNEUMONITE DE HIPERSENSIBILIDADE

Pneumonite de hipersensibilidade (PH) é uma reação imunomediada (de hipersensibilidade tipo III e IV) em indivíduos mais geneticamente susceptíveis, relacionado principalmente a polimorfismos na região genômica do complexo principal de histocompatibilidade (35). A PH acontece como resposta à exposição e inalação de antígenos, que podem ser origem orgânica e não orgânica, como fungos, mofo, bactérias, proteínas de origem animal, tintas, poeira de giz, entre outros (36). Esta doença pode apresentar-se de forma aguda, subaguda ou crônica: Na forma aguda, uma reação inflamatória é ativada em resposta a uma intensa exposição a um antígeno, que horas depois apresenta-se clinicamente com febre, dispneia e tosse (36). O término da

exposição ao antígeno provoca uma melhora rápida no paciente, diminuindo ou cessando os sintomas; A forma subaguda ocorre durante semanas ou alguns meses em pacientes expostos continuamente ao antígeno, apresentando clinicamente com febre, fadiga e até perda de peso (36); E a forma crônica acontece silenciosamente após continua exposição ao antígeno responsável, sem apresentar sintomas agudos. Nesses pacientes, a exposição prolongada causa, além de uma resposta inflamatória, um maior dano tecidual com consequente fibrose intersticial e é caracterizado clinicamente como uma doença de progressão lenta (36).

Diferente da ASP, a PH é uma doença mais já reconhecida há séculos. Acredita-se que o primeiro relato dessa doença foi em 1713, no qual Bernardino Ramazzini relatou a ocorrência de dispneia e edema em trabalhadores de grãos (37). Anos mais tarde, esse quadro clínico associado a tosse e perda de peso em indivíduos que trabalhavam na fazenda, foi denominado de pulmão de fazendeiro, o qual foi descrito como doença imunológica com sensibilização a proteínas (8). Curiosamente, os sintomas diminuía lentamente a partir do momento em que a exposição direta aos antígenos era interrompida (8). Ao longo dos anos, a PH foi relatada na literatura com um padrão de lesão NSIP (38), PIU (39) e PIB, e muitas vezes esses três padrões eram presentes na mesma coorte de pacientes (40, 41). No padrão PIB, fibrose intersticial centrada nas vias aéreas e epitélio bronquiolar metaplásico foi descrito em pacientes com exposição a antígenos pássaros, poeira e algodão (26); Colombat et al (42) relatou um paciente com exposição a pássaro por 30 anos que apresentou histologicamente fibrose intersticial centrada em grandes e pequenas vias aéreas com distorção do parênquima pulmonar; e fibrose intersticial centrada nas vias aéreas em um paciente com exposição à pássaro (43).

Assim como na ASP, o insulto inicial na PH ocorre na região bronquiolar e portanto, diversos mecanismos inflamatórias ocorrem nessa região, podendo resultar em uma alteração bronquiocêntrica de padrão PIB. Resumidamente, os antígenos são reconhecidos por receptores do tipo Toll (TLR), como TLR6 (44) expressos majoritariamente em macrófagos e células dendríticas (Figura 3A). Em seguida, as partículas inaladas são fagocitadas e processadas por essas células, e seu produto são apresentadas aos linfócitos T locais CD8+ e CD4+ por meio do complexo de histocompatibilidade de classe I e II (MHC)

respectivamente (Figura 3B-C) (35, 36). Uma série de respostas inflamatórias ocorrem com secreção de citocinas pelo linfócito T. Paralelamente, as células dendríticas e/ou macrófagos secretam citocinas que aumentam a proliferação e migração dos fibroblastos (Figura 3D) (35, 36). Em uma exposição crônica ao antígeno, esses mecanismos imunopatológicos são constantemente ativados, desestabilizando a arquitetura da MEC, que libera TGF- β no meio, resultando em uma intensa ativação miofibroblástica (Figura 3E) (35, 36). Como resultado, componentes da matriz são depositados no local da lesão, na região subepitelial bronquiolar, configurando em remodelamento peribronquiolar e, muitas vezes com extensão ao interstício, bronquíolo adjacente e região pleural, histopatologicamente reconhecido por fibrose em ponte (Figura 3F).

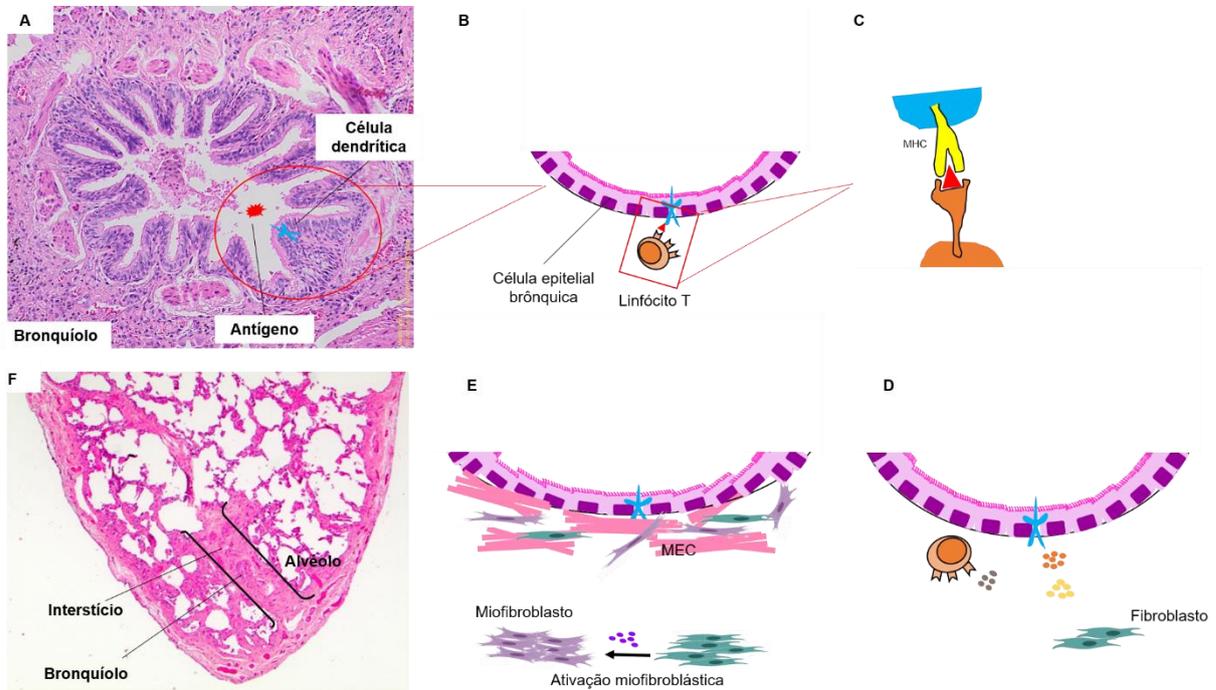


Figura 3 – Representação esquemática do processo fisiopatológico da pneumonite de hipersensibilidade. Os antígenos inalados entram em contato com as células epiteliais bronquiolares (A) e são reconhecidos por células dendríticas que processam esses antígenos, apresentando-os ao linfócito T (B-C). Respostas inflamatórias são ativadas, bem como uma resposta reparativa induzida pela produção de citocinas pelas células dendríticas (D). Impulsionado pelo TGF- β local, miofibroblastos ativos secretam e depositam proteínas da MEC no eixo broncovascular (E), que muitas vezes estende-se ao interstício, bronquíolo adjacente e a pleura, configurando a fibrose em ponte (linha contínua) (F).

1.4 DESAFIOS DO DIAGNÓSTICO NAS DOENÇAS PULMONARES INTERSTICIAIS

Diversas causas podem estar relacionadas às DPIs e portanto, muitas etiologias são englobadas nessa categoria. Apesar de todas envolverem lesões parenquimatosas e fibrose intersticial, os processos fisiopatológicos que geram este resultado comum diferem entre as etiologias, e diagnosticar corretamente um paciente é fundamental, visto que o manejo clínico é diferente e crítico para cada etiologia. Por conta disso, a recomendação científica internacional é a reunião multidisciplinar (MDD) entre pneumologistas, radiologistas e patologistas pulmonares para obtenção de uma melhor acurácia diagnóstica (45).

Nelas, três eixos são discutidos: No primeiro, informações clínico-demográficas dos pacientes são abordadas, destacando idade, gênero (46), tabagismo, uso de medicamentos (especialmente os pneumotóxicos) (47), entre outros, visto que demonstram íntima relação com as DPIs. Adicionalmente, a antiga e atual profissão do paciente e histórico familiar são informações relevantes no âmbito das DPIs. Muitas partículas orgânicas e inorgânicas expostas cronicamente ao paciente no local de trabalho ou em ambiente domiciliar podem ser a causa básica de uma lesão pulmonar intersticial fibrosante (48); e alterações genéticas familiares estão associadas à algumas DPIs, como a mutação no gene que codifica a proteína C do surfactante (49). Comorbidades como DRGE e hernia de hiato; e sintomas como pirose, tosse, dispneia são igualmente importantes (27, 30). Exames sorológicos e clínico-funcionais como teste de função pulmonar para análise da capacidade vital forçada (CVF) e difusão do monóxido de carbono (DLCO) são fundamentais para esta busca, visto que geralmente os pacientes com DPIs apresentam restrição com CFV e DLCO reduzida (6).

O segundo eixo refere-se às alterações vistas nos exames de imagem, radiografia do tórax e tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR). Atributos morfológicos nesses exames são avaliados com base na diretriz internacional da ATS/ERS/JRS/ALAT (17). Geralmente, as informações clínicas-demográficas aliadas aos atributos tomográficos são suficientes na determinação de um diagnóstico acurado em até 60% dos casos (50). Contudo, quando essas informações juntas não trazem nenhuma pista diagnóstica, se faz necessária a biópsia pulmonar, na maioria das vezes cirúrgica.

Sendo assim, no terceiro eixo são discutidos os atributos histopatológicos presentes na biópsia pulmonar, principalmente o tipo e local das alterações

pulmonares. Alguns autores acreditam que as informações patológicas são fundamentais para a conclusão de um diagnóstico assertivo (51). Com a biópsia, procura-se encontrar alguns atributos histopatológicos baseando-se no padrão PIU, conforme a diretriz proposta (17) (Tabela 1): 1) acometimento subpleural e/ou paraseptal; 2) presença de faveolamento (*honeycombing*); 3) aparência heterogênea (*patchwork*), onde áreas de parênquima normal se alternam abruptamente com áreas de fibrose/*honeycombing*; 4) foco fibroblástico, no qual há proliferação intensa de fibroblastos e ativação de miofibroblastos com intensa síntese de colágeno e outros componentes da ECM; e 5) ausência de achados sugestivos de outras doenças.

Tabela 1 - Atributos histopatológicos da ATS/ERS/JRS/ALAT, modificado(17)

PIU	Provável PIU	Indeterminado para PIU	Diagnóstico Alternativo
Fibrose densa com distorção da arquitetura (cicatriz e/ou faveolamento)	Algumas características histológicas da coluna 1 estão presentes, mas ainda há impedimentos para um diagnóstico definitivo de PIU/FPI	Fibrose com ou sem distorção da arquitetura, com atributos que favorecem tanto um padrão diferente de PIU ou sugestivo a PIU secundário à outras causas*	Atributos de outros padrões histológicos de PIs (ex: ausência de foco fibroblástico ou fibrose frouxa) em todas as biópsias
Distribuição da fibrose predominantemente subpleural e/ou paraseptal	E	Algumas características histopatológicas da coluna 1, mas com outras características que sugerem um diagnóstico alternativo**	Achados histológicos indicativos de outras doenças (ex: pneumonite de hipersensibilidade, histiocitose das células de Langerhans, sarcoidose, linfangioleiomiomatose)
Parênquima pulmonar com aparência de <i>patchwork</i> por fibrose	Ausência de atributos que sugerem um diagnóstico alternativo		
Foco fibroblasto	Ou		
Ausência de atributos que sugerem um diagnóstico alternativo	Apenas faveolamento		

Nota: *Granulomas, membrana hialina (sem ser quando associada à exacerbação aguda da FPI, que pode estar manifestado em alguns pacientes), proeminentes alterações centradas nas vias aéreas, áreas de inflamação intersticial sem estar associada a fibrose, pronunciada pleurite fibrosa crônica e pneumonia organizante. Tais atributos podem não estar evidentes ou facilmente vistas e muitas vezes precisam ser procurados especificamente.

** Atributos que devem ser considerados relevantes ao considerar um diagnóstico alternativo incluem um infiltrado celular inflamatório longe de áreas de faveolamento, proeminente hiperplasia linfóide incluindo centros germinais secundários, e uma distinta distribuição bronquiocêntrica que pode incluir extensa metaplasia peribronquiolar.

Abreviaturas: PIU: pneumonia intersticial usual; PII: pneumonia intersticial idiopática; FPI: fibrose pulmonar idiopática.

Embora as definições e classificações das DPIs serem estabelecidas pelas principais sociedades médicas e científicas, muitos autores ainda debatem a respeito da existência de outros padrões. Além disso, mesmo com essas diretrizes, em muitos casos o diagnóstico etiológico ainda é difícil devido à falta de informação clínico-demográfica do paciente, mistura de atributos rádio e histológicos dos padrões, entre outras causas. Por conta disso, buscam-se estratégias diagnósticas alternativas, como biomarcadores moleculares.

1.5 PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DAS DOENÇAS PULMONARES INTERSTICIAIS

Os inúmeros distúrbios pulmonares associados às DPIs tornam difícil a definição de um diagnóstico preciso. Várias estratégias foram propostas na tentativa de contornar este problema, como as MDD e padrões morfológicos tomográficos e histopatológicos. Contudo, um seguro diagnóstico etiológico ainda é difícil de ser definido. Assim, alguns trabalhos tem descrito o perfil genômico, transcriptômico e proteômico dos pacientes com DPIs a fim de melhor detalhá-las para futura determinação de biomarcadores mais específicos que possam melhor definir um diagnóstico etiológico preciso.

Devido a ampla casuística de FPI-PIU nos Estados Unidos e Europa (14), grande parte dos trabalhos descrevem sobre as variações de polimorfismo de nucleotídeo único e de expressão genica nos pacientes com essa doença. Neles, diversos genes são relatados e associados à FPI, assim como as vias moleculares envolvidas, principalmente no processo fibrogênico. Um promotor variante no gene MUC5B, por exemplo, foi identificada em cerca de 50% dos pacientes com pneumonia intersticial familiar ou FPI (52). Este mesmo gene, e outros genes como FAM13A, DSP, OBFC1, ATP11A, DPP9 foram associados às pneumonias intersticiais idiopáticas por outros autores (53). Além deles, variações em genes como TOLLIP, SPPL2C (54) e up-regulações no gene

KRT17 (55) também tem sido destaque nos pacientes com FPI. Adicionalmente, genes relacionados aos telômeros, e principalmente ao seu tamanho, tem ganhado destaque quando o assunto são DPIs. Fingerlin T et al (53) demonstraram relação de sua coorte com variações nos genes TERC e TERT que culminam em encurtamento dos telômeros nas células epiteliais alveolares, desequilibrando os mecanismos de homeostase intracelular, e consequentemente aumentando o risco de fibrose pulmonar. Análise de enriquecimento de ontologia genética (GO) em cultura celular de fibroblastos primários de pacientes com FPI e esclerose sistêmica revelaram associação à vias de sinalização pró fibrótica altamente ativadas, como WNT, TGF- β , NOTCH1, HIF1A (56).

Além de inumeros estudos a cerca da FPI, o perfil de expressão gênica de pacientes com PH com um padrão morfológico de não PIB, também é descrito na literatura. No trabalho de Furusawa et al (57), os autores compararam a expressão gênica entre pacientes com PH, FPI e controles: Cerca de 109 genes up-expressos foram descritos como diferencialmente expressos exclusivamente na PH (quando comparado ao controle, e não diferencialmente expressos em FPI), como BGN, CXCL9 e CHIT1; enquanto 150 genes down-expressos foram notados nos mesmos parametros, destacando ANO3, GPD1 e FMO2. Na análise de enriquecimento de GO, os genes comumente upexpressos em PH e FPI foram associados à processo catabólico de colágeno, organização de fibrilas de colágeno e adesão celular, enquanto para os genes exclusivos de PH, via de sinalização mediada por quimiocinas e responsividade imunológica foram os resultados desta análise (57).

A expressão gênica na microaspiração crônica ainda não é estudada. Contudo, a quantificação de citocinas em lavado broncoalveolar foi realizada, destacado elevados níveis de TGF- β em modelo experimental de ASP (58). Desta forma, trabalhos que avaliam a nível molecular a expressão de genes envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da PH e ASP é bastante escassa, principalmente em padrão de lesão PIB.

2. INTRODUÇÃO

As DPIs formam um grande grupo heterogêneo de doenças que causam cicatrizes com distorção arquitetural do interstício pulmonar, o qual é composto

por epitélio alveolar, endotélio capilar pulmonar, membrana basal, tecidos perivasculares e perilinfáticos (4, 45). Mais de 200 DPIs foram descritas como etiologias, que têm sido relacionadas a exposições ambientais, condições médicas de longo prazo, fatores genéticos e muitos outros (45). Além disso, a etiologia exata é desconhecida na maioria das DPIs, e os achados clínicos, radiológicos e patológicos inespecíficos não permitem um diagnóstico preciso, sendo um desafio clínico atual (45). Portanto, as MDD com pneumologistas, radiologistas torácicos e patologistas pulmonares tem sido recomendada para melhorar a precisão do diagnóstico dessas doenças em hospitais terciários dedicados a DPI. Apesar de tudo isso, cerca de 20% dos pacientes ainda não receberam o diagnóstico definitivo pela MDD (59), podendo levar a uma progressão da doença e eventualmente tendo um desfecho grave e potencialmente fatal .

Uma etapa crítica na abordagem diagnóstica de DPIs é o padrão patológico por biópsia pulmonar cirúrgica. Yousem e Dacic (24) relataram a pneumonite intersticial bronquiocêntrica, que é definida por um remodelamento fibrosante predominantemente bronquiocêntrico associada a infiltrado linfocítico bronquiolar ou peribronquiolar e metaplasia peribronquiolar, bem como uma fibrose intersticial em placas e/ou focal. Esse novo padrão é o protótipo da pneumonite de hipersensibilidade, mas inclui também uma ampla gama de diagnósticos diferenciais, especialmente microaspiração, colagenose, doenças autoimunes, efeitos de drogas tóxicas, pneumoconiose, tabagismo, idiopática e outros. Kuranishi et al (30) demonstraram que de 600 biópsias, cerca de 20% apresentavam um padrão de PIB com uma sobrevida média de 116 meses. Além disso, Churg et al (26) descrevem uma taxa de mortalidade de 33%, assim como Yousem e Dacic (24), ambos com taxa de progressão da doença superior a 40% dos pacientes. Além disso, um estudo sobre pneumonite de hipersensibilidade revelou que 10% das biópsias pulmonares cirúrgicas apresentaram padrão PIB com 90% sem granuloma (41). E na aspiração não associada a alimentos ou outro material particulado, cerca de 30% das biópsias pulmonares eram PIB (33).

Portanto, o padrão de PIB é uma resposta pulmonar final e comum a etiologias distintas com possível prognóstico negativo e alta mortalidade (26, 30). A PIB promove uma lesão pulmonar bronquiocêntrica por meio de eventos celulares e vias moleculares distintas, que culminam na ativação miofibroblástica

e deposição de matriz extracelular, o que significa remodelamento na região subepitelial bronquiolar. No momento da biópsia pulmonar cirúrgica, a PIB é o padrão final predominante desse remodelamento fibrosante. Infelizmente, esse padrão de lesão não revela pistas diagnósticas adicionais para o patologista com base em processos fisiopatológicos relacionados à etiologia da lesão pulmonar. Portanto, as reações de hipersensibilidade tipo III e IV da pneumonite de hipersensibilidade e lesões químicas bronquiolares de microaspiração crônica irão progredir no remodelamento das vias aéreas com histomorfologia muito semelhante, mas molecularmente distintas. Muitos biomarcadores diagnósticos têm sido descritos, como expressão de células dendríticas séricas YKL-40 e CD103 na pneumonite por hipersensibilidade (60, 61); e nível sérico de KL-6 e pepsina na microaspiração (62, 63); . No entanto, específicos biomarcadores a nível transcriptômico ainda precisam ser estabelecidos.

A sinalização molecular de miofibroblastos, pneumócitos e muitas outras células, que são dependentes de lesão pulmonar direta/indireta e restritas a eventos celulares focais, são expressados fenotipicamente pela apresentação clínica do paciente e dos atributos radio-histomorfológicos (Figura 4). Nossa proposta é integrar uma triagem de biomarcadores moleculares para PIB para validá-los para abordagem diagnóstica em medicina translacional (Figura 4), a partir do perfil transcriptômico dessa doença juntamente com a correlação entre seus resultados com os dados clínicos, radiológicos e histopatológicos.

Desta forma, a integração dos dados elucidará a relação complexa e a influência combinada de uma miríade de componentes celulares medidos nos processos da doença, estabelecendo um biomarcador de diagnóstico translacional para as etiologias da pneumonite intersticial bronquiocêntrica: microaspiração crônica e pneumonite de hipersensibilidade.

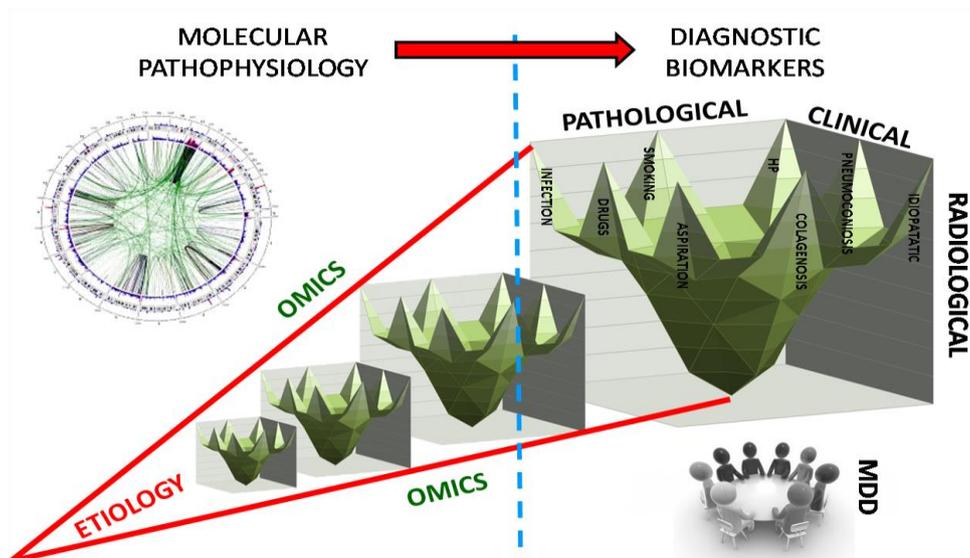


Figura 4 - Esquema da etiologia dos biomarcadores diagnósticos. As as vias moleculares detectadas pelos estudos ômicos podem ser biomarcadores para os achados clínicos, radiológicos e patológicos discutidos por abordagens multidisciplinares.

1.1. IMPACTO NA MEDICINA CLÍNICA E NA CIÊNCIA BÁSICA

O biomarcador de diagnóstico molecular para biópsia pulmonar cirúrgica melhorará o manejo dos pacientes indicando uma doença intersticial pulmonar específica e única. Desta forma, o tratamento será focado na causa etiológica, proporcionando um medicamento de precisão.

1.2. CONTRIBUIÇÃO PARA A PATOFISIOLOGIA DA DOENÇA

As vias moleculares das áreas de lesão revelarão mecanismos fisiopatológicos detalhados de doenças pulmonares intersticiais de maneira relacionada à etiologia. Novas estratégias terapêuticas e novos medicamentos podem ser desenvolvidos com melhor custo-benefício e com eficácia terapêutica.

3. HIPÓTESE

A microaspiração crônica do conteúdo oral/gástrico pode modificar o perfil transcriptômico induzindo uma resposta fibrosante diferente da resposta à antígenos inalados, como na pneumonite de hipersensibilidade.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto é determinar biomarcadores de diagnóstico translacional para pneumonite intersticial bronquiolocêntrica, mais especificamente para as etiologias de microaspiração crônica e pneumonite de hipersensibilidade, a partir da triagem molecular integrativa.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil clínico e radiológico;
2. Extrair Big Data de visualização de morfometria pulmonar;
3. Estudar o transcriptoma das biópsias pulmonares cirúrgicas;
4. Integrar os dados moleculares, achados clínicos, radiológicos e patológicos para biomarcadores translacionais;

5. METODOLOGIA

5.1 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil sob o protocolo 3.087.997 (Anexo A).

5.2 Desenho do Estudo e Pacientes

Neste estudo retrospectivo, os casos de DPIs do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCRP/FMRP/USP) entre 2016 a 2019 foram selecionados, totalizando 73 casos. Desse total, 63 casos foram diagnosticados como PIB pelo Serviço de Patologia (SERPAT) do HCRP/FMRP/USP. A partir desses casos, foram selecionados 12 com diagnóstico definitivo para as etiologias de PH (6) e ASP (6), tornando-se o grupo de estudo deste trabalho.

5.3 Revisão Clínica

Dados gerais como idade, gênero e grau de confiança diagnóstico definido nas MDD foram obtidos a partir do prontuário eletrônico do

HCRP/FMRP/USP, para os 63 casos com padrão PIB. Adicionalmente, foram anotados para os 12 casos do grupo de estudo deste trabalho, dados demográficos, principais comorbidades, sintomas, histórico familiar de doença pulmonar e evolução clínica, sendo 1) tempo do início dos sintomas com relação à biópsia pulmonar cirúrgica (BPC) em meses (valores negativos representam os meses que antecedem a BPC e valores positivos representam os meses que precedem a BPC); 2) tempo do início dos sintomas com relação ao óbito (em meses); 3) tempo da BPC com relação ao óbito (em meses); e 4) ocorrência de óbito. Também foram anotados os sinais sugestivos para as etiologias de ASP e PH, exemplo DRGE para ASP e exposição à partículas orgânicas e inorgânicas para PH; e foram tabulados a presença de medicamentos pneumotóxicos, gástricos, imunossupressores e pulmonares.

Ademais, dados da prova de função pulmonar (PFP) foram anotados para todos os pacientes desde o primeiro exame até o último registrado pelo prontuário eletrônico, sendo calculado o tempo decorrido da PFP após a BPC (valores negativos representam os meses que antecedem a BPC e valores positivos representam os meses que precedem a BPC), em meses. Foi destacado os seguintes parâmetros preditivos para idade, peso, altura, sexo e etnia: capacidade vital forçada (CVF)%, Volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1)%, VEF1/CVF%, capacidade pulmonar total (CPT)%, difusão pulmonar para o monóxido de carbono (DLCO)%.

5.4 Revisão Tomográfica

A partir do prontuário eletrônico do HCRP/FMRP/USP, as imagens adquiridas de TCAR foram selecionadas para casos selecionados. Foi calculado o tempo da realização do exame com relação à BPC em meses (valores negativos representam os meses que antecedem a BPC e valores positivos representam os meses que precedem a BPC) e os principais parâmetros tomográficos foram anotados conforme a diretriz do ATR/ERS 2018 (17), sendo: presença do padrão PIU, atenuação em mosaico, *honeycombing*, bronquiectasias de tração, consolidações, dentre outras.

5.5 Avaliação Histológica

Uma minuciosa avaliação histológica das BPC dos 12 pacientes foi realizada. Nela, 51 atributos histopatológicos foram tabulados, sendo a maioria termos consagrados na literatura, como *honeycombing*, ponte em delta e reta, bronquiolização, agregado linfóide peribronquiolar e subpleural, bronquioloectasia, foco fibroblástico peribronquiolar, entre outras; E outros termos nomeados pelo nosso grupo de pesquisa (Figura 5), são eles: 1) Sinal do punho fechado (Figura 5A): remodelamento peribronquiolar que causa tração e distorção dos alvéolos distais, conseqüentemente causando o rompimento nos septos e áreas císticas sequenciais; 2) Necrose péptica (Figura 5B): conteúdo basofílico intraluminal bronquiolar; 3) Concreções hialinas irregulares (Figura 5C) e redondas (Figura 5D) intraalveolares: estruturas hialinas densas intraalveolares podendo ter forma irregular ou arredondada; 4) Material rendilhado eosinofílico (Figura 5E): delicado conteúdo eosinofílico intraluminal bronquiolar; 5) Estrutura vegetal lentiliforme (Figura 5F): conteúdo vegetal, já descrito por outros autores (64) ; 6) Padrão ponta (Figura 5G): remodelamento parenquimatoso difuso, com ou sem necrose péptica, próximo ao final do segmento do lobo pulmonar; 7) Foco fibroblástico sob colapso (Figura 5H): foco fibroblástico subepitelial bronquiolar, mas que aparenta ser subepitelial devido à ausência de septo alveolar; 8) Distância entre pleura e bronquíolo (Figura 5I, linha vermelha): a retração do parênquima por fibrose foi demonstrada para cada caso pela a distância em micrometros entre 2 bronquíolos e a pleura mais próxima, resultando em uma média por caso; 9) Distância entre bronquíolos (Figura 5I, linha verde): medida em micrometros dos dois bronquíolos medidos no item anterior.

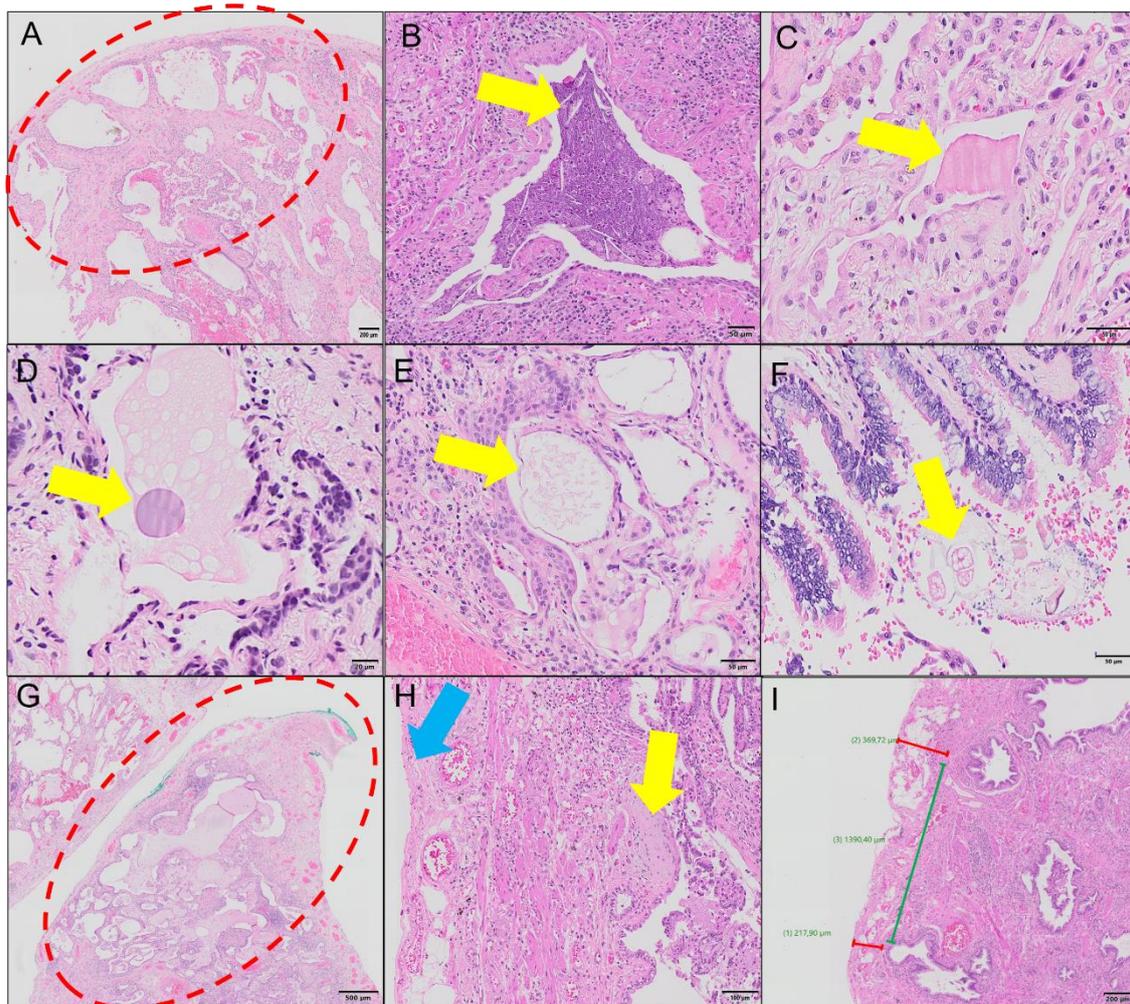


Figura 5 – Atributos histopatológicos observados nas BPCs dos 12 pacientes do trabalho, destacando 9 termos nomeados pelo nosso grupo de pesquisa: (A) Sinal do punho fechado: remodelamento peribronquiolar com tração e distorção dos alvéolos distais, causando o rompimento nos septos e formação de áreas císticas sequenciais (círculo pontilhado vermelho); (B) Necrose péptica: conteúdo basofílico intraluminal bronquiolar (seta amarela); (C) Concreções hialinas irregulares intraalveolares: estrutura hialina densa intraalveolar de forma irregular (seta amarela); (D) Concreções hialinas redondas intraalveolares: estrutura hialina densa intraalveolar de forma regular (seta amarela); (E) Material rendilhado eosinofílico: delicado conteúdo eosinofílico intraluminal bronquiolar (seta amarela); (F) Estrutura vegetal lentiliforme: conteúdo vegetal (seta amarela); (G) Padrão ponta: remodelamento parenquimatoso difuso próximo ao final do segmento do lobo pulmonar (círculo pontilhado vermelho); (H) Foco fibroblástico sob colapso: foco fibroblástico subepitelial bronquiolar (seta amarela) mimetizando localização subpleural (seta azul) devido ao colapso de septos alveolares; (I linha vermelha) Distância entre pleura e bronquíolo: medida em micrometros entre o bronquíolo e a pleura mais próxima, demonstrando a retração do parênquima por fibrose; e (I linha verde) Distância entre bronquíolos: medida em micrometros dos dois bronquíolos medidos no item anterior.

5.6 Análise Molecular – Transcriptoma

5.6.1 Extração de RNA

A análise dos RNAs presentes no tecido pulmonar dos 12 pacientes selecionados foi realizada através do sequenciamento de RNA (RNA-Seq) com extração e construção da biblioteca para Sequenciamento De Nova Geração (SNG).

Para cada bloco, foram realizados 3 cortes de 10 μ m armazenados em um tubo de centrífuga 1,5mL para a extração de RNA (Figura 6A), feita conforme protocolo do kit MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra (ThermoFisher Scientific), o qual utiliza beads magnéticas como princípio de extração (Figura 6B). Em seguida, o ponto de checagem com análise da quantidade pelo Qubit (Figura 6C) e de qualidade pelo BioAnalyzer (Agilent) com DV200 (Figura 6D) foram realizadas para todas as amostras.



Figura 6 - Extração de RNA de amostra parafinada e análise da quantidade e qualidade do RNA extraído. (A) Para cada amostra/bloco de parafina, 3 cortes de 10 μ m foram realizados; (B): O kit de extração utilizado baseia-se na metodologia de beads magnéticas. Assim, o material genético de carga negativa liga-se as beads magnéticas de carga positivas e ambos permanecem atraídos a rack magnética (formando um pellet no fundo do tubo), facilitando a separação do líquido e do RNA de interesse; (C): Quantificação em ng/ μ L do RNA extraído utilizando o Qubit; (D): Aplicação das amostras no RNA Pico Chip para análise da qualidade por BioAnalyzer.

Para a construção da biblioteca, foi utilizado o kit Collibri Stranded RNA Library Prep for Illumina with Collibri H/M/R rRNA depletion (ThermoFisher Scientific), também com beads magnéticas, conforme as instruções do fabricante (Figura 7A-B). Ao final, cada uma das 12 amostras possuía indexs diferentes para posterior identificação. Antes de prosseguir para o sequenciamento, a análise de qualidade pelo BioAnalyzer e a quantificação da biblioteca por qPCR com o kit Collibri Library Quantification (ThermoFisher Scientific) foi realizada conforme as instruções do protocolo.

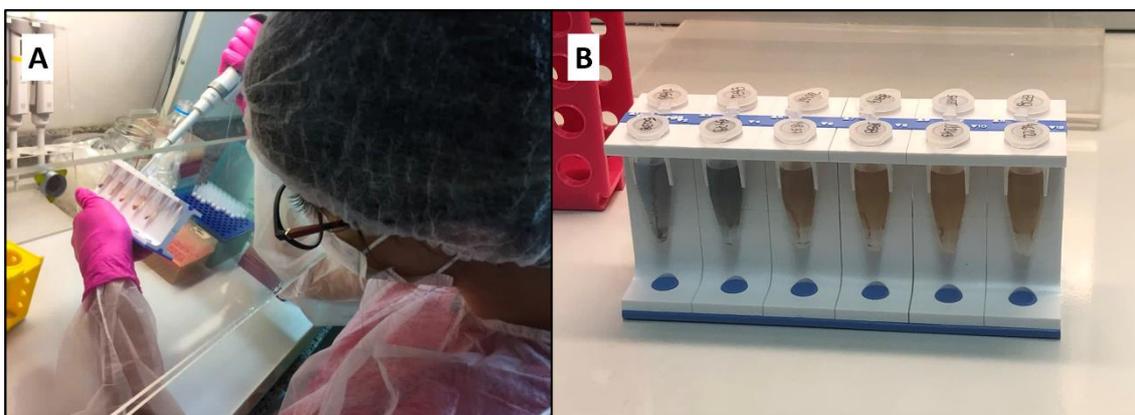


Figura 7 – Construção da biblioteca de RNA. (A): Procedimentos de bancada foram realizados com cautela e devidamente paramentado; (B): O kit utilizado utiliza como princípio as beads magnéticas (carga positiva) que irão facilitar o procedimento da construção da biblioteca por atraírem e unirem o RNA para uma região do tubo, facilitando as lavagens de purificação.

5.6.2 Sequenciamento de Nova Geração

O sequenciamento do RNA extraído foi realizado utilizando o kit NextSeq 500/550 High Output (Illumina) e seguindo as instruções do NextSeq System: Denature and Dilute Libraries Guide. Desta forma, foi necessária a normalização das amostras com base nos resultados do qPCR, optando pela concentração final de cada amostra em 2nM. Em seguida, as amostras foram unidas em um único tubo, formando o Library Pool. Por fim, o Library pool junto com o PhiX a 5% foram carregados no cartucho de sequenciamento no NextSeq 500 System (Figura 8A-B) para a leitura das amostras.

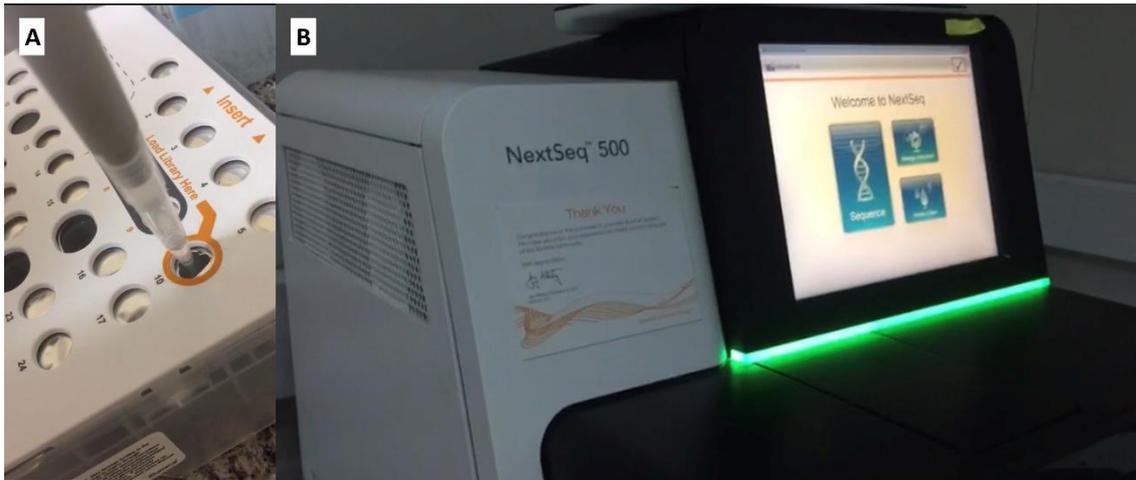


Figura 8 - Sequenciamento de nova geração. (A): O pool de biblioteca e o PhiX foram adicionados no cartucho de sequenciamento; (B): A corrida do sequenciamento de nova geração foi realizada no NextSeq 500, gerando arquivos para posterior análise bioinformática.

5.6.3 Bioinformática Integrada

Estrutura de fenotipagem integrativa foi realizada para descobrir subtipos de doenças a partir de conjuntos de dados multiômicos. Pelo menos 44 milhões de leituras de 100 bp *single-end* foram obtidas para cada amostra. As leituras foram alinhadas ao genoma humano (hg 19) usando HISAT2 versão 2.2.1 (65). O número de leituras sobrepostas a cada gene Entrez foi contado usando a anotação do gene RefSeq e featureCount (66). Em seguida, a tabela contendo contagens numéricas de genes foi submetida à plataforma online BioJupies (<https://maayanlab.cloud/biojupies/>). Nela, o processo de geração de dados consiste em 3 etapas: 1) carregamento de dados brutos do RNA-Seq (extensão FASTQ) e configurações a respeito dos dados (origem das amostras, single ou pair end, entre outras); 2) seleção de ferramentas computacionais para integrar na análise (exemplo, clusterização e gráfico de vulcão); 3) personalização da análise com parâmetros opcionais (ontologia de doenças, ontologia de drogas, etc) (67). Por fim, os resultados dessa análise foram disponibilizados por uma URL de fácil acesso.

A integração dos resultados do RNA-Seq com dados clínicos, histopatológicos e tomográficos também foi demonstrada pela clusterização dos dados por Heatmap, realizada na plataforma online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

5.7 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão e os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS v.13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, 2004). Os dados foram avaliados através do teste t e ANOVA com Tukey. A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar as relações entre variáveis e um valor de p inferior ($<$) a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A curva de sobrevida de Kaplan-Meier e a análise de riscos proporcionais de Cox foram usadas para calcular a sobrevida em nossa coorte a partir da data de óbito após o início dos sintomas, em meses. Heatmaps foram utilizados pela plataforma online Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). As informações utilizadas nas análises de clusterização hierárquica são: 1) Principais dados clínicos; 2) Grau de variação do CPT, DLCO e VEF1/CVF (variação entre o parâmetro do último exame e do primeiro exame); 3) Atributos histopatológicos; 4) Atributos radiológicos; 5) Atributos radio-histopatológicos; 6) Atributos histopatológicos com diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos e transcriptoma total; 7) Atributos histopatológicos com diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos e 28 genes selecionados com as maiores expressões gênicas diferenciadas entre os grupos.

6. RESULTADOS

6.1 Revisão Clínica

Os principais dados dos 63 pacientes com DPI em padrão PIB do HCRP/FMRP/USP estão descritos na Tabela 2. A média de idades desses pacientes é 60 anos, sendo 33 homens e 30 mulheres. A MDD realizada para a definição de um diagnóstico clínico destes pacientes obteve uma heterogeneidade de graus de confiança, variando de 30% para os casos com diagnóstico definitivo até cerca de 5% como casos inclassificáveis.

Tabela 2 – Principais dados dos 63 pacientes com DPI em padrão PIB.

Dados Gerais	
Demográficos	
Idade (anos)*	60.7 \pm 9.4
Gênero (M;F)	33;30
Grau de confiança diagnóstico DMD	

Diagnóstico definitivo (%)	19 (30.2)
Diagnóstico provisório forte (%)	17 (27.0)
Diagnóstico provisório fraco (%)	14 (22.2)
Inclassificável (%)	3 (4.8)
Sem diagnóstico (%)	10 (15.9)

Pacientes com diagnósticos definitivos para ASP e PH por MMD foram selecionados. Dados mais detalhados para os 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho estão reunidos na Tabela 3, distinguindo-se entre os diagnósticos etiológicos de ASP (n=6) e PH (n=6). A faixa etária dos pacientes encontra-se, em média, entre 65 a 70 anos e a média do IMC para os pacientes com PH apresentou-se maior que os pacientes com ASP. As comorbidades não revelaram nenhuma diferença estatística, apesar de predominarem nos pacientes com PH. A maioria dos pacientes apresentou dispneia, sendo a dispneia em pequenos esforços significativamente mais recorrente nos pacientes com ASP do que PH ($P < 0.05$, Tabela 3). Os fatores sugestivos de cada etiologia apresentaram-se de forma homogênea entre os grupos, sem diferença estatística (Tabela 3). Disfagia, refluxo e pirose foram sintomas recorrentes entre todos os pacientes e os diagnósticos de DRGE e hernia de hiato, apesar de presentes nos dois grupos, foram mais predominantes na ASP. Todos os pacientes com PH e 66% dos pacientes com ASP alegaram exposição à partículas orgânicas como mofo domiciliar, travesseiro de pena, criação de pássaros, dentre outros.

Apesar da falta de diferença estatística entre os grupos, apenas os indivíduos com PH alegaram fazer o uso de medicamentos pneumotóxicos e 5/6 pacientes com ASP utilizam medicamentos gástricos com frequência (Tabela 3). Com relação a evolução clínica desses pacientes, o grupo PH apresentou um maior tempo do início dos sintomas até a realização da BPC (cerca de 54 meses antes) comparado aos pacientes ASP (cerca de 36 meses antes). Da mesma forma, os pacientes com PH apresentaram um maior tempo do início dos sintomas e da realização da BPC até o óbito, sem diferença significativa. Nesse sentido, o óbito foi mais recorrente nos pacientes do grupo ASP do que PH (4 e 2 respectivamente) (Tabela 3). Com isso, a análise de sobrevida pelo método Kaplan-Meier demonstrou que os pacientes com ASP apresentaram uma

significativa menor probabilidade de sobrevida do que os pacientes com PH (P<0.05, Figura 9).

Tabela 3 – Dados demográficos e clínicos dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.

DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	ASP	PH	P
Demográficos			
Idade (anos)*	67.0 ± 4.6	66.5 ± 5.9	0.87
Gênero (M;F)	4;2	2;4	0.28
IMC (kg/m ²)*	27.8 ± 4.3	33.1 ± 4.7	0.06
Principais comorbidades			
Tabagista (%)	2 (33.3)	4 (66.6)	0.28
Carga Tabágica (anos/maço)*	50.60 ± 69.8	46.67 ± 37.9	0.93
Hipertensão Arterial Sistêmica(%)	3 (50.0)	3 (50.0)	0.99
Doença Arterial Coronariana(%)	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Diabetes Mellitus(%)	1 (16.6)	3 (50.0)	0.25
Sintomas			
Dispneia (%)	6 (100.0)	5 (83.3)	0.34
Pequenos Esforços(%)	3 (50.0)	0 (0.0)	0.05
Moderados Esforços(%)	2 (33.3)	5 (83.3)	0.09
Grandes Esforços(%)	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Ausência(%)	0 (0.0)	1 (16.6)	0.34
Ortopneia(%)	1 (16.6)	2 (33.3)	0.54
Tosse (%)	5 (83.3)	6 (100.0)	0.34
Histórico Familiar de Doença Pulmonar(%)	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Fatores Sugestivos para Etiologias			
Microaspiração Crônica			
Disfagia(%)	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Refluxo(%)	2 (33.3)	2 (33.3)	0.99
Pirose(%)	5 (83.3)	3 (50.0)	0.25
DRGE(%)	4 (66.6)	1 (16.6)	0.09
Hérnia de Hiato(%)	4 (66.6)	2 (33.3)	0.29
Pneumonite de Hipersensibilidade			
Exposição à partículas orgânicas(%)	4 (66.6)	6 (100.0)	0.14
Medicamentos			
Pneumotóxicos(%)	0 (0.0)	2 (33.3)	0.14
Gástricos(%)	5 (83.3)	2 (33.3)	0.09
Imunossupressores(%)	5 (83.3)	3 (50.0)	0.25
Pulmonares(%)	3 (50.0)	1 (16.6)	0.26
Evolução Clínica			
Início dos Sintomas até a BPC (meses)*	-36.20 ± 32.64	-53.67 ± 69.36	0.62
Início dos Sintomas até óbito (meses)*	30.83 ± 27.42	53.00 ± 23.03	0.17
BPC até óbito (meses)*	68.20 ± 37.37	106.67 ± 63.75	0.27
Óbito(%)	4 (66.6)	2 (33.3)	0.28

Nota – BPC: biópsia pulmonar cirúrgica; DRGE: doença do refluxo gastroesofágico.

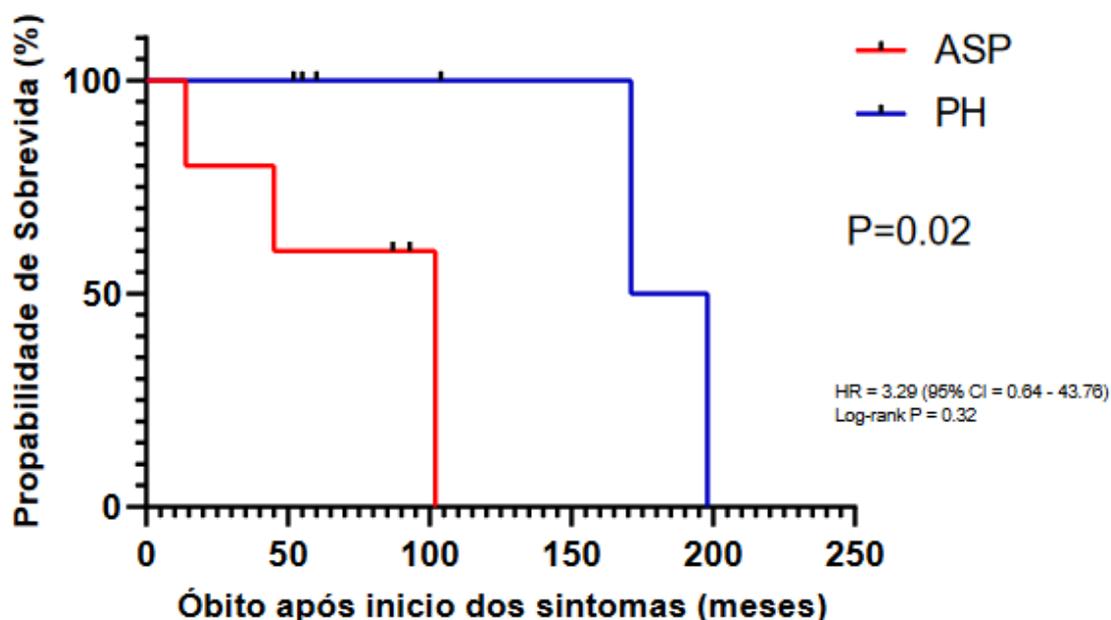


Figura 9 - Curva de sobrevivência Kaplan-Meier. Pacientes do grupo ASP apresentaram uma significativa menor probabilidade de sobrevivência do que os pacientes com PH.

Os dados tabulados da prova de função pulmonar dos 12 pacientes estão representados na Tabela 4, contendo o valor mais alto dentre os exames e os dados referentes a todos os três exames realizados, bem como a diferença de tempo com relação a BPC em meses. A análise dos valores mais altos de cada parâmetro evidencia um pior quadro pulmonar restritivo nos pacientes com ASP. Embora não estatisticamente significativa, os valores da DLCO registrados para todas as PFP apresentaram menores para esses pacientes do que PH, sugerindo um maior acometimento fibrosante. Ademais, houve diferença significativa para CVF% E VEF1% no primeiro exame registrado no prontuário eletrônico apresentando-se também menor nos pacientes com ASP do que PH ($P < 0.05$, Tabela 4).

Tabela 4 – Valores obtidos da prova de função pulmonar dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.

PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR	ASP	PH	P
Valor mais alto			
CVF% prevista*	65.00 ± 16.43	89.83 ± 21.34	0.06
VEF1% prevista*	72.50 ± 22.26	99.67 ± 22.51	0.07
VEF1/CVF% prevista*	116.00 ± 24.34	109.17 ± 12.88	0.57

CPT% prevista*	78.00 ± 22.69	91.20 ± 13.18	0.31
DLCO% prevista*	47.67 ± 19.30	63.17 ± 15.76	0.17
Mês 1: PFP após BPC (meses)*	-10.67 ± 22.94	4.50 ± 29.20	0.34
CVF% prevista*	59.60 ± 10.90	88.50 ± 22.41	0.03
VEF1% prevista*	64.80 ± 13.22	99.17 ± 24.92	0.02
VEF1/CVF% prevista*	111.40 ± 26.58	116.00 ± 5.77	0.75
CPT% prevista*	71.25 ± 22.84	81.50 ± 9.33	0.79
DLCO% prevista*	54.50 ± 15.20	62.33 ± 17.51	0.49
MÊS 2: PFP após BPC (meses)*	6.40 ± 19.60	21.67 ± 19.89	0.23
CVF% prevista*	65.00 ± 19.10	81.83 ± 21.36	0.24
VEF1% prevista*	69.00 ± 29.98	87.17 ± 21.83	0.30
VEF1/CVF% prevista*	119.33 ± 14.19	107.00 ± 12.39	0.22
CPT% prevista*	56.75 ± 38.47	62.60 ± 36.84	0.78
DLCO% prevista*	40.67 ± 16.62	55.67 ± 16.29	0.24
MÊS 3: PFP após BPC (meses)*	23.20 ± 28.54	34.20 ± 22.24	0.52
CVF% prevista*	58.50 ± 21.44	85.00 ± 28.22	0.17
VEF1% prevista*	68.25 ± 27.17	86.80 ± 24.55	0.32
VEF1/CVF% prevista*	116.75 ± 9.50	103.60 ± 12.52	0.13
CPT% prevista*	74.00 ± 0.00	87.33 ± 27.06	0.71
DLCO% prevista*	39.25 ± 24.01	57.75 ± 17.56	0.26

6.2 Revisão Tomográfica

A detalhada análise das TCAR revelou para todos os 12 pacientes, um padrão tomográfico não PIU de diagnóstico alternativo de padrão incaracterístico, conforme as diretrizes da ATS/ERS (17) (Tabela 5). Dos diversos atributos consistentes com diagnóstico alternativo, destacam-se: 1) atenuação em mosaico, presente em 67% e 83% dos pacientes ASP e PH respectivamente; 2) opacidade em vidro fosco, presente em 4/6 pacientes de ASP e em 6/6 de PH, condizente com o processo fisiopatológico inflamatório de lesão da PH; 3) *honeycombing* (atributo típico de PIU) presente apenas em 1 paciente de cada grupo; 4) bronquiectasia de tração, presente em quase todos os pacientes (5/6 ASP e 6/6 PH), que apesar de recorrente no padrão PIU pode estar presente em doenças bronquiocêntricas devido a retração do parênquima causada pela fibrose peribronquiolar; e 5) sinal do brônquio alongado ($P < 0.05$, Tabela 5).

Tabela 5 – Atributos avaliados nas TCAR dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.

CARACTERÍSTICAS TOMOGRÁFICAS	ASP	PH	P
------------------------------	-----	----	---

Tempo TCAR com relação à BPC	-9.67 ± 13.95	-13.17 ± 39.80	
Padrão tomográfico de acordo com ATS/ERS(17)			
PIU	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Provável ou indeterminado para PIU	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Diagnóstico alternativo	6 (100.0)	6 (100.0)	-
Se diagnóstico alternativo, qual padrão			
PINE	0 (0.0)	0 (0.0)	-
PO	0 (0.0)	0 (0.0)	-
DAD	0 (0.0)	0 (0.0)	-
PIL	0 (0.0)	0 (0.0)	-
FEPP	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Incaracterístico	6 (100.0)	6 (100.0)	-
PID	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Atenuação em mosaico	4 (66.6)	5 (83.3)	0.55
Retenção aérea na expiração	3 (50.0)	4 (66.6)	0.56
Headcheese sign	3 (50.0)	3 (50.0)	0.99
Nódulos centrolobulares	2 (33.3)	0 (0.0)	0.14
Opacidades em vidro fosco	4 (66.6)	6 (100.0)	0.14
Reticulações	6 (100.0)	6 (100.0)	-
Consolidações	3 (50.0)	1 (16.6)	0.26
Árvore em brotamento	2 (33.3)	0 (0.0)	0.14
Impactações brônquicas	0 (0.0)	1 (16.6)	0.34
Honeycombing	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Cistos que não configuram honeycombing	3 (50.0)	3 (50.0)	0.99
Bronquiectasias de tração	5 (83.3)	6 (100.0)	0.34
Sinal do brônquio alongado	5 (83.3)	1 (16.6)	0.02
Distribuição pelos lobos pulmonares			
Predomínio lobos inferiores	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Predomínio lobos superiores	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Difusa	4 (66.6)	5 (83.3)	0.55
Distribuição intralobar			
Predomínio periférico	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Predomínio central/peribrônquico	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Central e periférico	4 (66.6)	5 (83.3)	0.55
Distribuição entre os pulmões			
Simétrica	3 (50.0)	5 (83.3)	0.26
Pouco assimétrica	2 (33.3)	1 (16.6)	0.34
Muito assimétrica	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Gradiente apicobasal	0 (0.0)	0 (0.0)	-

Nota: DAD - dano alveolar difuso; PIL - pneumonia *intersticial* linfocítica; FEPP - fibroelastose pleuroparenquimatosa; PID - pneumonia intersticial descamativa (PID).

6.3 Avaliação Histopatológica

A minuciosa avaliação histopatológica dos grupos ASP e PH está detalhado na Tabela 6. O processo fisiopatológico de ambas as etiologias possui início pelo insulto nas células epiteliais bronquiolares, causando em última instancia um remodelamento peribronquiolar, como observado em todos os casos (Tabela 6 e Figura 10A). Os processos que antecedem a formação de um remodelamento no eixo broncovascular iniciam muitas vezes por agregados linfóides peribronquiolares, presente em todos os casos (Tabela 6 e Figura 10B) e por tecido de granulação subepitelial bronquiolar constituído de neovasculogênese, fibroblastos e miofibroblastos, igualmente presentes em 5/6 casos da ASP, assim como da PH, (Tabela 6 e Figura 10C). Em seguida, os miofibroblastos se agrupam em tecido mixóide conhecido por foco fibroblástico, entre o epitélio e a camada muscular bronquiolar, para depósito de MEC, como visto na maioria dos casos (Tabela 6 e Figura 10D). O acúmulo de proteínas da matriz iniciado na região subepitelial bronquiolar torna o tecido enrijecido, tracionando todo o parênquima ao seu entorno, resultando em bronquioloectasia, ou seja, aumento do diâmetro dos brônquios em relação ao vaso sanguíneo adjacente, presente em quase a maioria dos casos de ASP e em todos de PH (Tabela 6 e Figura 10E); e em colapso dos alvéolos na região subpleural, presente em todos os pacientes (Tabela 6 e Figura 10F). Nesses casos, é recorrente a presença de focos fibroblásticos que aparentam estarem na região subpleural, denotando um aspecto de lesão PIU, quando na verdade estão na região subepitelial bronquiolar, aqui chamado por foco fibroblástico sob colapso, presente em 5/6 na ASP e 3/6 na PH (Tabela 6 e Figura 10G). Ademais, a retração no tecido pulmonar causada pelo depósito exagerado de MEC no eixo broncovascular ocasiona rompimentos dos brônquios, muitas vezes fundindo com sacos alveolares adjacentes, denominado dilatações císticas subpleurais bronquiolares, visto em mais da metade dos casos (Tabela 6 e Figura 10H), ou rompimento dos sacos alveolares, chamado por dilatações císticas subpleurais do saco alveolar, presente em todos os casos (Tabela 6 e Figura 10I). Paralelamente à esses processos fibrosantes e suas consequências, a bronquiolização ocorre nos septos alveolares, bastante comum entre os casos (Tabela 6 e Figura 10J). Além disso, estruturas provenientes de célula vegetal lentiliforme (Tabela 6 e Figura 10K) e material mucóide eosinofílico (Tabela 6 e

Figura 10L) foram encontrados na região intraluminal bronquiolar de forma heterogênea entre os casos (Tabela 6).

Tabela 6 – Achados histopatológicos dos 12 pacientes do grupo de estudo deste trabalho.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	ASP	PH	P
Area lobular normal*	24.17 ± 16.86	19.17 ± 16.25	0.61
Remodelamento difuso*	51.67 ± 23.17	17.50 ± 10.84	0.01
Bronquiolocentrico*	20.00 ± 8.94	61.67 ± 11.69	0.01
PINE-simile*	0.83 ± 2.04	1.67 ± 2.58	0.54
Honeycombing(%)	3 (50.0)	0 (0.0)	0.05
Colapso alveolar subpleural(%)	6 (100.0)	6 (100.0)	-
Sinal do punho fechado(%)	5 (83.3)	3 (50.0)	0.26
Ponte em delta(%)	1 (16.6)	5 (83.3)	0.02
Ponte reta(%)	0 (0.0)	5 (83.3)	0.01
Dilatações císticas subpleurais bronquiolar(%)	5 (83.3)	3 (50.0)	0.26
Dilatação cística subpleural do saco alveolar(%)	6 (100.0)	6 (100.0)	-
Necrose péptica(%)	6 (100.0)	0 (0.0)	-
Fenda de colesterol(%)	5 (83.3)	1 (16.6)	0.02
Padrão ponta(%)	3 (50.0)	0 (0.0)	0.05
Exulceração bronquiolar(%)	5 (83.3)	0 (0.0)	0.01
Material mucóide eosinofílico(%)	5 (83.3)	4 (66.6)	0.55
Acúmulo macrofágico intraalveolar(%)	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Neutrófilos na luz(%)	5 (83.3)	0 (0.0)	0.01
Spillover(%)	4 (66.6)	0 (0.0)	0.01
Bronquiolização(%)	5 (83.3)	6 (100.0)	
Muscularização(%)	3 (50.0)	5 (83.3)	0.26
Agregado linfóide peribronquiolar(%)	6 (100.0)	6 (100.0)	-
Agregado linfóide subpleural(%)	1 (16.6)	4 (66.6)	0.09
Eosinófilo(%)	0 (0.0)	1 (16.6)	0.34
Remodelamento peribronquiolar(%)	6 (100.0)	6 (100.0)	-
Metaplasia escamosa imatura(%)	5 (83.3)	3 (50.0)	0.26
Bronquioloectasia(%)	5 (83.3)	6 (100.0)	0.34
Tecido mixóide/hialino peribronquiolar(%)	1 (16.6)	1 (16.6)	0.99
Racanalização bronquiolar(%)	0 (0.0)	2 (33.3)	0.14
Obstrução bronquiolar(%)	2 (33.3)	4 (66.6)	0.29
Tecido Granulação Subepitelial bronquiolar(%)	5 (83.3)	5 (83.3)	0.99
Hialinização subepitelial bronquiolar(%)	0 (0.0)	3 (50.0)	0.05
Inflamação subepitelial bronquiolar(%)	2 (33.3)	4 (66.6)	0.29
Hialinização perivascular(%)	2 (33.3)	2 (33.3)	0.99
Concreções hialinas irregulares intraalveolares(%)	5 (83.3)	0 (0.0)	0.01
Concreções hialinas redondas intraalveolares(%)	2 (33.3)	0 (0.0)	0.14

Células gigantes intraalveolares(%)	5 (83.3)	1 (16.6)	0.02
Pneumonia organizante bronquiolar(%)	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Pneumonia organizante intraalveolar(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Granuloma frouxo(%)	0 (0.0)	1 (16.6)	0.34
Granuloma compacto(%)	1 (16.6)	0 (0.0)	0.34
Foco fibroblástico peribronquiolar(%)	5 (83.3)	4 (66.6)	0.55
Foco fibroblástico sob colapso(%)	5 (83.3)	3 (50.0)	0.26
Ossificação dendriforme peribronquiolar(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
Ossificação dendriforme subpleural(%)	1 (16.6)	2 (33.3)	0.55
Antracose intersticial(%)	4 (66.6)	3 (50.0)	0.56
Material rendilhado eosinofílico(%)	4 (66.6)	0 (0.0)	0.01
Estrutura célula vegetal lentiliforme(%)	2 (33.3)	1 (16.6)	0.55
Nódulo meningoepitelial(%)	1 (16.6)	2 (33.3)	0.55
Distância entre pleura e bronquiolo(μ)*	340.53 \pm 176.09	697.72 \pm 264.52	0.01
Distância entre os bronquiolos(μ)*	1384.90 \pm 488.24	1944.41 \pm 922.50	0.22

Nota: PINE – Pneumonite intersticial não específica.

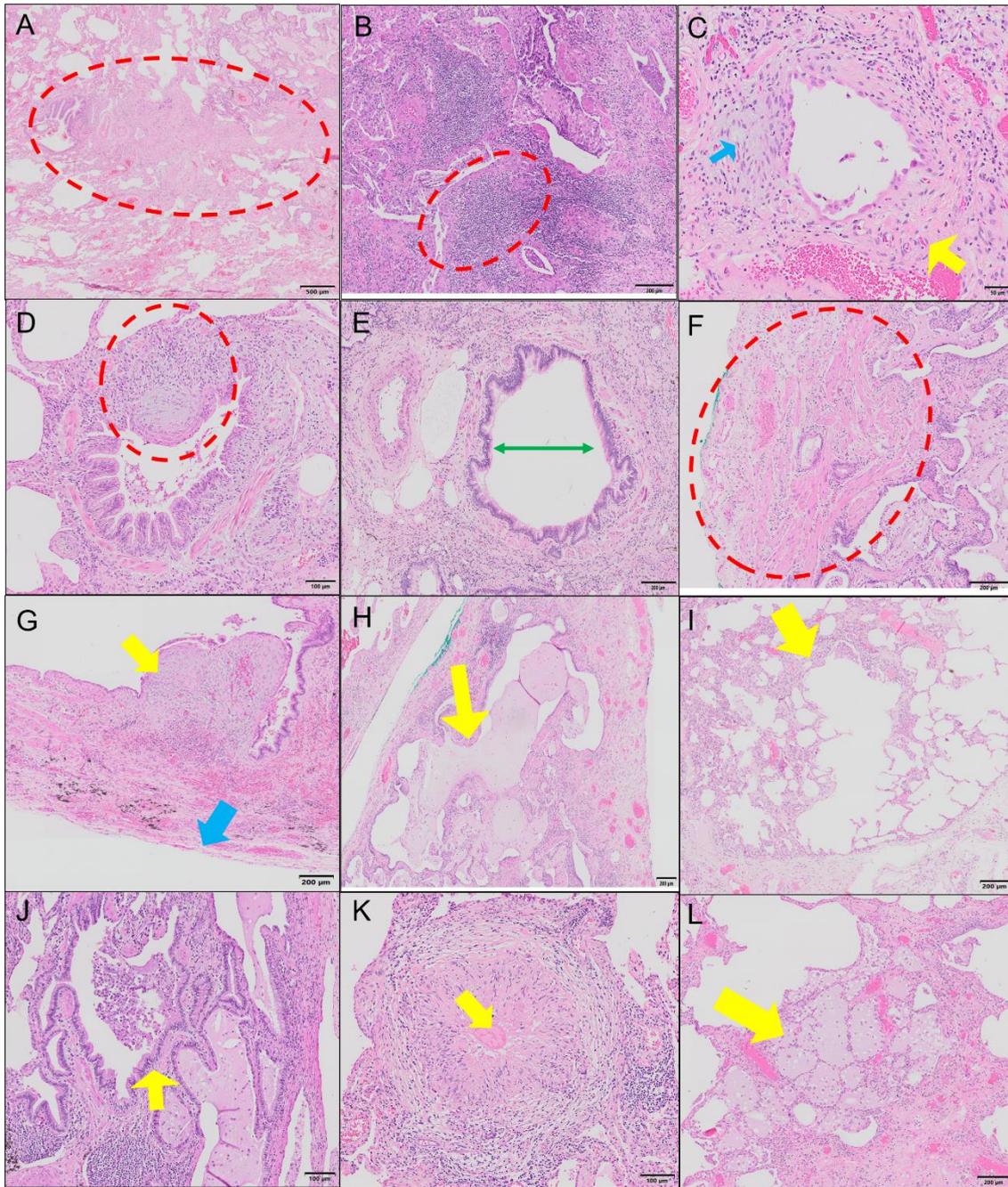


Figura 10 – Principais atributos histopatológicos observados nos grupos ASP e PH. (A) Remodelamento peribronquiolar (círculo pontilhado vermelho); (B) Agregado linfóide peribronquiolar (círculo pontilhado vermelho); (C) Tecido de granulação subepitelial bronquiolar, composto por novos capilares sanguíneos (seta amarela) e fibroblastos (seta azul); (D) Foco fibroblástico peribronquiolar (círculo pontilhado vermelho); (E) Bronquioloectasia (seta verde); (F) Colapso alveolar subpleural (círculo pontilhado vermelho); (G) Foco fibroblástico sob colapso na região subepitelial bronquiolar (seta amarela) com aparência subpleural (seta azul); (H) Dilatações císticas subpleurais bronquiolares (seta amarela); (I) Dilatações císticas subpleural do saco alveolar (seta amarela); (J) Bronquiolização (seta amarela); (K) Estrutura de célula vegetal lentiliforme (seta amarela); (L) Material mucóide eosinófilico (seta amarela).

Além dos achados descritos acima, foram observados alguns atributos específicos do processo fisiopatológico de cada etiologia, em sua maioria com diferença significativa de ocorrência entre ASP e PH. Na ASP, áreas com remodelamento difuso por fibrose foi predominante no parênquima pulmonar ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11A). Como descrito anteriormente, o processo de lesão inicia nos bronquíolos, onde foi observado fendas de colesterol em 5/6 indivíduos do grupo na região intraluminal bronquiolar ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11B), necrose péptica em todos os casos (Tabela 6 e Figura 11C), material rendilhado eosinofílico em 4/6 casos ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11D), e concreções hialinas irregulares intraalveolares na maioria dos casos de ASP ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11E), o que causaram, em 5/6 casos, exulceração bronquiolar devido ao insulto direto dessas estruturas com as células epiteliais ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11F). Além disso, essas estruturas estranhas provocam um processo inflamatório com a presença de neutrófilos na luz, *spillover* e células gigantes presente na maioria dos casos de ASP ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11G-I respectivamente). Concomitantemente à inflamação, foram observadas áreas fibróticas e remodeladas em uma fase mais tardia, com pouca inflamação ao redor. Algumas dessas regiões possuem remodelamento parenquimatoso difuso próximo ao fim do lobo pulmonar, culminando no padrão ponta encontrado em metade desses pacientes ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11J) e dilatações císticas com parede fibrótica densa com sacos alveolares destruídos em consequência à tração do remodelamento peribronquiolar, mimetizando um *honeycombing* típico de UIP, também presente em metade dos casos com ASP ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 11K).

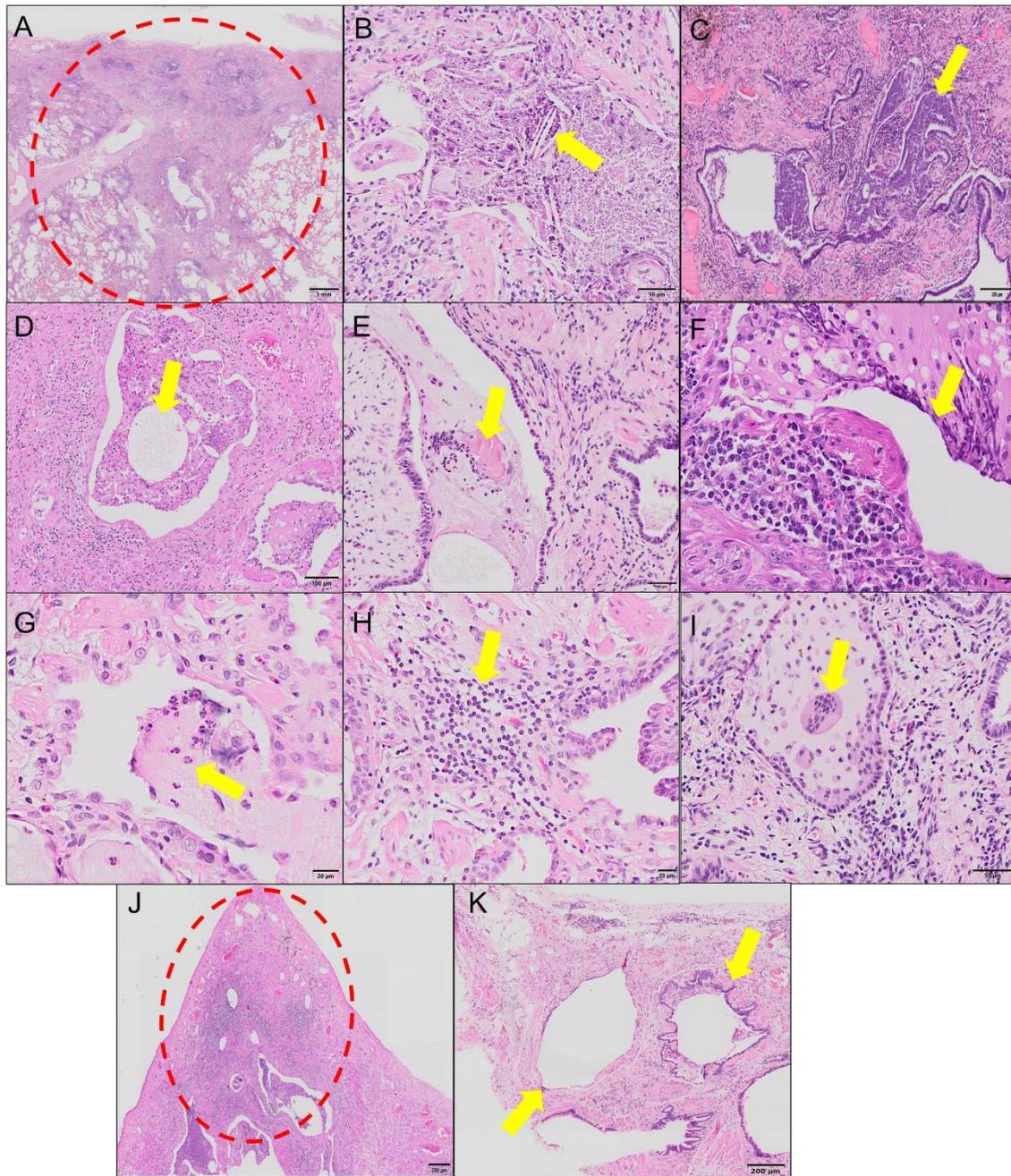


Figura 11 – Principais atributos histopatológicos observados nos pacientes do grupo ASP. (A) Remodelamento difuso (círculo pontilhado vermelho); (B) Fenda de colesterol (seta amarela); (C) Necrose péptica (seta amarela); (D) Material rendilhado eosinofílico (seta amarela); (E) Concreções hialinas irregulares intraalveolares (seta amarela); (F) Exulceração bronquiolar (seta amarela); (G) Neutrófilos na luz (seta amarela); (H) Spillover (seta amarela); (I) Células gigantes intraalveolares; (J) Padrão ponta (círculo pontilhado vermelho); (K) Honeycombing (seta amarela).

Nos casos de PH, o acometimento de lesão foi majoritariamente bronquiocêntrico ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 12A), com proliferação miofibroblástica e depósito de MEC no eixo broncovascular. Na maioria dos casos de PH, a fibrose bronquiocêntrica se estendeu ao bronquíolo adjacente,

formando a ponte reta ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 12B) ou à pleura, formando a ponte em delta ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 12C). Além da fibrose ativa presente, a hialinização subepitelial bronquiolar foi observada em metade dos casos, indicando um antigo processo fibrogênico ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 12D); e simultaneamente ao depósito de MEC e remodelamento parenquimatoso, focos de inflamação, como agregado linfóide na região subpleural, foram registrados em 4 de 6 casos (Tabela 6 e Figura 12E). De maneira geral, a retração do tecido pulmonar em decorrência do processo fibrosante foi significativamente menor do que nos casos de ASP, visto que a média da distância entre pleura e bronquíolo em PH foi maior ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 12F).

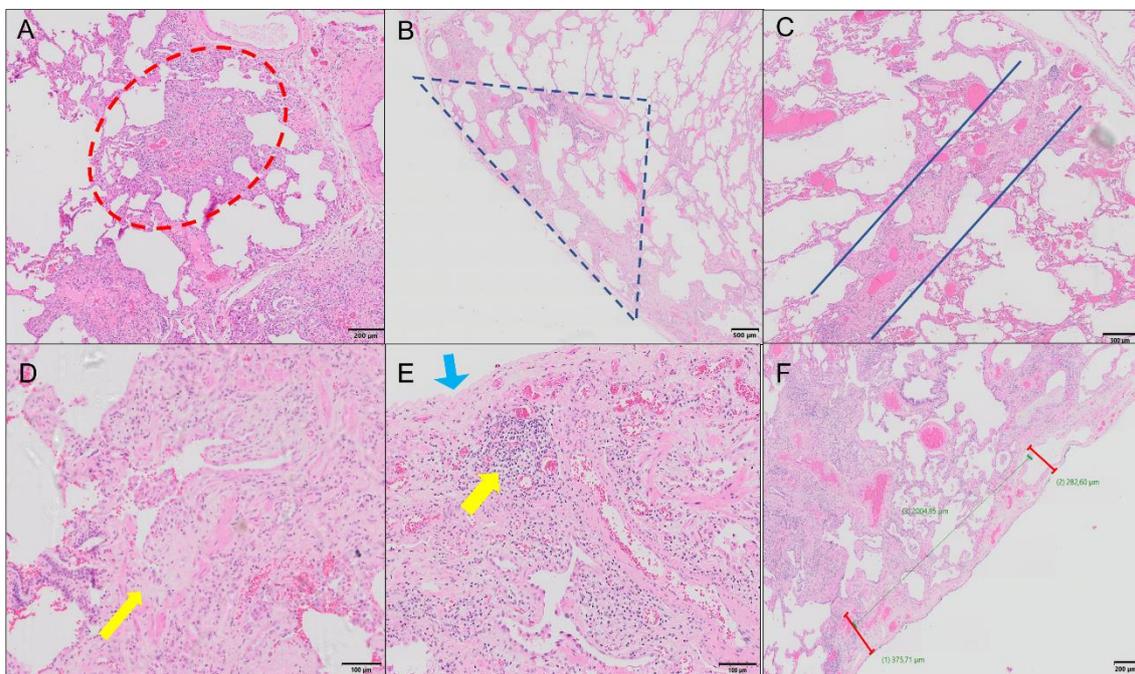


Figura 12– Principais atributos histopatológicos observados nos pacientes do grupo PH. (A) Lesão bronquiocêntrica (círculo pontilhado vermelho); (B) Ponte em delta (Triângulo pontilhado azul); (C) Ponte reta (linha contínua azul); (D) Hialinização subepitelial bronquiolar (seta amarela); (E) Agregado linfóide subpleural (agregado linfóide - seta amarela e pleura – seta azul); (F) Distância entre pleura e bronquíolo (linhas contínuas vermelhas).

6.4 Análise Molecular – Transcriptoma

6.4.1 Extração de RNA e Sequenciamento de Nova Geração

Após a extração de RNA, realizamos a quantificação das amostras pelo Qubit, obtendo resultados variando de 35 a 200 ng/ μ l (Tabela 7). Além disso, na avaliação da qualidade das amostras por BioAnalyzer, observados um baixo

número de integridade do RNA (RIN), o esperado por se tratar de amostras parafinadas. Contudo, para o DV200, a maioria apresentou cerca de 50 a 70% ou mais que 70% de RNA com 200 nucleotídeos, implicando em amostras pouco fragmentadas (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7 - Resultados da análise de quantidade e qualidade do RNA extraído de cada amostra.

ID	GRUPO	QUBIT (ng/μl)	RIN	DV200
1	ASP	152	2.4	30-50%
2	ASP	162	2.3	30-50%
3	ASP	200	2.6	50-70%
4	ASP	172	2.8	50-70%
5	ASP	35	1	> 70%
6	ASP	112	2.3	50-70%
7	PH	106	2.7	30-50%
8	PH	44.4	2.2	30-50%
9	PH	53.2	2.1	> 70%
10	PH	54.8	2.5	30-50%
11	PH	35.6	2.4	50-70%
12	PH	136	2.2	> 70%

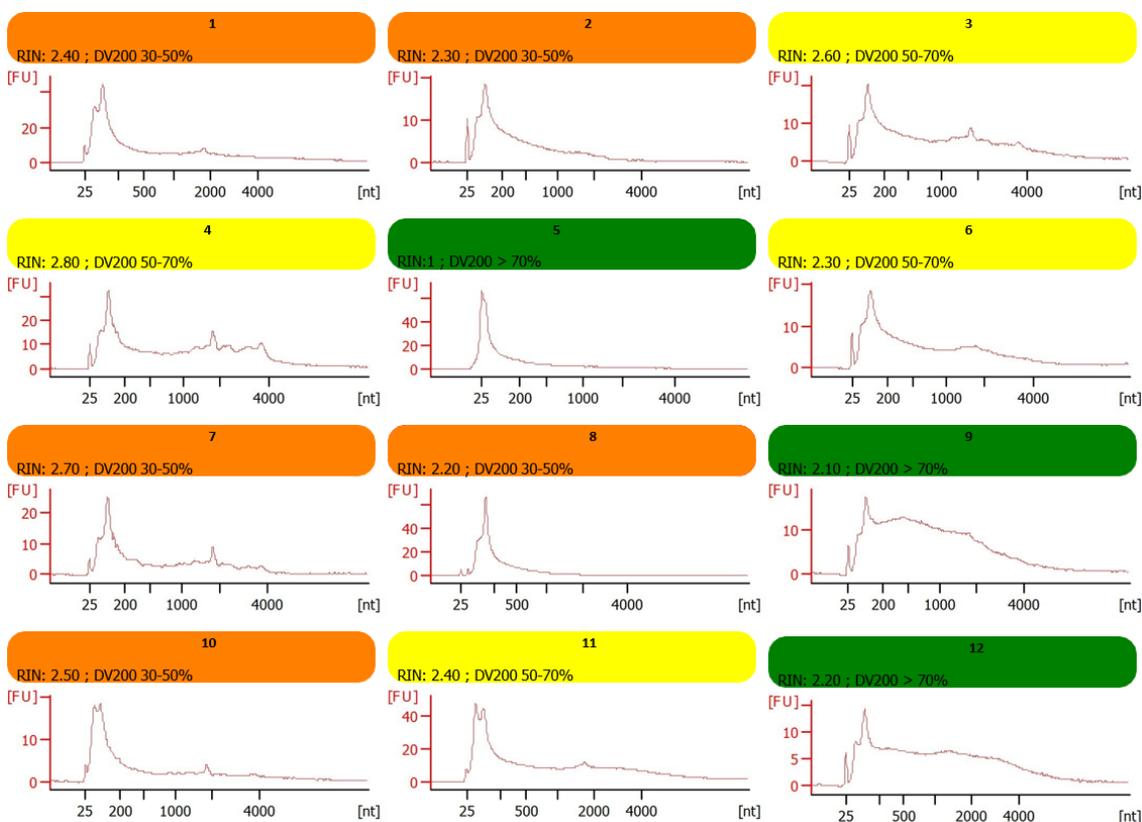


Figura 13 – Resultados do BioAnalyzer para RNA extraído com análise do RIN e DV200. O baixo valor de RIN é esperado para extração de RNA de amostra parafinada. Apesar disso, pelo DV200, nota-se que 3 amostras possuem mais que 70% das suas sequencias com 200 nucleotídeos e 4 amostras com 50 a 70% das suas sequencias com 200 nucleotídeos, implicando uma baixa fragmentação e boa qualidade de RNA além do esperado.

Em seguida, a construção da biblioteca e análise por BioAnalyser foram realizadas para avaliar o comprimento do cDNA amplificado (Figura 14). Foi notado que todas as amostras, exceto a amostra 11, apresentaram entre 300–450 pares de base (pb), o esperado de acordo com o protocolo. Adicionalmente, os resultados da quantificação por qPCR revelaram que as 12 amostras apresentaram valores de Ct dentro da curva padrão e as concentrações finais variaram de 0.6 a 116 nM. Diante desses resultados, a amostra 11 (de concentração 0,6 nM) foi excluída e a normalização das 11 amostras na concentração final de 2 nM foi realizada para o SNG. Para isso, as diluições das amostras foram feitas conforme os cálculos da Tabela 8.

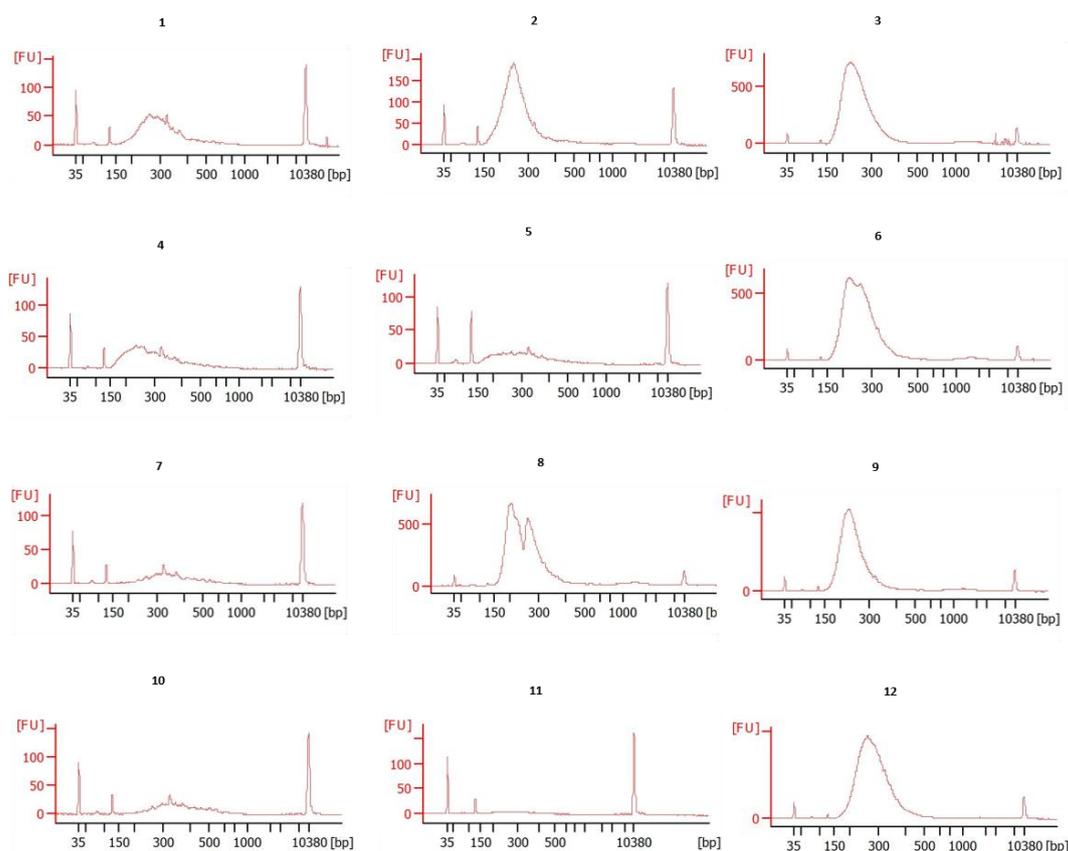


Figura 14 - Resultados do BioAnalyzer para cDNA amplificado. De acordo com o protocolo, o comprimento médio típico da biblioteca para inserções de 150 pb está na faixa de 300–450 pb. Assim, todas as amostras encontram-se nesta faixa, exceto a amostra 11.

Tabela 8 – Normalização das amostras para 2nM. De acordo com as concentrações individuais de cada amostra, a normalização foi feita para 2nM a partir de diluições seguindo os volumes da tabela.

ID	GRUPO	DILUIÇÃO	C nM	V INICIAL	C FINAL nM	V FINAL	V ÁGUA
1	ASP	1:10,000	5.599	2	2	5.6	3.6
2	ASP	1:100,000	15.75	2	2	15.75	13.75
3	ASP	1:100,000	95.302	2	2	95.3	93.3
4	ASP	1:10,000	4.377	2	2	4.38	2.38
5	ASP	1:10,000	3.037	2	2	3.04	1.04
6	ASP	1:100,000	85.269	2	2	85.27	83.27
7	PH	1:10,000	2.465	2	2	2.46	0.46
8	PH	1:100,000	116.075	2	2	116.08	114.08
9	PH	1:100,000	45.63	2	2	45.63	43.63
10	PH	1:10,000	3.01	2	2	3.01	1.01
12	PH	1:100,000	65.119	2	2	65.12	63.12

6.4.2 Bioinformática do RNA-Seq

Devido ao uso de amostras parafinadas, o tamanho das bibliotecas variou consideravelmente, entre 3.7 a 0,046 milhões de leituras (Figura 15A). Por conta da baixa profundidade de leitura, duas amostras do grupo PH (identificadas por 7 e 10) foram excluídas. Ademais, a análise de componentes principais (PCA) diferenciou os casos de ASP e PH por um agrupamento coeso dos casos de PH, enquanto os casos de ASP apresentaram-se orbitando os casos de PH (Figura 15B).

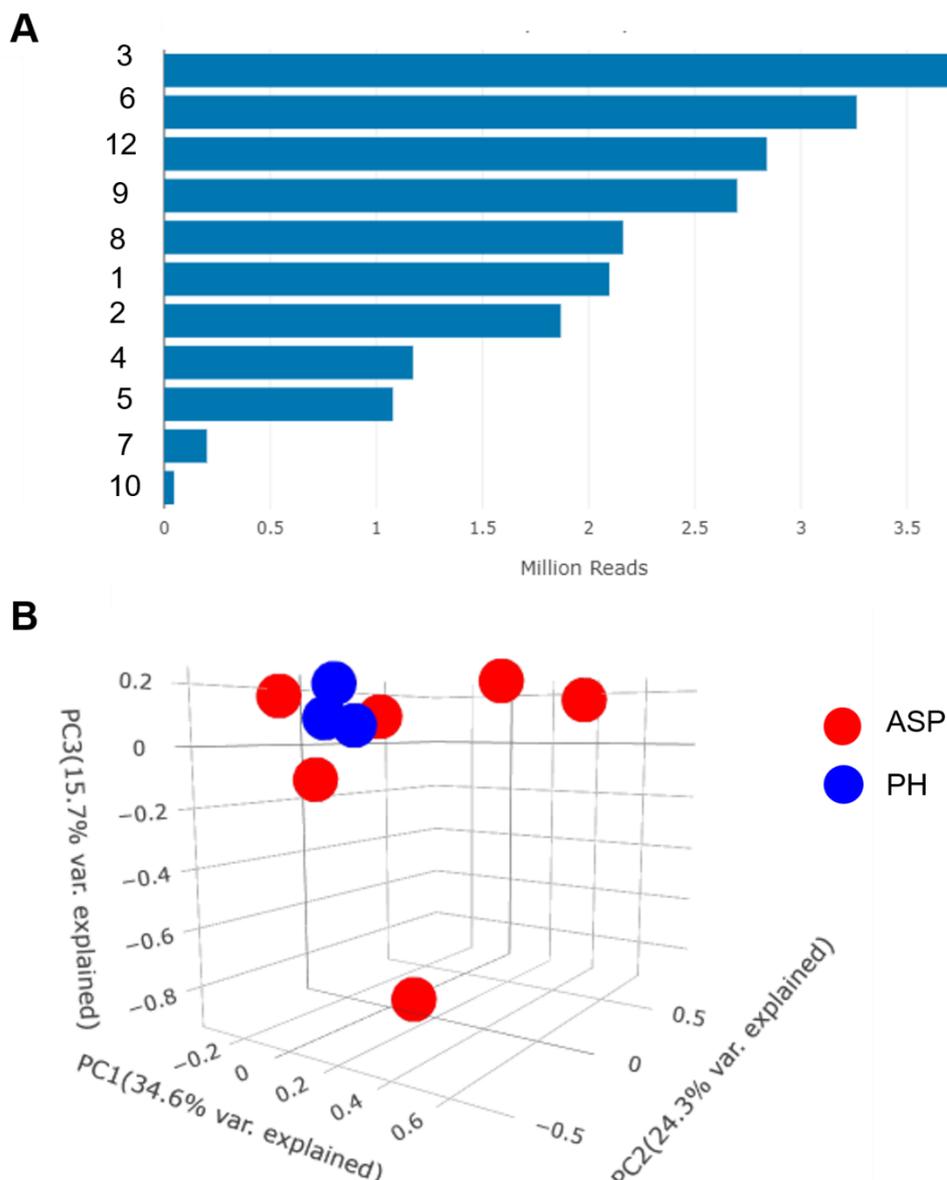


Figura 15 - Resultados iniciais do RNA-Seq. (A) Tamanho da biblioteca em milhões de leituras, variando de 0,046 a 3.7; (B) Análise de componentes principais (PCA) evidenciou um agrupamento coeso dos casos de PH com casos de ASP orbitando-os.

A comparação entre as assinaturas transcricionais entre os grupos ASP e PH foi realizada para encontrar os top 100 genes codificadores de proteínas diferencialmente expressões (Tabela 9). Foi identificado 40 genes up-regulados e 60 genes down-regulados em um valor de $P < 0,05$ e \log_2 fold change variando de 0,42 a 5,42 e -0,41 a -2,9 respectivamente. Dentre eles, 19 genes apresentaram-se up-expressos (\log_2 fold change > 1 , $P < 0,05$) e 28 down-expressos (\log_2 fold change < -1 , $P < 0,05$) entre os grupos ASP e PH e 8 up-expressos (\log_2 fold change $> 1,5$, $P < 0,05$) e 11 down-expressos (\log_2 fold change $< -1,5$, $P < 0,05$) entre ASP e PH (Figura 16). Dos genes diferencialmente

expressos, alguns destacam-se pelo seu papel em cada etiologia, são eles: Genes up-expressos na ASP: 1) MUC20; 2) GPC6; e 3) SDK1. E genes down-expressos na ASP e up-expressos da PH: 1) FN1; 2) CLEC10A; 3) IFI30; 4) COL6A6; 4) GPD1 (Tabela 9 e Figura 16).

Tabela 9 – Top 100 genes diferencialmente expressos entre ASP e PH.

Gene	logFC	AveExpr	P-value
<u>HLA-DQA1</u>	5.42	5.76	0.011548
<u>HLA-DRB5</u>	3.96	2.6	0.035157
<u>HLA-DQB1</u>	3.82	5.75	0.034424
<u>HLA-DRB1</u>	3.38	4.78	0.035226
<u>CYP24A1</u>	2.78	3.67	0.019557
<u>HNF4A</u>	1.76	2.32	0.010236
<u>B4GALNT4</u>	1.73	2.78	0.022284
<u>CNIH3</u>	1.58	2.22	0.024296
<u>IGLL5</u>	1.32	8.09	0.016558
<u>CTH</u>	1.27	2.29	0.031116
<u>FYB2</u>	1.24	4.21	0.020292
<u>KCNN3</u>	1.13	5.79	0.009378
<u>AK9</u>	1.09	5.06	0.01964
<u>IRF4</u>	1.09	7.07	0.034234
<u>SDS</u>	1.08	3.94	0.035409
<u>SYNPO2</u>	1.06	9.71	0.012466
<u>RASSF6</u>	1.05	4.02	0.018671
<u>MUC20</u>	1.01	7.29	0.005369
<u>HMCN2</u>	1	8.16	0.036599
<u>GPC6</u>	0.96	5.36	0.020622
<u>CFTR</u>	0.96	4.51	0.022104
<u>CES4A</u>	0.84	6.27	0.031449
<u>FAM241A</u>	0.78	4.34	0.028337
<u>CPXM2</u>	0.75	6.21	0.012572
<u>SULF1</u>	0.75	7.15	0.020478
<u>IGFBP3</u>	0.75	6.73	0.040911
<u>CDS1</u>	0.71	5.76	0.032502
<u>SLC13A4</u>	0.7	5.81	0.015117
<u>PRUNE2</u>	0.7	7.38	0.038109
<u>EBF1</u>	0.68	6.69	0.014995
<u>GLIS3</u>	0.67	7.3	0.030152
<u>ELL2</u>	0.62	7.4	0.021914
<u>HSPH1</u>	0.59	6.08	0.026313
<u>SDK1</u>	0.58	8.14	0.017611
<u>GOLGA8A</u>	0.58	7.89	0.021196
<u>SREK1</u>	0.53	7.66	0.015617

<u>PGRMC2</u>	0.52	6.38	0.03306
<u>EID1</u>	0.49	6.88	0.023938
<u>WWTR1</u>	0.48	7.84	0.021736
<u>CTCF</u>	0.42	6.92	0.037584
<u>DPYSL2</u>	-0.41	10.3	0.040838
<u>GUK1</u>	-0.43	7.67	0.032794
<u>HIP1</u>	-0.51	8.23	0.01055
<u>TANC2</u>	-0.51	8.53	0.040721
<u>VTI1B</u>	-0.52	5.57	0.027077
<u>FGR</u>	-0.52	7.33	0.035608
<u>COTL1</u>	-0.56	8.15	0.014028
<u>NCKAP1L</u>	-0.56	7.39	0.035245
<u>SLC34A2</u>	-0.59	11.25	0.02379
<u>TWF2</u>	-0.6	6.2	0.038168
<u>CISH</u>	-0.63	6.8	0.034925
<u>PNPLA6</u>	-0.63	8.84	0.035991
<u>ATP11A</u>	-0.65	9.85	0.012768
<u>ARPC1B</u>	-0.66	8.18	0.006801
<u>OSBPL11</u>	-0.67	5.81	0.024133
<u>DHCR7</u>	-0.67	5.29	0.027969
<u>GRN</u>	-0.7	9.21	0.024681
<u>KCNK3</u>	-0.71	7.59	0.017385
<u>AGPAT2</u>	-0.72	6.88	0.010584
<u>ICAM1</u>	-0.73	8.7	0.029509
<u>CENPX</u>	-0.75	4.52	0.034356
<u>NPC2</u>	-0.76	7.78	0.014012
<u>FBP1</u>	-0.77	6.96	0.034586
<u>CLYBL</u>	-0.78	4.97	0.034413
<u>SNORA73B</u>	-0.82	9.8	0.040772
<u>FN1</u>	-0.84	12.65	0.003332
<u>ITGB6</u>	-0.86	6.71	0.033578
<u>CLEC10A</u>	-0.87	4.92	0.016231
<u>GLIPR2</u>	-0.88	6.62	0.004486
<u>ALOX5</u>	-0.91	7.9	0.012473
<u>CD52</u>	-0.96	5.57	0.015179
<u>ACE</u>	-0.96	8.11	0.038332
<u>AQP1</u>	-1.04	10.27	0.004899
<u>IFI30</u>	-1.04	8.49	0.005047
<u>HCK</u>	-1.04	6.61	0.032225
<u>A2M-AS1</u>	-1.06	5.1	0.032058
<u>OSCAR</u>	-1.06	5.43	0.03987
<u>CTSW</u>	-1.09	4.9	0.014816
<u>ALOX5AP</u>	-1.17	4.81	0.018594
<u>CD300LF</u>	-1.17	4.75	0.02762
<u>ABCA3</u>	-1.19	9.56	0.022825
<u>VSIG4</u>	-1.19	6.4	0.031939

<u>GLDN</u>	-1.26	5.43	0.021928
<u>CCDC141</u>	-1.26	6.37	0.033321
<u>MCEMP1</u>	-1.35	4.98	0.006056
<u>PLA2G4F</u>	-1.36	6.98	0.036242
<u>C6orf223</u>	-1.39	3.78	0.018869
<u>LILRA5</u>	-1.4	3.02	0.012685
<u>COL6A6</u>	-1.43	7.43	0.029761
<u>LGI3</u>	-1.51	5.35	0.017547
<u>GPC5</u>	-1.55	5.08	0.003033
<u>ALPP</u>	-1.58	3.65	0.016734
<u>GPD1</u>	-1.69	4.9	0.010365
<u>VWC2</u>	-1.69	2.06	0.024848
<u>GPA33</u>	-1.77	2.94	0.026596
<u>DPYS</u>	-1.98	2.32	0.014868
<u>CCR4</u>	-2.48	1.78	0.016134
<u>HBB</u>	-2.49	8	0.00106
<u>FFAR4</u>	-2.64	1.71	0.030589
<u>VSIG1</u>	-2.9	2.14	0.017202

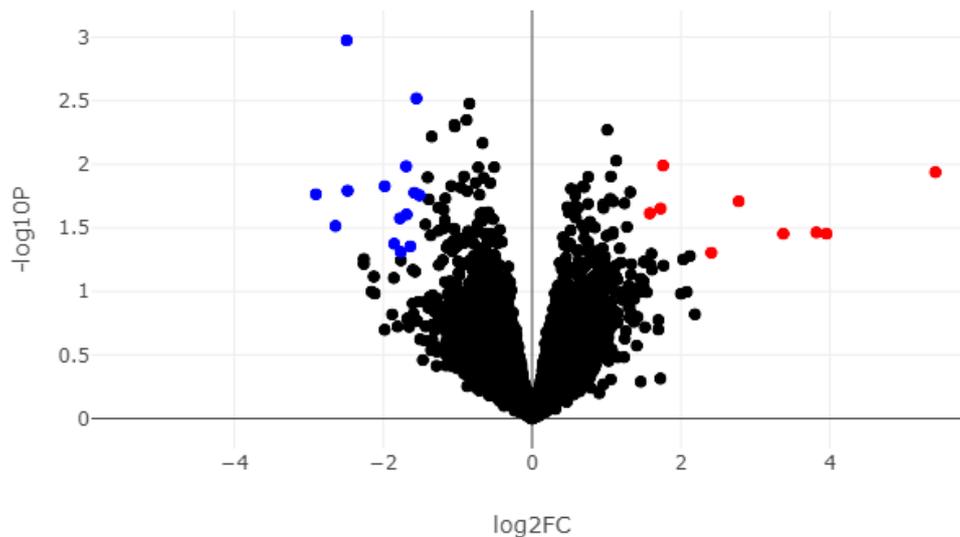


Figura 16 - Gráfico de vulcão mostrando genes diferencialmente expressos entre os grupos ASP e PH. Genes diferencialmente expressos na ASP com $P < 0,05$ e \log_2 fold change < -1.5 estão representados em azul; enquanto genes com $P < 0,05$ e \log_2 fold change > 1.5 estão representados em vermelho. Os genes com $P < 0,05$ e \log_2 fold change entre -1.5 a 1.5 estão representados em preto.

As contagens de genes brutos foram normalizadas usando o método logCPM, filtradas selecionando os 2.500 genes com expressão mais variável e finalmente transformadas usando o método Z-score. A clusterização hierárquica pela distância euclidiana desses genes agrupou com precisão as amostras conforme seus grupos ASP e PH (Figura 17A). Apesar da homogênea

distribuição e expressão da maioria dos genes entre os dois grupos, há algumas clusterizações gênicas com diferentes níveis de expressão entre ASP E PH, marcados pela barra em amarelo (Figura 17A). A clusterização dos 28 genes mais diferencialmente expressos entre os grupos (Tabela 9) evidenciou os seguintes agrupamentos (Figura 17B): Cluster gênico destacado pela seta verde apresentam uma up-expressão na ASP, com a participação do MUC12, COL7A1, COL17A1, ANKFN1, dentre outros. Os genes destacados pela seta rosa apresentam uma up-expressão na PH, como COL26A1, CLEC4C, CLEC9A e IFI44. E os genes destacados pela seta laranja apresentam uma distribuição mais homogênea entre os grupos, composta em uma maioria de genes da família COL, como COL22A1 e COL10A1 e CLEC4G e CLEC18A.

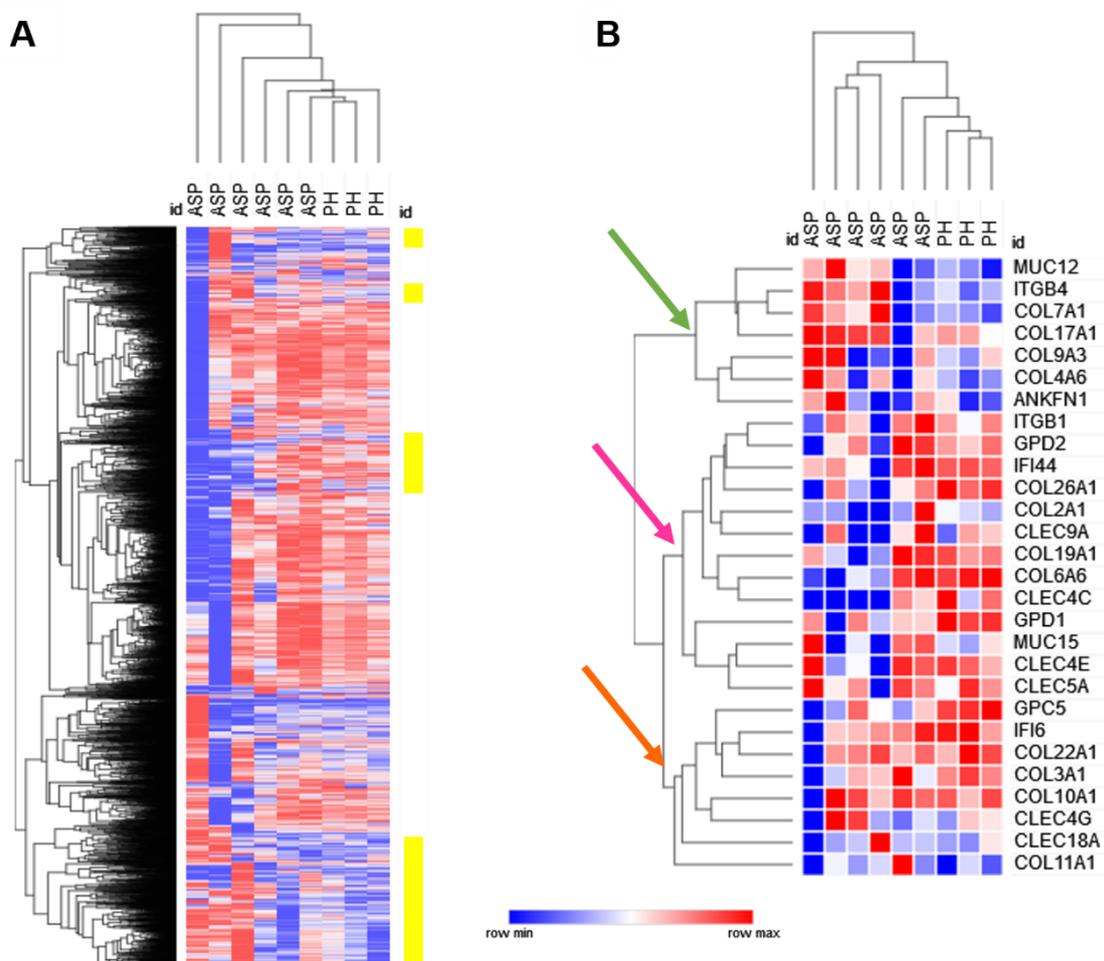


Figura 17 Resultados iniciais do RNA-Seq. (A) Clusterização hierárquica do transcriptoma total das 9 amostras sequenciadas, com clusterizações gênicas diferenciais entre os grupos (barra amarela); (B) Clusterização hierárquica das 9 amostras para 28 genes mais diferencialmente expressos entre os grupos (Tabela 9), destacando agrupamentos gênicos com up-expressão na ASP (seta verde), up-expressão na PH (seta rosa); e distribuição homogênea de expressão em ambos os grupos (seta laranja).

As análises de enriquecimento foram realizadas com *Gene Ontology* (GO) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Figura 18). Genes up-regulados diferencialmente expressos em ASP foram mapeados para 15 termos de GO processos biológicos, incluindo movimento e organização ciliar; enquanto os down-regulados estavam associados a imunidade mediada por neutrófilos e organização de MEC (Figura 18A). Nas vias de KEGG, os genes up-regulados em ASP foram mapeados a 15 vias, como asma; e interação do receptor MEC em down-regulação. (Figura 18B). A ferramenta L100CDS² identificou algumas substâncias preditivas que mimetizam e revertem os efeitos de uma assinatura de expressão gênica a partir dos genes diferencialmente expressos, como *emetine dihydrochloride hydrate* e *trichostatin A* respectivamente (Figura 18C).

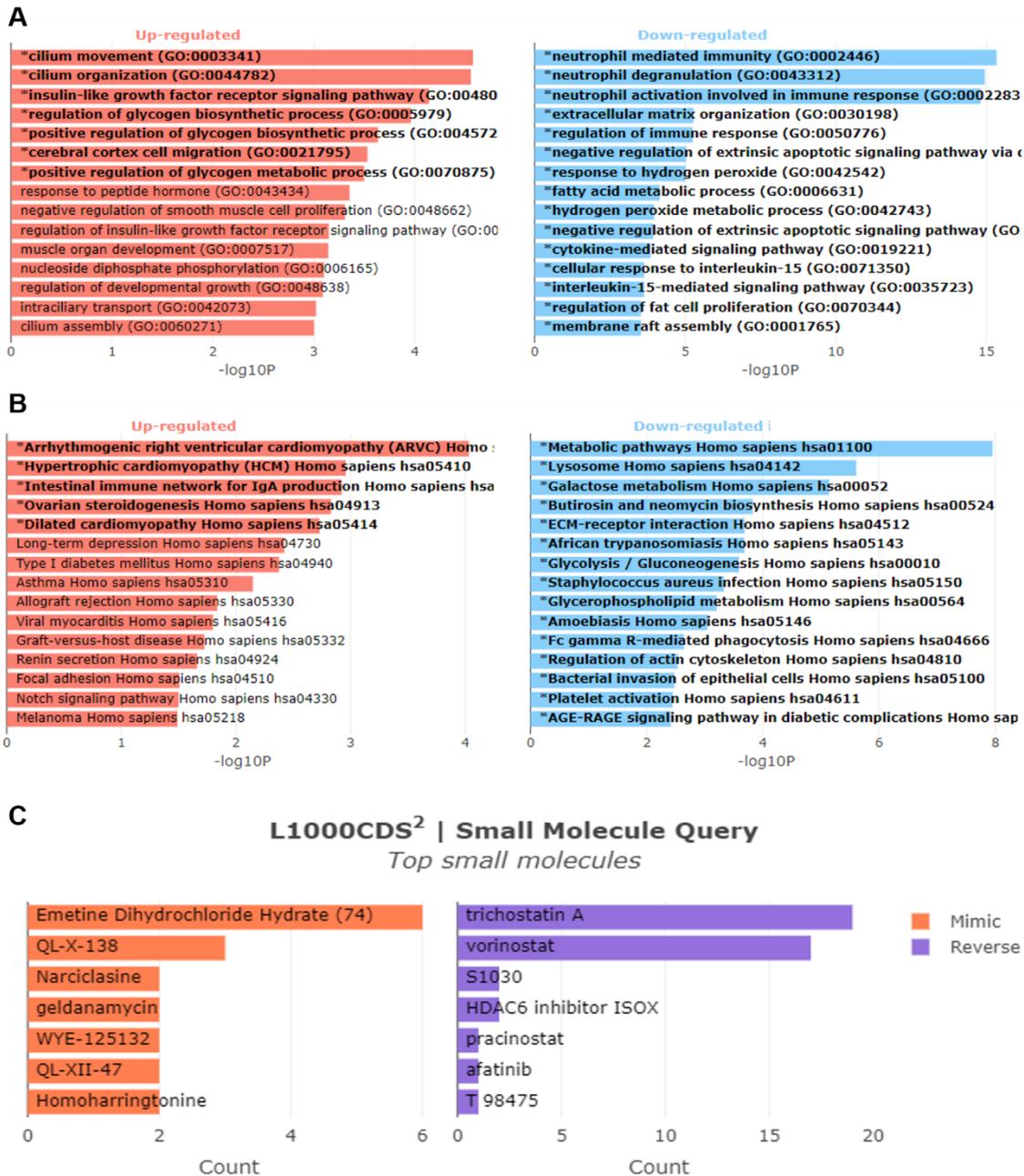


Figura 18 - Análises adicionais ao RNA-Seq. (A) Análise de enriquecimento gene ontology (GO) para processos biológicos de genes up-expressos na ASP (vermelho) e down-expressos na ASP (azul); (B) Análise de enriquecimento Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) para vias moleculares de genes up-expressos na ASP (vermelho) e down-expressos na ASP (azul); (C) Ferramenta preditiva L100CDS² destacando substâncias que mimetizam (laranja) e revertem (roxo) os efeitos da assinatura de expressão gênica diferencialmente expressa na ASP.

6.5 Clusterização dos dados

A análise dos dados individuais e em conjunto por heatmap proporcionou algumas importantes observações. A clusterização dos pacientes a partir das

principais informações clínicas (Figura 19A) e da PFP (Figura 19B) não agrupou os indivíduos conforme a etiologia, apresentando-se de maneira heterogenia. Similarmente, as informações radiológicas também não clusterizaram os pacientes conforme o diagnóstico etiológico, além de apresentar uma distribuição semelhante entre a presença ou ausência dos atributos (Figura 20).

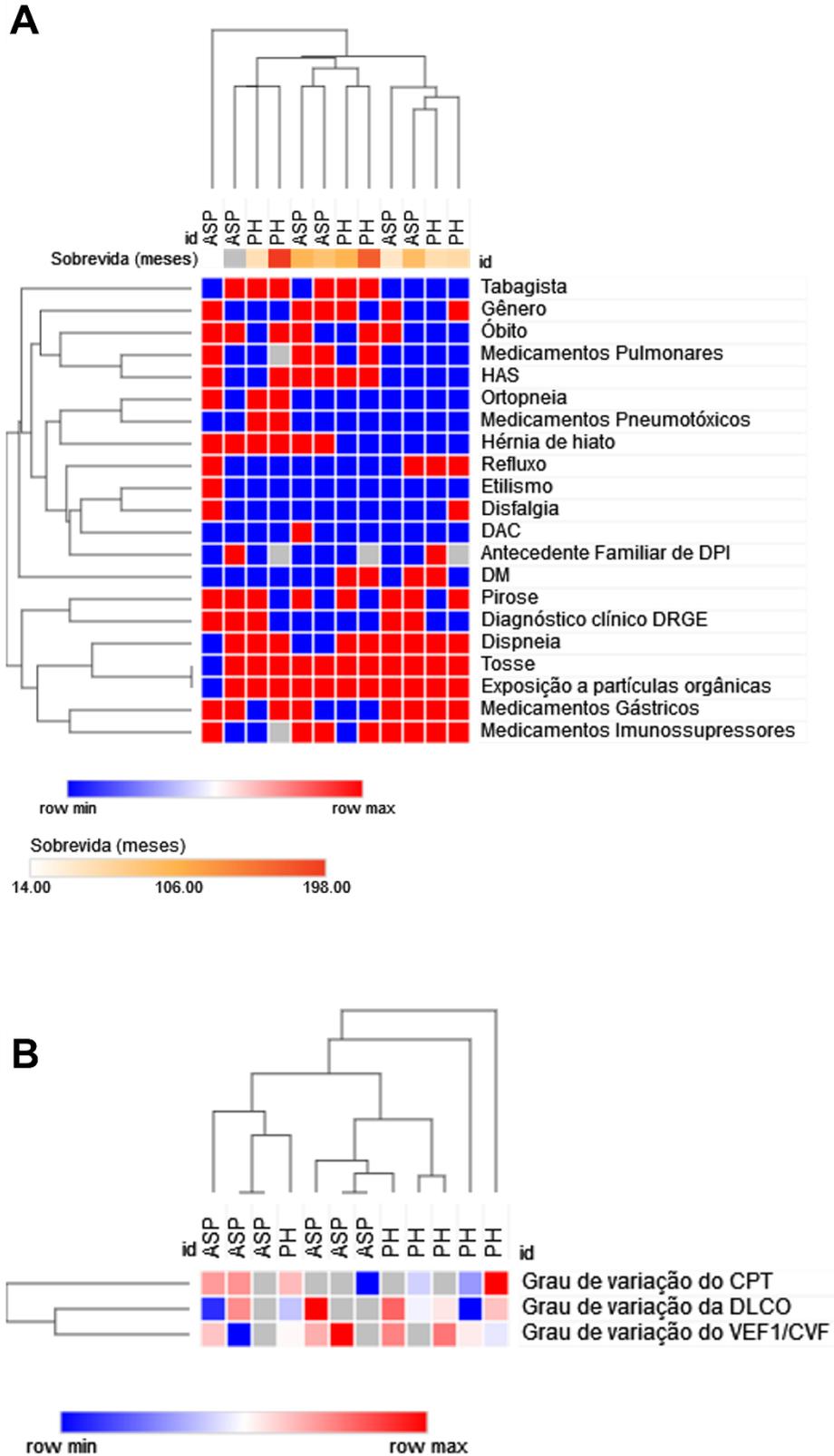


Figura 19 - Clusterização hierárquica dos dados clínicos e da prova de função pulmonar. (A) As informações dos principais dados clínicos não clusterizaram os pacientes corretamente conforme o diagnóstico etiológico; (B) O grau de variação do CPT, DLCO e VEF1/CVF (variação entre o valor do parâmetro do último exame e do

primeiro exame) não clusterizaram os pacientes corretamente conforme o diagnóstico etiológico.

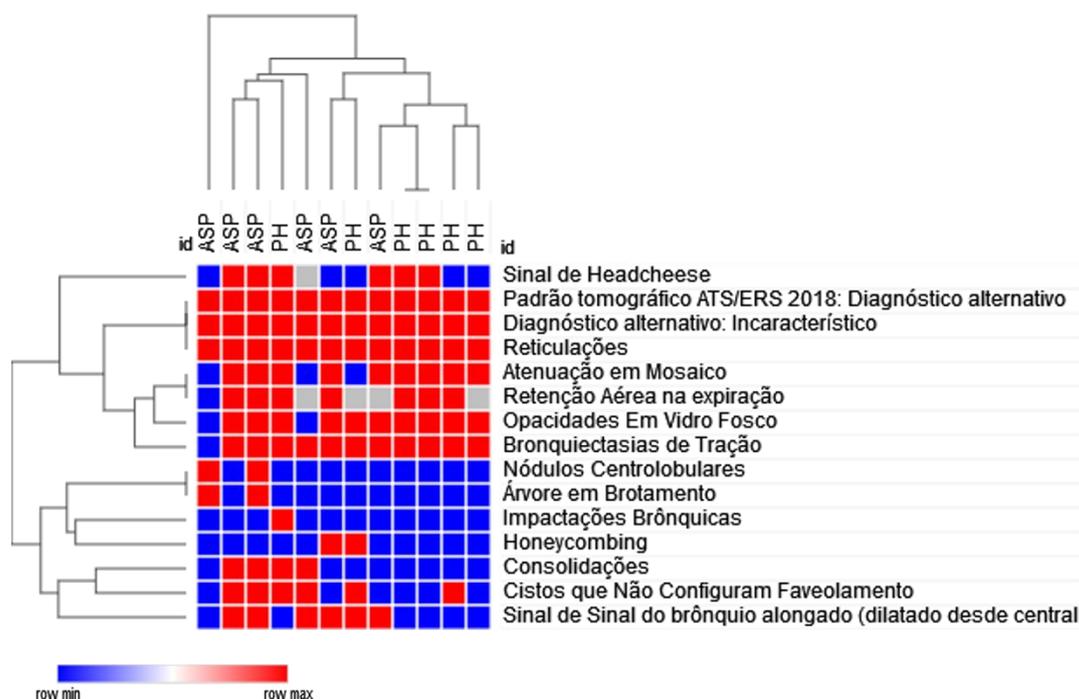


Figura 20 - Clusterização hierárquica dos atributos radiológicos. As informações adquiridas da TCAR apresentaram em homogênea distribuição entre os pacientes, sem distinção correta das etiologias.

Por outro lado, na clusterização dos dados histopatológicos, é possível observar a divisão entre os grupos PH e ASP. Ademais, nota-se alguns atributos específicos de cada etiologia, como necrose péptica, material rendilhado eosinofílico e exulceração bronquiolar para ASP (Figura 21 seta verde); e ponte em delta, ponte reta e agregado linfóide subpleural para PH (Figura 21 seta rosa). A análise em conjunta dos dados histopatológicos (estrela amarela) e radiológicos (triângulo verde) definiu corretamente os dois grupos, embora os atributos radiológicos ainda se comportarem inespecificamente (Figura 22).

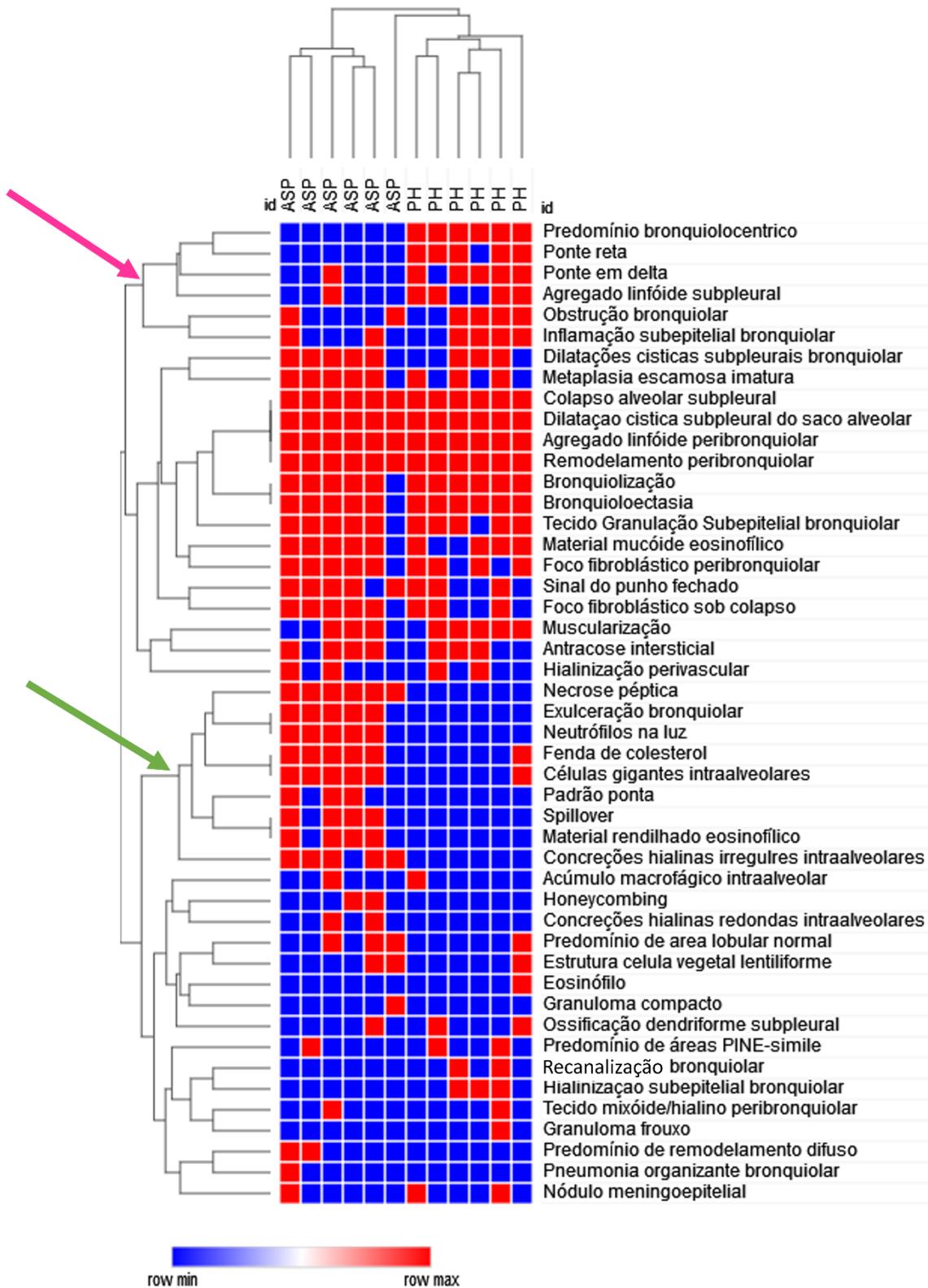


Figura 21- Clusterização hierárquica dos atributos histopatológicos. As informações histológicas clusterizaram os pacientes conforme o diagnóstico etiológico. Apesar de algumas regiões apresentarem distribuição homogênea para ausência e presença dos parâmetros histológicos, 2 clusters específicos de cada etiologia foram destacados em rosa (PH) e verde (ASP).

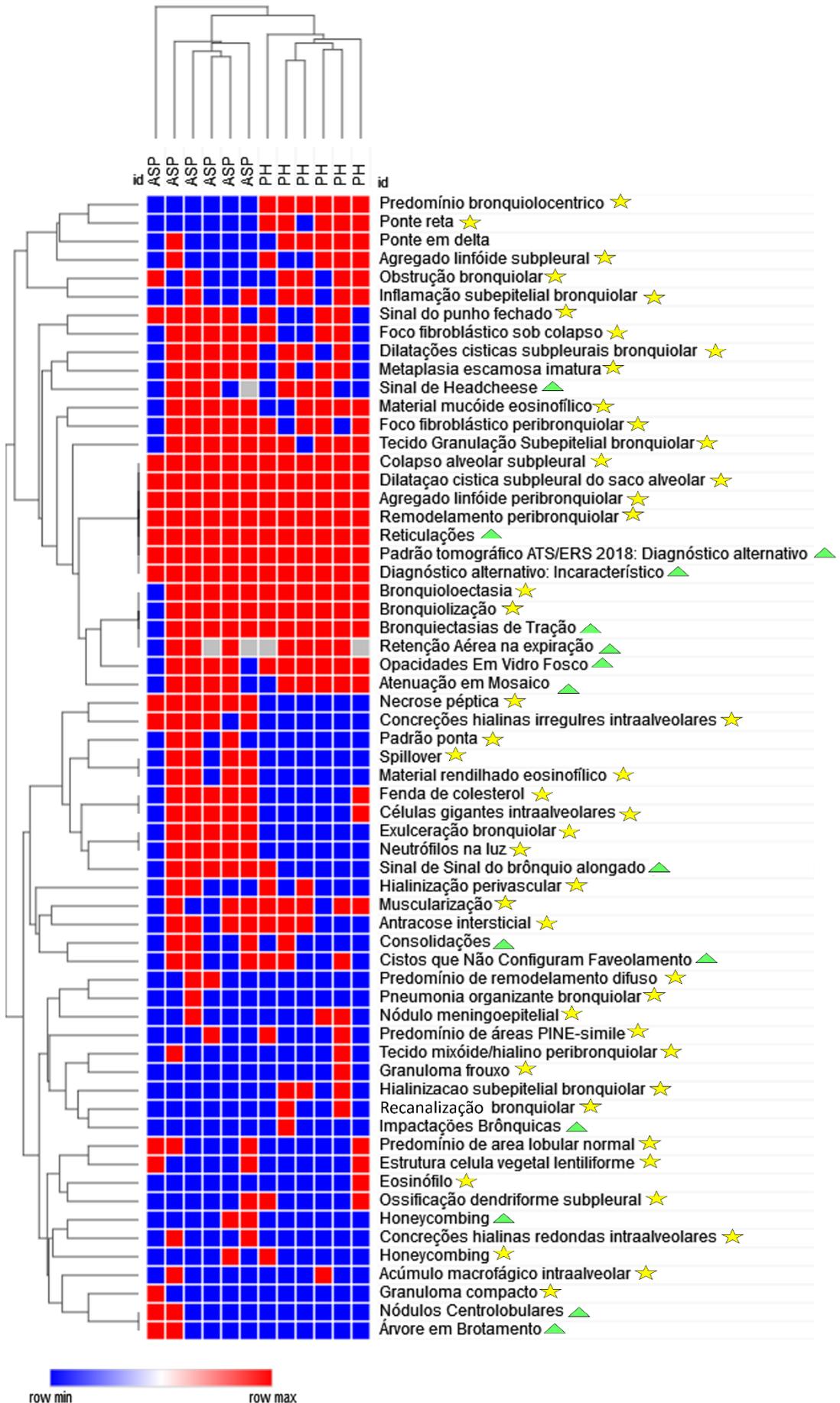


Figura 22 - Clusterização hierárquica dos atributos rádio e histopatológicos. Embora a clusterização dos pacientes estejam de acordo com os diagnósticos etiológicos, os atributos dos exames de imagem não contribuíram para a correta clusterização, permanecendo inespecífico. Atributos radiológicos destacados pelo triângulo verde e histopatológicos pela estrela amarela

No heatmap contendo os dados histológicos com diferença significativa entre os grupos (Tabela 6), juntamente com o transcriptoma total, foi possível notar a clusterização correta dos grupos e alguns agrupamentos gênicos em concordância com os atributos histológicos (Figura 23). Três agrupamentos gênicos são destacados na Figura 24): 1) Expressão homogênea entre ASP e PH (seta laranja), COL11A1, COL10A1, CLEC4G, IFI6, entre outros com remodelamento difuso, fenda de colesterol e células gigantes intraalveolares na histologia; 2) Up-expressão na PH (seta rosa), COL6A6, COL2A1, CLEC4C, CLEC9A, GPD2, IFI44, entre outros com ponte reta e delta e lesão bronquiocêntrica; 3) Up-expressão na ASP (seta verde), COL9A3, COL4A6, COL7A1, ANKFN1, MUC12, entre outros com remodelamento difuso, necrose péptica, material rendilhado eosinofílico, spillover e concreções hialinas irregulares intraalveolares.

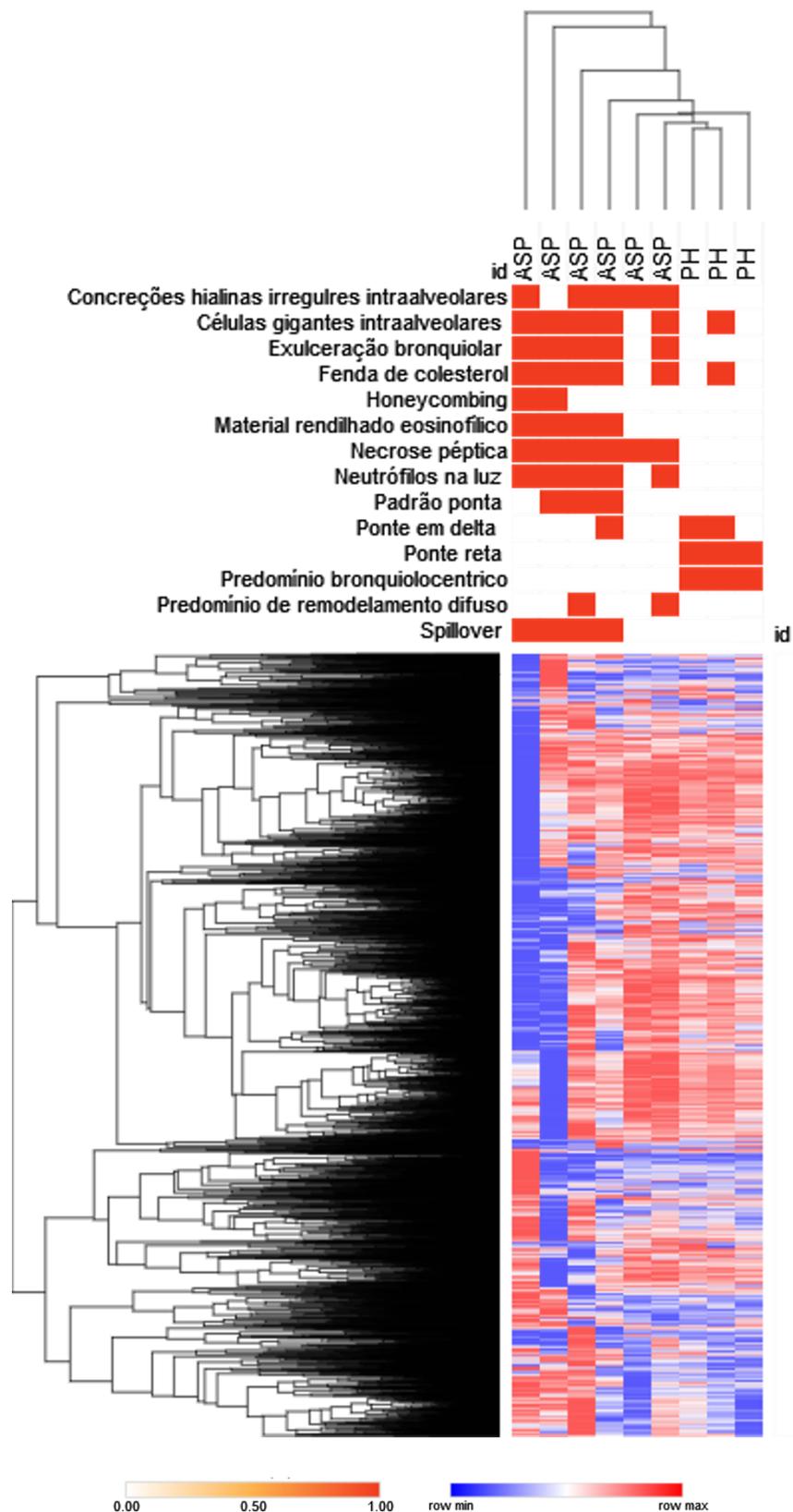


Figura 23 - Clusterização hierárquica dos atributos histopatológicos com diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos e transcriptoma total. Apesar de aparentar uma distribuição homogênea dos genes entre os grupos, os pacientes foram corretamente agrupados conforme suas etiologias, e foi possível notar alguns agrupamentos gênicos em concordância com os atributos histológicos.

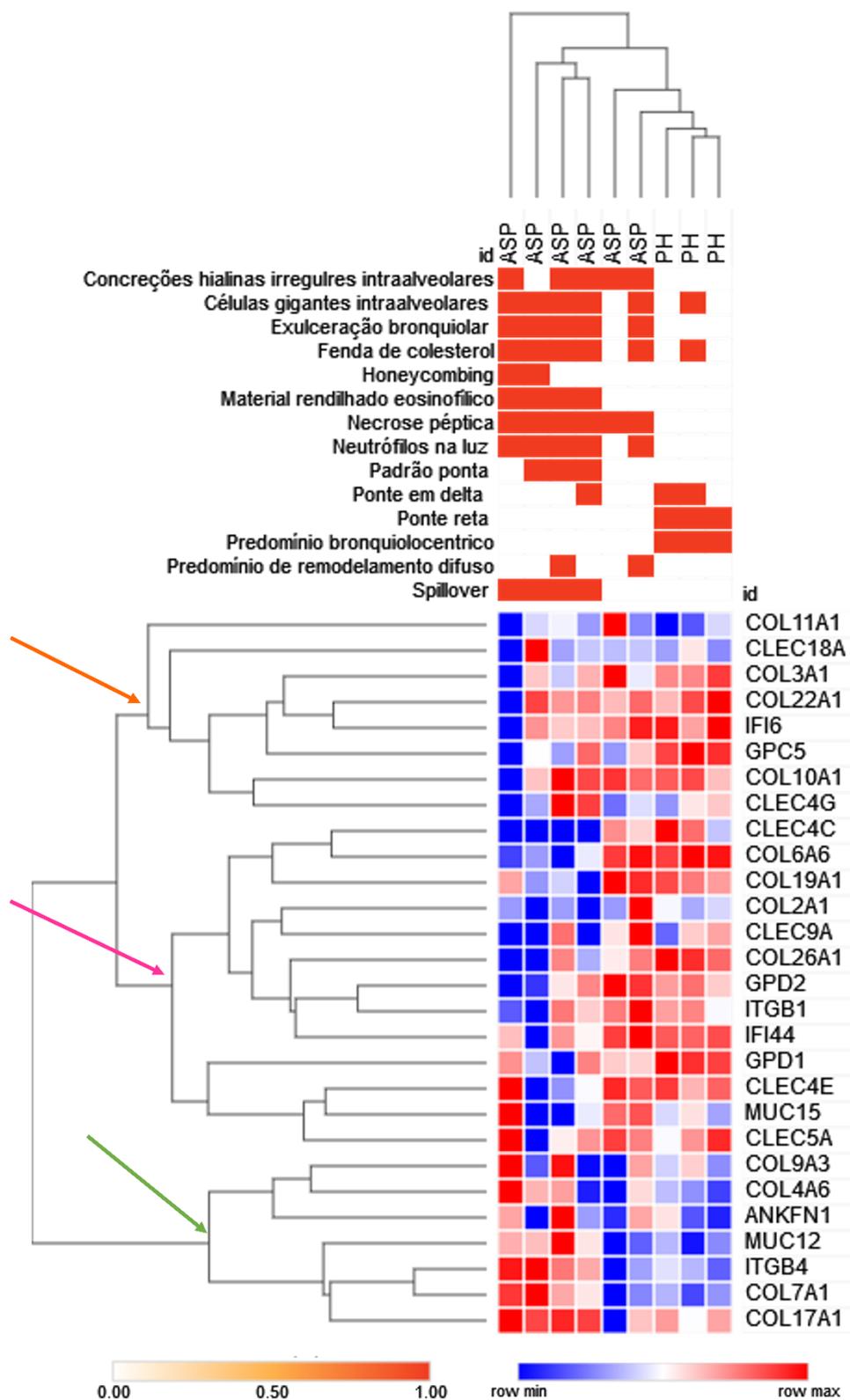


Figura 24 - Clusterização hierárquica dos atributos histopatológicos com diferença significativa ($P < 0.05$) entre os grupos e 28 genes selecionados. Nota-se três agrupamentos gênicos em concordância com os atributos histológicos: 1) Expressão homogênea entre ASP e PH (seta laranja); 2) Up-expressão na PH (seta rosa); 3) Up-expressão na ASP (seta verde).

7. DISCUSSÃO

As DPIs possuem um grande desafio para o diagnóstico etiológico da doença de base, visto que os achados clínicos, radiológicos e histopatológicos muitas vezes não revelam pistas diagnósticas adicionais aos médicos. Na tentativa de contornar este problema, as diretrizes internacionais (ATS/ERS/JRS/ALAT) vem determinando normas para o manejo clínico dos pacientes e estipulando atributos nos exames de imagem e de biópsia que sejam característicos do padrão de lesão PIU, diferenciando-os de lesões provável PIU, indeterminado para PIU e diagnóstico alternativo (não PIU). Neste último caso, a lesão pode se comportar de maneiras diferentes, como PINE, PIL e bronquiocêntrica (PIB). Yousem e Dacic (24) foram os precursores em descrever o padrão de lesão no eixo broncovascular, abrindo caminho para outros trabalhos que relataram o mesmo tipo de lesão em seus pacientes, apesar da atual falta de reconhecimento pelas diretrizes internacionais. A casuística da PIB é bastante recorrente no nosso serviço, representando 86% dos casos de BPC com doença intersticial fibrosante, englobando algumas das etiologias mais frequentes como ASP e PH. Apesar das duas possuírem processos fisiopatológicos diferentes com insultos de lesão distintos, as informações clínicas e radiológicas são, muitas vezes, semelhantes. Nesses casos, procura-se a BPC para tentar encontrar a etiológica definitiva. Contudo, na maioria das vezes a ASP e PH se comportam histopatologicamente de maneira semelhante, apenas com diferenças sutis que podem passar despercebidas. Diante do grande desafio encontrado nas DPIs padrão PIB, nosso grupo de estudo se propôs a definir biomarcadores moleculares que possam distinguir entre as etiologias de ASP e PH, traçando o perfil transcriptômico nos pacientes com prévia realização de BPC e diagnóstico etiológico para estas etiologias estipuladas pela MDD.

Começamos esse trabalho coletando os dados clínicos e demográficos dos pacientes. Tais informações não clusterizaram os indivíduos em seus respectivos diagnósticos etiológicos (Figura 19A), além da falta de diferença significativa entre os grupos (Tabela 3). Este fato reforça a premissa de que os dados clínicos e demográficos muitas vezes não são suficientes para determinar um diagnóstico etiológico definitivo nas DPIs, reforçando a importância de uma

investigação clínica acurada pelo encaminhamento à exames de imagem e BPC, além da DMM dos casos. Nesse sentido, apesar da dificuldade na coleta de dados do prontuário eletrônico por falta de informações coletadas ou acompanhamento dos pacientes, a maioria das informações coletadas apresentaram-se em homogênea distribuição (Tabela 3). O gênero dos pacientes nas DPIs tem importância clínica visto que a FPI-PIU é mais frequente em homens, enquanto doenças do tecido conjuntivo é comum em mulheres (15). Na nossa coorte, o gênero masculino foi predominante entre os pacientes com ASP, enquanto na PH, a maioria eram mulheres. Quanto aos fatores sugestivos para as etiologias, considerado muito importante no diagnóstico de DIP, não houve diferença significativa entre os grupos que pudesse sugerir algum diagnóstico etiológico no momento da consulta. Disfagia e refluxo foram relatados por 1 e 2, respectivamente, pacientes de cada grupo; enquanto pirose, DRGE e hernia de hiato foram relatados em maior frequência em pacientes com ASP, apesar de $P > 0.05$. O diagnóstico de DRGE e/ou hernia hiatal em pacientes com DPI foram descritos por outros autores (68, 69) e como Bois et al (70), em que 54% e 8% de seus pacientes com DPI tinham diagnóstico de DRGE e hernia de hiato, respectivamente. Além disso, exposição à mofo em ambiente domiciliar e residencial, travesseiro de pena e pássaros domésticos foram relatadas por 4/6 pacientes com ASP e por todos os pacientes com PH. A exposição ocupacional e não ocupacional tem relação direta com a PH, podendo ser um forte fator contribuinte para o desenvolvimento dessa doença (71). Hanak et al (72) identificaram antígenos aviários e exposição à mofo em respectivamente, 34% e 9% de seus pacientes com diagnóstico de PH. Quanto a medicação prescrita, medicamentos gástricos foram mais recorrentes em pacientes com ASP do que PH (83,3% x 33,3%), como o esperado; mas surpreendentemente, o uso de imunossupressores foi mais descrito na ASP (83,3% x 50%). Muitos trabalhos relatam o uso de corticóides para o tratamento de PH, inclusive demonstrando melhora na sobrevivência comparado a pacientes sem este tratamento (73). A evolução clínica dos pacientes do grupo de estudo deste trabalho relevou que 4/6 pacientes com ASP e 2/6 pacientes com PH evoluíram a óbito, e desses, houve um menor tempo decorrido desde o início dos sintomas e da BPC até o óbito nos casos de ASP, indicando um provável processo fisiopatológico de lesão mais grave do que a PH. Neste sentido, os pacientes

com ASP apresentaram uma menor probabilidade de sobrevida do que os pacientes com PH ($P < 0.05$, Figura 9). Apesar disso, a média da sobrevida da nossa coorte foi de 102 a 184 meses para ASP e PH respectivamente, sendo maior que a sobrevida de lesão PIU descrita na literatura, reforçando os achados de lesão bronquiocêntrica nesses pacientes. Pacientes com padrão de lesão PIU tem em média 2.8 anos de sobrevida, enquanto a sobrevida de indivíduos com fibrose peribronquiolar foi 11.3 anos no trabalho de Churg A et al (74) e 116 meses em pacientes com fibrose centrada na via aérea (30).

O acometimento pulmonar mais grave nos pacientes do grupo ASP pode ser confirmado pelas informações retrospectivas adquiridas na PFP (Tabela 4), mesmo com alguns dados faltantes pela falta de acompanhamento por parte do paciente ou imprevistos na realização do exame, como danos no aparelho, impossibilitando a realização do exame. Os valores mais altos dos 3 exames coletados em datas diferentes para os parâmetros CVF%, VEF1%, CPT% e DLCO% apresentaram menores quando comparado a PH, evidenciando um pior quadro pulmonar restritivo. Contudo, a variação entre o valor de CPT%, DLCO% e VEF1/CVF% do último exame e do primeiro exame, representado pelo grau de variação não clusterizaram os pacientes corretamente conforme o diagnóstico etiológico (Figura 19B). Por outro lado, a média da DLCO% foi menor nos casos de ASP do que PH para os 3 exames disponíveis no prontuário eletrônico (Tabela 4). A DLCO é considerada um parâmetro importante nas DPIs por determinar lesões pulmonares restritivas (75, 76). Semelhante aos nossos dados, pacientes com PH apresentaram uma redução moderada a acentuada de DLCO, com média de 47% no início do estudo e 37% 6 meses depois (77).

Assim como os dados clínicos e a PFP, as informações retrospectivas extraídas dos exames de imagem também não foram suficientes para distinguir os pacientes da ASP e PH, havendo uma sobreposição dos atributos entre os grupos (Figura 20). Como escrito na Tabela 5, os exames de todos os pacientes não corresponderam as características de padrão PIU descritas na diretriz da ATS/ERS (17), apresentando um padrão de diagnóstico alternativo incomum, segundo a classificação deles. Os pacientes apresentaram um padrão de lesão bronquiocêntrico, com distribuição de lesão central e periférica em 66.6% e 83.3% dos pacientes com ASP e PH respectivamente (Tabela 5). Atenuação em mosaico foi registrada para 4/6 pacientes de ASP e 5/6 de PH,

sendo considerada um preditor de PH para alguns autores (78). Curiosamente, bronquiectasia de tração, que pode estar presente em lesões PIU (17), foi presente em 83.3% de ASP e 100% de PH. Contudo, isso se deve a retração do parênquima causada pela fibrose bronquiolar, mimetizando os casos de fibrose subpleural. Similarmente, bronquiectasia foi um dos achados mais presentes em pacientes com microaspiração pulmonar crônica no estudo de Ghahderijan et al (79). Outra consequência do extenso remodelamento parenquimatoso com início no eixo broncovascular é a desconfiguração de bronquíolos que aparentam prolongados até a pleura, chamado de sinal do bronquíolo alongado, mais presente nos pacientes com ASP ($P < 0.05$ e Tabela 5). Ademais, reticulações foram observadas para todos os pacientes do grupo de estudo do trabalho. Interessantemente, reticulação na TCAR foi associada a altos níveis de pepsina no lavado broncoalveolar ($P < 0.05$), sugerindo uma microaspiração nesses pacientes, apesar de terem sido classificados como exacerbação aguda de FPI (80).

Diferente dos dados clínicos e radiológicos, a BPC proporcionou uma melhor diferenciação entre os grupos, clusterizando os pacientes com ASP e PH conforme a presença e ausência de atributos histopatológicos (Figura 21). A detalhada avaliação desses dados (Tabela 6), além de evidenciar alguns importantes atributos amplamente presentes nos dois grupos (Figura 10), destacou a presença de estruturas e configurações específicas de cada etiologia e que estão intimamente relacionados com a fisiopatologia da doença (Figura 11-12). Como descrito anteriormente, os pacientes do grupo de estudo deste trabalho apresentam lesões centradas nas vias aéreas (PIB) como consequência do processo fisiopatológico do insulto inicial. Desse modo, remodelamento peribronquiolar (Figura 10A) foi presente em todos os casos e foco fibroblástico na região subepitelial bronquiolar (Figura 10D) foi recorrente entre os pacientes de ambos os grupos (Tabela 6). Em decorrência do excessivo depósito de MEC entre o epitélio bronquiolar e sua camada muscular por miofibroblastos, confirmado pela marcação de células α -SMA+ (27), o parênquima pulmonar torna-se enrijecido com o tempo, podendo resultar em bronquiectasia (Figura 10E), com ou sem dilatação cística subpleural bronquiolar (Figura 10H), e tração dos septos pulmonares, resultando em colapso alveolar subpleural (Figura 10F). Com isso, alguns focos fibroblásticos subepiteliais bronquiolares podem

mimetizar os focos fibroblásticos da PIU, os quais se encontram na região subpleural (17), sendo um fator confundidor. Os focos fibroblásticos são atributos importantes na DPI pois podem indicar uma etiologia de base. Pacientes com FPI-PIU apresentaram mais focos fibroblásticos do que pacientes com doença vascular do colágeno-PIU, implicando em pior sobrevida (81).

Como já mencionado, as lesões bronquiocêntricas tem o insulto inicial nas células epiteliais bronquiolares. No caso da PH, o contato com antígenos inalados lesiona essa região, formando em última instancia o remodelamento centrilobular, como proposto por Takemura et al (82). Em alguns casos, essa fibrose pode estender-se até a pleura de forma direta, configuração conhecida por ponte reta, ou se estendendo sobre a pleura, ponte em delta, como visto na maioria dos pacientes dessa coorte ($P < 0.05$, Tabela 6 e Figura 12B-C). Considerado uma configuração histopatológica recorrente na PH, fibrose em ponte foi registrado em 69% dos pacientes de Chiba et al (83) e em 36% de Takemura et al (82). Curiosamente, além da fibrose centrada nas vias aéreas causada por antígenos inalados na PH, 1 paciente entre 6 apresentou estrutura de célula vegetal intraluminal bronquiolar (Tabela 6), podendo ser um fator adicional contribuinte da lesão bronquiolar.

No grupo ASP, material vegetal foi registrado em 2/6 pacientes (Tabela 6). No trabalho de Mukhopadhyay et al (84), material vegetal ou restos de alimentos foram registrados em 92% dos pacientes com pneumonia aspirativa, porem histologia muito diferente ao encontrado nesta coorte (Figura 10K). Ademais, 32 pacientes possuíam fatores predisponentes para aspiração, como refluxo grave, problemas para engolir e hernia hiatal (84), assim como os pacientes do grupo ASP (Tabela 3). Para esses pacientes, 10 atributos histológicos destacaram-se em significativa maior quantidade do que nos pacientes com PH ($P < 0.05$ e Tabela 6). Presença de conteúdo basofílico (necrose péptica) (Figura 11C) e material rendilhado eosifílico (Figura 11D). na região intraluminal bronquiolar foram relatados em respectivamente 6 e 4 pacientes do grupo ASP, sugerindo provável conteúdo alimentar responsável pela resposta fibrosante peribronquiolar. Da mesma forma, conteúdo basofílico com neutrófilos necrotizantes e material estranho, similar ao encontrado por Mukhopadhyay et al (84) e relatado aqui (Figura 10K e Figura 11G), foram descritos em de Carvalho et al (25) nos pacientes com padrão de lesão diferente

de PIU e PINE, denominado pelos autores de fibrose centrilobular. Ademais, células gigantes de corpo estranho em lesão bronquiolocêntrica, similar ao registrado no grupo ASP (Figura 11I), foi descrito por de Souza et al (33) em pacientes com dismotilidade esofágica e/ou esofagite. Tais resultados dispersos na literatura sugerem uma relação entre a microaspiração de conteúdo alimentar/gástrico, em decorrência a problemas gástricos, com lesões bronquiolocêntricas e conseqüente extenso remodelamento fibrosante, implicando em pior quadro pulmonar restritivo (Tabela 4). Ácidos biliares como ácido chenodeoxicólico e ácido desoxicólico podem iniciar uma resposta fibrótica como demonstrado no modelo experimental de Liu et al (85). Similarmente, ácido taurocólico, outro ácido biliar, foi demonstrado em maior quantidade no lavado broncoalveolar de pacientes com DRGE (86). A análise proteômica realizada pelo nosso grupo de estudo (28), revelou proteínas humanas do trato digestivo e proteínas vegetais e animais, como bovino e suíno, em pacientes com DRGE e clinicamente diagnosticados com microaspiração crônica. Essa relação entre conteúdo gástrico/alimentar e tecido pulmonar com conseqüente maior resposta fibrótica foi demonstrada molecularmente neste trabalho.

As análises do RNA-Seq adquirido de amostras parafinadas, embora com baixa qualidade em relação a amostras congeladas (Tabela 7 e Figura 13, revelaram uma maior expressão de alguns genes intimamente envolvidos no processo fisiopatológico da lesão inicial, como necrose péptica, fendas de colesterol, exulceração bronquiolar, células gigantes intraalveolares e spillover (Figura 24) nos pacientes do grupo ASP. Dentre esses genes, destacam-se os alguns genes da família do colágeno COL9A3, COL7A1, COL17A1 e COL4A6. Da mesma forma, Yao et al (87) demonstraram up-regulação do COL4A6 em células humanas de fibroblastos com FPI. Assim como no presente trabalho, os autores não detectaram diferença na transcrição do COL1A1, considerado o gene codificador de colágeno produzido em resposta à estimulação do TGF- β (88) . Outro gene up-expresso nos pacientes com ASP foi ITGB4, e sua expressão em células é ser considerada por alguns autores como “células tronco pulmonares” (89). A maior lesão do epitélio bronquiolar pelo conteúdo gástrico/alimentar pode ter aumentado a via de expressão desse gene, justificando a up-expressão do ITGB4 nesses pacientes.

Da mesma forma que na ASP, os pacientes com PH também apresentaram um perfil transcriptômico relacionado ao insulto inicial, representado histopatologicamente por ponte fibrótica e lesão bronquiocêntrica (Figura 24). Up-regulação do gene ITGB1 nos pacientes do grupo PH foi registrada, assim como no trabalho de Xia et al (90), que demonstraram relação com o crescimento de fibroblastos em FPI; e no estudo de Wan et al (91), em que os autores propuseram ITGB1 e outros genes como biomarcadores ideais para identificação de fibrose pulmonar. Outra família de genes intimamente relacionado ao processo de lesão na PH são os genes da família de domínio de lectina tipo C (CLEC), expressos por células dendríticas. Essas células estão relacionadas a PH por serem apresentadoras de antígenos inalados aos linfócitos T (92), sendo descrito em maior quantidade em pacientes com PH crônica comparado a indivíduos saudáveis (93). Assim, CLEC4C, CLEC4E, CLEC5A e CLEC9A apresentaram up-expressão nesses pacientes. Além desses genes, FN1 apresentou down-expressão na ASP comparado a PH (Tabela 9, $P < 0.05$ e LogFC -0.84). Similarmente à PH, células humanas de fibroblastos (94) e modelo experimental com fibrose pulmonar induzida (95) apresentaram up-expressão desse gene.

Apesar dos diferentes clusters gênicos destacados para cada etiologia, a análise do transcriptoma relevou alguns clusters gênicos em comum, mas justificáveis, já que ambos os grupos possuem a mesma configuração final de remodelamento fibrosante bronquiocêntrico (Figura 17B). Os genes codificadores das proteínas circulantes da MEC (COL11A1 e COL10A1) apresentaram expressão similar entre os pacientes, sem distinção entre os grupos. Curiosamente, ambos os genes tem seu papel descrito em fibroblastos isolados de pacientes com câncer de pulmão (96). Além deles, MUC12 e MUC20 apresentaram up-expressão na ASP, enquanto MUC15 foi up-expresso na PH (Figura 17B). Esses três genes codificam proteínas transmembranas, importantes para manter e proteger a mucosa e reparo de danos (97). A importância desses genes nas DPIs ainda não foi estabelecida, apenas para o gene MUC5, o qual é amplamente associado ao fator de risco de FPI (52, 97). Contudo, não foi detectado expressão diferencial para MUC5B na coorte dos pacientes deste trabalho, reforçando novamente um processo de lesão diferente das FPI-PIU, portanto bronquiocêntrico.

Além do reconhecimento individual do papel de cada gene, a análise de enriquecimento com GO foi realizada. Nela, a GO para processos biológicos destacou movimentação e organização ciliar nos pacientes do grupo ASP (Figura 18A), inferindo relação com a bronquiolização encontrada em 83.3% desses pacientes (Tabela 6). Essa configuração histológica é o processo de regeneração do epitélio ciliar brônquico após uma lesão (98), nesse caso sendo a exulceração do epitélio bronquiolar pelo conteúdo gástrico/alimentar. Reynaud et al (99) descreveram uma maior quantidade de células SCGB1A1+, marcador de células Clara, em pacientes com padrão de lesão não-PIU quando comparado a PIU. Isso sugere que a bronquiolização é mais recorrente nos processos bronquiocentricos visto que o insulto inicial de lesão se deu nas próprias células epiteliais bronquiolares, principalmente nos casos de ASP, reforçando mais uma vez o padrão PIB e uma maior resposta fibrótica nesses pacientes. Interessantemente, o modelo preditivo L1000CDS2 identificou a droga trichostatin A como revertora da assinatura gênica desses pacientes (Figura 18C). Esta molécula possui diversas e diferentes finalidades, como aumento da autofagia macrofágica em sepse polimicrobiana (100) e aumento da expressão de albumina, sendo considerada promissora no tratamento da doença de Alzheimer (101).

Diante de todos os dados apresentados neste trabalho, mesmo com um baixo "N" amostral, os pacientes do grupo ASP apresentaram uma maior lesão fibrosante com proliferação miofibroblástica, depósito de MEC e remodelamento parenquimatoso com aumento na expressão de genes relacionados à colágeno e proteção das células epiteliais bronquiolares, inferindo em um quadro pulmonar mais restritivo com pior sobrevida comparado aos pacientes do grupo PH, apesar de também apresentaram lesão fibrosante. Todo esse quadro clínico e histopatológico presente nos pacientes diagnosticados com ASP, provavelmente é ocasionado pela inalação de micropartículas alimentares ou gástricas, reforçada pelo maior relato de sintomas e uso de medicamentos gástricos, presença de estrutura vegetal na região intraluminal bronquiolar, e confirmação proteômica de proteínas animais e vegetais no pulmão de outra coorte de pacientes com ASP (28).

Ademais, apesar de ambas as etiologias possuírem semelhanças dos dados clínicos e radiológicos, as informações adquiridas com a BPC

possibilitaram uma distinção entre os casos, mas ainda com menor acurácia, enquanto o transcriptoma foi o melhor parâmetro para classificar os pacientes corretamente entre seus diagnósticos etiológicos (Figura 17). É importante ressaltar que poucos trabalhos descritos até o presente momento avaliaram a nível molecular a expressão de genes envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da ASP e PH, principalmente em padrão de lesão PIB, sendo mais recorrente estas análises em pacientes com FPI-PIU. Portanto, a descoberta destes pequenos clusters gênicos possibilita uma melhor acurácia diagnóstica e subsequente tratamento específico para ASP e PH, possibilitando um melhor manejo clínico e prognóstico para esses pacientes.

8. CONCLUSÃO

Uma resposta fibrosante mais acentuada com pior evolução clínica é vista nos grupo ASP, o que está relacionada ao perfil transcriptômico desses pacientes. Desta forma, a microaspiração crônica do conteúdo oral/gástrico pode modificar o perfil transcriptômico, sendo responsável pelo pior quadro fibrosante.

9. PRESPECTIVAS FUTURAS

A validação dos resultados evidenciados pelo RNA-Seq será realizada para a publicação do trabalho em revista científica de alto impacto. Os principais genes diferencialmente expressos entre os grupos serão validados por reação em cadeia da polimerase em tempo real (para os genes) e imunohistoquímica (para as proteínas codificadas pelos genes). Ademais, até a publicação do trabalho, será realizado o transcriptoma de amostras pulmonares como controles, provenientes de tecido pulmonar não neoplásico a fim de comparação dos genes diferencialmente expressos.

10. REFERÊNCIAS

1. Pump KK. The Morphology of the Finer Branches of the Bronchial Tree of the Human Lung. *Diseases of the chest*. 1964;46:379-98.
2. Patel VI, Metcalf JP. Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets in the Resting Human Lung. *Critical reviews in immunology*. 2018;38(4):303-31.

3. Widdicombe JG, Pack RJ. The Clara cell. *European journal of respiratory diseases*. 1982;63(3):202-20.
4. Massaro GD, Massaro D. Formation of pulmonary alveoli and gas-exchange surface area: quantitation and regulation. *Annual review of physiology*. 1996;58:73-92.
5. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med*. 1981;70(3):542-68.
6. American Thoracic S, European Respiratory S. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):277-304.
7. von Buhl L. *Lungenentzündung, tuberkulose und Schwindsucht: zwölf Briefe an einen Freund*: Oldenbourg; 1873.
8. Guler SA, Corte TJ. Interstitial Lung Disease in 2020: A History of Progress. *Clinics in chest medicine*. 2021;42(2):229-39.
9. Hamman L, Rich AR. Fulminating Diffuse Interstitial Fibrosis of the Lungs. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 1935;51:154-63.
10. Herbert FA, Nahmias BB, Gaensler EA, Macmahon HE. Pathophysiology of interstitial pulmonary fibrosis. Report of 19 cases and follow-up with corticosteroids. *Archives of internal medicine*. 1962;110:628-48.
11. Liebow A, Carrington C, Simon M, Potchen E, Lemay E. *Frontiers of pulmonary radiology. Alveolar Diseases: The Interstitial Pneumonias* New York: Grune & Stratton. 1969:102-41.
12. Muller NL, Coiby TV. Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 1997;17(4):1016-22.
13. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4 Pt 1):1301-15.

14. Olson AL, Gifford AH, Inase N, Fernandez Perez ER, Suda T. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2018;27(150).
15. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):788-824.
16. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(2 Pt 1):646-64.
17. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(5):e44-e68.
18. Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, Mageto Y. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: results of a prospective, open-label Phase II study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(4 Pt 1):1061-9.
19. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2014;370(22):2083-92.
20. Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, Suga M, Abe S, Nakata K, et al. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(9):1040-7.
21. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2014;370(22):2071-82.
22. Kolb M, Raghu G, Wells AU, Behr J, Richeldi L, Schinzel B, et al. Nintedanib plus Sildenafil in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2018;379(18):1722-31.
23. Administration USFaD. FDA approves first treatment for patients with rare type of lung disease. 2019.

24. Yousem SA, Dacic S. Idiopathic bronchiolocentric interstitial pneumonia. *Mod Pathol.* 2002;15(11):1148-53.
25. de Carvalho ME, Kairalla RA, Capelozzi VL, Deheinzelin D, do Nascimento Saldiva PH, de Carvalho CR. Centrilobular fibrosis: a novel histological pattern of idiopathic interstitial pneumonia. *Pathol Res Pract.* 2002;198(9):577-83.
26. Churg A, Myers J, Suarez T, Gaxiola M, Estrada A, Mejia M, et al. Airway-centered interstitial fibrosis: a distinct form of aggressive diffuse lung disease. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(1):62-8.
27. Fabro A, Batah S, Alda M, Felix R, Figueira R, Sbragia L, et al. Airway-Centered Fibroblastic Foci Contributes to Differential Diagnosis of Bronchiolocentric Interstitial Pneumonitis. C38 RARE LUNG DISEASES: American Thoracic Society; 2020. p. A4959-A.
28. Batah S, Alda M, Felix R, Figueira R, Baddini-Martinez J, Santos M, et al. Proteomic Profile of Intraluminal Mucus as Potential Diagnostic Biomarkers of Microaspiration in Bronchiolocentric Interstitial Pneumonitis. C38 RARE LUNG DISEASES: American Thoracic Society; 2020. p. A4960-A.
29. Munoz A, Aranda I, Pascual J, Ferrando C. [Idiopathic bronchiolocentric interstitial pneumonia: a new idiopathic interstitial pneumonia]. *Archivos de bronconeumologia.* 2007;43(8):464-6.
30. Kuranishi LT, Leslie KO, Ferreira RG, Coletta EA, Storrer KM, Soares MR, et al. Airway-centered interstitial fibrosis: etiology, clinical findings and prognosis. *Respir Res.* 2015;16:55.
31. Cardasis JJ, MacMahon H, Husain AN. The spectrum of lung disease due to chronic occult aspiration. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(6):865-73.
32. Lee JS, Collard HR, Raghu G, Sweet MP, Hays SR, Campos GM, et al. Does chronic microaspiration cause idiopathic pulmonary fibrosis? *Am J Med.* 2010;123(4):304-11.
33. de Souza RB, Borges CT, Capelozzi VL, Parra ER, Jatene FB, Kavakama J, et al. Centrilobular fibrosis: an underrecognized pattern in systemic sclerosis. *Respiration.* 2009;77(4):389-97.
34. Kumar V AA, Aster J. *Robbins Basic Pathology* 2013.

35. Vasakova M, Selman M, Morell F, Sterclova M, Molina-Molina M, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(3):301-8.
36. Selman M, Pardo A, King TE, Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(4):314-24.
37. Hirschmann JV, Pipavath SN, Godwin JD. Hypersensitivity pneumonitis: a historical, clinical, and radiologic review. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2009;29(7):1921-38.
38. Vourlekis JS, Schwarz MI, Cool CD, Tuder RM, King TE, Brown KK. Nonspecific interstitial pneumonitis as the sole histologic expression of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Med*. 2002;112(6):490-3.
39. Churg A, Muller NL, Flint J, Wright JL. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(2):201-8.
40. Gaxiola M, Buendia-Roldan I, Mejia M, Carrillo G, Estrada A, Navarro MC, et al. Morphologic diversity of chronic pigeon breeder's disease: clinical features and survival. *Respir Med*. 2011;105(4):608-14.
41. Wang P, Jones KD, Urisman A, Elicker BM, Urbania T, Johannson KA, et al. Pathologic Findings and Prognosis in a Large Prospective Cohort of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*. 2017;152(3):502-9.
42. Colombat M, Groussard O, Taille C, Marrash-Chahla R, Brugiere O, Mal H, et al. Lung transplantation in a patient with airway-centered fibrosis. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(11):1540-2.
43. Fenton ME, Cockcroft DW, Wright JL, Churg A. Hypersensitivity pneumonitis as a cause of airway-centered interstitial fibrosis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2007;99(5):465-6.
44. Fong DJ, Hogaboam CM, Matsuno Y, Akira S, Uematsu S, Joshi AD. Toll-like receptor 6 drives interleukin-17A expression during experimental hypersensitivity pneumonitis. *Immunology*. 2010;130(1):125-36.
45. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(6):733-48.

46. Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJ, West J, Tata LJ. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax*. 2006;61(11):980-5.
47. Camus P, Fanton A, Bonniaud P, Camus C, Foucher P. Interstitial lung disease induced by drugs and radiation. *Respiration*. 2004;71(4):301-26.
48. Kalchier-Dekel O, Galvin JR, Burke AP, Atamas SP, Todd NW. Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History. *Journal of clinical medicine*. 2018;7(12).
49. Nogee LM, Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *The New England journal of medicine*. 2001;344(8):573-9.
50. Rubin AS, SANTANA ANdC, Costa AN, Baldi BG, PEREIRA CAAdC, Carvalho CRR, et al. Diretrizes de doenças pulmonares intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2012.
51. Flaherty KR, King TE, Jr., Raghu G, Lynch JP, 3rd, Colby TV, Travis WD, et al. Idiopathic interstitial pneumonia: what is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):904-10.
52. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *The New England journal of medicine*. 2011;364(16):1503-12.
53. Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nature genetics*. 2013;45(6):613-20.
54. Noth I, Zhang Y, Ma SF, Flores C, Barber M, Huang Y, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2013;1(4):309-17.
55. Renzoni EA, Poletti V, Mackintosh JA. Disease pathology in fibrotic interstitial lung disease: is it all about usual interstitial pneumonia? *Lancet*. 2021.
56. Mullenbrock S, Liu F, Szak S, Hronowski X, Gao B, Juhasz P, et al. Systems Analysis of Transcriptomic and Proteomic Profiles Identifies Novel Regulation of Fibrotic Programs by miRNAs in Pulmonary Fibrosis Fibroblasts. *Genes*. 2018;9(12).

57. Furusawa H, Cardwell JH, Okamoto T, Walts AD, Konigsberg IR, Kurche JS, et al. Chronic Hypersensitivity Pneumonitis, an Interstitial Lung Disease with Distinct Molecular Signatures. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(10):1430-44.
58. Li B, Hartwig MG, Appel JZ, Bush EL, Balsara KR, Holzkecht ZE, et al. Chronic aspiration of gastric fluid induces the development of obliterative bronchiolitis in rat lung transplants. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(8):1614-21.
59. De Sadeleer LJ, Meert C, Yserbyt J, Slabbynck H, Verschakelen JA, Verbeken EK, et al. Diagnostic Ability of a Dynamic Multidisciplinary Discussion in Interstitial Lung Diseases: A Retrospective Observational Study of 938 Cases. *Chest*. 2018;153(6):1416-23.
60. Bernatchez E, Langlois A, Brassard J, Flamand N, Marsolais D, Blanchet MR. Hypersensitivity pneumonitis onset and severity is regulated by CD103 dendritic cell expression. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179678.
61. Long X, He X, Ohshimo S, Griese M, Sarria R, Guzman J, et al. Serum YKL-40 as predictor of outcome in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J*. 2017;49(2).
62. Wakamoto H, Sano N, Yano Y, Sakai S, Kikuchi T, Fukuda M, et al. Clinical Usefulness of Serum Krebs von den Lungen-6 for Detecting Chronic Aspiration in Children with Severe Motor and Intellectual Disabilities. *The Journal of pediatrics*. 2015;167(5):1136-42.
63. Johnston N, Dettmar PW, Ondrey FG, Nanchal R, Lee SH, Bock JM. Pepsin: biomarker, mediator, and therapeutic target for reflux and aspiration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1434(1):282-9.
64. Rosen Y, Garcia PM, Navale P. Pulse/hyaline ring granuloma revisited: etiologic role of seed-derived storage cells. *Virchows Archiv*. 2021:1-10.
65. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*. 2015;12(4):357-60.
66. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.

67. Torre D, Lachmann A, Ma'ayan A. BioJupies: Automated Generation of Interactive Notebooks for RNA-Seq Data Analysis in the Cloud. *Cell systems*. 2018;7(5):556-61 e3.
68. Lee CM, Lee DH, Ahn BK, Hwang JJ, Yoon H, Shin CM, et al. Protective Effect of Proton Pump Inhibitor for Survival in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of neurogastroenterology and motility*. 2016;22(3):444-51.
69. Noth I, Zangan SM, Soares RV, Forsythe A, Demchuk C, Takahashi SM, et al. Prevalence of hiatal hernia by blinded multidetector CT in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2012;39(2):344-51.
70. Bois MC, Hu X, Ryu JH, Yi ES. Could prominent airway-centered fibroblast foci in lung biopsies predict underlying chronic microaspiration in idiopathic pulmonary fibrosis patients? *Hum Pathol*. 2016;53:1-7.
71. Barnes H, Olin AC, Toren K, McSharry C, Donnelly I, Larstad M, et al. Occupation versus environmental factors in hypersensitivity pneumonitis: population attributable fraction. *ERJ Open Res*. 2020;6(4).
72. Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. *Mayo Clinic proceedings*. 2007;82(7):812-6.
73. Ejima M, Okamoto T, Suzuki T, Anzai T, Takahashi K, Miyazaki Y. Efficacy of treatment with corticosteroids for fibrotic hypersensitivity pneumonitis: a propensity score-matched cohort analysis. *BMC pulmonary medicine*. 2021;21(1):1-12.
74. Churg A, Sin DD, Everett D, Brown K, Cool C. Pathologic patterns and survival in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(12):1765-70.
75. Pereira C, Viegas C, Alves R. Capacidade de difusão do monóxido de carbono. *J Pneumol*. 2002;28(Supl 3):S122-S38.
76. Arcadu A, Byrne SC, Pirina P, Hartman TE, Bartholmai BJ, Moua T. Correlation of pulmonary function and usual interstitial pneumonia computed tomography patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2017;129:152-7.
77. Ferreira M, Borie R, Crestani B, Rigaud P, Wemeau L, Israel-Biet D, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with chronic hypersensitivity

pneumonitis (cHP): A retrospective, multicentric, observational study. *Respir Med.* 2020;172:106146.

78. Salisbury ML, Gross BH, Chughtai A, Sayyoub M, Kazerooni EA, Bartholmai BJ, et al. Development and validation of a radiological diagnosis model for hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J.* 2018;52(2).

79. Ghahderijani BH, Hosseinabadi F, Kahkouee S, Momeni MK, Salajeghe S, Soleimantabar H. Investigation of high-resolution computed tomographic (HRCT) outcomes associated with chronic pulmonary microaspiration (CPM) in Tehran and Zahedan, Iran. *African health sciences.* 2020;20(4):1710-5.

80. Lee JS, Song JW, Wolters PJ, Elicker BM, King TE, Jr., Kim DS, et al. Bronchoalveolar lavage pepsin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2012;39(2):352-8.

81. Flaherty KR, Colby TV, Travis WD, Toews GB, Mumford J, Murray S, et al. Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1410-5.

82. Takemura T, Akashi T, Kamiya H, Ikushima S, Ando T, Oritsu M, et al. Pathological differentiation of chronic hypersensitivity pneumonitis from idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Histopathology.* 2012;61(6):1026-35.

83. Chiba S, Tsuchiya K, Akashi T, Ishizuka M, Okamoto T, Furusawa H, et al. Chronic Hypersensitivity Pneumonitis With a Usual Interstitial Pneumonia-Like Pattern: Correlation Between Histopathologic and Clinical Findings. *Chest.* 2016;149(6):1473-81.

84. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Pulmonary disease due to aspiration of food and other particulate matter: a clinicopathologic study of 59 cases diagnosed on biopsy or resection specimens. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(5):752-9.

85. Liu Y, Wang C, Chen H, Zhang M, Zhu J, Zhang X, et al. The profibrotic effects of chronic microaspiration of bile acids on lungs of rats at different stages. *International immunopharmacology.* 2020;84:106545.

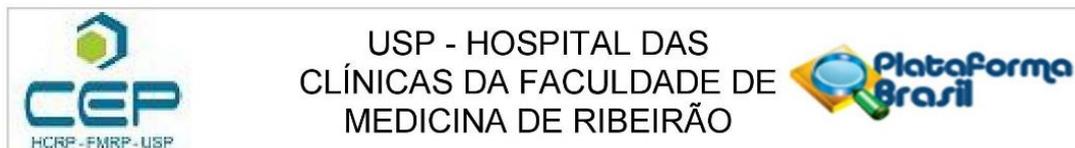
86. Zhang CYK, Ahmed M, Huszti E, Levy L, Hunter SE, Boonstra KM, et al. Bronchoalveolar bile acid and inflammatory markers to identify high-risk lung transplant recipients with reflux and microaspiration. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 2020;39(9):934-44.

87. Yao L, Zhou Y, Li J, Wickens L, Conforti F, Rattu A, et al. Bidirectional epithelial–mesenchymal crosstalk provides self-sustaining profibrotic signals in pulmonary fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;297(3).
88. Tsuchida K, Zhu Y, Siva S, Dunn SR, Sharma K. Role of Smad4 on TGF-beta-induced extracellular matrix stimulation in mesangial cells. *Kidney international*. 2003;63(6):2000-9.
89. Kotton DN, Morrissey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nature medicine*. 2014;20(8):822-32.
90. Xia H, Diebold D, Nho R, Perlman D, Kleidon J, Kahm J, et al. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1659-72.
91. Wan XL, Zhou ZL, Wang P, Zhou XM, Xie MY, Mei J, et al. Small molecule proteomics quantifies differences between normal and fibrotic pulmonary extracellular matrices. *Chinese medical journal*. 2020;133(10):1192-202.
92. Girard M, Israel-Assayag E, Cormier Y. Mature CD11c(+) cells are enhanced in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J*. 2009;34(3):749-56.
93. Greer AM, Matthay MA, Kukreja J, Bhakta NR, Nguyen CP, Wolters PJ, et al. Accumulation of BDCA1(+) dendritic cells in interstitial fibrotic lung diseases and Th2-high asthma. *PLoS One*. 2014;9(6):e99084.
94. Tao J, Zhang M, Wen Z, Wang B, Zhang L, Ou Y, et al. Inhibition of EP300 and DDR1 synergistically alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;106:1727-33.
95. Dong J, Yu X, Porter DW, Battelli LA, Kashon ML, Ma Q. Common and distinct mechanisms of induced pulmonary fibrosis by particulate and soluble chemical fibrogenic agents. *Archives of toxicology*. 2016;90(2):385-402.
96. Andriani F, Landoni E, Mensah M, Facchinetti F, Miceli R, Tagliabue E, et al. Diagnostic role of circulating extracellular matrix-related proteins in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2018;18(1):899.
97. Ballester B, Milara J, Cortijo J. Mucins as a New Frontier in Pulmonary Fibrosis. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(9).

98. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, et al. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell stem cell*. 2009;4(6):525-34.
99. Reynaud P, Ahmed E, Serre I, Knabe L, Bommart S, Suehs C, et al. Club Cell Loss as a Feature of Bronchiolization in ILD. *Frontiers in immunology*. 2021;12:630096.
100. Cui SN, Chen ZY, Yang XB, Chen L, Yang YY, Pan SW, et al. Trichostatin A modulates the macrophage phenotype by enhancing autophagy to reduce inflammation during polymicrobial sepsis. *International immunopharmacology*. 2019;77:105973.
101. Su Q, Li T, He PF, Lu XC, Yu Q, Gao QC, et al. Trichostatin A ameliorates Alzheimer's disease-related pathology and cognitive deficits by increasing albumin expression and Abeta clearance in APP/PS1 mice. *Alzheimer's research & therapy*. 2021;13(1):7.

11. ANEXO A:

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico Molecular das Pneumonites Intersticiais Bronquiocêntricas

Pesquisador: ALEXANDRE TODOROVIC FABRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03737018.6.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.087.997

Apresentação do Projeto:

As Doenças Intersticiais Pulmonares (DIPs) formam um grande grupo heterogêneo de distúrbios que causam a cicatrização com distorção da arquitetura do interstício pulmonar. Achados clínicos, radiológicos e patológicos são inespecíficos e não permitem um diagnóstico preciso, apesar da discussão multidisciplinar (MDD) com pneumologistas, radiologista torácico e patologista pulmonar. A pneumonite intersticial bronquiocêntrica (BIP), definida por um remodelamento fibroplásico predominantemente bronquiocêntrico associado a infiltrado linfocitário bronquiolar ou peribronquiolar e metaplasia peribronquiolar, bem como uma fibrose intersticial irregular e / ou massas fibroplásicas focais de tecido conjuntivo fibromixóide, é um novo padrão relacionado uma ampla gama de diagnósticos diferenciais, especialmente aspiração, colagenoses, doenças autoimunes, efeitos tóxico-medicamentoso, pneumoconiose, tabagismo, idiopática e outros. Além disso, a doença está associada à alta morbimortalidade. Por isso tudo, o diagnóstico etiológico precoce é fundamental para aprimorar o melhor tratamento e o resultado dele nos pacientes. Este projeto estudará o rastreamento molecular das áreas de lesão de atividade miofibroblástica, onde o mecanismo específico inicial está presente, para validar biomarcadores diagnósticos translacionais. As vias moleculares das áreas de lesão de atividade miofibroblástica revelarão mecanismos fisiopatológicos detalhados das doenças pulmonares intersticiais de forma relacionada à etiologia. O biomarcador molecular de diagnóstico da biópsia pulmonar cirúrgica melhorará o manejo dos pacientes devido a uma particular e única doença intersticial pulmonar. A

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.087.997

evolução e o tratamento serão focados na causa etiológica, entrando na era da medicina de precisão. Novas estratégias terapêuticas e novas drogas podem ser desenvolvidas com melhor custo-benefício e com eficácia terapêutica.

Objetivo da Pesquisa:

Rastreamento molecular integrativo para pneumonite intersticial bronquiocêntrica em um padrão de atividade espacial para biomarcadores diagnósticos translacionais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esse projeto promoverá os seguintes resultados esperados:

- 1) Melhor compreensão da fisiopatologia relacionada às doenças intersticiais pulmonares;
- 2) Novos biomarcadores translacionais para o diagnóstico etiológico das doenças intersticiais pulmonares;
- 3) Formação de recursos humanos qualificados;
- 4) Desenvolvimento de medicina de precisão para doenças pulmonares intersticiais;
- 5) Estabelecimento do centro integrado para doenças torácicas e pulmonares;
- 6) Internacionalização da pesquisa acadêmica com redes internacionais ou colaboradores de pesquisa para melhorar o impacto de nossas ideias e projetos; e
- 7) Extrapolar a fronteira do conhecimento com métodos de ponta e novas tecnologias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo Retrospectivo das biópsias pulmonares cirúrgicas com diagnóstico anátomo-patológico de pneumonite intersticial bronquiocêntrica para avaliar seu perfil clínico-molecular em potencial biomarcador diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A obtenção atual do consentimento dos pacientes para a utilização dos blocos de parafina referente as biópsias pulmonares cirúrgicas é inviável, pois não houve prévio relacionamento entre o proponente do presente projeto de pesquisa e os pacientes e, além disso, vários pacientes já perderam o seguimento neste hospital por motivos variados (mudança de residência, óbito etc.). O sigilo quanto à identificação dos pacientes será preservado.

Recomendações:

não se aplica

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 3.087.997

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1241464.pdf	05/12/2018 13:36:50		Aceito
Outros	09_Carta_05122018.pdf	05/12/2018 13:36:31	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	04_TCLE_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:21:13	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	08_Tales_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:16:51	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	07_Marcel_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:16:39	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	06_Baddini_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:16:27	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	05_Infraestrutura_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:16:14	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	03_cronograma_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:15:33	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	02_orcamento_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:15:18	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Outros	01_Projeto_V02_05122018.pdf	05/12/2018 13:14:57	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.pdf	03/12/2018 22:35:51	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_PORTUGUES.pdf	27/11/2018 23:41:42	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Orçamento	orcamento_PORTUGUES.pdf	27/11/2018	ALEXANDRE	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 3.087.997

Orçamento	orcamento_PORTUGUES.pdf	23:41:05	TODOROVIC	Aceito
Cronograma	cronograma_PORTUGUES.pdf	27/11/2018 23:40:26	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Orçamento	fabro.pdf	13/11/2018 23:24:40	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	13/11/2018 23:16:13	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	13/11/2018 23:06:40	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	project.pdf	13/11/2018 23:03:47	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Outros	upc.pdf	13/11/2018 23:01:44	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	marcel.pdf	13/11/2018 23:00:59	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	tales.pdf	13/11/2018 23:00:45	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	baddini.pdf	13/11/2018 23:00:29	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	13/11/2018 22:58:22	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Dezembro de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br