

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Natália de Souza Xavier Costa

Expressão de biomarcadores de lesão epitelial em tecido pulmonar proveniente de necrópsia de pacientes diagnosticados com sepse e síndrome do desconforto respiratório agudo.

São Paulo
2023

Natália de Souza Xavier Costa

**Expressão de biomarcadores de lesão epitelial em tecido pulmonar
proveniente de necrópsia de pacientes diagnosticados com sepse e síndrome
do desconforto respiratório agudo.**

Versão Original

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

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da
Silva

**São Paulo
2023**

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.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Natalia de Souza Xavier
Expressão de biomarcadores de lesão epitelial em
tecido pulmonar proveniente de necrópsia de
pacientes diagnosticados com sepse e síndrome do
desconforto respiratório agudo / Natalia de Souza
Xavier Costa. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientador: Luiz Fernando Ferraz da Silva.

Descritores: 1.Síndrome do desconforto
respiratório agudo 2.Sepse 3.Biomarcadores 4.Elafina
5.Dano alveolar difuso

USP/FM/DBD-367/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: DE SOUZA XAVIER COSTA, Natália

Título: Expressão de biomarcadores de lesão epitelial em tecido pulmonar proveniente de necrópsia de pacientes diagnosticados com sepse e síndrome do desconforto respiratório agudo.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e acadêmico ao longo desta jornada:

Aos meus pais, Pedro e Sônia, e minha irmã Mariana por todo apoio sempre incondicional, por toda paciência e todas as palavras de carinho e incentivo.

Ao meu marido, Danilo, pelos 15 anos de companheirismo, apoio, incentivo e muita paciência.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, a quem continuo admirando e quem sempre foi uma influência muito positiva durante a minha formação. Agradeço por continuar sendo meu orientador, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim e disponibilidade durante estes anos.

À Prof^ª. Dr^ª. Marisa Dolhnikoff, por todas as discussões sempre muito produtivas, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim.

À Prof^ª. Dr^ª. Thaís Mauad por todos os ensinamentos, discussões e oportunidades de participar em diferentes projetos, ampliando meu conhecimento.

Ao Luciano Belotti pela amizade, incentivo e prontidão para me ajudar

Aos amigos Gabriel e Adair pela amizade de tantos anos e por todo incentivo.

À arquivista, Bruna de Silva Martins por toda ajuda com levantamento de casos, lâmina e blocos e pela amizade.

Aos técnicos do laboratório de histologia e imunohistoquímica do departamento de patologia, em especial à Kely Soares, Cassia Arruda e Angela Batista Gomes dos Santos, cuja expertise e apoio foram essenciais para execução deste projeto.

Ao Reginaldo Silva do Nascimento pelas centenas de lâminas escaneadas.

Aos alunos de iniciação científica, Giovana e Alexandre pela colaboração no projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (2017/22903-3).

RESUMO

De Souza Xavier Costa N. Expressão de biomarcadores de lesão epitelial em tecido pulmonar proveniente de necrópsia de pacientes diagnosticados com sepse e síndrome do desconforto respiratório agudo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA) é caracterizada por edema, hipoxemia grave, e diminuição da complacência pulmonar. Histologicamente, o dano alveolar difuso é considerado a principal marca da fase exsudativa da SDRA. A SDRA representa 10,4% das admissões da unidade de terapia intensiva. A taxa de mortalidade pode variar de 34,9% a 46,1% dependendo da sua gravidade e estima-se que cerca de 40% dos casos não são diagnosticados. Como continua sendo um desafio identificar pacientes com SDRA e diferenciá-la de outras causas de insuficiência respiratória aguda, muitos estudos têm-se centrado na identificação de biomarcadores. Apesar dos avanços nessa área, não existe um único e confiável biomarcador sendo utilizado na prática clínica atualmente. O objetivo deste estudo é avaliar e comparar a expressão tecidual dos biomarcadores RAGE, elafina e SP-D no epitélio pulmonar de pacientes com SDRA, pacientes sépticos e indivíduos controle. Para tanto, selecionamos pacientes com diagnóstico de SDRA (n=47), posteriormente subclassificados em quadros leves, moderados e severos; pacientes com diagnóstico de sepse e sem critérios para SDRA (n=30); e pacientes controles que faleceram de causas não pulmonares (n=27) que tiveram suas autopsias realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC). Informações dos laudos necroscópicos e exames laboratoriais foram coletados. Observamos um aumento da expressão proteica da elafina nos grupos sepse e SDRA. O grupo SDRA severa apresentou maior expressão proteica de elafina no tecido pulmonar em comparação aos grupos SDRA leve e sepse. Além disso, observamos um aumento da expressão proteica de RAGE na SDRA grave em comparação com a SDRA leve e uma diminuição da expressão proteica de SP-D nos pacientes com sepse e com SDRA em comparação com os controles. Nos pacientes com SDRA, as expressões de elafina e RAGE no tecido pulmonar estão correlacionadas com vários parâmetros gasométricos arteriais, indicando uma correlação entre a gravidade da hipoxemia e a expressão destes marcadores. Além disso, correlacionam-se com a percentagem de broncopneumonia e o score de membrana hialina. A expressão de SP-D não teve qualquer correlação com os parâmetros gasométricos ou com as variáveis histológicas. A expressão de RAGE foi negativamente correlacionada com a duração da Ventilação Mecânica (VM) tanto em pacientes com SDRA quanto em pacientes

com sepse. Nos pacientes com sepse, os marcadores não se correlacionaram com os parâmetros gasométricos, exceto o RAGE que se correlaciona com a saturação de O₂. Além disso, no grupo sepse, a elafina foi positivamente correlacionada com o tempo de permanência na UTI, a SP-D foi positivamente correlacionada com o lactato sérico e o RAGE foi positivamente correlacionado com PCR. A análise da expressão tecidual de elafina, RAGE e SP-D não discrimina pacientes com sepse de pacientes com SDRA, porém a expressão de elafina e RAGE, mas não de SP-D, está correlacionada com a gravidade da SDRA.

Palavras-Chave: Síndrome do desconforto respiratório agudo. Sepse. Biomarcadores. Elafina. Dano alveolar difuso.

ABSTRACT

De Souza Xavier Costa N. Expression of epithelial injury biomarkers in lung tissue from necropsy of patients with sepsis and acute respiratory distress syndrome [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by edema, severe hypoxemia, and decreased pulmonary compliance. Histologically, diffuse alveolar damage is considered the hallmark of the exudative phase of ARDS. ARDS accounts for 10.4% of intensive care unit admissions. Mortality rate can range from 34.9% to 46.1% depending on its severity, and it is estimated that about 40% of cases are undiagnosed. As it remains a challenge to identify ARDS patients and differentiate them from other causes of acute respiratory failure, many studies have focused on identifying biomarkers. Despite advances in this area, there is no single reliable biomarker being used in clinical practice currently. The aim of this study is to evaluate and compare the tissue expression of RAGE, elafin and SP-D in the lung epithelium of ARDS patients, septic patients and control subjects. To this end, we selected patients diagnosed with ARDS (n = 47), later subclassified as mild, moderate and severe; patients diagnosed with sepsis without criteria for ARDS (n = 30); and control patients who died of non-pulmonary causes (n = 27) with autopsies performed at the São Paulo Autopsy Service (SVOC). We collected information from the autopsy reports and laboratory tests. We observed an increased protein expression of elafin in the sepsis and ARDS groups. The severe ARDS showed higher elafin expression in the lung tissue compared to the mild ARDS and sepsis group. In addition, we observed increased protein expression of RAGE in severe ARDS compared to mild ARDS and decreased protein expression of SP-D in septic and ARDS patients compared to controls. In ARDS patients, elafin and RAGE expressions on the lung tissue correlate with several blood gas parameters, a correlation between the severity of the hypoxemia and the expression of these markers. In addition, they correlate with the percentage of bronchopneumonia and hyaline membrane score. SP-D expression does not show any correlation with blood gas parameters or histological scores. RAGE expression was negatively correlated with Mechanical Ventilation (MV) duration in both ARDS and septic patients. In septic patients, the markers almost did not correlate with blood gas parameters, except for the RAGE that correlates with O₂ saturation. Moreover, elafin was positively correlated with ICU stay, SP-D was positively correlated with serum lactate and RAGE was also correlated with C-reactive protein. Thus, looking solely at

the tissue expression of elafin, RAGE and SP-D does not discriminate sepsis patients from ARDS patients, however the expression of elafin and RAGE, but not SP-D, does correlate with ARDS severity.

Keywords: Acute respiratory distress syndrome. Sepsis. Biomarkers. Elafin. Diffuse alveolar damage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplo da quantificação no Image Por Plus.....	31
Figura 2. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar de controle, sepse e SDRA (coloração H&E).....	37
Figura 3. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de espessamento septal com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado	40
Figura 4. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de edema com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado.	41
Figura 5. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de inflamação com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado.	42
Figura 6. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de membrana hialina com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado.	43
Figura 7. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de hemorragia alveolar com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado.	44
Figura 8. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de proliferação de pneumócitos tipo II com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado.....	45
Figura 9. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do padrão inflamatório com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado	46
Figura 10. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar imunocorado com anticorpo anti- elafina.	49
Figura 11. Representação gráfica da expressão proteica de elafina no tecido pulmonar.	50
Figura 12. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar imunocorado com anticorpo anti- RAGE.	51
Figura 13. Representação gráfica da expressão proteica de RAGE no tecido pulmonar	52

Figura 14. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar imunocorado com anticorpo anti- SP-D.	53
Figura 15. Representação gráfica da expressão proteica de SP-D no tecido pulmonar.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios recomendados para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela definição de Berlim.....	14
Tabela 2 - Padronização das reações imunohistoquímicas.....	29
Tabela 3 - Características demográficas e principais comorbidades dos pacientes.	34
Tabela 4 - Principais condições associadas a Sepsis e SDRA.	35
Tabela 5 - Exames dos pacientes de sepsis e SDRA.....	36
Tabela 6 – Análise Histológica Semi-quantitativa.	38

LISTA DE SIGLAS

ADAM10: do inglês, *α disintegrin and metalloproteinase 10*

AGER: do inglês, *Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor*

BE: Excesso de base

DAD: Dano alveolar difuso

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

FCO₂Hb: Fração de carboxihemoglobina

FHHb: Fração de desoxihemoglobina

FiO₂: Fração inspirada de oxigênio

FMetHb: Fração de meta-hemoglobina

FO₂Hb: Fração de oxihemoglobina

HCO₃: Bicarbonato

HMGB1: do inglês, *high mobility group box 1 protein*

p50: pressão parcial do oxigênio numa saturação de oxigênio de 50%

PaO₂/FiO₂: Relação da pressão parcial de oxigênio (PaO₂) pela Fração inspirada de oxigênio (FiO₂)

pCO₂: Pressão parcial gás carbônico

PCR: Proteína C reativa;

PEEP: Pressão positiva ao final da expiração

pO₂: Pressão parcial de oxigênio

RAGE: do inglês, *receptor for advanced glycation end products*; receptor para produtos finais de glicação avançada

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

SO₂: Saturação de oxigênio

SOFA: do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*; Avaliação Sequencial de Falência orgânica

SP-D: do inglês, *surfactant protein D*; proteína surfactante D

SIRPα: do inglês, *Signal-regulatory protein alpha*; Proteína Reguladora de Sinal alfa

UTI: Unidade de terapia intensiva

VM: Ventilação Mecânica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 RAGE (do inglês <i>receptor for advanced glycation end products</i> ; receptor para produtos finais de glicação avançada).....	19
1.2 SP-D (do inglês <i>surfactant protein D</i> ; proteína surfactante D).....	21
1.3 Elafina.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Seleção dos pacientes.....	27
3.2 Coleta de dados clínicos.....	28
3.3 Processamento tecidual.....	29
3.4 Análise semi-quantitativa.....	30
3.5 Análise quantitativa.....	30
3.6 Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Características Demográficas e Clínicas.....	33
4.2 Características histológicas e avaliação do dano alveolar difuso.....	36
4.3 Avaliação imunohistoquímica da Elafina.....	48
4.4 Avaliação imunohistoquímica de RAGE.....	51
4.5 Avaliação imunohistoquímica de SP-D.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
Anexo A: Parecer Consubstanciado do CEP.....	76

1. INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma causa comum de insuficiência respiratória em pacientes críticos e é definida pelo início agudo de edema pulmonar não cardiogênico e hipoxemia que requer ventilação mecânica (Matthay et al., 2019). É caracterizada por edema por aumento de permeabilidade, rico em proteínas, que pode levar à hipoxemia grave, diminuição da complacência pulmonar, aumento do peso pulmonar e espaço morto fisiológico (Dushianthan et al., 2011).

Desde a sua primeira descrição em 1967 por Ashbaugh et al., diversas definições foram propostas. Em 2012 foi publicada a definição de Berlim (ARDS Definition Task Force, 2012) com o objetivo de atualizar a definição utilizando novos dados epidemiológicos, fisiológicos e estudos clínicos para lidar com as limitações presentes nas definições anteriores. Na definição de Berlim, a SDRA é dividida em 3 subgrupos e classificada de acordo com a severidade da hipoxemia: leve, moderada e severa. Os critérios determinados pela definição de Berlin são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Critérios recomendados para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela definição de Berlim.

Síndrome do desconforto respiratório agudo	
Início	Dentro de 1 semana após um quadro clínico conhecido ou novo ou agravamento de sintomas respiratórios.
Imagem do tórax^a	Opacidades bilaterais – não totalmente explicadas por derrames, colapso lobar/pulmonar ou nódulos.
Origem do edema	Insuficiência respiratória não totalmente explicada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga hídrica. Necessária avaliação objetiva (ex. ecocardiograma) para exclusão de edema hidrostático na ausência de fatores de risco.
Oxigenação^b	Leve: $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$ com PEEP ou CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}^c$ Moderada: $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$ com PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$ Severa: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$ com PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$.

FONTE: Adaptada de ARDS Definition Task Force, 2012.

^a Radiografia ou tomografia computadorizada de tórax;

^b Se altitude > 1.000 m, calcular fator de correção da seguinte maneira [$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \times (\text{Pressão barométrica}/760)$];

^c Pode ser oferecido ventilação não invasiva para pacientes com SDRA leve.

Apesar da definição de Berlim ter sido um grande avanço, algumas limitações foram reconhecidas após a publicação. Entre elas destacam-se: a Definição de Berlim é problemática em locais com recursos limitados porque a radiografia de tórax, a gasometria arterial e a ventilação mecânica nem sempre estão disponíveis (Riviello et al., 2016). Métodos de oximetria de pulso não invasivos para avaliar critérios de oxigenação para SDRA foram validados e aplicados em estudos observacionais e ensaios clínicos, porém não contemplados nos exames definidores listados (Brown et al., 2016; Rice et al., 2007). Pacientes com insuficiência respiratória aguda tratados com cateter nasal de alto fluxo (CNAF) não atendem à definição de Berlim, que requer ventilação mecânica invasiva ou não invasiva com um mínimo de 5 cm H₂O de pressão expiratória final positiva (PEEP) (Matthay et al., 2021; Ware, 2022).

Recentemente novas recomendações foram propostas por um comitê composto por 32 especialistas para expandir a definição de Berlim (Matthay et al., 2023). O comitê fez quatro recomendações principais: (1) Incluir CNAF com vazão mínima de 30 litros/min; (2) Utilizar a relação da pressão parcial de oxigênio (PaO₂) pela fração inspirada de oxigênio (FiO₂) ≤ 300 mmHg ou a fração da saturação de oxigênio pela FiO₂ (SpO₂/FiO₂) < 315 (se SpO₂ menor que 97%) para identificar a hipoxemia; (3) Manter as opacidades bilaterais como critérios de imagem, mas adicionar o ultrassom como modalidade de imagem, especialmente em áreas com recursos limitados; e (4) Em ambientes com recursos limitados, não exigir PEEP, taxa de fluxo de oxigênio ou dispositivos específicos de suporte respiratório.

O maior estudo sobre a epidemiologia da SDRA foi publicado por Bellani et al. em 2016 e consistiu em um estudo multicêntrico conduzido durante 4 semanas em 459 UTIs de 50 países. Este estudo verificou que casos de SDRA representam 10,4% das admissões da unidade de terapia intensiva (UTI). A SDRA leve apresentou prevalência de 30% e mortalidade de 34,9%, a SDRA moderada teve prevalência de 46,6% e a taxa de mortalidade foi de 40,3% e SDRA severa apresentou prevalência de 23,4% e mortalidade de 46,1%. Cerca de 25% dos casos de SDRA leve evoluem para moderada, 10,38% dos casos leves e moderados evoluem para severo e 12,87% dos pacientes morrem dentro da primeira semana de internação sem evolução do status da SDRA. A taxa de reconhecimento clínico de SDRA foi baixa, sendo que 40% dos casos não foram diagnosticados e um dos fatores que contribuem para isso é a presença de sepse extrapulmonar (Bellani et al., 2016). Alguns grandes ensaios clínicos de SDRA como o ensaio ACURASYS de bloqueio neuromuscular contínuo precoce (Papazian et al., 2010), o ensaio PROSEVA de posicionamento pronado (Guérin et al., 2013) e o ensaio ROSE que reavalia o bloqueio neuromuscular contínuo precoce (National Heart, Lung, and Blood Institute PETAL

Clinical Trials Network, 2019) que foram direcionadas a pacientes com SDRA moderada a grave, tiveram taxas de mortalidade nos braços de controle que excederam 40%.

A SDRA é heterogênea em termos de fatores de risco clínicos, fisiologia da lesão pulmonar e microbiologia, explicando potencialmente por que as terapias farmacológicas têm sido em sua maioria malsucedidas no tratamento da SDRA. A estratificação de risco de pacientes com SDRA não é novidade. A definição de Berlim estratifica a SDRA em três subgrupos (Tabela 1) de acordo com o grau de hipoxemia (leve, moderada e severa), e a mortalidade aumenta à medida que a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ diminui (ARDS Definition Task Force, 2012; Bellani et al., 2016). Identificar fenótipos de SDRA e integrar essas informações na seleção de pacientes para ensaios clínicos pode aumentar a chance de eficácia com novos tratamentos (Matthay et al., 2020). As principais subcategorias que foram propostas para a SDRA são:

Subfenótipos fisiológicos: O estudo publicado por Wendel Garcia et al. (2021) identificou que o subfenótipo não-recrutável apresentou menor elastância do sistema respiratório, menor espaço morto alveolar e menor quantidade de volume pulmonar potencialmente recrutável do que o subfenótipo recrutável. Já o subfenótipo recrutável respondeu à manobra de recrutamento com aumento do tecido pulmonar ventilado, da complacência e da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$. Um padrão parecido também foi identificado em pacientes com SDRA relacionada a COVID-19. O subfenótipo recrutável foi caracterizado por menor $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, menor volume pulmonar normalmente aerado e menor complacência. Além disso, tiveram maior diminuição na massa pulmonar não-aerada em resposta a uma manobra de recrutamento padronizada e foram ventilados mecanicamente por mais tempo até a extubação bem-sucedida (Grieco et al., 2022).

Subfenótipos por causa: A SDRA pode ser desencadeada por diferentes fatores de risco pulmonares como pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico ou contusão pulmonar e extrapulmonares como sepse, pancreatite ou trauma não torácico, sendo que a pneumonia e sepse extrapulmonar são as causas mais comuns de SDRA (Thompson et al., 2017; Ware, Matthay, 2001). Pacientes com causas pulmonares diretas apresentam mais lesão no epitélio alveolar e inflamação alveolar do que pacientes com causas indiretas não pulmonares (Pelosi et al., 2003). Quando um fator de risco extrapulmonar leva à SDRA, a lesão endotelial e a inflamação sistêmica aumentam (Calfee et al., 2015; Pelosi et al., 2003). A heterogeneidade biológica e fisiológica entre os fatores de risco pulmonares e extrapulmonares para SDRA tem sido um foco de pesquisa há décadas, mas não resultou em avanços terapêuticos significativos (Bos e Ware, 2022). Por outro lado, foram feitos progressos substanciais na prevenção da SDRA por diferentes causas específicas. Por exemplo, a transfusão de plasma de doadores do sexo feminino, em vez de doadores do sexo masculino, foi identificada como um importante

fator de risco para lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI) (Gajic et al., 2007). A SDRA relacionada à COVID-19, na qual a disfunção imunológica impulsiona o desenvolvimento da SDRA, exemplifica o valor de avaliar uma população suficientemente homogênea para um tratamento farmacológico direcionado. Na maioria dos casos, pacientes com SDRA não relacionada à COVID-19 não responderam favoravelmente às abordagens anti-inflamatórias; por outro lado, pacientes com SDRA relacionada à COVID-19 mostraram benefícios do tratamento com corticosteroides no estudo RECOVERY (RECOVERY Collaborative Group, 2021).

Subfenótipos hipoinflamatórios e hiperinflamatórios: Estes subfenótipos foram bem descritos no estudo publicado por Calfee et al., em 2014. Este estudo descreve que o subfenótipo hiperinflamatório apresentou concentrações plasmáticas mais altas de IL-6, IL-8 e do receptor do TNF-1, e menores concentrações de bicarbonato e proteína C reativa do que o subfenótipo hipoinflamatório. Pacientes com o subfenótipo hiperinflamatório apresentaram com mais frequência a sepse extrapulmonar como fator de risco para SDRA do que aqueles que eram hipoinflamatórios. Além disso, o subfenótipo hiperinflamatório necessitou de vasopressores com mais frequência, confirmando os achados da pesquisa em subfenótipos baseados na causa; entretanto, a sepse ou o uso de vasopressores isoladamente não foram suficientes para separar os dois subfenótipos. Pacientes com SDRA hiperinflamatória também permaneceram mais tempo em unidades de terapia intensiva, tiveram menos dias sem ventilação e tiveram maior mortalidade em 90 dias, sugerindo que o fenótipo hiperinflamatório pode ser útil para o prognóstico. Mais tarde, outros estudos também observaram que o subfenótipo hiperinflamatório apresentou maior mortalidade em 60 e 90 dias (Sinha et al., 2018) e que o desenvolvimento de SDRA entre pacientes em UTI com sepse confere risco aumentado de mortalidade (Auriemma et al., 2020). As diferenças na resposta inflamatória sistêmica que determinam a distinção entre os dois subfenótipos na SDRA não são necessariamente refletidas na resposta alveolar do hospedeiro. Foram observados níveis discordantes de citocinas pró-inflamatórias na circulação e no lavado broncoalveolar (Heijnen et al., 2021), mostrando a heterogeneidade inflamatória na SDRA com subfenótipos na inflamação sistêmica e alveolar.

Subfenótipos radiológicos: Embora a SDRA seja caracterizada por infiltrados bilaterais difusos na radiografia de tórax, Constantin et al. (2010) ao realizar tomografia computadorizada em pacientes com SDRA ventilados com PEEP de 5 cmH₂O, identificaram dois subfenótipos distintos com base na morfologia pulmonar radiográfica. Pulmões com perda difusa e irregular de aeração (subfenótipo não focal) respondem bem às estratégias de recrutamento alveolar com melhora nas trocas gasosas e na mecânica pulmonar, enquanto os pulmões com consolidações

dorso-inferiores predominantes (subfenótipo focal) respondem melhor ao posicionamento pronado (Constantin et al., 2010). Outro estudo mostrou que pacientes com SDRA com infiltrados não focais tiveram maior mortalidade em comparação com pacientes com achados radiográficos focais (Mrozek et al., 2016).

Histologicamente, o dano alveolar difuso (DAD) é considerado a principal marca da fase exsudativa da SDRA. O DAD pode se dividir em 3 fases, que podem se sobrepor. A fase exsudativa é caracterizada pelo dano difuso ao epitélio alveolar e endotélio capilar, destruição principalmente de pneumócitos tipo I, influxo de células inflamatórias, formação de membrana hialina, edema rico em proteínas e hemorragia alveolar. A fase proliferativa é caracterizada pela hiperplasia e proliferação de pneumócitos tipo II revestindo as áreas onde ocorreu a destruição dos pneumócitos tipo I, diminuição da luz alveolar, proliferação de fibroblastos no interstício e luz alveolar. A fase fibrótica é caracterizada pelo início do processo de reparação ao dano alveolar e deposição de colágeno, podendo haver uma recuperação funcional do tecido lesionado ou intensa fibrose pulmonar e grande perda da função (Crouser, Fahy, 2009; Piatt, O'Brien, 2002). O processo de fibrose pulmonar pode começar no início do curso de SDRA e é mais evidente em pacientes que recebem ventilação mecânica (Marshall et al., 2000; Rocco et al., 2009).

No entanto, estudos mostram que nem todos os pacientes que se encaixam na definição clínica de SDRA apresentam o padrão de DAD na histologia pulmonar, o que poderia caracterizar um novo subfenótipo da síndrome (Cardinal-Fernández et al., 2017). O estudo conduzido por Thille et al. (2013a) mostrou que 45% dos pacientes com critérios clínicos para SDRA apresentaram DAD em suas autópsias e que este padrão histológico é mais comum nas SDRA moderada e grave. Ele observou ainda que o DAD foi mais frequente em pacientes que preenchiam critérios clínicos para SDRA por mais de 72 horas e foi encontrada em 69% daqueles com SDRA grave por 72 horas ou mais. O achado de fibrose pulmonar foi mais frequente na SDRA de origem pulmonar do que na SDRA de origem extrapulmonar (Thille et al. 2013b). Outro estudo realizado por Kao et al. (2015), que avaliou retrospectivamente biópsias de pulmão de pacientes com critérios clínicos para SDRA, observou que 56,5% das biópsias apresentavam DAD. Ao contrário do trabalho de Thille et al. (2013), Kao et al. (2015) não observou diferença nas frequências de DAD entre os pacientes com SDRA leve, moderada e grave. Kao et al. (2015) ainda descreve que os pacientes com DAD apresentaram maior mortalidade do que pacientes sem DAD.

Hoje em dia, o diagnóstico de SDRA baseia-se apenas em variáveis clínicas e características relacionadas com a histologia não estão incluídas na definição porque o processo

de avaliação destas variáveis é invasivo e considerado clinicamente inviável (Cardinal-Fernandez et al., 2017). No entanto, as informações do tecido pulmonar sobre DAD e sobre a lesão da barreira alvéolo-capilar são relevantes porque foi relatado que pacientes com SDRA e que apresentaram DAD no tecido pulmonar tinham cerca de cinco vezes mais probabilidade de morrer de hipoxemia refratária do que pacientes sem DAD (Lorente et al., 2015).

Como continua sendo um desafio identificar pacientes que estão em maior risco de desenvolver SDRA e diferenciá-la de outras causas de insuficiência respiratória aguda, muitos estudos têm-se centrado em biomarcadores para identificar pacientes com SDRA e/ou para prever seus desfechos. Apesar dos recentes avanços na nossa compreensão de biomarcadores associados com o diagnóstico de SDRA, não existe um único e confiável biomarcador sendo utilizado na prática clínica atualmente. De uma maneira geral, a maior parte dos biomarcadores de SDRA propostos podem ser divididos em 4 categorias: (1) citocinas inflamatórias; (2) fatores de coagulação; (3) marcadores de dano epitelial e (4) marcadores de dano endotelial (Tang et al., 2014). Assim como na SDRA, muitos estudos também têm procurado biomarcadores para o diagnóstico/prognóstico da sepse e muitos dos descritos para SDRA também são modulados na sepse (Matsumoto et al., 2015; Pierrakos e Vincent, 2010).

Mais recentemente, um crescente conjunto de evidências mostra que uma forma mais viável de avaliar a lesão epitelial pulmonar poderia ser através de marcadores específicos no plasma ou lavado broncoalveolar, como a proteína surfactante D (SP-D) e o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Neste estudo também incluímos o marcador elafina, descrito como um potente inibidor de protease. Durante processos inflamatórios no tecido pulmonar, a atividade excessiva da protease pode levar a danos na barreira endotelial epitelial-capilar alveolar, resultando na produção de edema pulmonar no espaço alveolar (Kerrin et al., 2013).

1.1 RAGE (do inglês *receptor for advanced glycation end products*; receptor para produtos finais de glicação avançada)

O RAGE é uma proteína que pertence a superfamília das imunoglobulinas de superfície celular e possui duas formas principais: o RAGE ligado a membrana e o RAGE solúvel (sRAGE). O RAGE ancorado à membrana possui um domínio extracelular responsável por reconhecer e ligar-se aos seus ligantes, um domínio transmembranar hidrofóbico e um domínio citoplasmático necessário para a transdução de sinais intracelulares (Oczypok. et al., 2017). Por outro lado, o sRAGE é composto exclusivamente pelo domínio extracelular e pode ser gerado

por dois mecanismos distintos: por meio do *splicing* alternativo do gene *AGER* (Yonekura et al., 2003) ou pela clivagem proteolítica do RAGE ligado à membrana por meio de proteínas como o ADAM10 (Raucci et al., 2008) e a metaloproteinase 9 (Zhang et al., 2008). O sRAGE tem a capacidade de capturar os seus ligantes, mas não de iniciar uma resposta intracelular, impedindo assim a ativação do RAGE ligado a membrana (Oczypok. et al., 2017).

O RAGE identifica os seus ligantes com base na sua estrutura tridimensional ao invés de uma sequência específica de aminoácidos (Xie et al., 2008). Apesar ter sido primeiramente identificado como o receptor dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), que são compostos formados a partir da glicosidação não enzimática de proteínas celulares (Xie et al., 2008), o RAGE pode se ligar a uma grande variedade de ligantes endógenos (Dong et al., 2022). Alguns exemplos de ligantes do RAGE são as proteínas S100, que são secretadas por células inflamatórias ativadas (Leclerc et al., 2009) e o HMGB1 (do inglês, *high mobility group box 1 protein*) que pode ser ativamente secretado por macrófagos, células NK e células dendríticas ou passivamente por células lesionadas (Scaffidi et al., 2002). Além disso, o RAGE também pode ligar-se à integrina Mac-1 dos leucócitos, facilitando o recrutamento celular para o tecido inflamado (Chavakis et al., 2003) e ligar-se a diferentes componentes da matriz extracelular, como a laminina e os colágenos tipo I e IV, desempenhando um importante papel na aderência e disseminação dos pneumócitos tipo I no tecido pulmonar (Demling et al., 2006).

Na maioria dos tecidos, a expressão de RAGE é baixa ou inexistente, entretanto no pulmão a expressão de RAGE é constitutivamente alta (Brett, et al., 1993; Buckley, Ehrhardt, 2010). No tecido pulmonar, a expressão de RAGE se localiza principalmente nos pneumócitos tipo I, porém a expressão nos pneumócitos tipo II também já foi relatada (Fehrenbach et al., 1998; Katsuoka et al., 1997). Além das células epiteliais, a expressão de RAGE já foi observada em células do músculo liso de vasos e vias aéreas, células endoteliais e células inflamatórias como macrófagos, eosinófilos, linfócitos T e B e células dendríticas (Dong et al., 2022).

O RAGE regula uma série de processos celulares como inflamação, apoptose, proliferação e autofagia, além disso ele é descrito como um amplificador de respostas imunes e inflamatórias, estando envolvido na patogênese de diversas doenças como diabetes mellitus, doenças vasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (Schmidt et al., 2001; Sparvero et al., 2009; Xie et al., 2013). O envolvimento e modulação da expressão de RAGE já foram descritos em diversas doenças pulmonares, como a fibrose cística, displasia broncopulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, fibrose pulmonar e SDRA (Oczypok. et al., 2017).

Cada vez mais estudos mostram o envolvimento do RAGE na resposta inflamatória da SDRA e seu potencial como biomarcador. O estudo conduzido por Ware et al. (2013) mostrou

que níveis séricos anormais de 5 biomarcadores (SP-D, RAGE, IL-8, IL-6 e CC-16) proporcionaram discriminação para o diagnóstico de SDRA em pacientes com sepse grave quando comparados com pacientes com sepse, mas sem critérios para SDRA. Além disso, os níveis plasmáticos de sRAGE (RAGE solúvel) é correlacionado com a mortalidade da SDRA (Jabaudon et al., 2018) e com a gravidade da SDRA, diminuindo com o decorrer do tempo (Jabaudon et al., 2011).

Na sepse, Matsumoto et al. (2015) mostrou que os níveis séricos de sRAGE aumentam durante a progressão e severidade da sepse. Bopp et al. (2008) mostrou que não só que a concentração plasmática de sRAGE são maiores em pacientes sépticos, mas também que estes níveis são mais altos nos pacientes não sobreviventes.

1.2 SP-D (do inglês *surfactant protein D*; proteína surfactante D)

O surfactante pulmonar é uma mistura complexa de fosfolipídios e colesterol (90%) e proteínas (10%) que cobre a área superficial do epitélio alveolar e tem como principal função manter a tensão superficial mínima para evitar o colapso pulmonar durante a respiração (Kishore et al., 2006). Existem quatro tipos de proteínas surfactantes no pulmão: SP-A, SP-B, SP-C e SP-D. SP-B e SP-C são proteínas de baixo peso molecular e com propriedades extremamente hidrofóbicas. SP-A e SP-D são proteínas hidrofílicas com alto peso molecular pertencentes a família das colectinas (Kishore et al., 2006).

O principal local de síntese de proteínas surfactantes é o pulmão. Os pneumócitos tipo II sintetizam os quatro tipos de proteínas surfactantes e lipídeos surfactantes, que são armazenados nos corpos lamelares. Quando estimulados, este conteúdo é secretado na fina fase líquida que recobre o epitélio alveolar, formando um filme superficial que é capaz de reduzir a tensão superficial, tornando assim a expansão pulmonar possível. (Kishore et al., 2006; Wright, 2005). SP-A e SP-D também são secretados por células bronquiolares não ciliadas (*Club cells*), por glândulas da submucosa e células epiteliais de outros tecidos respiratórios, como traqueia e brônquios (Carreto-Binaghi et al., 2016). Além disso, SP-A e SP-D foram localizadas em regiões externas ao pulmão como intestino, cérebro, testículos, coração, próstata, rim, pâncreas e trato urogenital feminino (Leth-Larsen et al., 2004; Lin et al., 2001; Madsen et al., 2000).

As funções de defesa do surfactante pulmonar são principalmente mediadas pelas SP-A e SP-D. Tanto a SP-A quanto a SP-D podem se ligar a uma variedade de bactérias, vírus, alérgenos e células apoptóticas funcionando como opsoninas, aumentando assim a eficiência da fagocitose (Wright, 2005; Han, Mallampalli, 2015). Além disso, Ohya et al. (2006) mostrou

que a SP-D pode se ligar aos receptores toll-like 2 e 4, sugerindo-lhe um papel direto na modulação de respostas celulares dependentes dos receptores toll-like. O SP-D também parece ter um papel importante na modulação dos macrófagos no pulmão. Guo et al. (2019) usando camundongos mutantes que superexpressão SP-D, mostrou que o SP-D pode desempenhar um papel fundamental na regulação do microambiente que determina o fenótipo dos macrófagos no pulmão. Além do papel pró inflamatório desempenhado pelo SP-D, ele também pode ajudar a manter, em condições normais, um ambiente pulmonar não inflamado, se ligando a SIRP α nas células residentes. A ativação da SIRP α suprimiria a produção de mediadores pró-inflamatórios potencialmente desencadeados por processos corriqueiros aos pulmões (Gardai et al., 2003).

A SP-D também tem sido descrita como um biomarcador para dano epitelial pulmonar e para SDRA. Endo et al. (2002) mostraram que os níveis séricos de SP-D são quase 5 vezes mais altos nos pacientes com SDRA do que em pacientes com sepse. Além disso, os níveis séricos de SP-D aumentam de acordo com a severidade da SDRA (Kuzovlev, 2013). No início do curso da SDRA, níveis aumentados de SP-D plasmático estão associados a um pior desfecho clínico (Eisner et al., 2003). Entretanto, Chen et al. (2003) mostraram que baixos níveis de SP-D em amostras de edema pulmonar provenientes de pacientes com SDRA são associados com piores prognósticos.

1.3 Elafina

A elafina e a sua precursora trappin-2 (ou pré-elafina) são inibidores de proteases e membros da família das quelonianinas (Deraison et al., 2023). A elafina (6 kDa) foi purificada pela primeira vez na década de 1990 a partir da pele de pacientes com psoríase e foi caracterizada como uma proteína com propriedades inibidoras da elastase (Schalkwijk et al., 1990; Wiedow et al., 1990). Mais tarde, a clonagem do cDNA da elafina revelou que a molécula era mais longa do que o esperado, revelando que a sua forma precursora denominada de trappin-2 (12 kDa) contém um domínio N-terminal adicional, distinto do domínio com função inibidora de protease (Deraison et al., 2023). Este domínio N-terminal adicional é uma sequência de ancoramento da proteína em locais específicos da matriz extracelular após a ação da transglutaminase (Nara et al., 1994), além disso acredita-se que este domínio pode desempenhar um papel nas propriedades antimicrobianas da proteína (Baranger et al., 2008). A elafina é liberada a partir da clivagem proteolítica da trappin-2, liberando o domínio C-terminal (WAP), que possui a função anti-protease (Deraison et al., 2023).

Muitas proteases diferentes podem catalisar a clivagem proteolítica da trappin-2 liberando a elafina como as proteases serina e cisteína (que são as mais eficazes), metaloproteinases e a triptase dos mastócitos (Deraison et al., 2023; Guyot et al., 2005). Num contexto inflamatório, onde a atividade proteolítica tecidual é marcadamente aumentada, muitas proteases diferentes poderiam ser responsáveis pela esta clivagem, inclusive a elastase produzida pelos neutrófilos (Guyot et al., 2008).

In vivo, a elafina é detectada principalmente em condições inflamatórias. No sistema respiratório, ela é expressa pelas glândulas traqueais, *club cells*, epitélio brônquico e alveolar e por células inflamatórias como macrófagos alveolares e neutrófilos (Henriksen, 2014; Moreau et al., 2008; Sallenave, 2000; Sallenave et al., 1997). Fora do pulmão, já foi descrita a expressão de elafina nas células epiteliais da pele, da vagina, da cavidade oral e de todo trato gastrointestinal (Deraison et al., 2023).

Muitas atividades biológicas têm sido associadas a trappin-2 e a elafina, no entanto, ainda não está claro qual forma da proteína (trappin-2, elafina ou ambas) está associada a condições fisiológicas ou fisiopatológicas específicas (Deraison et al., 2023). Estudos anteriores demonstraram que a expressão da elafina pode ser regulada positivamente em respostas a estímulos pró-inflamatórios como lipopolissacarídeo (Simpson et al., 2001), elastase dos neutrófilos (Reid et al., 1999), e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 beta e TNF-alfa (Pfundt et al., 2000; Sallenave et al., 1994). A elafina e trappin-2 desempenham um papel importante na prevenção de lesões excessivas de tecido durante eventos inflamatórios, controlando a atividade excessiva de elastase de neutrófilos (Tejera et al., 2014). Estudos mais recentes mostraram que a elafina também pode favorecer a resolução da inflamação. A elafina pode proteger os receptores CD40, CD80 e CD86 nas células dendríticas contra a clivagem mediada pela elastase de neutrófilos. Estes receptores são essenciais para o reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas, favorecendo a resolução da inflamação (Roghanian et al., 2006). O tratamento prévio com elafina de camundongos desafiados com LPS acelerou a resolução da inflamação com o aumento de neutrófilos apoptóticos nos exsudatos pleurais, inibição da elastase e diminuição da ativação do NF- κ B (Vago et al., 2016).

Além de sua propriedade anti-protease, também foi demonstrado que o trappin-2 e a elafina possuem atividades anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais, independentes da sua atividade anti-elastase. Wilkinson et al. (2011) demonstrou que a secreção de trappin-2/elafina pelos linfócitos T $\gamma\delta$, o que poderia contribuir para a opsonização de patógenos nas superfícies mucosas. Outros estudos mostram que a elafina pode suprimir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (Bellemare et al., 2008), a infecção e replicação do vírus da imunodeficiência

humana 1 (HIV-1) (Iqbal et al., 2009) e a infecção pelo vírus herpes simplex 2 (Drannik et al., 2013).

Estudos experimentais mostraram que a trappin-2 pode reduzir o influxo de neutrófilos induzido por LPS nos alvéolos pulmonares de camundongos, além de inibir a produção da metaloproteinase 9 e dos potentes atrativos de neutrófilos CXCL1 e CXCL2 sugerindo um papel imunomodulador na imunidade inata (Vachon et al., 2002). Além disso, em outro estudo, a elafina inibiu a produção de MCP-1 induzida por LPS em monócitos, inibindo a ativação do NF- κ B (Butler et al., 2006). Henriksen et al. (2004) demonstraram que ao reduzir a ativação do NF- κ B, a trappin-2 atenua a secreção de IL-8 pelas células endoteliais em resposta a vários estímulos pró-inflamatórios, como o LPS, e lipoproteína de baixa densidade oxidada.

Alguns estudos já exploraram a modulação da elafina na SDRA. Um desequilíbrio entre os níveis plasmáticos de elastase de neutrófilos e elafina em pacientes com SDRA foi associado com maior mortalidade na SDRA (Wang et al., 2017). Os níveis plasmáticos de elafina diminuem significativamente durante a fase aguda da SDRA, sendo possível utilizar este parâmetro como um marcador clínico para monitorar o desenvolvimento precoce de SDRA (Wang et al., 2008; Wang et al., 2009). No entanto, Sallenave et al. (1999) mostraram que os níveis de elafina aumentaram no lavado broncoalveolar de pacientes em risco de desenvolver SDRA e este incremento é maior ainda em pacientes já com a SDRA estabelecida. Kerrin et al. (2013) demonstraram que os níveis de elafina aumentaram significativamente no lavado broncoalveolar proveniente de pacientes no início da SDRA quando comparados com voluntários saudáveis, mas essas concentrações diminuem progressivamente ao longo do curso da SDRA como resultado de degradação proteolítica.

Atualmente existem muitos trabalhos na literatura que buscam candidatos a biomarcadores de SDRA, porém muitos destes estudos têm limitações como amostras de tamanho reduzido, controles inconsistentes e falta de grandes estudos para a validação de diversos biomarcadores (Ware, Calfee, 2016). Embora haja diversos estudos com identificação destes biomarcadores no sangue e no lavado broncoalveolar, há poucos estudos com tecido humano demonstrando as características de expressão destes marcadores no pulmão. Além disso, a identificação do perfil de expressão destes candidatos a biomarcadores no tecido pulmonar em condições normais e patológicas pode propiciar melhor compreensão de seu papel no desenvolvimento da doença, complicações e prognóstico. Poucos estudos abordaram esses marcadores de lesão epitelial pulmonar no tecido pulmonar de pacientes com SDRA ou sépticos. Portanto, nosso estudo se

concentrou em caracterizar a expressão proteica de elafina, RAGE e SP-D por meio de imunohistoquímica no tecido pulmonar em pacientes que faleceram por doenças não pulmonares, sepse e SDRA. Analisamos ainda a correlação entre esses marcadores e variáveis clínicas. Além disso, comparamos a expressão proteica desses marcadores entre os pacientes que faleceram por sepse e diferentes gravidades de SDRA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é avaliar e comparar a expressão dos marcadores de lesão epitelial RAGE, elafina e SP-D no epitélio pulmonar de pacientes com SDRA, com sepse e indivíduos controle.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo são:

- Caracterizar os aspectos histológicos do dano alveolar difuso nos casos de SDRA e sepse.
- Comparar a expressão dos marcadores de lesão epitelial RAGE, elafina e SP-D no epitélio pulmonar dos pacientes de sepse, SDRA leve, SDRA moderada e SDRA severa.
- Correlacionar os níveis de expressão tecidual de RAGE, elafina e SP-D com os escores de lesão tecidual.
- Correlacionar as variáveis clínicas e parâmetros ventilatórios com os níveis de expressão tecidual de RAGE, elafina e SP-D.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP sob o número CAAE 67771417.0.0000.0068 e parecer número 2.074.942 (anexo A).

3.1 Seleção dos pacientes

Os casos para este estudo foram selecionados a partir de uma pesquisa de laudos de autópsia do arquivo do Departamento de Patologia da FMUSP. Pacientes falecidos no HC-FMUSP que tiveram suas autópsias realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP) com finalidade diagnóstica no período de 2002 a 2014 foram incluídos retrospectivamente após a análise de diferentes parâmetros clínicos e patológicos nos laudos de autópsia. Os pacientes foram divididos nos seguintes grupos:

- a) Controle – Pacientes que faleceram de causas não pulmonares, sem história prévia de tabagismo e/ou doença pulmonar crônica e/ou ventilação mecânica, comprovadas pela ausência de alterações histológicas relacionadas.
- b) Sepses – Paciente com quadro de sepse, mas sem diagnóstico clínico de SDRA, além do quadro clínico compatível com septicemia, níveis de lactato sérico maiores que 18 mg/dL (Singer et al., 2016) e alterações histológicas características da sepse como congestão de múltiplos órgãos e infiltrado inflamatório reacional difuso. Foram excluídos pacientes tabagistas e com doenças pulmonares crônicas.
- c) SDRA – Paciente com critério clínico para o diagnóstico de SDRA segundo a definição de Berlim (ARDS Definition Task Force, 2012) com ou sem diagnóstico de sepse (conforme critérios descritos acima), sem alterações pulmonares crônicas prévias e alterações histológicas compatíveis incluindo dano alveolar difuso, formação de membrana hialina, infiltrado inflamatório misto e áreas de reparo tecidual. Foram excluídos pacientes tabagistas e com doenças pulmonares crônicas.

Os casos controles foram selecionados previamente por outros projetos do departamento. Para a busca dos casos do grupo sepse foram utilizadas as palavras chaves: sepse, septicemia e choque séptico. Foram analisados em torno de 300 laudos e pré-selecionados cerca de 60 casos. Para os casos do grupo SDRA foram utilizadas as palavras chaves: síndrome do desconforto respiratório agudo, síndrome da angústia respiratória aguda e dano alveolar difuso. Foram analisados em torno de 200 laudos e pré-selecionados 67 casos. Em cada laudo foram analisadas

a história clínica e a descrição das alterações macro e microscópicas compatíveis com os critérios estabelecidos de cada grupo.

Todos os casos pré-selecionados pelas informações dos laudos de autópsia tiveram as lâminas histológicas reavaliadas por um patologista experiente afim de confirmar as características histológicas compatíveis com cada grupo. Para melhor representatividade do tecido pulmonar, só foram selecionados casos com pelo menos 2 blocos de parafina contendo fragmentos de tecido pulmonar. Além disso, excluímos casos nos quais o prontuário médico referente a última internação não estava disponível para consulta.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram selecionados: 47 casos de SDRA, 30 casos de sepse sem critérios para SDRA e 27 casos controles.

3.2 Coleta de dados clínicos

Através dos registros de óbitos e questionários respondido pelos familiares realizados de rotina no SVOC-USP foram coletadas informações como sexo, idade, índice de massa corpórea (IMC), causa de óbito, comorbidades, hábitos e vícios dos pacientes. Além disso os casos de SDRA e sepse tiveram seus prontuários avaliados para obtenção adicional de parâmetros clínicos gerais. Os dados coletados a partir da revisão dos prontuários médicos e exames clínicos realizados 24 horas antes do óbito foram:

- a) Informações clínicas: duração da internação, da ventilação mecânica e da internação na unidade de tratamento intensivo (UTI), escore SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*);
- b) Informações sobre a ventilação mecânica: fração inspirada de oxigênio (FiO_2), pressão positiva ao final da expiração (PEEP) e relação da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) pela FiO_2 .
- c) Gasometria arterial: pH, pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial gás carbônico (pCO_2), bicarbonato (HCO_3), excesso de base (BE), saturação de oxigênio (SO_2), fração de oxihemoglobina (FO_2Hb); fração de carboxihemoglobina (FCO_2Hb), Fração de desoxihemoglobina ($FHHb$), fração de meta-hemoglobina ($FMetHb$), pressão parcial do oxigênio numa saturação de oxigênio de 50% ($p50$);
- d) Hemograma: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, neutrófilos, segmentados, metamielócitos, mielócitos, promielócitos e linfócitos;
- e) Quantidade de plaquetas, lactato sérico e proteína C reativa;

f) Exames de culturas e sorologias durante todo o período da última internação.

3.3 Processamento tecidual

Fragmentos de diferentes regiões de tecido pulmonar coletados na autópsia de rotina foram armazenados em solução de formalina a 10% tamponada, submetidos a embebição e emblocamento em parafina. A partir destes blocos foram coletados cortes histológicos de 5 µm de espessura com os seguintes propósitos: 1. Coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histopatológica; 2. Coloração de picrosirius red para quantificação de colágeno no parênquima pulmonar; 3. Uso de técnica imunohistoquímica para avaliação da expressão de RAGE, SP-D e elafina. Os detalhes das reações imunohistoquímicas padronizadas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Padronização das reações imunohistoquímicas.

Anticorpo Primário	Marca	Concentração Padronizada	Anticorpo Secundário	Tampão de Recuperação
Anti-RAGE	Santa Cruz sc-365154	1:300	Mach4 Universal HRP-Polymer Biocare medical M4U534	Citrato pH 6
Anti-SP-D	Santa Cruz sc-25324	1:750	Easylink One Easypath EP12-20503	Tris-EDTA pH 9
Anti-Elafin/Skalp [TRAB2F]	Abcam ab81681	1:300	Easylink One Easypath EP12-20503	EDTA pH 8

Para as reações, seguiu-se a rotina das reações imunohistoquímicas que incluem a desparafinização com imersão em xilol sob calor por 20 minutos, seguido de três banhos de hidratação do tecido com banhos sequenciais em álcool com concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi feita por alta temperatura em tampão de recuperação como descrito na tabela 2, por 45 minutos. Peróxido de hidrogênio foi utilizado para inibição da peroxidase endógena. A incubação dos anticorpos primários foi realizada por 20 horas a 4°C. Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 minutos e o anticorpo secundário foi aplicado por uma hora em estufa a 37°C. A revelação da reação se deu com a aplicação do cromógeno diaminobenzidina por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água

corrente, desidratadas com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes e xilol e contra-coradas com hematoxilina de Harris.

3.4 Análise semi-quantitativa

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram cegadas e avaliadas por um patologista experiente que quantificou a proporção (%) dos seguintes padrões histológicos: tecido pulmonar normal, DAD exsudativo, DAD fibroproliferativo e broncopneumonia aguda. Os critérios histológicos utilizados foram: (a) tecido normal: parênquima pulmonar com histologia normal ou alterações inespecíficas mínimas como edema leve e congestão; (b) DAD exsudativa: edema intersticial e/ou intra-alveolar, inflamação intersticial, quantidades variáveis de hemorragia alveolar e deposição de fibrina, membranas hialinas intra-alveolares e hiperplasia de pneumócitos tipo II; (c) DAD fibroproliferativa: qualquer grau de proliferação fibroblástica dentro do interstício e/ou espaços alveolares, incluindo agregados soltos de fibroblastos misturados com células inflamatórias dispersas, deposição de colágeno, metaplasia escamosa, entremeados a áreas com membranas hialinas ou áreas densamente fibróticas (Mauad et al., 2021). Para explorar ainda mais as características de cada padrão DAD, cada lâmina também foi pontuada para espessamento septal, edema, inflamação, membrana hialina, hemorragia alveolar e proliferação de pneumócitos tipo II, seguindo a graduação: 0-ausente, 1-leve, 2- moderado e 3- severo (Simão et al., 2016). Além disso, os casos foram classificados pelo tipo de inflamação: 0- Ausente, 1- Inflamação predominantemente neutrofílica, 2- Inflamação predominantemente linfomononuclear e 3- Inflamação mista.

3.5 Análise quantitativa

As lâminas imunomarcadas com RAGE, SP-D e elafina e as lâminas coradas com H&E e picrosirius red foram digitalizadas utilizando o Scanner Panoramic Flash (3D Histech, Budapest, Hungria) com objetiva de 40x. Foram definidas 20 áreas de parênquima pulmonar utilizando-se a objetiva de 20x do software de visualização das lâminas digitalizadas SlideViewer (3D Histech, Budapest, Hungria). As imagens foram transferidas para o software de análise de imagens Image Pro Plus, versão 4.1 (Media Cybernetics, USA).

O Image Pro Plus foi previamente calibrado para a conversão de pixels em micrometros e um intervalo de positividade foi determinado a partir da análise de um conjunto de lâminas para cada anticorpo gerando assim um padrão que foi salvo e aplicado a todas as imagens durante a

quantificação. Em cada imagem, o septo pulmonar foi desenhado através da ferramenta de região de interesse e foram anotados os valores dos seguintes parâmetros: 1. Área positiva do marcador (μm^2); 2. Densidade ótica integrada (sem unidade); 3. Comprimento do leito alveolar correspondente ao epitélio marcado (μm). Então, foi calculado a razão de área positiva marcada pelo comprimento do septo selecionado.

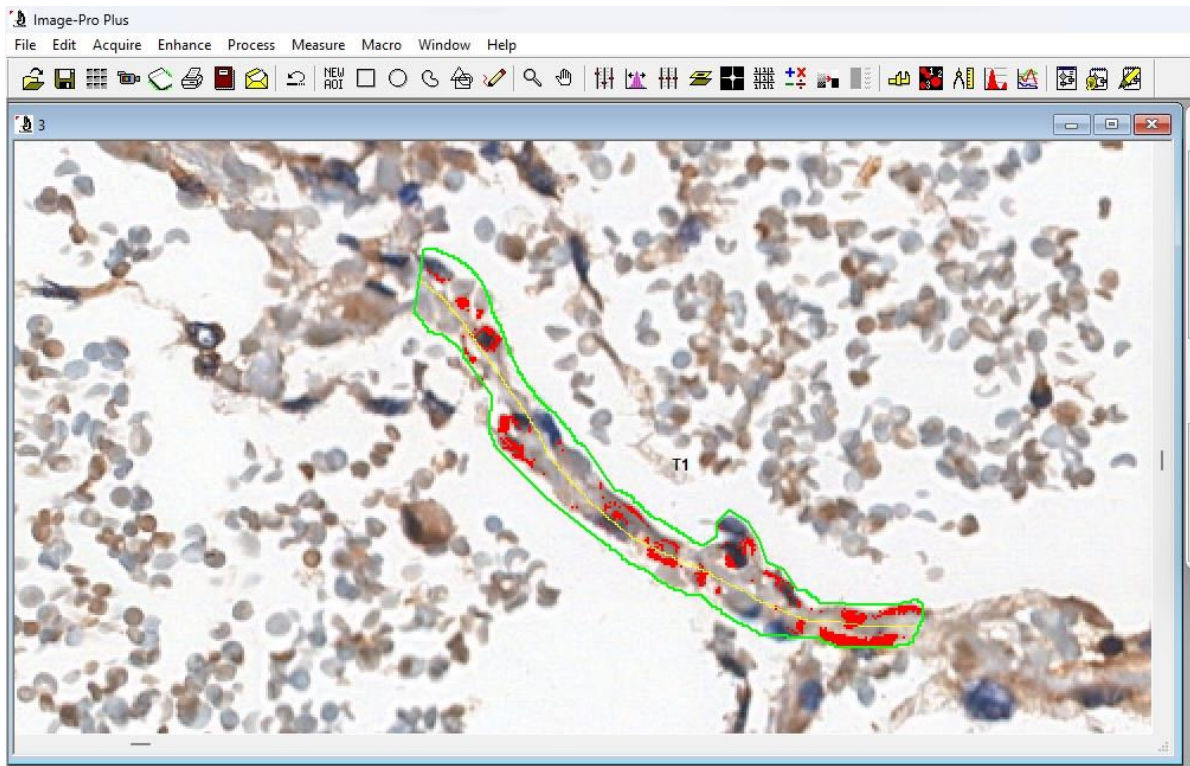


Figura 1. Exemplo da quantificação no Image Por Plus. Linha verde delimita a área de interesse (septo alveolar). Linha amarela representa o comprimento do septo. Área em vermelho mostra a área positiva do marcador.

3.6 Análise Estatística

O software SPSS 23 (SPSS Inc/IBM Chicago, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e RStudio, versão 4.1.1 (RStudio, PBC, Boston, MA, EUA) foram usados para visualização dos dados.

As variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste qui-quadrado e pela análise de correspondência simples (ANACOR). Analisamos as relações de dependência entre cada par de categorias utilizando os resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado, sempre que este teste apresentou significância estatística. Nessa análise, adotamos um valor alfa de 0,05.

Portanto, valores dos resíduos padronizados ajustados maiores que +1,96 ou menores que -1,96 indicam desvios significativos em relação às frequências esperadas (Sharpe, 2015).

A distribuição das variáveis métricas foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Dependendo da distribuição dos dados, testes T-student ou Mann-Whitney foram usados para comparar dois grupos e Kruskal-Wallis ou testes de análise de variância (ANOVA), seguidos pelo pós-teste de Bonferroni ou Tukey para comparar quatro grupos. A diferença estatística foi assumida ao nível de significância de 5%. O coeficiente de variação (CV) foi calculado para cada caso dividindo-se o desvio padrão pela média. Além disso, foi realizado o teste de correlação de Spearman entre as variáveis; coeficientes (r) foram considerados estatisticamente significativos em $p < 0,05$.

Como estratégia de análise dos dados, comparamos todas as variáveis histológicas entre os 3 grupos: Controle, Sepsis e SDRA. Além disso, comparamos o grupo sepsis com os subgrupos formados pela classificação do grupo SDRA de acordo com sua gravidade: Leve: $200 \text{ mmHg} < \text{relação PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$, Moderada: $100 \text{ mmHg} < \text{relação PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$, e grave: $\text{relação PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$. O grupo SDRA também foi dividido em pulmonar, causada por um insulto diretamente nos pulmões (ex. broncopneumonia) ou extrapulmonar caracterizado por uma lesão pulmonar indireta resultante de uma resposta inflamatória sistêmica (ex. sepsis). Os dados dos exames laboratoriais foram comparados apenas entre os grupos SDRA e sepsis e correlacionados com as variáveis histológicas.

4. RESULTADOS

4.1 Características Demográficas e Clínicas

A tabela 3 mostra as características demográficas e principais comorbidades dos pacientes incluídos no estudo.

Foram incluídos 27 casos de controle (12 homens/15 mulheres), com a mediana de idade de 62 anos (mínimo de 27 anos e máximo de 93 anos), com causas de morte não pulmonares. A maioria destes casos vieram a óbito por morte súbita, como infarto agudo do miocárdio (37%, n=10), insuficiência cardíaca (37%, n=10), choque hipovolêmico (11,1%, n=3) ou acidente vascular cerebral (3,7%, n=1). Os demais casos faleceram por câncer (7,4% n=2) e miocardite aguda (3,7%, n=1).

Também selecionamos 30 casos de sepse (10 homens, 20 mulheres), com mediana de idade de 59 anos (mínimo de 27 e máximo de 87), com foco de infecção pulmonar (n=5) ou extrapulmonar (n=25). Vinte e cinco casos (83,3%) necessitaram de ventilação mecânica. As condições associadas à sepse mais comuns foram insuficiência renal aguda (n=10), seguida de doenças cardiovasculares (n=7) e doenças hepáticas (n=7). As principais condições associadas à sepse estão descritas na tabela 4.

Selecionamos 47 casos de SDRA (24 homens, 23 mulheres), com mediana de idade de 55 anos (mínimo de 19 e máximo de 88 anos), com SDRA pulmonar (n=25) ou extrapulmonar (n=22). As condições mais comuns associadas à insuficiência respiratória foram insuficiência renal aguda (n=26) e broncopneumonia (n=25), seguidas de sepse extrapulmonar (n=20), doenças cardiovasculares (n=11) e doenças hepáticas (n=9). As principais condições associadas à SDRA estão descritas na tabela 4.

Não observamos diferenças estatísticas na idade, IMC e proporção de paciente do sexo feminino e masculino entre os grupos. Também não observamos diferença estatística no tempo de internação, permanência na UTI, escore SOFA, FiO₂ e relação PaO₂/FiO₂ entre os grupos sepse e SDRA. No entanto, o grupo SDRA apresentou maior duração da ventilação mecânica (p<0,0001), maior peso pulmonar (p<0,0001) e maior PEEP (p<0,0001) (Tabela 3).

Tabela 3 - Características demográficas e principais comorbidades dos pacientes.

	Controle	Sepse	SDRA	Valor de p
Idade em anos , mediana (IIQ)	62 (20)	59 (31)	55 (22)	0,079
IMC em Kg/m² , mediana (IIQ)	24,1 (3,68)	25,7 (6,68)	24,3 (6,03)	0,310
Sexo , n (%)				
Masculino	12 (44,4%)	10 (33,3%)	24 (51,1%)	0,311
Feminino	15 (55,6%)	20 (66,7%)	23 (48,9%)	
Autodeclaração Étnico-racial , n (%)				
Branca	20 (74,1%)	24 (80%)	32 (68,1%)	0,512
Afrodescendente	7 (25,9%)	6 (20%)	15 (31,9%)	
Comorbidades , n (%)				
HAS	20 (74,1%)	19 (63,3%)	20 (42,6%)	0,021
Insuficiência Cardíaca	12 (46,2%)	8 (26,7%)	5 (10,6%)	0,003
Doenças vasculares	15 (57,7%)	5 (16,7%)	5 (10,6%)	<0,0001
Diabetes mellitus	10 (37%)	11 (36,7%)	11 (23,4%)	0,335
Obesidade	4 (14,8%)	7 (25,9%)	4 (10,3%)	0,229
Doenças Hepáticas	4 (15,4%)	8 (26,7%)	9 (19,1%)	0,556
Neoplasia	2 (7,4%)	5 (16,7%)	14 (29,8%)	0,059
Alcoolismo	2 (7,4%)	3 (10%)	6 (12,8%)	0,770
Doença Renal Crônica	0	4 (13,3%)	6 (15,8%)	0,056
Imunossupressão	0	3 (10%)	14 (29,8%)	0,041
Doenças do Sistema Nervoso	0	3 (10%)	6 (15,8%)	0,173
Hipertensão pulmonar	0	3 (10%)	2 (4,3%)	0,251
HIV +	0	1 (3,3%)	3 (6,4%)	0,383
Duração da hospitalização em dias , mediana (IIQ)	-	7,5 (24)	13 (14)	0,101
Duração da Ventilação mecânica em dias , mediana (IIQ)	-	1 (2)	3 (7)	<0,0001
Duração da internação na UTI , mediana (IIQ)	-	3,5 (7)	5 (10)	0,154
Escore SOFA , mediana (IIQ)	-	15 (6)	15 (4)	0,961
Peso dos pulmões em gramas , mediana (IIQ)	-	1026 (456)	1575 (756)	<0,0001
Ventilação mecânica , n (%)	-	25 (83,3%)	47 (100%)	0,031
FiO ₂ (%), mediana (IIQ)	-	100 (50)	90 (50)	0,895
PEEP (cmH ₂ O), mediana (IIQ)	-	8 (5)	10 (6)	<0,0001
Relação PaO ₂ /FiO ₂ , mediana (IIQ)	-	120,5 (136)	95 (124)	0,218

IIQ: Intervalo Interquartil. IMC: Índice de massa corpórea. HAS: Hipertensão arterial sistêmica.

Tabela 4 - Principais condições associadas a Seps e SDRA.

Condições associadas*, n (%)	Seps (n=30)	SDRA (n=47)
Infecção Extrapulmonar	25 (83,3%)	20 (42,6%)
Broncopneumonia	5 (16,7%)	25 (53,2%)
Bacteriana	5 (16,7%)	14 (29,8%)
Influenza H1N1	0	6 (12,8%)
Pneumocistose **	0	2 (4,3%)
Citomegalovírus	0	2 (4,3%)
Vírus Respiratório Sincial	0	1 (2,1%)
Aspergilose	0	1 (2,1%)
Insuficiência Renal aguda	10 (33,3%)	26 (55,3%)
Doenças cardiovasculares	7 (23,3%)	11 (23,4%)
Doenças Hepáticas	7 (23,3%)	9 (19,1%)
Doenças do SNC	4 (13,3%)	4 (8,5%)
Sangramento Gastrointestinal	3 (10%)	4 (8,5%)
Tromboembolismo pulmonar	2 (6,7%)	4 (8,5%)
Outras Doenças Gastrointestinais	2 (6,7%)	3 (6,4%)
Pancreatite Aguda	1 (3,3%)	2 (4,3%)
Doença de Chagas	1 (3,3%)	1 (2,1%)
Acidente vascular cerebral	1 (3,3%)	1 (2,1%)

*Alguns pacientes podem apresentar mais de uma condição associada. ** Um caso que apresentou exame positivo para *Pneumocystis jiroveci*, também apresentou exame positivo para Citomegalovírus no lavado broncoalveolar.

Como os indivíduos do grupo controle morreram em sua maioria de morte súbita, tivemos acesso apenas aos prontuários e exames laboratoriais dos pacientes com SDRA e seps. Os resultados dos exames laboratoriais dos pacientes de seps e SDRA estão apresentados na tabela 5.

Com relação aos parâmetros gasométricos, observamos que o grupo SDRA apresenta valores mais elevados de $p\text{CO}_2$ ($p=0,049$), HCO_3 ($p=0,005$) e excesso de base ($p=0,004$) e valores menores de $p50$ ($p=0,009$) em relação ao grupo seps. O grupo SDRA também apresenta níveis aumentados de proteína C reativa ($p=0,042$) e quantidade aumentada de metamielócitos ($p=0,028$) em relação ao grupo seps.

Por sua vez, o grupo seps apresenta maiores níveis de lactato sérico ($p=0,003$) e quantidade aumentada de mielócitos ($p=0,003$) e plaquetas ($p=0,028$). Os demais parâmetros dos exames laboratoriais não apresentaram diferença estatística.

Tabela 5 - Exames dos pacientes de sepse e SDRA

	Sepse		SDRA		Valor de p	Valores referenciais
	n	Mediana (IIQ)	n	Mediana (IIQ)		
Gasometria						
pH	19	7,08 (0,29)	47	7,15 (0,25)	0,172	7,35 a 7,45
pO ₂ (mmHg)	19	86,9 (46,1)	47	81 (38,1)	0,118	80 a 100
pCO ₂ (mmHg)	19	32,5 (14,3)	47	37,7 (25,1)	0,049	35 a 45
HCO ₃ (mmol/L)	19	10,5 (7,5)	47	15,05 (9,6)	0,005	21 a 28
Excesso de base (mmol/L)	19	-19,1 (8,7)	47	-12,5 (12,6)	0,004	-3 a +3
SO ₂ (%)	19	89,6 (10,5)	47	88,5 (14,8)	0,385	> 95
FO ₂ Hb (%)	17	89,4 (13,8)	32	86,1 (15,5)	0,323	95 a 99
FCO ₂ Hb (%)	17	1,4 (0,8)	32	0,9 (1)	0,135	0,5 a 2,5
FHHb (%)	17	9 (14)	32	11,5 (15)	0,248	1 a 5
FMetHb (%)	17	0,7 (0,4)	32	0,8 (0,6)	0,386	0,4 a 1,5
p50 (mmHg)	17	38 (10)	32	32 (8)	0,009	25 a 29
Lactato Sérico (mg/dL)	30	125 (120)	46	45,5 (82)	0,003	4,5 a 19,8*
Proteína C reativa (mg/L)	23	146 (175,9)	28	234,4 (212)	0,042	< 5,0
Hemograma						
Eritrócitos (milhões/mm ³)	24	2,9 (0,96)	44	2,9 (0,64)	0,505	4 a 5,4
Hemoglobina (g/dL)	25	8 (1,9)	44	8,6 (2,1)	0,685	12 a 16
Hematócrito (%)	25	26,4 (4,8)	44	26,8 (6,9)	0,631	35 a 47
Leucócitos (mil/mm ³)	25	18,78 (21,33)	45	11,1 (21,3)	0,106	4 a 11
Neutrófilos (mil/mm ³)	24	15,8 (21,7)	40	12,75 (19)	0,325	1,6 a 7
Segmentados (mil/mm ³)	18	18,15 (20)	28	15,6 (16,8)	0,323	1,3 a 7
Metamielócitos (mil/mm ³)	12	0,5 (1)	23	0,12 (0)	0,028	-
Mielócitos (mil/mm ³)	6	0,6 (0)	19	0 (0)	0,003	-
Promielócitos (mil/mm ³)	2	0,5	14	0 (0)	0,067	-
Linfócitos (mil/mm ³)	24	1,45 (3,4)	40	1,15 (1,1)	0,122	0,9 a 3,4
Plaquetas (mil/mm ³)	25	112 (120)	46	79 (123)	0,028	140 a 450

IIQ: Intervalo interquartil. * Valores referenciais para sangue venoso.

4.2 Características histológicas e avaliação do dano alveolar difuso

A Figura 2 mostra fotomicrografia representativas de lâminas coradas com H&E de cada grupo.

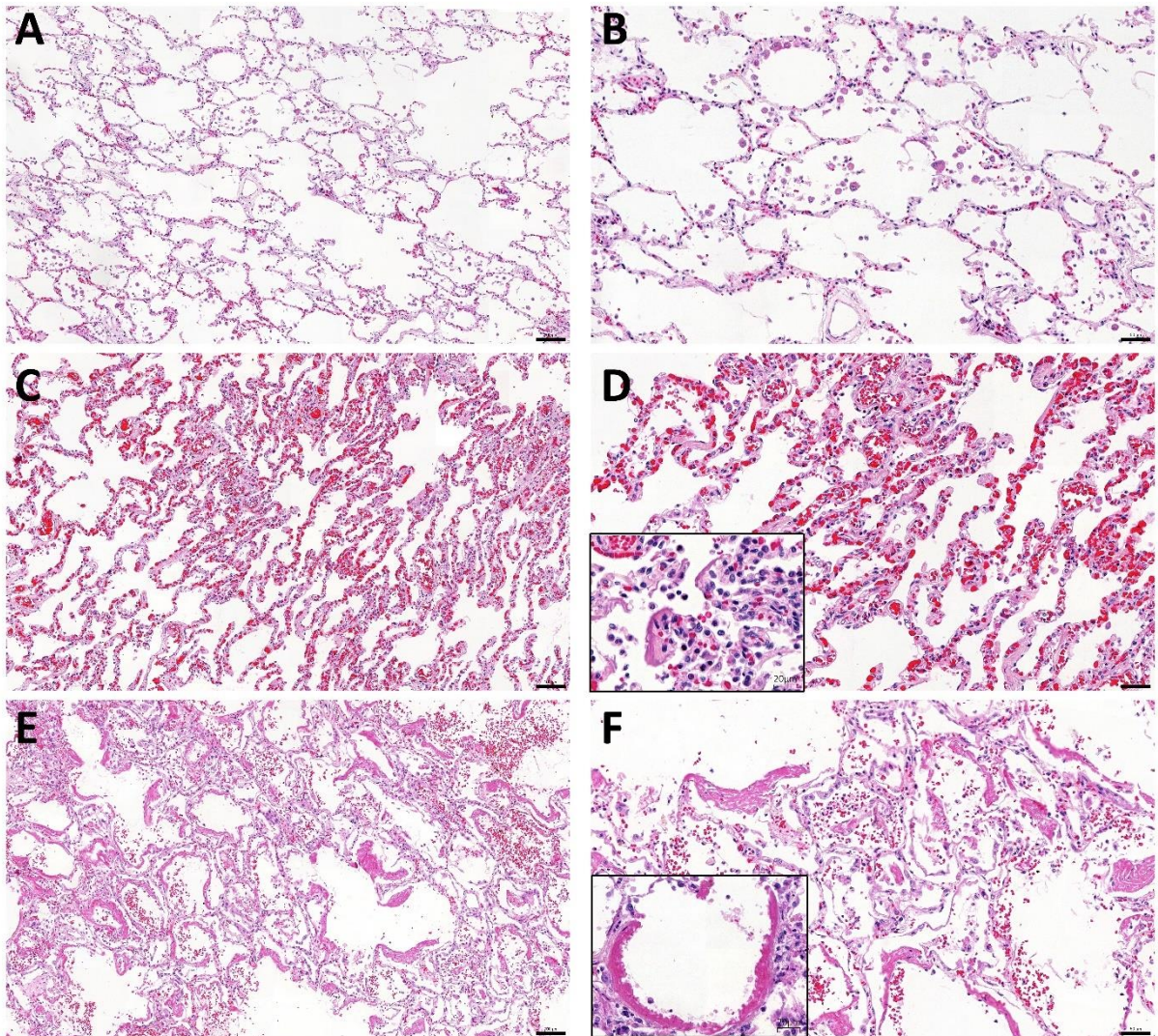


Figura 2. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar de controle, sepse e SDRA (coloração H&E). A (10x) e B (20x) - Grupo controle: Parênquima alveolar preservado. Como a maior parte desse grupo apresenta causas de morte relacionadas a problemas cardíacos, é possível observar uma presença moderada de macrófagos no tecido pulmonar. C (10x) e D (20x) – Grupo Sepse: Congestão intensa e infiltrado inflamatório leve. Em detalhe (40x), é mostrada uma área focal de formação de membrana hialina. E (10x) e F (20x) – Grupo SDRA: intensa formação de membrana hialina e leve hemorragia alveolar. Em detalhe (40x), formação de membrana hialina sobre membrana basal alveolar desnudada. Barra de escala 10x = 100um. Barra de escala 20x = 50um. Barra de escala 40x = 20um.

Como esperado, todas as características da lesão do tecido pulmonar avaliadas na análise histológica semi-quantitativa mostraram uma diferença estatística entre os grupos SDRA e sepse e o grupo controle. Esses resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Análise Histológica Semi-quantitativa.

	Controle (n=27)	Sepse (n=30)	SDRA			
			Todos casos (n=47)	Leve (n=8)	Moderado (n=14)	Severo (n=25)
Padrão Histológico (%), mediana (mínimo-máximo)						
Tecido Normal	100 (95-100)	10 (0-55) ^A	2,5 (0-50) ^A	10 (0-50)	0 (0-50) ^B	2,5 (0-40) ^B
DAD Exsudativa	0	57,5 (10-100) ^A	60 (28-100) ^A	55 (35-93)	60 (28-100)	60 (30-100)
DAD FP	0	0 (0-40) ^A	0 (0-45) ^A	2,5 (0-10)	2,5 (0-45)	0 (0-45)
Broncopneumonia	0 ^B	0 (0-20)	0 (0-48) ^B	0 (0-25)	0 (0-40)	0 (0-48)
Escores, mediana (mínimo-máximo)						
Espessamento Septal	0 (0-1)	1 (0-3) ^A	2 (1-3) ^{AB}	1 (0-3)	1,5 (1-2) ^B	2 (1-3) ^B
Edema	0	1,5 (1-3) ^A	2 (0-3) ^A	1 (1-3)	2 (0-3)	2 (1-3) ^B
Inflamação	0 (0-1)	1 (1-2) ^A	2 (1-3) ^{AB}	2 (1-2)	2 (1-3) ^B	2 (1-3) ^B
Membrana Hialina	0	1 (0-2) ^A	1 (1-3) ^{AB}	1 (1-3)	1 (1-3) ^B	2 (1-3) ^B
Hemorragia alveolar	0 (0-1)	1 (0-3) ^A	1 (0-3) ^{AB}	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)
Proliferação de pneumócitos tipo II	0	1 (0-2) ^A	1 (0-3) ^A	1,5 (0-3)	2 (1-3)	1 (1-3)
Padrão Inflamatório, n (%)						
Ausente	23 (85,5%)	0	0	0	0	0
Neutrófilico	0	5 (16,7%)	6 (12,8%)	1 (12,5%)	2 (14,3%)	3 (12%)
Linfomononuclear	4 (14,8%)	11 (36,7%)	11 (23,4%)	2 (25%)	3 (21,4%)	6 (24%)
Misto	0	14 (46,7%)	30 (63,8%)	5 (62,5%)	9 (64,3%)	16 (64%)

DAD: Dano alveolar difuso. FP: Fibroproliferativo. ^A p<0.05 comparado ao grupo controle. ^B p<0.05 comparado ao grupo sepse. Padrão inflamatório: $\chi^2 = 89.218$; p<0.0001.

Entre os grupos sepse e SDRA, a porcentagem de broncopneumonia foi mais elevada no grupo SDRA do que no grupo sepse (p=0,025). O grupo SDRA também apresentou escores mais altos para inflamação (p=0,015), membrana hialina (p=0,001), hemorragia (p=0,019) e espessamento septal (p=0,049) do que o grupo sepse.

Em relação ao padrão de inflamação, o grupo SDRA teve 12,8% dos casos com predominância neutrófilica, 23,4% dos casos com predominância linfomononuclear e 63,8%

dos casos com inflamação mista. O grupo sepse teve 16,7% dos casos com predominância neutrofílica, 36,7% dos casos com predominância linfomononuclear e 46,7% dos casos com inflamação mista. Os mapas perceptuais gerados a partir da análise de correspondência simples mostram visualmente as diferenças entre os escores histológicos dos grupos e os resíduos padronizados ajustados revelam as relações de dependências entre cada par de categorias (Figuras 3-9).

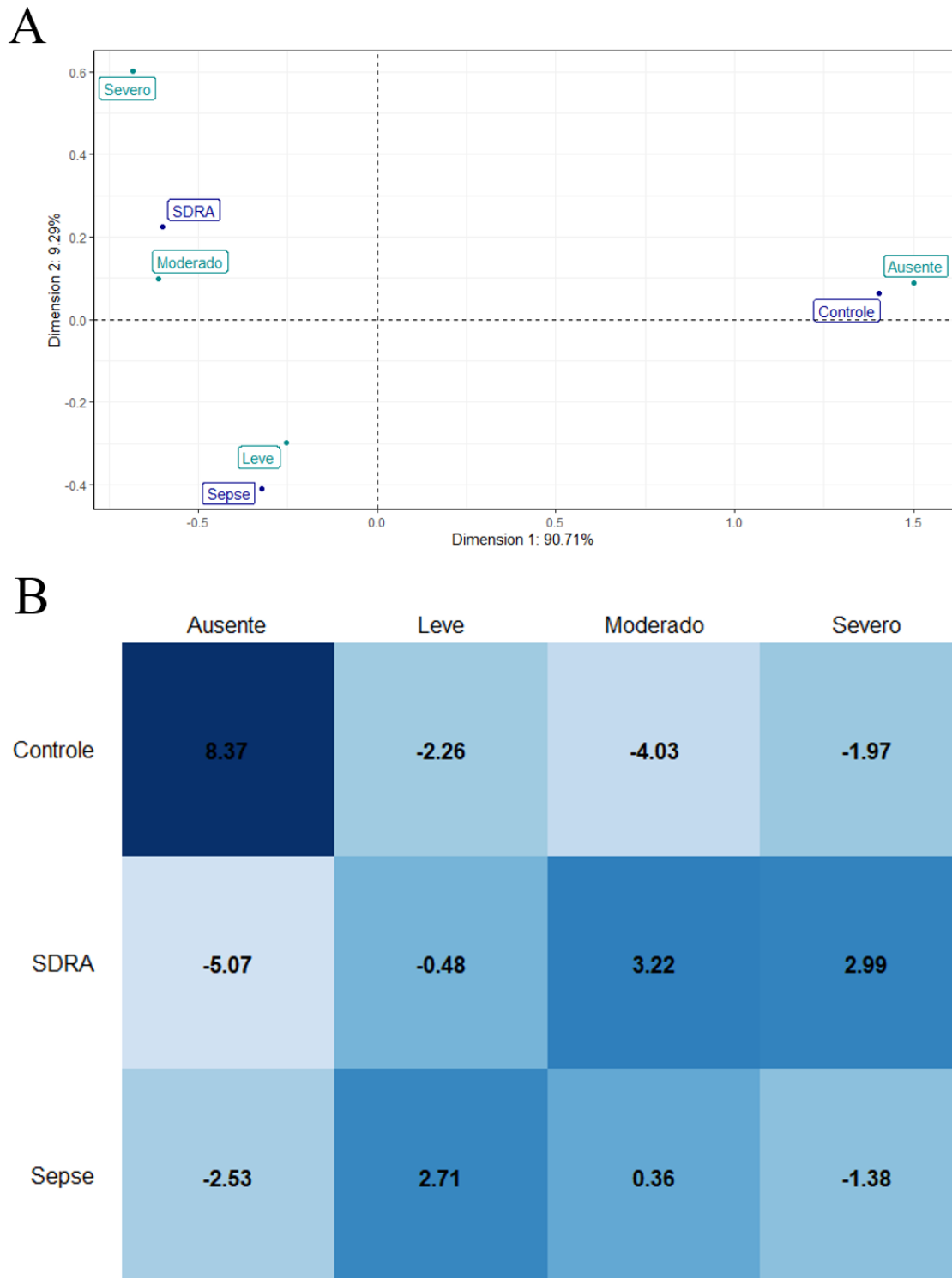


Figura 3. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de espessamento septal com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=80.634; $p < 0.0001$.

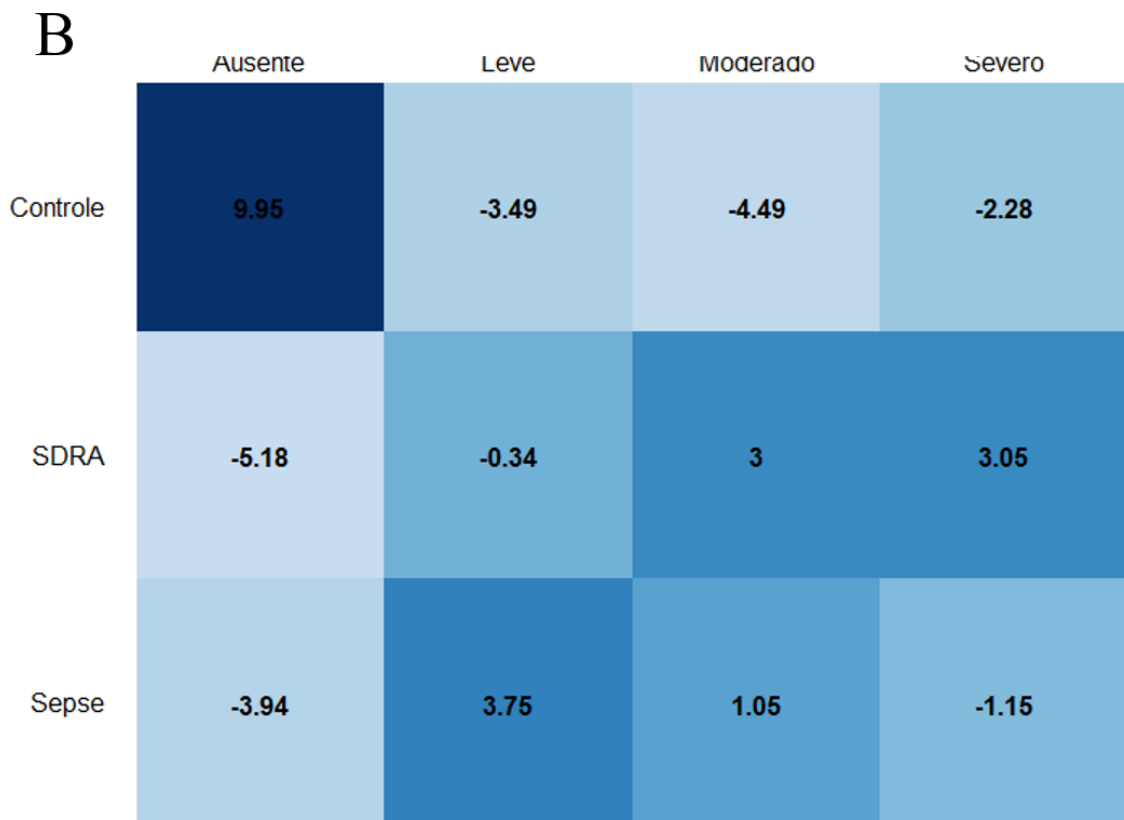
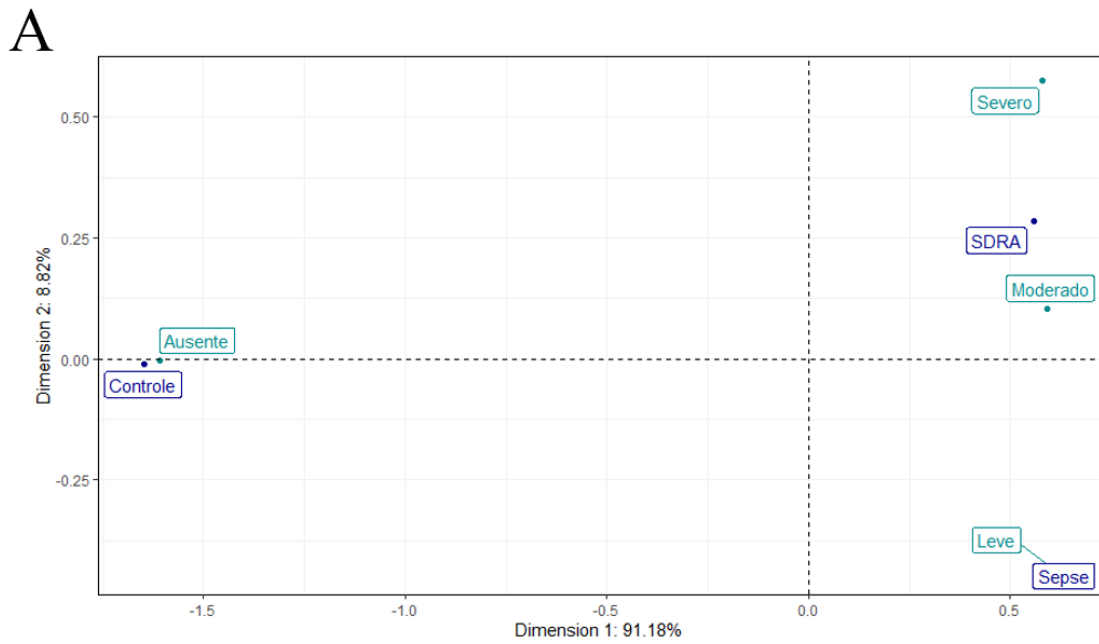


Figura 4. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de edema com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=108.607; $p < 0.0001$.

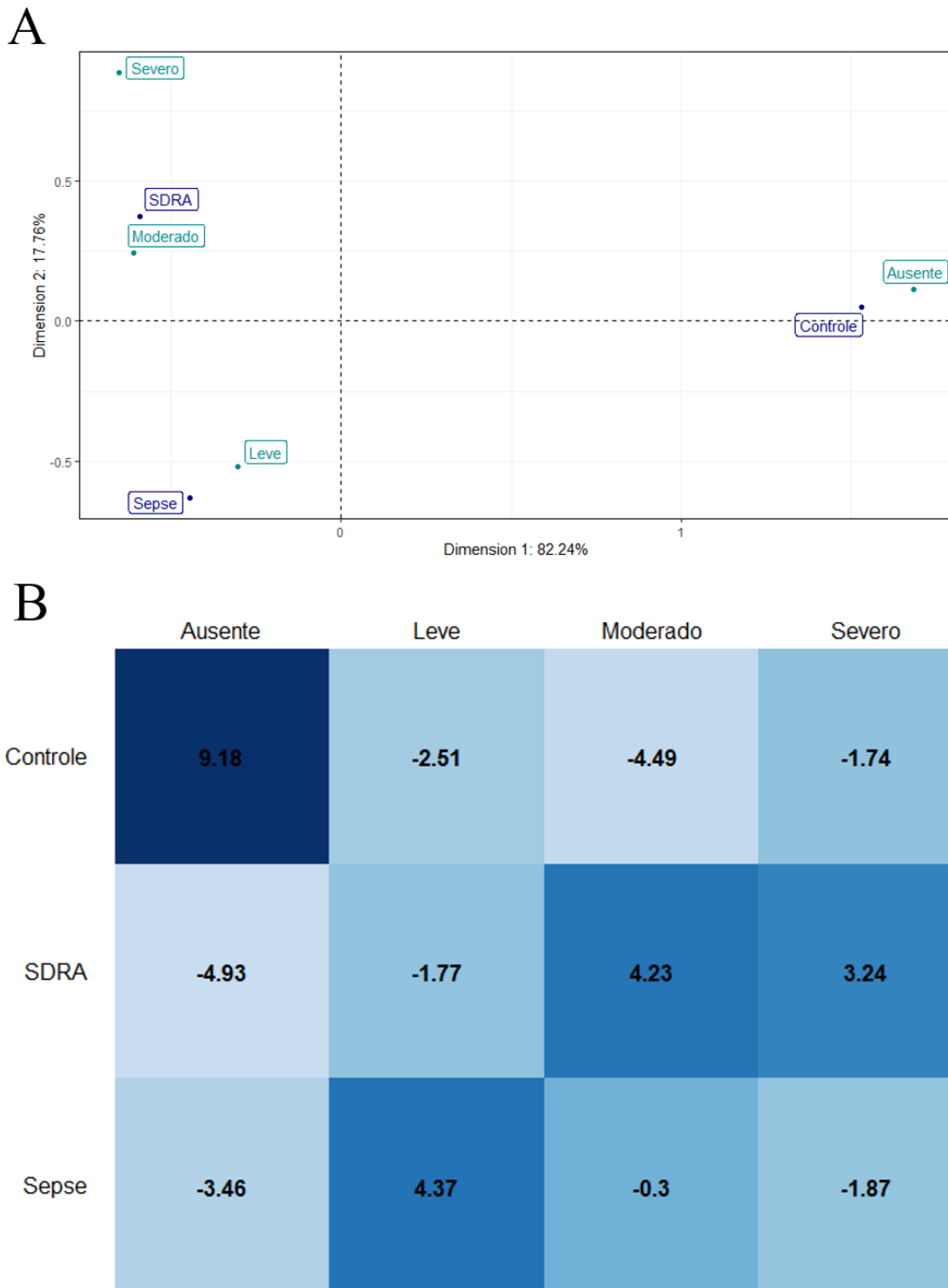


Figura 5. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de inflamação com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=104.343; $p < 0.0001$.

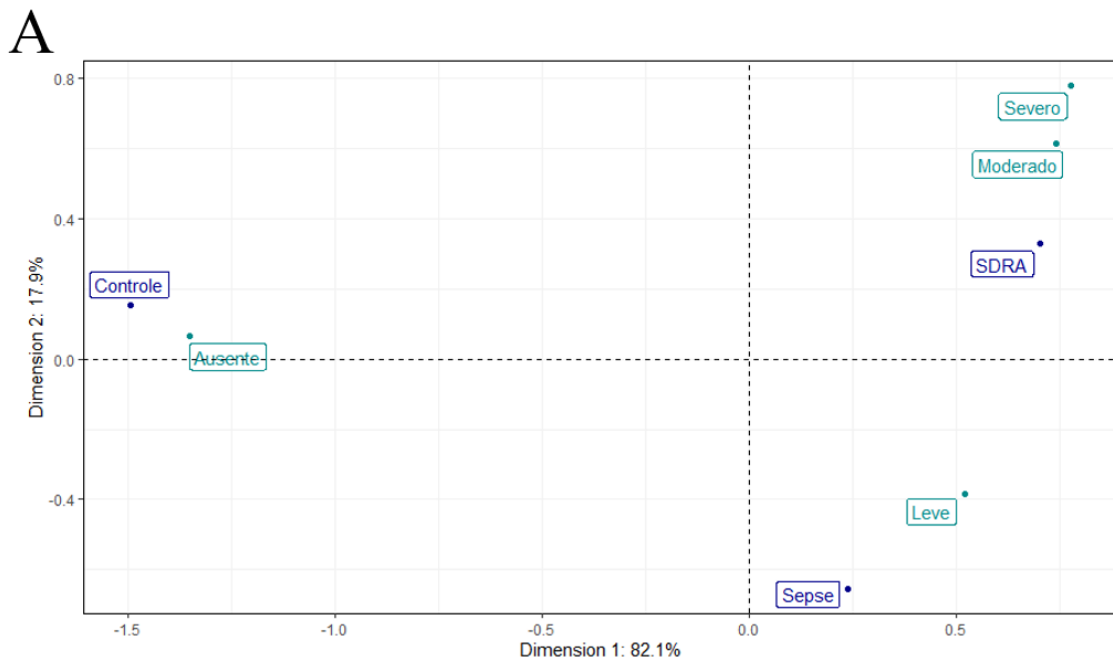


Figura 6. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de membrana hialina com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=103.698; $p < 0.0001$.

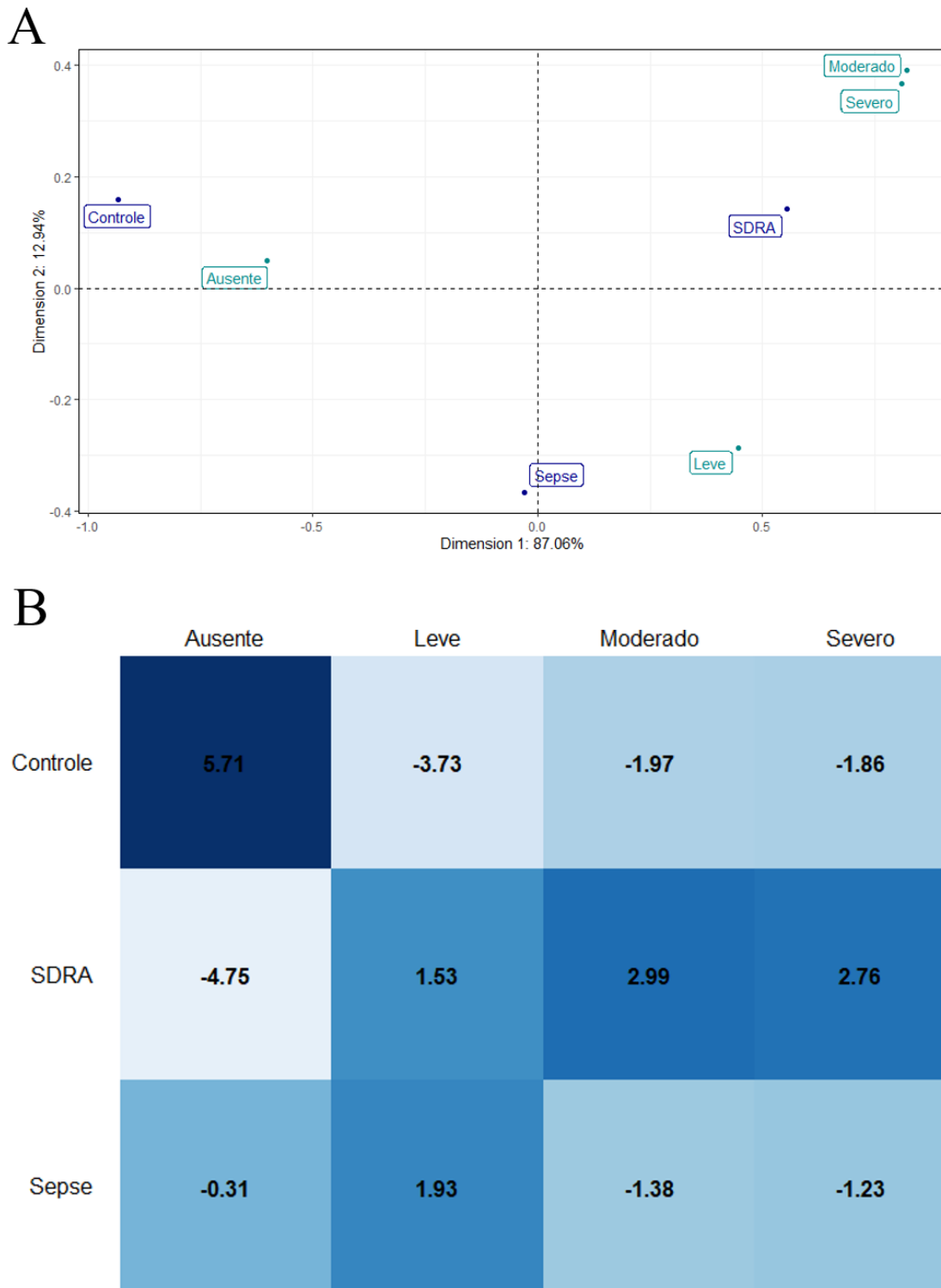


Figura 7. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de hemorragia alveolar com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=43.611; $p < 0.0001$.

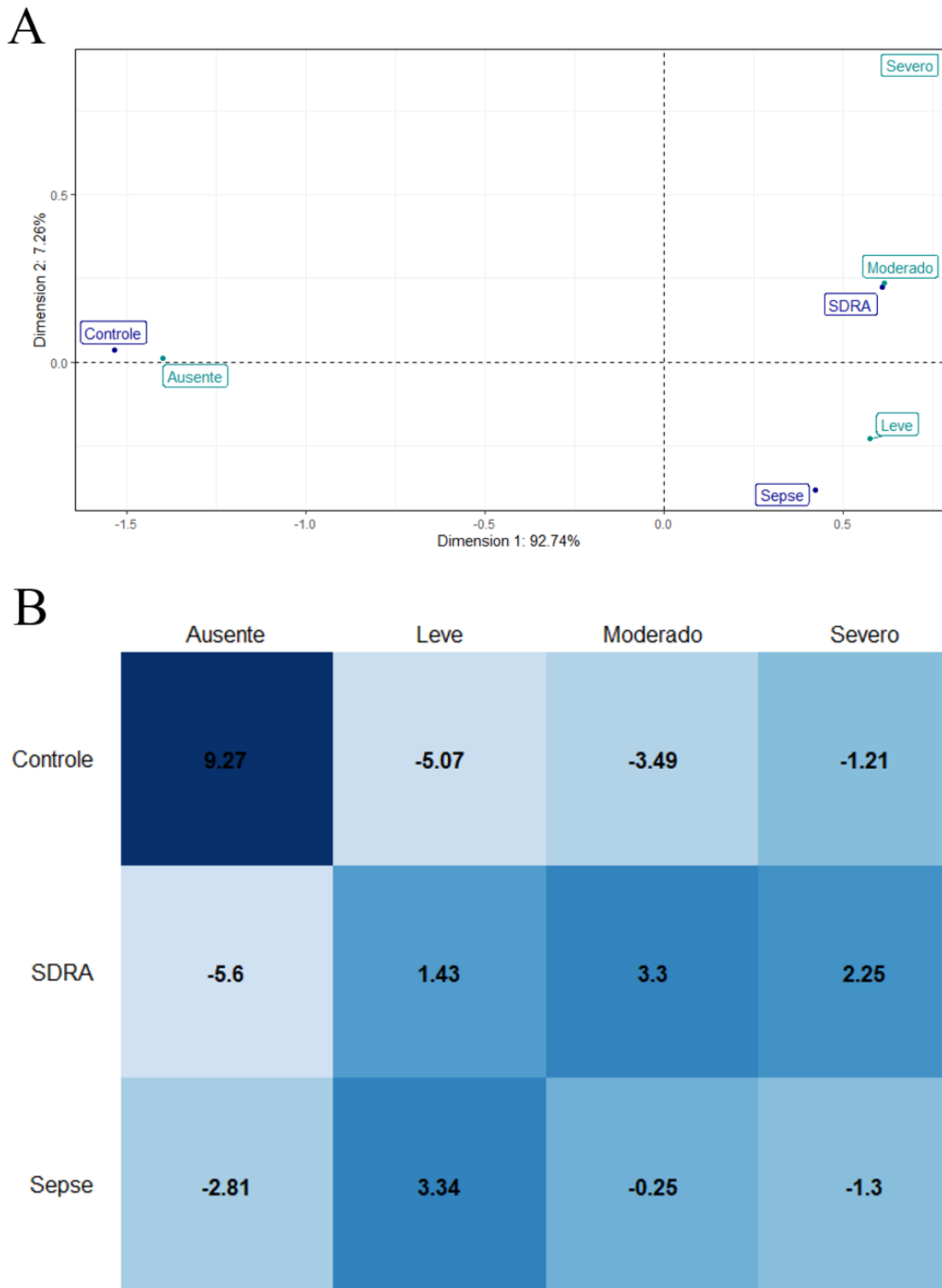


Figura 8. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do escore de proliferação de pneumócitos tipo II com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=93.237; $p < 0.0001$.

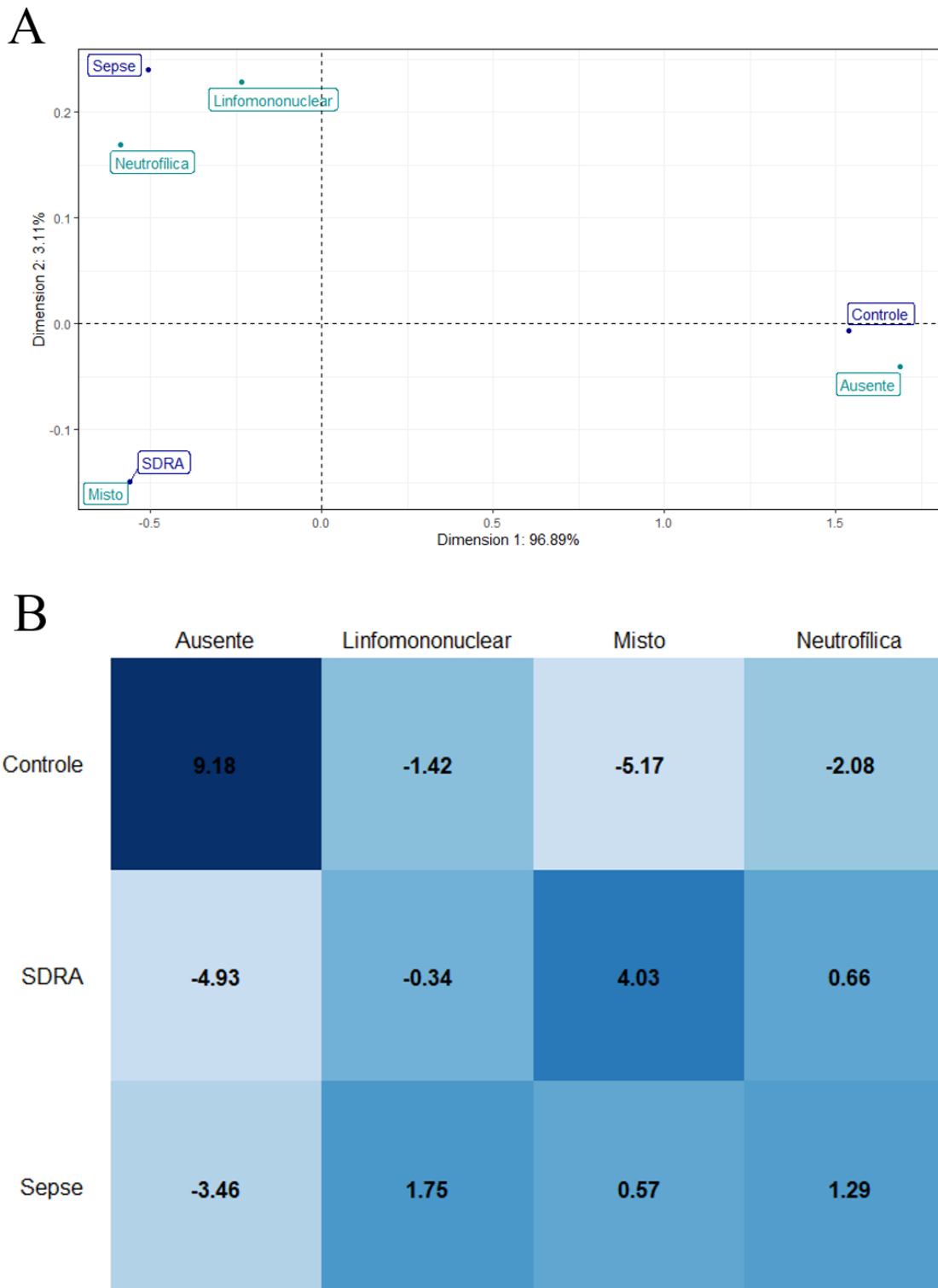


Figura 9. A – Mapa perceptual resultante da análise de correspondência simples demonstrando a relação da classificação do padrão inflamatório com os grupos. B – Mapa de calor dos resíduos padronizados ajustados do teste qui-quadrado. Qui-Quadrado=89.218; $p < 0.0001$.

Quando comparamos os subgrupos da SDRA de acordo com sua gravidade com o grupo de sepse, observamos que a porcentagem de tecido normal foi menor na SDRA moderada ($p=0,032$) e na SDRA grave ($p=0,045$) em comparação com o grupo sepse. Os escores de inflamação e de membrana hialina foram mais elevadas na SDRA moderada ($p=0,005$ e $p<0,0001$, respetivamente) e na SDRA grave ($p=0,017$ e $p=0,031$, respetivamente) do que no grupo da sepse. As pontuações de espessamento septal e edema também foram mais elevadas na SDRA grave em comparação com a sepse ($p=0,038$ e $p=0,006$, respetivamente). Estes resultados também são mostrados na tabela 6.

No grupo SDRA, a porcentagem de tecido normal foi negativamente correlacionada com neutrófilos ($r= -0,326$; $p=0,040$), metamielócitos ($r= -0,636$; $p=0,001$), mielócitos ($r= -0,825$; $p=0,001$), promielócitos ($r= -0,615$; $p=0,019$), pCO_2 ($r=-0,457$; $p=0,002$), HCO_3 ($r= -0,544$; $p<0,0001$) e excesso de base ($r= -0,483$; $p=0,001$). A porcentagem de DAD exsudativo foi positivamente correlacionada com FO_2Hb ($r=0,413$; $p=0,019$) e negativamente correlacionada com $FHHb$ ($r= -0,447$; $p=0,010$). A porcentagem de DAD fibroproliferativo foi positivamente correlacionada com pCO_2 ($r=0,324$; $p=0,032$), HCO_3 ($r=0,382$; $p=0,010$), excesso de bases ($r=0,346$; $p=0,021$) e $FHHb$ ($r=0,378$; $p=0,033$). Além disso, a porcentagem de DAD fibroproliferativo foi negativamente correlacionada com o escore SOFA ($r= -0,326$; $p=0,034$) e FO_2Hb ($r= -0,362$; $p=0,042$).

Ainda no grupo SDRA, o escore de espessamento septal foi positivamente correlacionado com a quantidade de leucócitos ($r=0,298$; $p=0,047$) e plaquetas ($r=0,330$; $p=0,025$), pCO_2 ($r=0,362$; $p=0,016$), HCO_3 ($r=0,428$; $p=0,004$), excesso de base ($r=0,383$; $p=0,010$) e FCO_2Hb ($r=0,403$; $r=0,022$). O escore de edema foi positivamente correlacionado com pCO_2 ($r=0,420$; $p=0,004$) e HCO_3 ($r=0,321$; $p=0,034$) e negativamente correlacionado com leucócitos ($r= -0,356$; $p=0,017$), plaquetas ($r= -0,310$; $p=0,036$) e relação PaO_2/FiO_2 ($r= -0,474$; $p=0,001$). O escore de inflamação foi positivamente correlacionado com a pCO_2 ($r=0,350$; $p=0,020$). O escore da hemorragia foi negativamente correlacionado com as plaquetas ($r=-0,346$; $p=0,018$) e positivamente correlacionado com o peso dos pulmões ($r=0,429$; $p=0,003$). O escore de membrana hialina foi negativamente correlacionado com a relação PaO_2/FiO_2 ($r= -0,394$; $p=0,006$) e positivamente correlacionado com pCO_2 ($r=0,347$; $p=0,021$), HCO_3 ($r=0,384$; $p=0,010$) e $FMetHb$ ($r=0,425$; $p=0,017$).

No grupo sepse, a porcentagem de tecido pulmonar normal foi negativamente correlacionada com os níveis de PCR ($r= -0,429$; $p=0,041$) e quantidade de linfócitos circulantes ($r= -0,463$, $p=0,023$) e positivamente correlacionada com a FCO_2Hb ($r=0,603$, $p=0,010$). A porcentagem de DAD exsudativo foi negativamente correlacionada com o pH do sangue arterial

($r = -0,512$; $p = 0,025$) e positivamente correlacionada com a quantidade de neutrófilos segmentados ($r = 0,545$; $p = 0,019$) e linfócitos ($r = 0,463$; $p = 0,023$). A percentagem de DAD fibroproliferativo foi negativamente correlacionada com o peso dos pulmões ($r = -0,468$; $p = 0,009$). A percentagem de pneumonia foi negativamente correlacionada com a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r = -0,628$; $p = 0,012$).

Quanto aos escores, no grupo sepse, o escore de edema foi positivamente correlacionado com a pO_2 ($r = 0,484$; $p = 0,036$) e o peso dos pulmões ($r = 0,434$; $p = 0,016$) e negativamente correlacionado com o excesso de base ($r = -0,482$; $p = 0,037$). O escore de hemorragia foi positivamente correlacionado com o peso dos pulmões ($r = 0,381$; $p = 0,038$) e negativamente correlacionado com a FCOHb ($r = -0,555$; $p = 0,021$). O escore de proliferação de pneumócitos do tipo II foi positivamente correlacionado com leucócitos ($r = 0,433$; $p = 0,031$), neutrófilos ($r = 0,586$; $p = 0,003$), neutrófilos segmentados ($r = 0,605$; $p = 0,008$), metamielócitos ($r = 0,614$; $p = 0,034$) e linfócitos ($r = 0,576$; $p = 0,003$).

4.3 Avaliação imunohistoquímica da Elafina

Em condições normais, a imunomarcação de elafina é quase negativa, com exceção de alguns macrófagos ligeiramente positivos (Figura 10A). O grupo com sepse apresenta coloração positiva leve, principalmente em células linfomononucleares (Figura 10B) e o grupo com SDRA apresenta coloração positiva intensa em células epiteliais e inflamatórias (Figura 10C).

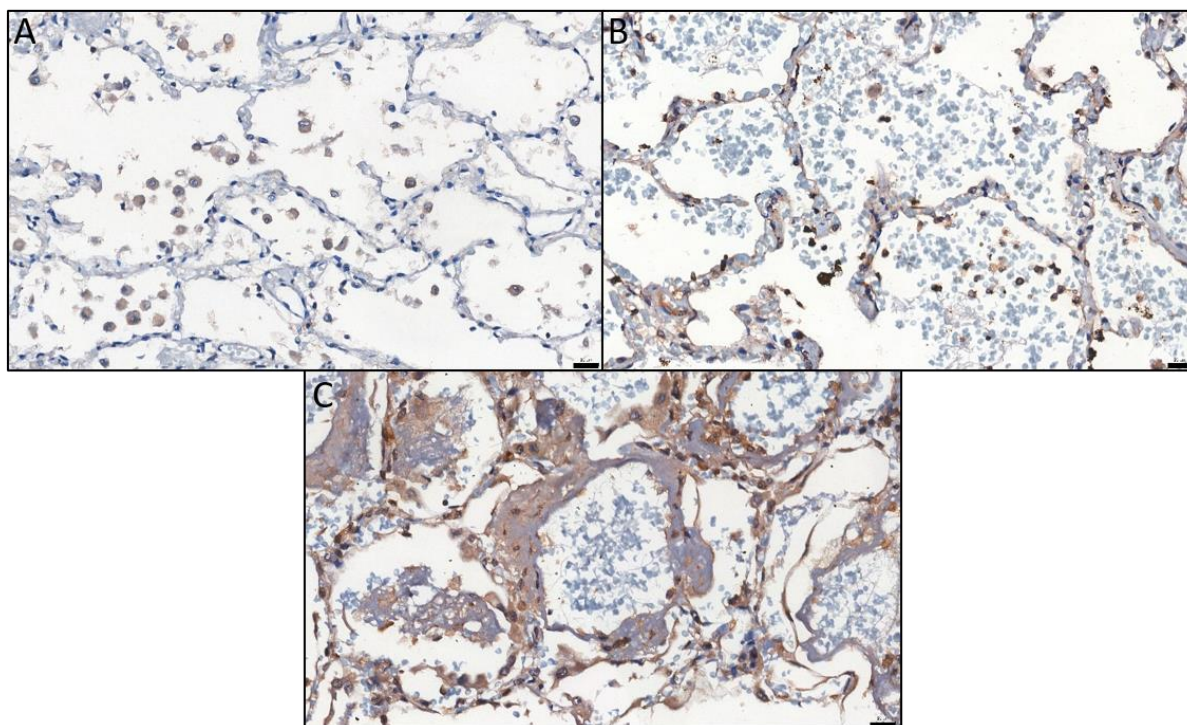


Figura 10. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar imunocorado com anticorpo anti- elafina. A – Grupo Controle. B – Grupo Sepses. C – Grupo SDRA. Escala = 20 μ m.

A expressão de elafina foi altamente heterogênea em cada caso. A elafina apresentou um CV médio de 93% no grupo controle, 85% no grupo de sepse e 87% no grupo de SDRA, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 11A).

A comparação entre os grupos controle, sepse e SDRA mostrou um aumento da expressão de elafina nos grupos SDRA ($p=0,045$) e sepse ($p=0,049$) em comparação com o grupo controle (Figura 11B). Quando dividimos o grupo SDRA de acordo com a sua gravidade e comparamos estes novos subgrupos com o grupo sepse observamos um aumento da expressão de elafina na SDRA grave em comparação com a SDRA leve ($p=0,042$) e com os casos de sepse ($p=0,049$) (Figura 11C). Além disso, observamos uma tendência ao aumento da elafina no grupo SDRA pulmonar em comparação ao grupo SDRA extrapulmonar ($p=0,05$) (Figura 11D).

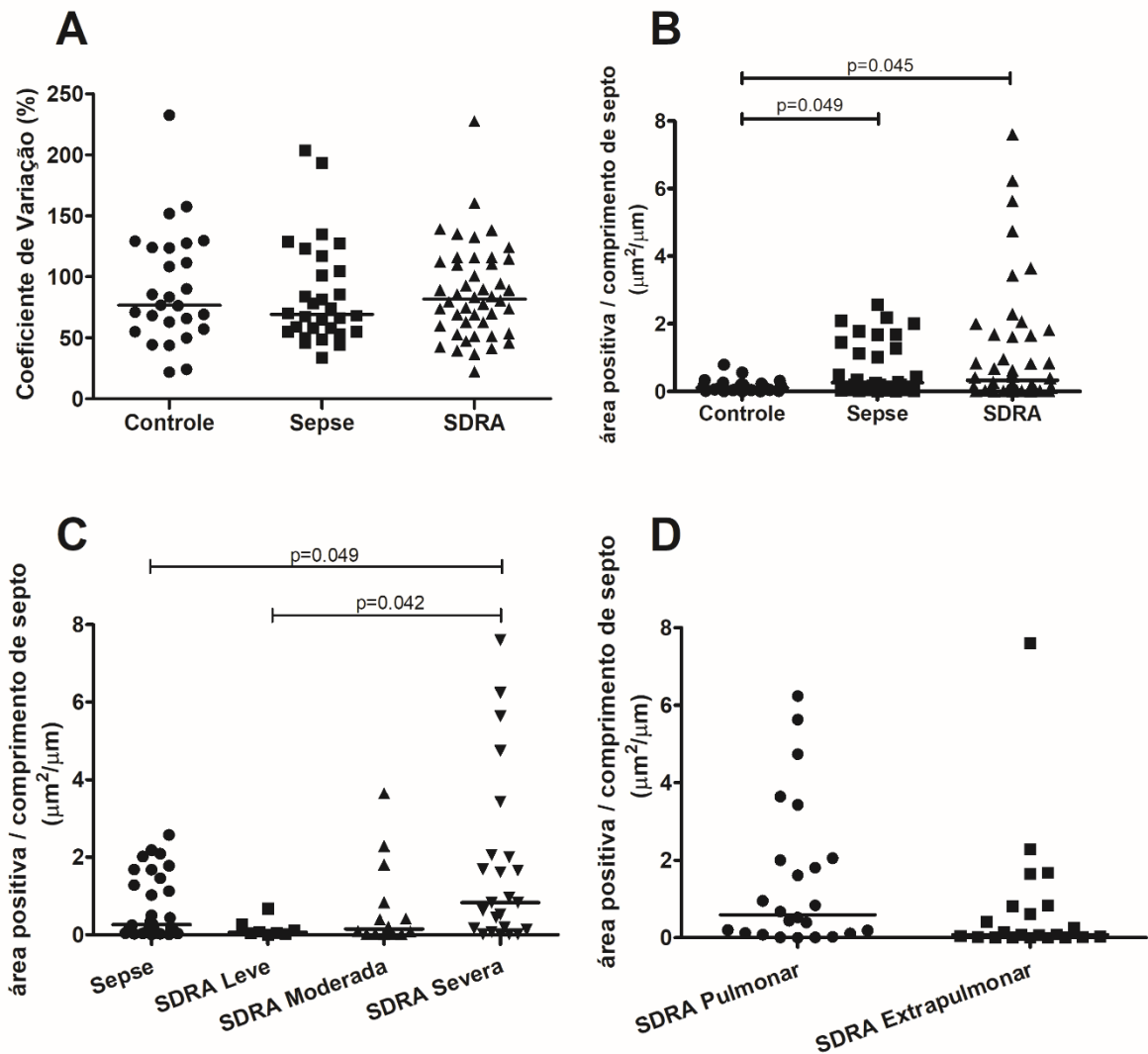


Figura 11. Representação gráfica da expressão proteica de elafina no tecido pulmonar. A - Coeficiente de variação da expressão proteica de elafina no tecido pulmonar. B - Comparação entre os grupos controle, sepse e SDRA. C - Comparação entre os grupos sepse, SDRA leve, SDRA moderada e SDRA severa. D - Comparação entre os grupos SDRA pulmonar e SDRA extrapulmonar.

No grupo SDRA, a expressão proteica de elafina mostrou correlação positiva com a percentagem de broncopneumonia ($r=0,320$; $p=0,03$), escore de membrana hialina ($r=0,342$; $p=0,02$) e metamielócitos ($r=0,557$; $p=0,006$) e mielócitos circulantes ($r=0,354$; $p=0,002$). Além disso, também apresentou correlação negativa com a percentagem de tecido pulmonar normal ($r= -0,295$; $p=0,046$) e escore de edema ($r= -0,298$; $p=0,044$). A quantidade de elafina também foi correlacionada com vários parâmetros gasométricos, tais como $p\text{O}_2$ ($r= -0,376$; $p=0,013$), $p\text{CO}_2$ ($r=0,607$; $p<0,0001$), HCO_3 ($r=0,509$; $p<0,0001$), SO_2 ($r= -0,344$; $p=0,024$),

FO₂Hb ($r = -0,398$; $p = 0,027$), FMetHb ($r = 0,402$; $p = 0,028$), FiO₂ ($r = 0,360$; $p = 0,014$) e relação PaO₂/FiO₂ ($r = -0,414$; $p = 0,004$).

No grupo sepse, a elafina foi positivamente correlacionada com a duração da internação na UTI ($r = 0,533$; $p = 0,015$).

4.4 Avaliação imunohistoquímica de RAGE

Em todos os grupos, RAGE se apresentou altamente expresso nos septos alveolares (Figura 12A-C). Além disso, as células inflamatórias apresentaram intensa coloração positiva para RAGE nos grupos sepse (Figura 12B) e SDRA (Figura 12C).

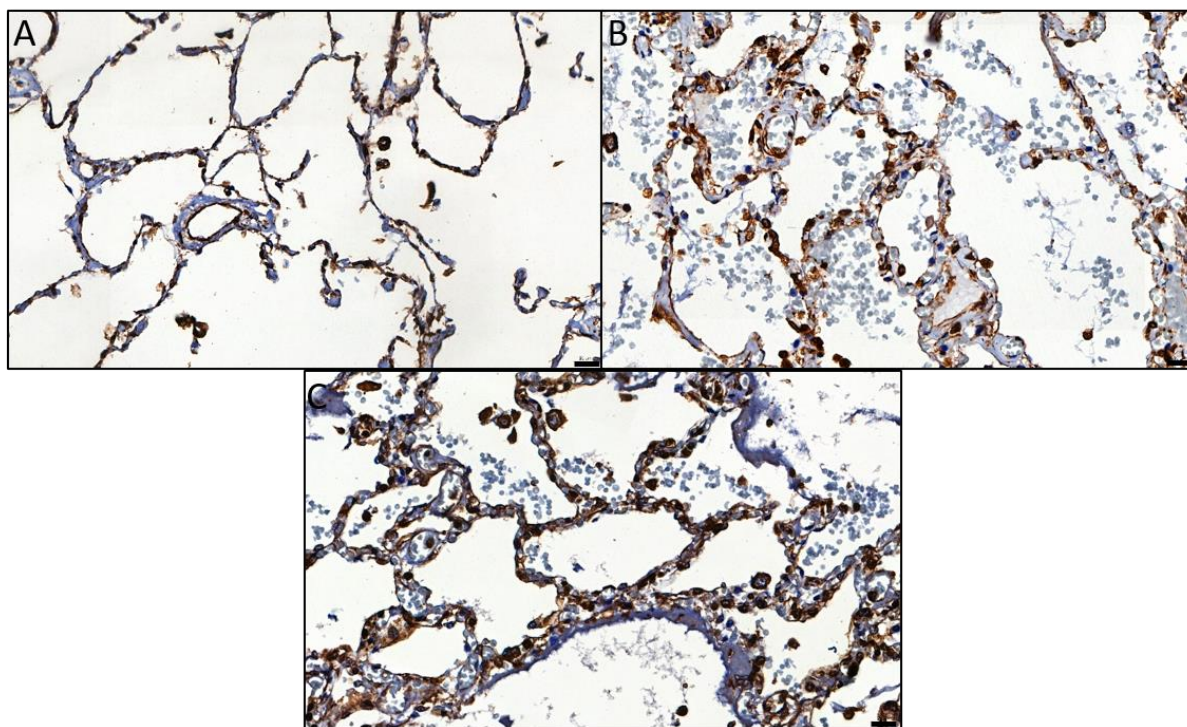


Figura 12. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar imunocorado com anticorpo anti- RAGE. A – Grupo Controle. B – Grupo Sepse. C – Grupo SDRA. Escala = 20μm.

A expressão de RAGE apresentou um CV médio de 32% no grupo controle, 36% no grupo sepse e 35% no grupo SDRA, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 13A).

Não observamos diferença estatística na expressão de RAGE entre os grupos controle, sepse e SDRA (Figura 13B). Entretanto, observamos um aumento da expressão de RAGE na SDRA grave em comparação com a SDRA leve ($p = 0,029$) (Figura 13C). Também não observamos diferença estatística entre a SDRA pulmonar e extrapulmonar (Figura 13D).

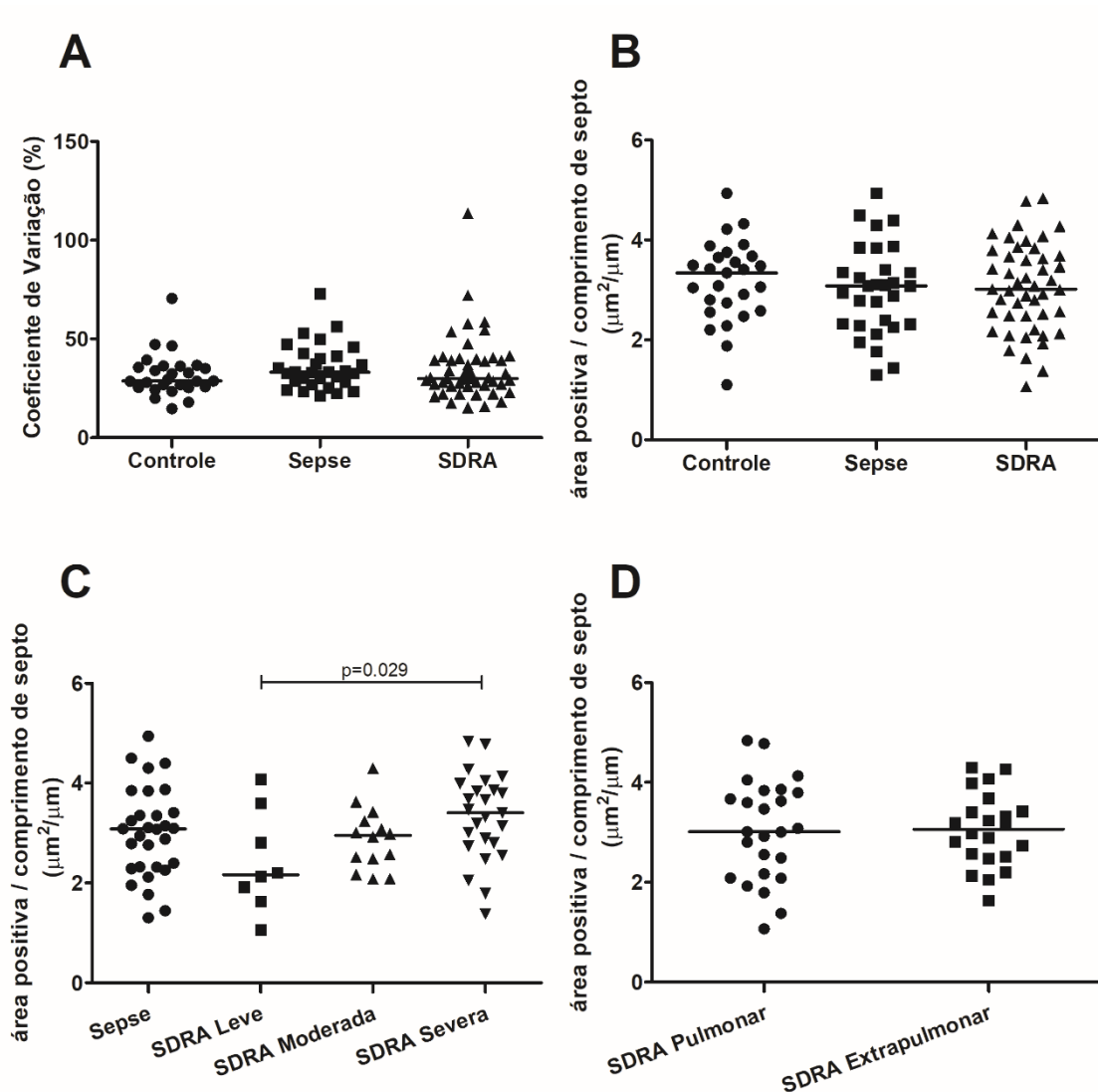


Figura 13. Representação gráfica da expressão proteica de RAGE no tecido pulmonar. A - Coeficiente de variação da expressão proteica de RAGE no tecido pulmonar. B - Comparação entre os grupos controle, sepse e SDRA. C - Comparação entre os grupos sepse, SDRA leve, SDRA moderada e SDRA severa. D - Comparação entre os grupos SDRA pulmonar e SDRA extrapulmonar.

No grupo SDRA, a expressão proteica de RAGE foi positivamente correlacionada com o escore de hemorragia ($r=0,318$; $p=0,029$), de membrana hialina ($r=0,318$; $p=0,029$) e FCO_2Hb ($r=0,395$; $p=0,025$). Além disso, foi negativamente correlacionada com a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($r=-0,298$; $p=0,045$) e com a duração da ventilação mecânica ($r=-0,354$; $p=0,015$).

No grupo sepse, a expressão de RAGE foi positivamente correlacionada com a proteína C reativa ($r=0,418$; $p=0,047$) e negativamente correlacionada com a duração da ventilação mecânica ($p= -0,422$; $p=0,014$) e a saturação de O_2 ($r= -0,835$; $p=0,003$).

4.5 Avaliação imunohistoquímica de SP-D

Todos os grupos mostram uma coloração positiva de SP-D dos pneumócitos do tipo II (Figura 14A-C). Os macrófagos apresentam uma coloração SP-D positiva leve pois podem fagocitar as proteínas do surfactante. A membrana hialina também é positivamente corada para SP-D no grupo SDRA (Figura 14C).

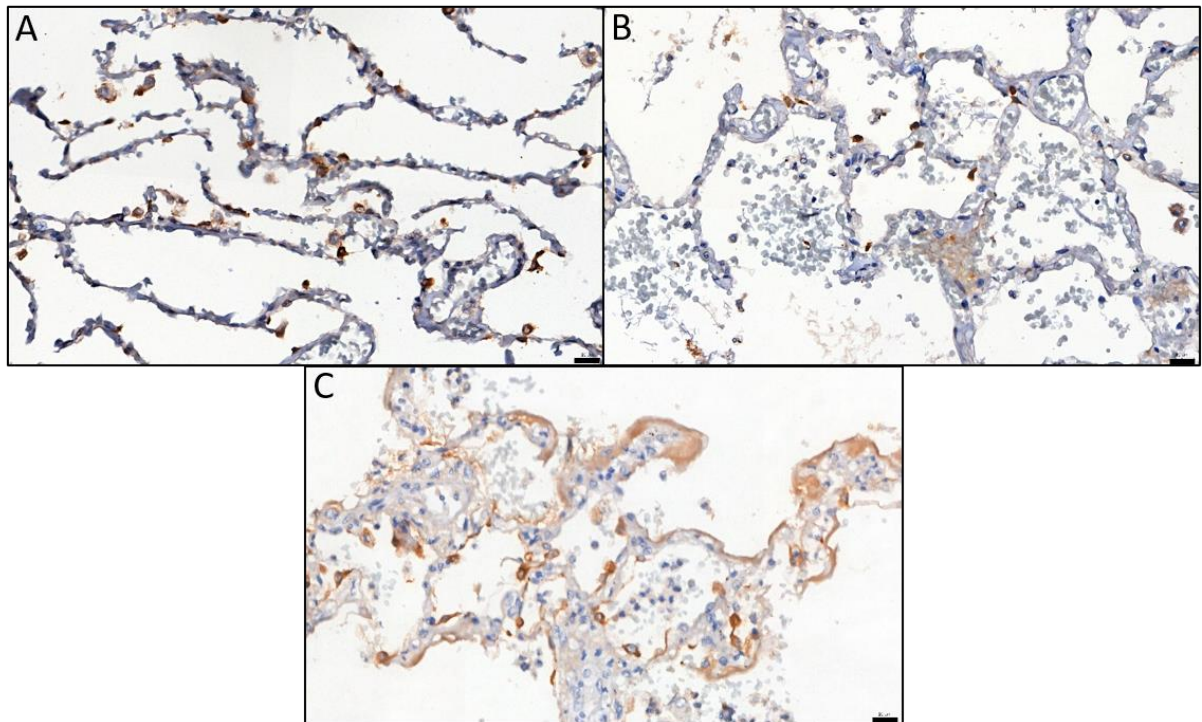


Figura 14. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar imunocorado com anticorpo anti- SP-D. A – Grupo Controle. B – Grupo Sepse. C – Grupo SDRA. Escala = 20 μ m.

O CV da expressão de SP-D foi o único que apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. O CV médio de SP-D do grupo controle (61%) foi significativamente inferior ao dos grupos sepse (87%; $p<0,0001$) e SDRA (92%; $p<0,0001$) (Figura 15A).

Além disso, observamos uma diminuição da expressão proteica de SP-D nos grupos SDRA ($p=0,003$) e sepse ($p=0,035$) em comparação com o grupo controle (Figura 15B). Quando comparamos os subgrupos da SDRA divididos de acordo com a sua gravidade com o grupo sepse, não observamos diferença estatística na expressão proteica de SP-D (Figura 15C).

Também não observamos diferença estatística na comparação entre os grupos SDRA pulmonar e extrapulmonar (Figura 15D).

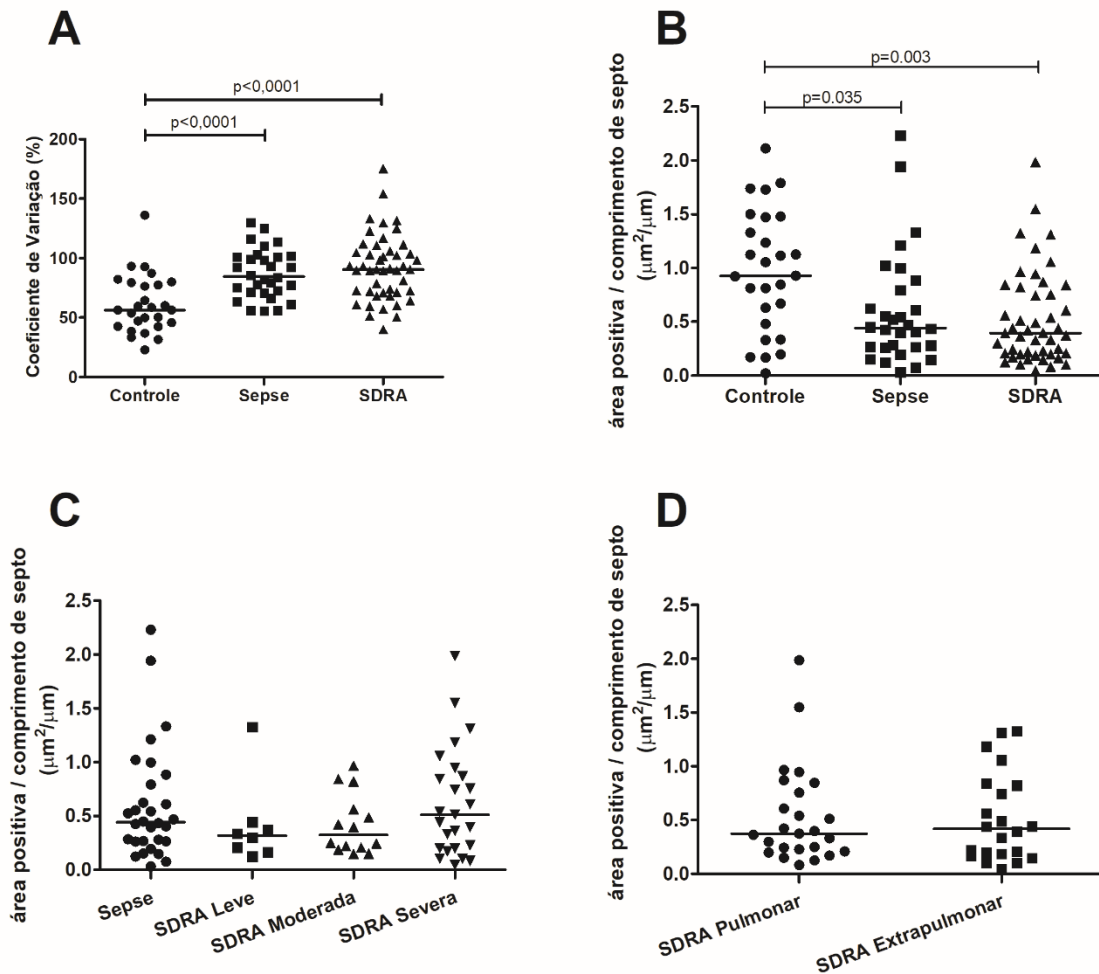


Figura 15. Representação gráfica da expressão proteica de SP-D no tecido pulmonar. A - Coeficiente de variação da expressão proteica de SP-D no tecido pulmonar. B - Comparação entre os grupos controle, sepse e SDRA. C - Comparação entre os grupos sepse, SDRA leve, SDRA moderada e SDRA severa. D - Comparação entre os grupos SDRA pulmonar e SDRA extrapulmonar.

No grupo SDRA, a expressão de SP-D foi negativamente correlacionada com eritrócitos ($r = -0,338$; $p = 0,025$), hemoglobina ($r = -0,375$; $p = 0,012$), hematócrito ($r = -0,324$; $p = 0,032$) e promielócitos ($r = -0,609$; $p = 0,021$).

No grupo sepse, a expressão da SP-D foi positivamente correlacionada com o lactato sérico ($r = 0,540$; $p = 0,008$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a expressão proteica de elafina, RAGE e SP-D no tecido pulmonar de pacientes com diagnóstico clínico de sepse/choque séptico, SDRA e pacientes controles. Nestes casos, observamos um aumento da expressão proteica da elafina nos grupos sepse e SDRA. O grupo SDRA severa apresentou maior expressão proteica de elafina no tecido pulmonar em comparação aos grupos SDRA leve e sepse. Além disso, observamos um aumento da expressão proteica de RAGE na SDRA grave em comparação com a SDRA leve e uma diminuição da expressão proteica de SP-D nos pacientes com sepse e com SDRA em comparação com os controles. Nos pacientes com SDRA, as expressões de elafina e RAGE no tecido pulmonar estão correlacionadas com vários parâmetros gasométricos arteriais, indicando uma correlação entre a gravidade da hipoxemia e a expressão destes marcadores. Além disso, correlacionam-se com a percentagem de broncopneumonia e o escore de membrana hialina. A expressão de SP-D não teve correlações com os parâmetros gasométricos ou com as variáveis histológicas. A expressão de RAGE foi negativamente correlacionada com a duração da VM tanto em pacientes com SDRA quanto em pacientes com sepse. Nos pacientes com sepse, os marcadores não se correlacionaram com os parâmetros gasométricos, exceto o RAGE que se correlaciona com a saturação de O₂. Além disso, no grupo sepse, a elafina foi positivamente correlacionada com o tempo de permanência na UTI, a SP-D foi positivamente correlacionada com o lactato sérico e o RAGE foi positivamente correlacionado com PCR.

O DAD pode ser induzido por uma cascata de eventos patológicos que culminam em danos nas barreiras alvéolo-capilares e na homeostase pulmonar. O DAD é uma reação pulmonar não específica a uma série de condições, que se podem sobrepor, como a sepse, a pneumonia intersticial, o trauma e a SDRA (Kaarteenaho e Kinnula, 2011). A lesão causada nas células epiteliais e endoteliais pode resultar na ruptura da barreira epitelial-capilar alveolar. Este dano aumenta a permeabilidade alvéolo-capilar, permitindo assim o extravasamento de proteínas séricas para os espaços aéreos, ao mesmo tempo que facilita o escape de proteínas do espaço alveolar para a corrente sanguínea (Matthay et al., 2019; Kuroki et al., 1998).

Todos os casos de sepse e SDRA incluídos neste estudo apresentaram pelo menos algum grau de DAD. No entanto, algumas das características do DAD foram mais intensas no grupo da SDRA, como o aumento do peso dos pulmões, dos escores de inflamação, de formação de membranas hialinas, de espessamento septal e de hemorragia alveolar. O DAD é considerado o correlato histopatológico da SDRA. O edema intersticial e alveolar, a destruição e a descamação das células epiteliais alveolares levam à formação de uma membrana hialina rica

em proteínas na membrana basal alveolar desnuda. Este processo pode ocorrer precocemente na SDRA (Matthay et al., 2019; Matthay e Zemans, 2011).

Foi observado que, na SDRA, a gravidade da lesão epitelial pulmonar é um importante fator determinante na sobrevivência do paciente (Ware e Matthay, 2001). O epitélio alveolar consiste em dois tipos distintos de pneumócitos. Os pneumócitos do tipo I cobrem a maior parte da área da superfície alveolar, cerca de 90-95%, enquanto os do tipo II compreendem aproximadamente 5%. Acredita-se que os pneumócitos de tipo II são as células progenitoras das células de tipo I após lesão celular (Wang e Hubmayr, 2011). Quando as células epiteliais alveolares são lesadas, perdem a integridade de sua barreira, o que diminui a sua capacidade de reabsorção eficiente de fluidos, exacerbando a formação de edema pulmonar. Por isso, a medição da reabsorção de fluidos alveolares prejudicada tem sido utilizada para identificar a lesão epitelial pulmonar (Ware e Matthay, 2001). Mais recentemente, a avaliação de marcadores específicos no plasma ou lavado broncoalveolar, como o SP-D e o RAGE, tem se mostrado útil para a avaliação da lesão epitelial pulmonar (Bos et al., 2022).

Não observamos uma diferença na expressão tecidual de RAGE entre os grupos controle, sepse e SDRA. RAGE é constitutivamente expresso em altos níveis nos pulmões, produzido principalmente por pneumócitos tipo I (Oczypok et al., 2017). O RAGE também é expresso por uma variedade de células imunes, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Oczypok et al., 2017). Mesmo com os danos evidentes das células epiteliais pulmonares no grupo SDRA, não observamos uma diminuição da expressão proteica de RAGE, mas uma modificação do perfil celular expressando a proteína, provavelmente devido à presença de numerosas células inflamatórias no tecido. A própria ativação de RAGE pode desencadear múltiplas vias de sinalização com importantes consequências inflamatórias, como a ativação de NF- κ B (González et al., 2013), participando do processo de recrutamento celular. De forma similar, Wittkowski et al. (2007) também não observaram uma diferença significativa na expressão da proteína RAGE em biópsias pulmonares de pacientes com SDRA e controles.

RAGE solúvel (sRAGE), a forma clivada do receptor, detectado no plasma ou no lavado broncoalveolar, pode ser libertado no pulmão devido a lesão epitelial e endotelial alveolar ou pode ocorrer como parte de uma resposta inflamatória pulmonar. Independentemente do estímulo inicial, a translocação de sRAGE para a circulação sistêmica pode ser reforçada pelo aumento da permeabilidade alvéolo-capilar (Griffiths e McAuley, 2008). Assim, propõe-se que os níveis de sRAGE sejam um biomarcador da lesão das células alveolares do tipo I e da reabsorção do fluido alveolar.

Briot et al. (2009) demonstraram que a taxa de reabsorção do fluido alveolar estava inversamente correlacionada com os níveis de sRAGE avaliados no fluido alveolar de pulmões humanos recusados para transplante. Mrozek et al. (2016) verificaram que a sRAGE plasmática estava associada a uma SDRA não-focal, que é sugestiva de edema inflamatório e de uma reabsorção deficiente do líquido alveolar. Além disso, os níveis plasmáticos de sRAGE foram correlacionados com a mortalidade por SDRA (Jabaudon et al., 2018) e com a gravidade da SDRA (Jabaudon et al., 2015), diminuindo ao longo do tempo, sugerindo a resolução da lesão epitelial alveolar (Jabaudon et al., 2011). Assim, também observamos uma correlação entre a gravidade da SDRA e a expressão proteica de RAGE no tecido, demonstrada pela correlação negativa entre a RAGE e a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e o aumento significativo no grupo com SDRA grave em comparação com a SDRA leve. Além disso, também observamos uma correlação negativa com a duração da VM nos grupos SDRA e sepse.

Existem relatos de aumento da expressão de RAGE em várias outras doenças inflamatórias (Oczypok et al., 2017), incluindo a sepse. Foi demonstrado que os níveis plasmáticos de sRAGE aumentam durante a progressão e a gravidade da sepse (Matsumoto et al., 2015) e que esses níveis são ainda mais altos em não sobreviventes (Bopp et al., 2008). Um estudo realizado por Ware et al. (2013) demonstrou que os níveis anormais de cinco marcadores plasmáticos (SP-D, RAGE, IL-8, IL-6 e CC-16) proporcionavam uma discriminação válida para o diagnóstico de SDRA em doentes com sepse grave.

Observamos que a SP-D está diminuída nos grupos com sepse e SDRA em comparação com o grupo controle. Da mesma forma, Cheng et al. (2003) observaram que os níveis de SP-D eram mais baixos nos doentes com SDRA com pior oxigenação e nos doentes que não sobreviveram. Logo após o início da SDRA, Greene et al. (1999) verificaram que a concentração de SP-D no LBA era significativamente menor nos pacientes que morreram e que estava correlacionada com a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$. O aumento do extravasamento do epitélio pulmonar durante a lesão pulmonar pode reduzir os níveis de proteínas do surfactante no LBA, com ou sem incremento na sua síntese (Sorensen et al., 2007). De acordo com a afirmação anterior, foi demonstrado que, no início do curso da SDRA, o aumento dos níveis plasmáticos de SP-D está associado a uma pior evolução clínica e que estes níveis são atenuados pela ventilação mecânica pulmonar protetora com volumes correntes mais baixos (Eisner et al., 2003). Além disso, Endo et al. (2002) demonstraram que os níveis plasmáticos de SP-D são quase 5 vezes mais elevados em pacientes com ARDS do que em pacientes com sepse.

Villar et al. (2021) mostraram que os pacientes com sepse com foco pulmonar apresentavam níveis plasmáticos mais elevados de RAGE e SP-D do que os da sepse com foco

extrapulmonar e Peukert et al. (2021) mostraram que a SDRA viral também apresentou níveis mais elevados de SP-D do que a SDRA bacteriana e SDRA extrapulmonar.

Nos pulmões, a elafina é produzida por células epiteliais e inflamatórias que inibem de forma potente a elastase derivada de neutrófilos, protegendo o tecido pulmonar dos efeitos nocivos das proteases (Shaw e Wiedow, 2011). Observamos um aumento da expressão proteica da elafina no grupo da sepse e da SDRA. No grupo SDRA, também observámos uma correlação negativa com a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ e uma expressão ainda mais elevada de elafina no grupo SDRA grave. Outros parâmetros gasométricos correlacionaram-se com a quantificação de elafina no tecido pulmonar, reforçando que quanto pior for a hipoxemia, mais elafina é produzida localmente no tecido pulmonar.

Sallenave et al. (1999) mostraram que as concentrações de elafina estavam aumentadas no lavado broncoalveolar de pacientes com SDRA, no entanto, não houve diferença significativa entre pacientes com SDRA e aqueles em risco de desenvolver a SDRA, mas sem critérios para a síndrome. Outros estudos observaram que os níveis de elafina estavam aumentados no soro de pacientes no início da SDRA (Kerrin et al., 2013), mas diminuía com a evolução clínica da SDRA (Wang et al., 2008; Wang et al., 2009; Kerrin et al. 2013). Além disso, Wang et al. (2017) mostraram que os níveis séricos de elafina eram ainda mais baixos em pacientes com SDRA não sobreviventes em comparação com pacientes sobreviventes. Em nosso estudo, não observamos nenhuma correlação entre a expressão da proteína elafina e variáveis que possam sugerir qualquer variação ao longo do curso temporal da SDRA. Notavelmente, Kerrin et al. (2013) demonstraram que a queda das concentrações de elafina no lavado broncoalveolar ao longo da SDRA foi resultado de degradação proteolítica, enquanto Wang et al. (2008) levantaram a hipótese de que o declínio da elafina no soro foi devido à sua ligação à matriz extracelular. Ambas as hipóteses sugerem que pode ser difícil avaliar com precisão os níveis de elafina no lavado broncoalveolar ou no plasma.

Segundo estudos conduzidos por Thille et al. (2013a) e Kao et al. (2015) aproximadamente 50% dos casos com critérios clínicos para a SDRA apresentam DAD na histologia pulmonar. O DAD parece ser mais frequente em casos mais graves de SDRA e pacientes com DAD apresentam maior mortalidade (Lorente et al., 2015; Thille et al., 2013a). Considerando que o DAD e a perda da integridade da barreira epitelial-capilar são fatores que favorecem a translocação de proteínas do pulmão para a corrente sanguínea, estes marcadores de lesão epitelial podem não ser bons preditivos para casos que possuem critérios clínicos para SDRA, mas não possuem DAD significativo. Entretanto, estes marcadores podem ser bons

discriminantes de uma subpopulação de pacientes com diagnóstico histológico mais uniforme e que tem pior prognóstico.

O nosso estudo tem algumas limitações devido à dificuldade de abordar a natureza multifatorial da SDRA e as múltiplas condições que se podem sobrepor em pacientes críticos. Os nossos casos controles não foram pareados em termos de sexo, idade ou duração da ventilação mecânica. Além disso, o número limitado de indivíduos não nos permite abordar todos os possíveis fatores de confusão. Uma vez que se trata de um estudo retrospectivo e só havia tecido disponível para análise, não foi possível avaliar de que forma a lesão pulmonar refletiria nas concentrações de elafina, RAGE e SP-D no lavado broncoalveolar ou plasma o que permitiria melhor avaliação a respeito das diferenças e conexões entre estes compartimentos. Apesar destas limitações, os nossos resultados contribuem para o conjunto de conhecimentos existentes sobre a SDRA e sobre o perfil de expressão tecidual destes marcadores.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, a análise da expressão tecidual de elafina, RAGE e SP-D não discrimina pacientes com sepse de pacientes com SDRA, porém a expressão de elafina e RAGE, mas não de SP-D, está correlacionada com a gravidade da SDRA.

REFERÊNCIAS

ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012; 307(23): 2526-33.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967; 2: 319-23.

Auriemma CL, Zhuo H, Delucchi K, Deiss T, Liu T, Jauregui A, Ke S, Vessel K, Lippi M, Seeley E, Kangelaris KN, Gomez A, Hendrickson C, Liu KD, Matthay MA, Ware LB, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome-attributable mortality in critically ill patients with sepsis. *Intensive Care Med*. 2020; 46(6): 1222-31.

Baranger K, Zani ML, Chandenier J, Dallet-Choisy S, Moreau T. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J*. 2008; 275(9): 2008-20.

Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, van Haren F, Larsson A, McAuley DF, Ranieri M, Rubenfeld G, Thompson BT, Wrigge H, Slutsky AS, Pesenti A; LUNG SAFE Investigators; ESICM Trials Group. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*. 2016; 315(8): 788-800.

Bellemare A, Vernoux N, Morisset D, Bourbonnais Y. Human pre-elafin inhibits a *Pseudomonas aeruginosa*-secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(2): 483-90.

Bopp C, Hofer S, Weitz J, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Büchler MW, Weigand MA. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res*. 2008; 147(1): 79-83.

Bos LDJ, Laffey JG, Ware LB, Heijnen NFL, Sinha P, Patel B, Jabaudon M, Bastarache JA, McAuley DF, Summers C, Calfee CS, Shankar-Hari M. Towards a biological definition of ARDS: are treatable traits the solution? *Intensive Care Med Exp*. 2022; 10(1): 8.

Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet*. 2022; 400(10358): 1145-56.

Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A, Migheli A, Stern D. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*. 1993; 143(6): 1699-712.

Briot R, Frank JA, Uchida T, Lee JW, Calfee CS, Matthay MA. Elevated levels of the receptor for advanced glycation end products, a marker of alveolar epithelial type I cell injury, predict impaired alveolar fluid clearance in isolated perfused human lungs. *Chest*. 2009; 135(2): 269-75.

Brown SM, Grissom CK, Moss M, Rice TW, Schoenfeld D, Hou PC, Thompson BT, Brower RG; NIH/NHLBI PETAL Network Collaborators. Nonlinear Imputation of Pao₂/Fio₂ From Spo₂/Fio₂ Among Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *Chest*. 2016; 150(2): 307-13.

Buckley ST, Ehrhardt C. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 917108.

Butler MW, Robertson I, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Elafin prevents lipopolysaccharide-induced AP-1 and NF-kappaB activation via an effect on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2006; 281(46): 34730-5.

Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Thompson BT, Ware LB, Matthay MA; NHLBI ARDS Network. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2014; 2(8): 611-20.

Calfee CS, Janz DR, Bernard GR, May AK, Kangelaris KN, Matthay MA, Ware LB. Distinct molecular phenotypes of direct vs indirect ARDS in single-center and multicenter studies. *Chest*. 2015; 147(6): 1539-48.

Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Ballén-Barragán A, Matute-Bello G. Acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage. New insights on a complex relationship. *Ann Am Thorac Soc*. 2017; 14(6): 844-50.

Carreto-Binaghi LE, Aliouat el M, Taylor ML. Surfactant proteins, SP-A and SP-D, in respiratory fungal infections: their role in the inflammatory response. *Respir Res.* 2016; 17(1): 66.

Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med.* 2003; 198(10): 1507-15.

Cheng IW, Ware LB, Greene KE, Nuckton TJ, Eisner MD, Matthay MA. Prognostic value of surfactant proteins A and D in patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003; 31: 20–7.

Constantin JM, Grasso S, Chanques G, Aufort S, Futier E, Sebbane M, Jung B, Gallix B, Bazin JE, Rouby JJ, Jaber S. Lung morphology predicts response to recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2010; 38(4): 1108-17.

Crouser ED, Fahy RJ. Lesão pulmonar aguda, edema pulmonar e insuficiência múltipla de órgãos. In: Wilkins RL, Stoller JK, Kacmarek RM. *Fundamentos da terapia respiratória de Egan.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 571-81.

Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res.* 2006; 323(3): 475-88.

Deraison C, Bonnard C, Langella P, Roget K, Vergnolle N. Elafin and its precursor trappin-2: What is their therapeutic potential for intestinal diseases? *Br J Pharmacol.* 2023; 180(2): 144-60.

Dong H, Zhang Y, Huang Y, Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2022; 13: 931473.

Drannik AG, Nag K, Sallenave JM, Rosenthal KL. Antiviral activity of trappin-2 and elafin in vitro and in vivo against genital herpes. *J Virol.* 2013; 87(13): 7526-38.

Dushianthan A, Grocott MPW, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J.* 2011; 87: 612-22.

Eisner MD, Parsons P, Matthay MA, Ware L, Greene K. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax*. 2003; 58(11): 983-8.

Endo S, Sato N, Nakae H, Yamada Y, Makabe H, Abe H, Imai S, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. Surfactant protein A and D (SP-A, SP-D) levels in patients with septic ARDS. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2002; 111 (5-6): 245-51.

Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Shearman MS, Schuh D, Müller M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998; 44(7): 1147-57.

Gajic O, Yilmaz M, Iscimen R, Kor DJ, Winters JL, Moore SB, Afessa B. Transfusion from male-only versus female donors in critically ill recipients of high plasma volume components. *Crit Care Med*. 2007; 35(7): 1645-8.

Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*. 2003; 115(1): 13-23.

González I, Romero J, Rodríguez BL, Pérez-Castro R, Rojas A. The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges. *Immunobiology* 2013; 218(5): 790-97.

Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160(6): 1843-50.

Grieco DL, De Pascale G, Antonelli M. Lung Recruitability and Positive End-Expiratory Pressure Setting in ARDS Caused by COVID-19. *Chest*. 2022; 161(4): 869-71.

Griffiths MJ, McAuley DF. RAGE: a biomarker for acute lung injury. *Thorax*. 2008; 63(12): 1034-36.

Guérin C, Reignier J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, Mercier E, Badet M, Mercat A, Baudin O, Clavel M, Chatellier D, Jaber S, Rosselli S, Mancebo J, Sirodot M, Hilbert G,

Bengler C, Richecoeur J, Gainnier M, Bayle F, Bourdin G, Leray V, Girard R, Baboi L, Ayzac L; PROSEVA Study Group. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2013; 368(23): 2159-68.

Guo CJ, Atochina-Vasserman EN, Abramova E, Smith LC, Beers MF, Gow AJ. Surfactant protein-D modulation of pulmonary macrophage phenotype is controlled by S-nitrosylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019; 317(5): L539-L549.

Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem*. 2008; 283(47): 32377-85.

Guyot N, Zani ML, Berger P, Dallet-Choisy S, Moreau T. Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin. *Biol Chem*. 2005; 386(4): 391-9.

Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc*. 2015; 12 (5): 765-74.

Heijnen NFL, Hagens LA, Smit MR, Schultz MJ, van der Poll T, Schnabel RM, van der Horst ICC, Dickson RP, Bergmans DCJJ, Bos LDJ; BASIC consortium. Biological subphenotypes of acute respiratory distress syndrome may not reflect differences in alveolar inflammation. *Physiol Rep*. 2021; 9(3): e14693.

Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, Wang J, Haslett C, Riemersma RA, Webb DJ, Kotelevtsev YV, Sallenave JM. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli. *J Immunol*. 2004; 172(7): 4535-44.

Henriksen PA. The potential of neutrophil elastase inhibitors as anti-inflammatory therapies. *Curr Opin Hematol*. 2014; 21(1): 23-8.

Iqbal SM, Ball TB, Levinson P, Maranan L, Jaoko W, Wachihi C, Pak BJ, Podust VN, Broliden K, Hirbod T, Kaul R, Plummer FA. Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS*. 2009; 23(13): 1669-77.

Jabaudon M, Blondonnet R, Pereira B, Cartin-Ceba R, Lichtenstern C, Mauri T, Determann RM, Drabek T, Hubmayr RD, Gajic O, Uhle F, Coppadoro A, Pesenti A, Schultz MJ, Ranieri MV, Brodska H, Mrozek S, Sapin V, Matthay MA, Constantin JM, Calfee CS. Plasma sRAGE is independently associated with increased mortality in ARDS: a meta-analysis of individual patient data. *Intensive Care Med.* 2018; 44(9): 1388-99.

Jabaudon M, Blondonnet R, Roszyk L, Pereira B, Guérin R, Perbet S, Cayot S, Bouvier D, Blanchon L, Sapin V, Constantin JM. Soluble Forms and Ligands of the Receptor for Advanced Glycation End-Products in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: An Observational Prospective Study. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0135857.

Jabaudon M, Futier E, Roszyk L, Chalus E, Guerin R, Petit A, Mrozek S, Perbet S, Cayot-Constantin S, Chartier C, Sapin V, Bazin JE, Constantin JM. Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2011; 39(3): 480-8.

Kaarteenaho R, Kinnula VL. Diffuse alveolar damage: a common phenomenon in progressive interstitial lung disorders. *Pulm Med.* 2011; 2011: 531302.

Kao KC, Hu HC, Chang CH, Hung CY, Chiu LC, Li SH, Lin SW, Chuang LP, Wang CW, Li LF, Chen NH, Yang CT, Huang CC, Tsai YH. Diffuse alveolar damage associated mortality in selected acute respiratory distress syndrome patients with open lung biopsy. *Crit Care.* 2015; 19(1): 228.

Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H, Yamashita K. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238(2): 512-6.

Kerrin A, Weldon S, Chung AHK, Craig T, Simpson AJ, O’Kane CM, McAuley DF, Taggart CC. Proteolytic cleavage of elafin by 20S proteasome may contribute to inflammation in acute lung injury. *Thorax.* 2013; 68: 315–21.

Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol.* 2006; 43(9): 1293-315.

Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408(2-3): 334-45.

Kuzovlev AN. Surfactant Proteins A and D – New Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Acute Respiratory Distress Syndrome in Septic Patients. *J Pulm Respir Med*. 2013; S:12.

Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(6): 993-1007.

Leth-Larsen R, Floridon C, Nielsen O, Holmskov U. Surfactant protein D in the female genital tract. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10(3): 149-54.

Lin Z, deMello D, Phelps DS, Koltun WA, Page M, Floros J. Both human SP-A1 and Sp-A2 genes are expressed in small and large intestine. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2001; 20(5): 367-86.

Lorente JA, Cardinal-Fernández P, Muñoz D, Frutos-Vivar F, Thille AW, Jaramillo C, Ballén-Barragán A, Rodríguez JM, Peñuelas O, Ortiz G, Blanco J, Pinheiro BV, Nin N, del Carmen Marin M, Esteban A, Thompson TB. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. *Intensive Care Med*. 2015; 41(11): 1921-1930.

Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol*. 2000; 164(11): 5866-70.

Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, Laurent GJ. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162 (5): 1783-8.

Matsumoto H, Matsumoto N, Ogura H, Shimazaki J, Yamakawa K, Yamamoto K, Shimazu T. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015; 78(6): 1086-94.

Matthay MA, Arabi Y, Arroliga AC, Bernard G, Bersten AD, Brochard LJ, Calfee CS, Combes A, Daniel BM, Ferguson ND, Gong MN, Gotts JE, Herridge MS, Laffey JG, Liu KD, Machado FR, Martin TR, McAuley DF, Mercat A, Moss M, Mularski RA, Pesenti A, Qiu H, Ramakrishnan N, Ranieri M, Riviello ED, Rubin E, Slutsky A, Thompson BT, Twagirumugabe

T, Ware LB, Wick KD. A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023; Jul 24. doi: 10.1164/rccm.202303-0558WS.

Matthay MA, Arabi YM, Siegel ER, Ware LB, Bos LDJ, Sinha P, Beitler JR, Wick KD, Curley MAQ, Constantin JM, Levitt JE, Calfee CS. Phenotypes and personalized medicine in the acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2020; 46(12): 2136-52.

Matthay MA, Thompson BT, Ware LB. The Berlin definition of acute respiratory distress syndrome: should patients receiving high-flow nasal oxygen be included? *Lancet Respir Med*. 2021; 9(8): 933-36.

Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, Herridge M, Randolph AG, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5(1):18.

Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6: 147-163.

Mauad T, Duarte-Neto AN, da Silva LFF, de Oliveira EP, de Brito JM, do Nascimento ECT, de Almeida Monteiro RA, Ferreira JC, de Carvalho CRR, do Nascimento Saldiva PH, Dolhnikoff M. Tracking the time course of pathological patterns of lung injury in severe COVID-19. *Respir Res*. 2021; 22(1): 32.

Moreau T, Baranger K, Dadé S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie*. 2008; 90(2): 284-95.

Mrozek S, Jabaudon M, Jaber S, Paugam-Burtz C, Lefrant JY, Rouby JJ, Asehnoune K, Allaouchiche B, Baldesi O, Leone M, Lu Q, Bazin JE, Roszyk L, Sapin V, Futier E, Pereira B, Constantin JM; Azurea network. Elevated Plasma Levels of sRAGE Are Associated With Nonfocal CT-Based Lung Imaging in Patients With ARDS: A Prospective Multicenter Study. *Chest*. 2016; 150(5): 998-1007.

Nara K, Ito S, Ito T, Suzuki Y, Ghoneim MA, Tachibana S, Hirose S. Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem*. 1994 Mar;115(3):441-8.

National Heart, Lung, and Blood Institute PETAL Clinical Trials Network; Moss M, Huang DT, Brower RG, Ferguson ND, Ginde AA, Gong MN, Grissom CK, Gundel S, Hayden D, Hite RD, Hou PC, Hough CL, Iwashyna TJ, Khan A, Liu KD, Talmor D, Thompson BT, Ulysse CA, Yealy DM, Angus DC. Early Neuromuscular Blockade in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2019; 380(21): 1997-2008.

Oczypok EA, Perkins TN, Oury TD. All the "RAGE" in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses. *Paediatr Respir Rev*. 2017; 23: 40-9.

Ohya M, Nishitani C, Sano H, Yamada C, Mitsuzawa H, Shimizu T, Saito T, Smith K, Crouch E, Kuroki Y. Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide. *Biochemistry*. 2006; 45(28): 8657-64.

Papazian L, Forel JM, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, Jaber S, Arnal JM, Perez D, Seghboyan JM, Constantin JM, Courant P, Lefrant JY, Guérin C, Prat G, Morange S, Roch A; ACURASYS Study Investigators. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2010; 363(12): 1107-16.

Pelosi P, D'Onofrio D, Chiumello D, Paolo S, Chiara G, Capelozzi VL, Barbas CS, Chiaranda M, Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. *Eur Respir J Suppl*. 2003; 42: 48s-56s.

Peukert K, Seeliger B, Fox M, Feuerborn C, Sauer A, Schuss P, Schneider M, David S, Welte T, Putensen C, Wilhelm C, Steinhagen F, Bode C. SP-D Serum Levels Reveal Distinct Epithelial Damage in Direct Human ARDS. *J Clin Med* 2021; 10(4): 737.

Pfundt R, Wingens M, Bergers M, Zweers M, Frenken M, Schalkwijk J. TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Arch Dermatol Res*. 2000; 292(4): 180-7.

Piatt CU, O'Brien G. Lesão e inflamação do parênquima. In: Crinee GJ, D'Alonzo GE. *Fisiopatologia Pulmonar*. São Paulo: Atheneu; 2002. p.135-47.

Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010; 14(1): R15.

Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) *FASEB J*. 2008; 22(10): 3716–27.

RECOVERY Collaborative Group; Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Brightling C, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Green C, Felton T, Chadwick D, Rege K, Fegan C, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Montgomery A, Rowan K, Juszczak E, Baillie JK, Haynes R, Landray MJ. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384(8): 693-704.

Reid PT, Marsden ME, Cunningham GA, Haslett C, Sallenave JM. Human neutrophil elastase regulates the expression and secretion of elafin (elastase-specific inhibitor) in type II alveolar epithelial cells. *FEBS Lett*. 1999; 457(1): 33-7.

Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Hayden DL, Schoenfeld DA, Ware LB; National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. Comparison of the SpO₂/FIO₂ ratio and the PaO₂/FIO₂ ratio in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*. 2007; 132(2): 410-7.

Riviello ED, Kiviri W, Twagirumugabe T, Mueller A, Banner-Goodspeed VM, Officer L, Novack V, Mutumwinka M, Talmor DS, Fowler RA. Hospital Incidence and Outcomes of the Acute Respiratory Distress Syndrome Using the Kigali Modification of the Berlin Definition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193(1): 52-9.

Rocco PRM, Dos Santos C, Pelosi P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol*. 2009; 75 (12): 730-40.

Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174(11): 1189-98.

Sallenave JM, Donnelly SC, Grant IS, Robertson C, Gauldie J, Haslett C. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is preferentially increased in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 1999; 13(5): 1029-36.

Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 11(6): 733-41.

Sallenave JM, Si Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1997; 61(6): 695-702.

Sallenave JM. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respir Res*. 2000; 1(2): 87-92.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418(6894): 191-5.

Schalkwijk J, Chang A, Janssen P, De Jongh GJ, Mier PD. Skin-derived antileucoproteases (SKALPs): characterization of two new elastase inhibitors from psoriatic epidermis. *Br J Dermatol*. 1990; 122(5): 631-41.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001; 108(7): 949-55.

Sharpe D. Chi-Square Test is Statistically Significant: Now What? Practical Assessment, Research, and Evaluation. 2015; 20 (8). Disponível em: <https://scholarworks.umass.edu/pare/vol20/iss1/8>. doi: <https://doi.org/10.7275/tbfa-x148>

Shaw L, Wiedow O. Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans*. 2011; 39(5): 1450-54.

Simão RR, Ferreira SG, Kudo GK, Armstrong Junior R, Silva LF, Sannomiya P, Breithaupt-Faloppa AC, Moreira LF. Sex differences on solid organ histological characteristics after brain death. *Acta Cir Bras.* 2016; 31(4): 278-285.

Simpson AJ, Cunningham GA, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM. Regulation of adenovirus-mediated elafin transgene expression by bacterial lipopolysaccharide. *Hum Gene Ther.* 2001;12(11): 1395-406.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8): 801-10.

Sinha P, Delucchi KL, Thompson BT, McAuley DF, Matthay MA, Calfee CS; NHLBI ARDS Network. Latent class analysis of ARDS subphenotypes: a secondary analysis of the statins for acutely injured lungs from sepsis (SAILS) study. *Intensive Care Med.* 2018; 44(11): 1859-69.

Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* 2007; 212(4-5): 381-416.

Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *J Transl Med.* 2009; 7: 17-38.

Tang L, Zhao Y, Wang D, Deng W, Li C, Li Q, Huang S, Shu C. Endocan levels in peripheral blood predict outcomes of acute respiratory distress syndrome. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 625180 - 9.

Tejera P, O'Mahony DS, Owen CA, Wei Y, Wang Z, Gupta K, Su L, Villar J, Wurfel M, Christiani DC. Functional characterization of polymorphisms in the peptidase inhibitor 3 (elafin) gene and validation of their contribution to risk of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014; 51 (2): 262-72.

Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez JM, Aramburu JA, Peñuelas O, Cortés-Puch I, Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Comparison of the Berlin

definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013a Apr 1;187(7):761-7.

Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodríguez JM, Aramburu JA, Vargas-Errázuriz P, Martín-Pellicer A, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med.* 2013b; 1(5): 395-401.

Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2017; 377(6): 562-72.

Vachon E, Bourbonnais Y, Bingle CD, Rowe SJ, Janelle MF, Tremblay GM. Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Biol Chem.* 2002; 383(7-8): 1249-56.

Vago JP, Tavares LP, Sugimoto MA, Lima GL, Galvão I, de Caux TR, Lima KM, Ribeiro AL, Carneiro FS, Nunes FF, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM, Sousa LP. Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. *J Immunol.* 2016; 196(4): 1922-32.

Villar J, Herrán-Monge R, González-Higueras E, Prieto-González M, Ambrós A, Rodríguez-Pérez A, Muriel-Bombín A, Solano R, Cuenca-Rubio C, Vidal A, Flores C, González-Martín JM, García-Laorden MI; Genetics of Sepsis (GEN-SEP) Network. Clinical and biological markers for predicting ARDS and outcome in septic patients. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 22702.

Wang S, Hubmayr RD. Type I alveolar epithelial phenotype in primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 44(5): 692-699.

Wang T, Zhu Z, Liu Z, Yi L, Yang Z, Bian W, Chen W, Wang S, Li G, Li A, Martin GS, Zhu X. Plasma Neutrophil Elastase and Elafin as Prognostic Biomarker for Acute Respiratory Distress Syndrome: A Multicenter Survival and Longitudinal Prospective Observation Study. *Shock.* 2017; 48(2): 168-74.

Wang Z, Beach D, Su L, Zhai R, Christiani DC. A genome-wide expression analysis in blood identifies pre-elafin as a biomarker in ARDS. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38 (6): 724-32.

Wang Z, Chen C, Zhai R, Zhang L, Su L, Lin X, Thompson T, Christiani DC. Plasma neutrophil elastase and elafin imbalance is associated with acute respiratory distress syndrome (ARDS) development. *PLoS ONE*. 2009; 4(2): e4380.

Ware LB, Calfee CS. Biomarkers of ARDS: what's new? *Intensive Care Med*. 2016; 42(5):797-9.

Ware LB, Koyama T, Zhao Z, Janz DR, Wickersham N, Bernard GR, May AK, Calfee CS, Matthay MA. Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2013; 17(5): R253.

Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 1376–83.

Ware LB. Go with the Flow: Expanding the Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome to Include High-Flow Nasal Oxygen. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022; 205(4): 380-82.

Wendel Garcia PD, Caccioppola A, Coppola S, Pozzi T, Ciabattini A, Cenci S, Chiumello D. Latent class analysis to predict intensive care outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome: a proposal of two pulmonary phenotypes. *Crit Care*. 2021; 25(1): 154.

Wiedow O, Schröder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem*. 1990; 265(25): 14791-5.

Wilkinson TS, Roghanian A, Simpson AJ, Sallenave JM. WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity. *Biochem Soc Trans*. 2011; 39(5): 1409-15.

Wittkowski H, Sturrock A, van Zoelen MA, Viemann D, van der Poll T, Hoidal JR, Roth J, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007; 35(5): 1369-1375.



Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(1): 58-68.

Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V, Aguilar-Hernández MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal*. 2013; 25 (11): 2185-97.

Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003; 370: 1097–109.

Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, et al. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2008; 283(51): 35507–16.

Anexo A: Parecer Consubstanciado do CEP

	USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES DE LESÃO EPITELIAL EM TECIDO PULMONAR PROVENIENTE DE NECRÓPSIA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM SEPSE E SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.		
Pesquisador: Luiz Fernando Ferraz da Silva		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 67771417.0.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 2.074.942		
Apresentação do Projeto:		
<p>Trata-se de estudo retrospectivo controlado. A síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA) caracteriza-se por dano alveolar difuso, edema, hipoxemia grave, diminuição da complacência pulmonar, aumento do peso pulmonar, aumento do espaço morto fisiológico, aumento da formação da membrana hialina e hemorragia. Representa 10% das admissões em UTI com taxa de mortalidade de cerca de 40%. Há alta prevalência de casos não são diagnosticados e um dos fatores que contribuem para isso é a presença de sepse. Continua sendo um desafio identificar pacientes com SDRA e diferenciá-la de outras causas de insuficiência respiratória aguda. Ainda que muitos estudos tenham focado a identificação de biomarcadores, não existe um único e confiável biomarcador sendo utilizado na prática clínica atualmente. Para tanto, será feito um levantamento de pacientes com diagnóstico de SDRA, pacientes com diagnóstico de sepse e sem critérios para SDRA e pacientes controles que faleceram de causas não pulmonares provenientes do HC-FMUSP e que tiveram suas necrópsias realizadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC). Fragmentos de tecido pulmonar coletados na rotina diagnóstica da necrópsia serão utilizados para análise imunohistoquímica de RAGE, SP-D, elafina e pré-elafina. A expressão proteica destes biomarcadores será mensurada no epitélio pulmonar e comparada entre os grupos. Além disso,</p>		
<p>Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br</p>		
Página 01 de 03		



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.074.942

estes parâmetros serão correlacionados com variáveis clínicas obtidas a partir da avaliação do prontuário.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é comparar a expressão de substâncias candidatas a serem biomarcadores para a SDRA, como RAGE, elafina, pré-elafina e SP-D no epitélio pulmonar de pacientes com SDRA, com sepse e indivíduos controle. Todos os materiais biológicos (blocos e cortes histológicos) pertencem à Divisão de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos envolvidos e não há benefícios imediatos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador responsável é especialista no tema proposto e tem toda a capacidade de levar o estudo a bom termo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador deve ser dispensado da obtenção dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, uma vez que o material foi colhido para finalidades assistenciais e encontra-se estocado na Divisão de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, onde o pesquisador é docente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo apresenta todas as condições de ser aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.074.942

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_888151.pdf	27/04/2017 21:16:04		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_laboratorio.jpg	27/04/2017 21:11:21	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativa_TCLE.pdf	27/04/2017 21:11:01	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Outros	Luiz_Fernando27042017_cappesq.pdf	27/04/2017 17:54:20	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	Projeto_pb.doc	27/04/2017 17:51:06	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Luiz_Fernando127042017_Folha_de_rosto.pdf	27/04/2017 17:49:53	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Orçamento	Orçamento.jpg	27/04/2017 17:49:42	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_departamento.jpg	27/04/2017 17:49:03	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.jpg	27/04/2017 17:45:34	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Maio de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br