

George Castro Figueira de Mello

**Remodelamento das pequenas vias aéreas nas
pneumonias intersticiais idiopáticas**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Mauad

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mello, George Castro Figueira de
Remodelamento das pequenas vias aéreas nas pneumonias intersticiais idiopáticas /
George Castro Figueira de Mello. -- São Paulo, 2009.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.
Área de concentração: Patologia.
Orientadora: Thaís Mauad.

Descritores: 1.Doenças pulmonares intersticiais 2.Metaloproteinases 2 da
matriz 3. Pequenas vias aéreas 4. Pneumonia intersticial

USP/FM/SBD-242/09

Dedico este trabalho

À minha esposa, Liciane, e a meus pais, Roosevelt e Remédios, pelo apoio e incentivo imprescindíveis para a realização desta tese.

Meus sinceros agradecimentos

A **Deus**, pela dádiva da vida e sua presença infalível e incessante;

Aos meus pais, **Roosevelt e Remédios**, pelo amor, oportunidades, ensinamentos a mim ofertados ao longo da vida e exemplos de médicos que são;

Aos queridos irmãos, **Caroline e Roosevelt Júnior**, pela fraternidade e incentivos constantes;

À minha esposa **Liciane** pela compreensão e auxílio essenciais em todas as horas, condição *si ne qua non* para a conclusão deste trabalho;

À **Profa Dra. Patrícia Maluf Cury**, estimuladora e elo primário fundamental para o início da relação com minha estimada orientadora;

Aos amigos **André, Eduarley e Rodrigo** companheiros de morada e de luta pelo conhecimento em terras paulistanas;

Aos compadres **Alexandre e Sandra** que me premiaram com a afilhada **Bianca** e com momentos maravilhosos importantíssimos enquanto estive em Sampa;

A todos os funcionários do Departamento de Patologia e da Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que sempre foram extremamente solícitos, dos quais cito, a **Dona Célia, o Reginaldo, Júnior, Carlos, Raimundo, Zilá; Nildo, Ana Luiza, Rosângela**, as biólogas **Sandra e Ângela**, que desenvolveram as reações de imunohistoquímica, as secretárias **Vera e Liduvina** (esta fundamental, principalmente na fase final deste trabalho);

Aos colaboradores do Grupo do Interstício nas pessoas dos **Profs Drs Carlos Carvalho, Ronaldo Kairalla e João Marcos Salge**;

Ao **Prof Dr Paulo Saldiva, o Prof Pepino**, pelo seu auxílio no desenho desta pesquisa;

À **Profa Dra Marisa Dolhnikoff**, por suas análises críticas e importantes sugestões;

A todos do **Grupo ASMA**, particularmente nas pessoas da **Aletea, Ana Laura, Dra Bianca, Burns, Cristina, Denise, Diógenes, Eliane, Profa Dra Fabíola Del Carlo, Maína, Raquel, Ruy e Tati**, que através do espírito acadêmico-investigador e ao mesmo tempo solidário e divertido, constituindo-se em um ambiente muito familiar, contribuíram de modo decisivo para o bom andamento desta pesquisa e para proporcionar o sentimento de perpetuar em minha vida o prazer de fazer investigações científicas;

De modo todo especial à **Profa Dra Thais Mauad**, minha eterna orientadora, exemplo de dedicação aos seus pós-graduandos, perfeita na metódica arte de fazer pesquisa, sabendo como poucos, trabalhar no cumprimento de metas e obter o melhor dentro dos limites de cada um.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a realização desta obra.

Normalização Adotada

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Pneumonias Intersticiais Idiopáticas.....	2
1.2	Classificação das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas	3
1.2.1	Pneumonia Intersticial Usual	5
1.2.2	Pneumonia Intersticial Não-Específica	9
1.2.3	Pneumonia Organizante Criptogênica	10
1.2.4	Pneumonia Intersticial Aguda	12
1.2.5	Doença Pulmonar Intersticial Associada a Bronquiolite Respiratória	13
1.2.6	Pneumonia Intersticial Descamativa.....	14
1.2.7	Pneumonia Intersticial Linfóide	15
1.2.8	Casos não-classificáveis	16
1.3	As pequenas vias aéreas	17
1.4	As pequenas vias aéreas e as Pneumonias Intersticiais Idiopáticas: indícios de acometimento morfológico e funcional.....	19
1.5	As Pneumonias Intersticiais Idiopáticas e o processo de remodelamento pulmonar com possível participação das pequenas vias aéreas	25
1.6	HIPÓTESE	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivos gerais	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MÉTODOS	32
3.1	Ética.....	33
3.2	População estudada.....	33
3.2.1	Critérios de inclusão	34
3.2.2	Critérios de exclusão	35
3.3	Processamento tecidual	37
3.4	Estudo morfológico: morfometria e análise semiquantitativa.....	37
3.5	Imunohistoquímica.....	46
3.6	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS	49
4.1	População de pacientes	50
4.2	Dados categóricos e semiquantitativos	52
4.3	Dados morfométricos (quantitativos)	54
4.4	Imunohistoquímica.....	58
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	77
7	ANEXO	80
8	REFERÊNCIAS	83

Apêndice

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Delimitação das áreas dos compartimentos estudados das pequenas vias aéreas através do software adotado.
.....40.
- Figura 02 - Exemplos de algumas das variáveis categóricas avaliadas.
.....43.
- Figura 03 - Exemplos representativos de vias aéreas no controle e nas doenças estudadas.
.....53.
- Figura 04 - Expressão dos anticorpos estudados no epitélio das pequenas vias aéreas.61.
- Figura 05 - Correlação entre a expressão de Matrilisina (MMP-7) no epitélio das pequenas vias aéreas dos pacientes com Pneumonia Intersticial Usual (UIP) e o Log do valor % predito do $FEF_{25-75\%}$.
.....63.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Aspectos demográficos, clínicos, funcionais e tomográficos dos pacientes inclusos no estudo.
.....51.

Tabela 02 - Dados histopatológicos semiquantitativos e categóricos estudados.
.....55.

Tabela 03 - Dados morfométricos na estrutura da pequena via aérea.
.....57.

Tabela 04 - Expressão de Fator Transformador de Crescimento β (TGF- β), Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Inibidor Tecidual de Metaloproteinases (TIMP) no epitélio das pequenas vias aéreas.
.....59.

RESUMO

Mello GCF. *Remodelamento das pequenas vias aéreas nas pneumonias intersticiais idiopáticas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 101p.

Introdução: Poucos estudos têm sido direcionados às mudanças histopatológicas nas pequenas vias aéreas e seu possível papel no processo de remodelamento, nas pneumonias intersticiais idiopáticas. **Objetivos:** Estudar aspectos morfológicos, morfométricos e de imunohistoquímica das pequenas vias aéreas na Fibrose Pulmonar Idiopática/ Pneumonia Intersticial Usual (FPI/ UIP) e Pneumonia Intersticial Não-específica (NSIP). **Métodos:** Foram estudadas as pequenas vias aéreas em biópsias pulmonares de 29 pacientes com FPI/ UIP e 08 com NSIP. As biópsias foram comparadas com 13 pacientes com Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC) – como controle positivo – e 10 pulmões controles normais de autópsia. Foram analisados semi e quantitativamente aspectos arquiteturais, inflamatórios, estruturais das vias aéreas, além da expressão de TGF- β , MMP -2, -7, -9, e seus inibidores (TIMP-1, -2). **Resultados:** Comparados com os controles, pacientes com FPI/ UIP, NSIP e BC apresentaram inflamação bronquiolar, inflamação e fibrose peribronquiolar aumentadas e áreas luminiais diminuídas. Pacientes com FPI/ UIP tiveram paredes das vias aéreas mais espessadas, devido ao aumento de todos os compartimentos. Pacientes com NSIP apresentaram área do epitélio aumentada, enquanto pacientes com BC tiveram maior lâmina própria. Todos os grupos estudados demonstraram expressão epitelial bronquiolar aumentada de MMP-7 e -9 comparados ao controle. **Conclusão:** As pequenas vias aéreas são patologicamente alteradas e podem fazer parte do processo de remodelamento nas pneumonias intersticiais idiopáticas.

Descritores: Doenças Pulmonares Intersticiais, Metaloproteinases da Matriz, Pequenas vias aéreas, Pneumonia Intersticial.

SUMMARY

Mello GCF. Small airway remodeling in idiopathic interstitial pneumonias [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 101p.

Background: Few studies have addressed small airway (SA) histopathological changes, and their possible role in the remodeling process, in idiopathic interstitial pneumonias. **Objectives:** To study morphological, morphometrical and immunohistochemical features of SA in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (Usual Interstitial Pneumonia – UIP) and Non-Specific Interstitial Pneumonia (NSIP). **Methods:** We analyzed SA pathology in lung biopsies of 29 patients with UIP and of 8 with NSIP. Biopsies were compared with lung tissue of 13 patients with Constrictive Bronchiolitis (CB) - as a positive control - and 10 normal autopsied control lungs. We analyzed, semi-quantitatively, SA structure, inflammation, architectural features and the bronchiolar epithelial immunohistochemical expression of TGF- β , MMP -2, -7, -9, and their tissue inhibitors (TIMP-1, -2). **Results:** Compared to controls, patients with UIP, NSIP and CB presented increased bronchiolar inflammation, peribronchiolar inflammation and fibrosis and decreased luminal areas. UIP patients had thicker walls, due to an increase in most airway compartments. NSIP patients presented increased epithelial areas, whereas patients with CB had larger inner wall areas. All of the groups studied presented increased bronchiolar expression of MMP-7 and MMP-9, compared to the controls. **Conclusion:** We conclude that SA are pathologically altered and may take part in the lung remodeling process in idiopathic interstitial pneumonias.

Descriptors: Interstitial lung diseases, Interstitial Pneumonia, Matrix Metalloproteinase, Small Airways.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Pneumonias Intersticiais Idiopáticas

O termo doença pulmonar intersticial (DPI) é aplicado a um grupo numeroso e heterogêneo de afecções, em geral caracterizadas pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória, com ou sem deposição de matriz extracelular ao longo do parênquima pulmonar. Atualmente, as Doenças Pulmonares Intersticiais têm sido chamadas de Doenças Pulmonares Parenquimatosas Difusas (DPPDs) uma vez que acometem além do interstício pulmonar, a pleura, vias aéreas, vasos sanguíneos e epitélio dos alvéolos e bronquíolos (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Travis et al, 2002b).

Poucos estudos trazem dados epidemiológicos seguros sobre este grupo de doenças, devido ao número e heterogeneidade das entidades patológicas agrupadas, falta de uniformidade nos registros, nomenclaturas e critérios utilizados, além da subnotificação. Demedts e colaboradores em extensa revisão de literatura destacaram dentre as DPPDs uma variável prevalência, a cada 100 mil pessoas, de 10-40 casos de Sarcoidose, 3-20 casos de Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI), 10-200 casos de Pneumonia de Hipersensibilidade (PH), 40 casos de Pneumonite por Lúpus Eritematoso Sistêmico, 10 casos de Pneumonite por Esclerose Sistêmica e 2 casos de Pneumonite por Artrite Reumatóide. Nesta mesma revisão foi apresentada uma mortalidade de 0,65 casos de DPPDs para cada 100 mil pessoas, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística da Bélgica (2001).

Dentro deste grupo abrangente de entidades destacam-se aquelas de etiologia desconhecida denominadas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PIIs). A literatura relata uma prevalência de PIIs em torno de 80,9 casos a cada 100 mil homens e 67,2 casos a cada 100 mil mulheres (Demedts et al, 2001; American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

O diagnóstico e o manejo das PIIs têm desafiado clínicos desde suas primeiras descrições há mais de um século. Na década de 60 o entendimento dessas doenças alcançou significativo progresso com o reconhecimento das doenças vasculares do colágeno, drogas e exposições ocupacionais como causas potenciais de Doenças Pulmonares Parenquimatosas Difusas. Entretanto, um grande número de casos permanece ainda como idiopático (Kaminski et al, 2003).

1.2) Classificação das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PIIs)

Os esquemas de classificação (clínico-histológica) das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PIIs) vêm sendo discutidos desde 1968 quando Liebow e Carrington descreveram cinco tipos distintos: Pneumonia Intersticial Usual (UIP), Pneumonia Intersticial Bronquiolítica (BIP), Pneumonia Intersticial Descamativa (DIP), Pneumonia Intersticial de Células Gigantes (GIP) e Pneumonia Intersticial Linfóide (LIP) (Demedts e Costabel, 2002; Kaminski et al, 2003).

Muller e Colby em 1997; e Katzenstein e Myers em 1998, propuseram uma nova classificação mantendo Pneumonia Intersticial Usual e Pneumonia Intersticial Descamativa como tipos separados de doenças pulmonares e excluindo LIP e GIP que foram posteriormente consideradas como distúrbios linfoproliferativos e pneumoconioses por metais pesados, respectivamente. Além disso, novas entidades foram reconhecidas incluindo a Doença Pulmonar Intersticial Associada a Bronquiolite Respiratória (RB-ILD), Pneumonia Organizante Obliterante Bronquiolítica (BOOP), Pneumonia Intersticial Aguda (AIP) e Pneumonia Intersticial Não-específica (NSIP) (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

Após vários anos de trabalhos individuais ou grupos isolados no estudo das PIIs, a *American Thoracic Society* e a *European Respiratory Society* (ATS/ERS) (2002) através de uma comissão de especialistas em doenças do interstício unificaram terminologias e reformularam uma nova classificação das PIIs após um Consenso Multidisciplinar Internacional. Esta atual classificação enfatiza a existência de padrões histopatológicos como base para um diagnóstico dinâmico e essencialmente clínico-radiopatológico (Demedts e Costabel, 2002; Nicholson, 2002; Travis et al, 2002b; Kaminski et al, 2003; Flaherty et al, 2004).

Com este consenso foram estabelecidas sete entidades: UIP, NISP, Pneumonia Organizante Criptogênica (COP), AIP, RB-ILD, DIP e LIP.

Devido ao maior impacto clínico e epidemiológico e às controvérsias existentes, UIP e NSIP foram intensamente discutidas naquele fórum e serão abordadas de modo mais aprofundado a seguir (Demedts e Costabel, 2002; Nicholson, 2002; Travis et al, 2002b; Kaminski et al, 2003; Flaherty et al, 2004).

1.2.1) Pneumonia Intersticial Usual (UIP)

O tipo mais comum e mais agressivo de Pneumonia Intersticial Idiopática é o padrão de Pneumonia Intersticial Usual (UIP), também chamado clinicamente de Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) ou Alveolite Fibrosante Criptogênica (CFA, no Reino Unido). A literatura relata uma prevalência crescente com a idade e variando de 3 a 20 pessoas por 100.000 (Demedts et al, 2001; Du Bois e Wells, 2001; American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Khalil e O'connor, 2004), mas que nos idosos acima de 75 anos poderia exceder 175 por 100.000 (Scott; Johnston; Britton, 1990 apud American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Leslie e Fukuoka, 2005). A maior prevalência encontra-se na quinta e sexta décadas de vida, parecendo não haver de fato predileção por sexo ou etnia. Até o momento a evolução clínica é de progressiva deterioração do paciente cursando com uma tosse seca e dispnéia. A média de sobrevida tem variado de 2,5 a 5 anos com aproximadamente 60% dos óbitos decorrentes de causa direta da doença pulmonar, em geral por insuficiência respiratória (Hasleton, 1996; American

Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Khalil e O'connor, 2004).

Com relação à patogênese, o conceito dominante nos anos 70 e 80 era o da “hipótese inflamatória”. Este paradigma foi pautado na observação de aumento de células inflamatórias (principalmente neutrófilos e eosinófilos) em lavados bronco-alveolares dos pacientes e com maior expressão de interleucinas, fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esta resposta inflamatória exacerbada e contínua, como consequência de algum estímulo exógeno desconhecido, teria um papel fundamental levando a um processo reparativo intenso culminando com fibrose pulmonar progressiva. Decorrente deste entendimento muito se propagou sobre a utilização de terapia antiinflamatória para estes pacientes, entretanto não há ensaios clínicos controlados e criteriosos realizados e a experiência clínica tem demonstrado precariedade de resposta terapêutica (Pardo e Selman, 2002; Kaminski et al, 2003; Kamp, 2003; White et al 2003; Khalil e O'connor, 2004).

Mais recentemente, notou-se em modelos animais a FPI na ausência de processo inflamatório significativo, sendo então postulado que a inflamação seria secundariamente envolvida. Por este modelo acredita-se que células epiteliais alveolares ativadas (pneumócitos tipos I e II), após sofrer uma agressão de etiologia desconhecida, levariam à destruição da membrana basal, produção de citocinas e fatores de crescimento (como o

TGF- β), induziriam migração de fibroblastos, com proliferação e mudanças no seu fenótipo celular (miofibroblastos). A partir daí teríamos um processo de remodelamento aberrante da matriz extracelular. Este desequilíbrio do microambiente pulmonar estaria representado pelo aumento da apoptose de células epiteliais, excesso de produção de metaloproteinases (MMPs) como as gelatinases A e B (proteínas que degradam moléculas da membrana basal) e seus inibidores (Inibidores Teciduais de Metaloproteinases - TIMPs), resultando na evolução fibroproliferativa gradual característica da FPI (Pardo e Selman, 2002; Kaminski et al, 2003; Kamp, 2003; Khalil e O'connor, 2004).

Zuo e colaboradores estudando padrões de expressão gênica em amostras de tecido pulmonar de pacientes com FPI detectaram expressão aumentada de genes envolvidos na formação (colágenos I e III, fibronectina, laminina) e degradação (MMPs) de matriz extracelular (2002). Há ainda alguns relatos da ocorrência de FPI de padrão familiar podendo atingir até quatro gerações, sugerindo um modo autossômico dominante de transmissão genética (Rosas et al, 2007). Neste contexto fica clara a necessidade de um melhor entendimento da história natural da patogênese da fibrose pulmonar, principalmente em função de seu provável impacto terapêutico. (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Pardo e Selman, 2002; Kamp, 2003; Khalil e O'connor, 2004).

Radiologicamente, o exame de escolha é a Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) de tórax, que tipicamente

demonstra fibrose predominantemente subpleural, de padrão reticular com cistos (“*honeycombing*/ pulmão em favo de mel/ faveolamento”) e bronquiectasias de tração, sendo diagnóstico de Pneumonia Intersticial Usual em cerca de 90% dos casos (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Khalil; O’connor, 2004).

O padrão de Pneumonia Intersticial Usual é caracterizado histologicamente por uma distribuição temporalmente heterogênea subpleural e paraseptal (principalmente nas bases), alternando áreas de parênquima normal com áreas por vezes, apresentando infiltrado inflamatório crônico, focos fibroblásticos, lambertose (metaplasia bronquiolar do epitélio alveolar) e cistos/ faveolamento. Frequentemente também se nota a presença de mucostase e sinais de hipertensão pulmonar. Este padrão pode ser identificado em outras situações que não a FPI como doença vascular do colágeno, toxicidade por drogas, pneumonite por hipersensibilidade crônica e asbestose. Isto ratifica a necessidade de se considerar o padrão histopatológico em conjunto com os aspectos clínicos e radiológicos para exclusão das possíveis etiologias acima (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Kaminski et al, 2003; Khalil e O’connor, 2004).

Do ponto de vista funcional a UIP apresenta o espectro característico das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas com padrão ventilatório restritivo, demonstrando redução da capacidade pulmonar total (CPT), da capacidade

vital forçada (CVF) e do volume residual (VR), sendo que em alguns pacientes apresentam uma menor diminuição do VR, causando aumento da relação VR/CPT. Apesar da diminuição do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), a relação VEF_1/CVF encontra-se normal ou até supranormal. A capacidade de difusão também se encontra reduzida desde a fase inicial da FPI (Flaherty e Martinez, 2000; American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Chetta, 2004).

1.2.2) Pneumonia Intersticial Não-Específica (NSIP)

O termo Pneumonia Intersticial Não-Específica (NSIP) foi introduzido em 1994 por Katzenstein e Fiorelli inicialmente como uma entidade patológica propriamente dita por apresentar uma evolução clínica muito mais favorável em relação à Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI). Após o consenso ATS/ERS passou a ser considerado como um diagnóstico clínico provisório até haver uma melhor compreensão deste que é certamente o mais controverso subtipo das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas. Provavelmente, trata-se de um grupo heterogêneo de desordens tendo como ponto comum um prognóstico bem melhor. A média de idade dos pacientes é, em geral, uma década mais jovem em relação a FPI (entre 40 e 50 anos em diferentes séries), podendo ocorrer em crianças. Não há associação com sexo ou fumo, mas a maioria dos pacientes tem apresentação aguda (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Flaherty e Martinez, 2006).

A NSIP não é bem caracterizada radiologicamente, exibindo padrões extremamente variáveis e por vezes com fatores superponíveis com a própria FPI/ UIP, embora a atenuação em vidro-fosco seja frequentemente descrita. Em cerca de apenas 9% dos casos o primeiro diagnóstico é feito corretamente através de TCAR de tórax (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

O diagnóstico deve ser feito por exclusão, sendo mandatório afastar a possibilidade de pneumopatias decorrentes de doença vascular do colágeno, uso de drogas, hipersensibilidade, infecções e imunodeficiências incluindo o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). O aspecto histológico é tipicamente difuso, temporalmente homogêneo, com leve a moderada inflamação mononuclear intersticial (padrão celular) e/ ou densa fibrose intersticial (padrão fibrosante). Agregados linfóides são comuns. Focos fibroblásticos e cistos/ faveolamento são ausentes ou raros (Flaherty, 2001; Kaminski et al, 2003).

1.2.3) Pneumonia Organizante Criptogênica (COP)

A Pneumonia Organizante Criptogênica (COP) é uma entidade clínico-patológica descrita inicialmente por Davison e colaboradores em 1983. Em 1985, Epler e colaboradores descreveram a mesma entidade sob o termo Pneumonia Organizante Obliterante Bronquiolítica (BOOP). A

Pneumonia Organizante Criptogênica tornou-se a expressão preferencial porque congrega os aspectos fundamentais da síndrome e evita confusão com doenças das vias aéreas como a bronquiolite constrictiva obliterante. Não há diferenças na distribuição quanto ao sexo e a média de idade é em torno de 55 anos, mas há uma distinção em relação ao tabagismo de 2:1 (entre não-fumantes e fumantes). Do ponto de vista funcional, a COP apresenta um padrão misto restritivo e obstrutivo (Toews, 2000; American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

A Pneumonia Organizante Criptogênica é incluída na classificação das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PIIs) pela sua natureza desconhecida, tendência em ser confundida com outras formas de PIIs, além da infiltração alveolar septal por células linfóides com hiperplasia de pneumócitos tipo II nas áreas envolvidas (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

O quadro radiológico exhibe áreas de consolidações com broncogramas aéreos e/ ou nódulos grandes, em geral bilaterais de distribuição peribrônquica ou subpleural (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

A histologia da COP demonstra homogeneidade temporal, exibindo “plugs” de tecido conectivo fibromixóide nos lumens das vias aéreas (“bronquiocentrismo”) e nos espaços aéreos. Observa-se um leve infiltrado

mononuclear intersticial e peribronquiolar (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Kaminski et al, 2003).

1.2.4) Pneumonia Intersticial Aguda (AIP)

Dentre as pneumonias intersticiais idiopáticas a Pneumonia Intersticial Aguda (AIP) apresenta-se como uma forma distinta histologicamente e rapidamente progressiva. Não se observa associação com fumo, idade ou sexo e é importante distinguí-la dos casos de doença vascular do colágeno, infecção, pneumonite por drogas, pneumonite por hipersensibilidade e da pneumonia eosinofílica aguda. A taxa de mortalidade é elevada (50% ou mais) ocorrendo entre 1 a 2 meses de doença (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

Os exames de imagem demonstram uma distribuição difusa com consolidação e densidade em “vidro-fosco” e tração bronquiectásica tardia (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

As biópsias pulmonares são infrequentes e quando realizadas mostram o padrão do dano alveolar difuso (DAD) em fase aguda ou de reorganização. Vê-se edema, membrana hialina e inflamação aguda intersticial. A presença de microtrombos é comum em pequenas arteríolas pulmonares (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

1.2.5) Doença Pulmonar Intersticial Associada a Bronquiolite Respiratória (RB-ILD)

O quinto tipo de Pneumonia Intersticial Idiopática, segundo o Consenso da ATS/ ERS, é a Doença Pulmonar Intersticial Associada a Bronquiolite Respiratória (RB-ILD). Esta é raramente sintomática e usualmente associada com tabagismo de longa data (há mais de 30 anos) e com disfunção nas pequenas vias aéreas. A faixa etária mais acometida encontra-se entre quarta e quinta décadas de vida e os homens são mais afetados (2H: 1M). Comumente ocorre remissão após abstinência ao fumo e a evolução para fibrose progressiva é rara (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

A tomografia computadorizada de alta resolução de tórax revela padrão difuso, com espessamento da parede das vias aéreas centrais e periféricas, nódulos centro-lobulares e atenuação do “vidro-fosco” em mais de 50% dos casos (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Leslie e Fukuoka, 2005).

O padrão histológico da Doença Pulmonar Intersticial Associada a Bronquiolite Respiratória tem distribuição bronquiolocêntrica, temporalmente homogênea, com leve fibrose e infiltrado mononuclear peribronquiolares, espaço aéreo centrolobular preenchido por macrófagos pigmentados. A

presença de enfisema centrolobular é um achado frequente (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Kaminski et al, 2003).

1.2.6) Pneumonia Intersticial Descamativa (DIP)

A Pneumonia Intersticial Descamativa (DIP) ocorre primariamente em fumantes na quarta ou quinta décadas de vida, sendo mais comum no sexo masculino (2H: 1M). O prognóstico é frequentemente bom, havendo sensível melhora com suspensão do tabagismo e uso de corticosteróide. A sobrevida fica em torno de 70% após 10 anos (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

O perfil radiológico é de opacificação em “vidro-fosco”, principalmente de localização periférica e em bases (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

Caracteristicamente, nota-se de forma difusa fibrose e inflamação alveolar septal homogênea temporalmente, com espaços aéreos preenchidos por macrófagos pigmentados. Há ainda pneumócitos reativos e septos alveolares espessados por infiltrado mononuclear (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Leslie e Fukuoka, 2005).

1.2.7) Pneumonia Intersticial Linfóide (LIP)

Devido à constatação de que muitos casos de Pneumonia Intersticial Linfóide (LIP) na verdade correspondiam a Linfomas do Tecido Linfóide associado à Mucosa (MALT) de células B de baixo grau, esta entidade havia sido retirada da classificação das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas. Porém com o desenvolvimento da imunohistoquímica e análise molecular, infiltrados reativos e neoplásicos são mais bem separados, podendo-se afirmar que somente poucos casos de LIP realmente sofreram transformação maligna. A incidência de Pneumonia Intersticial Linfóide idiopática, não relacionada ao HIV, é baixa. Sua apresentação clínica é pouco definida, sendo mais comum em mulheres na quinta década da vida (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Kaminski et al, 2003).

O achado radiológico dominante é a opacidade em “vidro-fosco”, anormalidade reticular e nódulos centro-lobulares ocorrendo difusamente no parênquima pulmonar (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Kaminski et al, 2003).

A microscopia é caracterizada por uma infiltração linfóide densa e difusa (temporalmente homogênea) predominantemente em septos alveolares. Na sua maioria o infiltrado é constituído de linfócitos T,

plasmócitos e macrófagos (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Kaminski et al, 2003).

Além das neoplasias linfóides, a LIP deve ser diferenciada histologicamente da bronquiolite folicular, hiperplasia linfóide nodular, infecções (especialmente Pneumonia por *Pneumocystis carinii*) e outras Pneumonias Intersticiais Idiopáticas como NSIP, pneumonias em organização e UIP. Deve-se também afastar ainda a associação com doenças auto-imunes, principalmente a Síndrome de Sjögren (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Swigris et al, 2002; Kaminski et al, 2003).

1.2.8) Casos não-classificáveis

O Consenso da *American Thoracic Society* e *European Respiratory Society* (ATS/ERS) prevê ainda um pequeno número de casos que permanece sem classificação mesmo depois de extensa investigação clínica, radiológica e histopatológica. Dentre os fatores que corroboram para existência destes casos não-classificáveis destacam-se: a amostragem pulmonar inadequada, a possibilidade de coexistência de múltiplos padrões histológicos em diferentes áreas pulmonares e a ausência de informações clínico-radiológicas satisfatórias (2002).

Indubitavelmente, um dos entraves para um processo diagnóstico mais eficaz e com maior influência do ponto de vista prognóstico-terapêutico é a falta de um maior esclarecimento dos mecanismos fisiopatogênicos das PIIs, apesar de alguns avanços já alcançados neste campo, conforme mencionado anteriormente.

1.3) As pequenas vias aéreas (PVAs)

As pequenas vias aéreas (PVAs) representam as porções distais da árvore brônquica (bronquíolos) que medem até dois milímetros (mm) de diâmetro, não apresentam cartilagem e possuem uma camada muscular lisa na sua parede (Bai et al, 1994; Colby e Yousen, 1997; Mauad et al, 1999; Travis et al, 2002a). Para fins de pesquisa em alguns trabalhos histológicos o ponto de corte de seis milímetros de perímetro de membrana basal em vias aéreas transversais é usado para categorizar as pequenas vias aéreas (< 6mm) e as grandes vias aéreas (> 6mm) (Mauad et al, 1999).

Fisiologicamente as PVAs têm um papel importante promovendo a manutenção de baixos níveis distais de resistência ao fluxo aéreo para as vias aéreas condutoras (Crapo, 2000).

Em conjunto com as porções mais proximais da região de troca gasosa alveolar, as PVAs são o sítio primário em desordens pulmonares causadas pela maioria das substâncias inaladas (Crapo, 2000).

A detecção de alterações em testes de função pulmonar pode fornecer informações imprescindíveis sobre a mecânica respiratória, muitas vezes demonstrando claramente a presença de lesões nas pequenas vias aéreas em diversas formas e graus de acometimento, a depender da entidade patológica em questão. As principais anormalidades funcionais encontradas em vias aéreas patológicas estão associadas à obstrução ao fluxo aéreo, levando a um aumento da resistência das vias aéreas e a uma consequente diminuição nos fluxos aferidos através das provas de função pulmonar (Crapo, 2000; Rubin et al, 2001).

Em pacientes asmáticos, por exemplo, alterações funcionais observadas através da espirometria estão associadas a mecanismos multifatoriais como broncoespasmo, inflamação, edema, secreções, tampões mucosos, hipertrofia da musculatura lisa e, em casos mais graves, ao remodelamento da parede brônquica que pode tornar este processo irreversível (Mauad, 1999; Rubin et al, 2001).

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é outro protótipo de distúrbio que acomete a árvore brônquica, especialmente as pequenas vias aéreas, caracterizando-se por uma obstrução do fluxo aéreo progressiva não plenamente reversível, decorrente de um processo inflamatório crônico, com extensão ao parênquima e consequente remodelamento exacerbado. Nestes pacientes são evidenciadas alterações estruturais dos compartimentos da

parede bronquiolar como espessamento do epitélio, lâmina própria, músculo e adventícia, além de fibrose peribrônquica. Estes achados se associam com destruição alveolar e espessamento vascular e apresentam intensa correlação com a severidade da doença (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2008).

Apesar dos vários estudos já realizados, segundo Shaw e colaboradores, as PVAs constituem uma das áreas menos entendidas dos pulmões, sendo considerada a “zona silenciosa do pulmão” (2002). Acredita-se que seja necessário haver acometimento patológico extenso das PVAs para a presença de alterações funcionais ou radiológicas significativas.

1.4) As pequenas vias aéreas (PVAs) e as Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PIIs): indícios de acometimento morfológico e funcional.

O envolvimento das pequenas vias aéreas (PVAs) nas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas (PIIs) foi identificado há décadas através de observações morfológicas nas análises histopatológicas e radiológicas e de modo controverso nos estudos funcionais.

O primeiro relato de envolvimento de PVAs na Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) foi publicado por Ostrow e Cherniack (1973) que estudaram funcionalmente 11 pacientes com fibrose pulmonar de várias etiologias (sarcoidose, esclerodermia, asbestose e idiopática) e descreveram um

padrão obstrutivo em nível periférico associado a aumento da retração elástica em todos os pacientes analisados. Entretanto neste estudo observou-se que 91% dos pacientes eram fumantes, possivelmente podendo comprometer suas interpretações atuando como condição de confusão em sua análise.

Schofield e colaboradores (1976) relataram condutância e fluxo expiratório máximo normais em 09 pacientes com “alveolite fibrosante”, não encontrando assim evidência de fechamento de pequenas vias aéreas em sua pesquisa. Todavia seus pacientes não foram submetidos à biópsia pulmonar, sendo seis deles com diagnóstico clínico de pneumonia por hipersensibilidade (após contato com aves) e os demais (a *priore* criptogênicos) eram todos tabagistas.

Em outro estudo, Tan e Tashkin (1981) sugeriram que as taxas de fluxo expiratório máximo quando corrigidos pelo volume pulmonar seriam supranormais na fibrose pulmonar idiopática, ao estudar 54 pacientes com anormalidades clínicas e funcionais consistentes com doenças intersticiais de várias etiologias.

Fulmer e colaboradores (1977) avaliaram o tecido pulmonar de 18 pacientes com diagnóstico de FPI e demonstraram através de métodos semiquantitativos que 94% dos pacientes apresentavam fibrose de vias aéreas, bronquiolite e inflamação peribronquiolar. Encontraram ainda

significante correlação entre complacência dinâmica e o diâmetro estimado da pequena via aérea que se encontrava diminuído em 67% dos casos, postulando que a FPI seria uma doença tanto de PVAs como de alvéolos.

Nesta mesma linha de pensamento, através do estabelecimento de escores clínico, funcional e patológico semiquantitativos em 23 pacientes com média de idade de 43 anos, Myre e colaboradores concluíram que a obstrução das PVAs é frequente nas fases precoces da FPI (1988).

Em 1996, Padilla e colaboradores, descreveram fibrose e inflamação de PVAs em 21 biópsias de pacientes com FPI, sugerindo que este processo ocorre na interdependência dos fenômenos inflamatórios e deposição de colágeno no pulmão.

Respectivamente, em 1997 e 2002, Chung e Rhee e Shaw e colaboradores, publicaram artigos de revisão ratificando o claro acometimento das PVAs nas doenças intersticiais pulmonares e apontando o aumento da pressão de retração elástica como provável justificativa para os fluxos expiratórios manterem-se bem preservados nas provas de função respiratória pulmonar.

Salge (2007) em tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) avaliou a função e a mecânica respiratória pulmonar, com enfoque das pequenas vias aéreas, em

20 pacientes com doença intersticial pulmonar (16 casos de FPI e 4 casos de Pneumonia por Hipersensibilidade) não conseguindo caracterizar repercussões funcionais obstrutivas ou de limitação de fluxo sobre as PVAs especificamente.

Inúmeros estudos de imagem têm analisado as pequenas vias aéreas nas Doenças Intersticiais Pulmonares, principalmente após o advento da TCAR. Com esta técnica tem sido possível avaliar radiologicamente o lúmen e a parede de vias aéreas até 2 mm de diâmetro. Embora o padrão tomográfico predominante seja o reticular, dos pacientes com FPI cerca de 4% podem apresentar o padrão em mosaico, 23% o padrão em vidro-fosco, 97% exibem bronquiolectasias de tração e 95% cistos/ faveolamento (Lynch et al, 2005).

Através de reconstrução multiplanar de imagens tomográficas de 97 pacientes com fibrose pulmonar, observou-se que imagens císticas sujeitas à redução de volume na expiração, apresentavam continuidade com estruturas bronquiolares, indicando tratar-se de bronquiolectasias de tração, ou seja, demonstrando provável acometimento de vias aéreas (Johkoh et al, 1999).

Desta forma acredita-se que alterações nas PVAs poderiam participar efetivamente em muitas doenças pulmonares, dentre elas as Pneumonias Intersticiais Idiopáticas, propiciando uma morbidade significativa e

determinando, por exemplo, má distribuição ventilatória, falta de homogeneidade da impedância, causando uma redução da complacência dinâmica, aumento do trabalho respiratório e provavelmente levando a sensação de dispnéia (Chung e Rhee, 1997; Wilcox, 2000; Shaw et al, 2002).

Classicamente as Doenças Intersticiais Pulmonares Difusas tem um caráter funcional predominantemente ventilatório-restritivo. Esta classe de disfunção pulmonar é caracterizada por reações fibróticas dos septos alveolares que notoriamente inclui as paredes das PVAs. Para alguns autores o tecido fibrótico aumentado acentua a retração elástica no parênquima e como estas paredes são interconectadas com as paredes das vias aéreas, estas acabam sendo lesadas. A evolução deste processo proporciona um aumento da resistência contra a inspiração, trazendo dificuldade para inalação e diminuição da capacidade vital forçada (Crapo, 2000; Husain e Kumar, 2005).

A despeito dos avanços alcançados, a avaliação individualizada da função das PVAs, principalmente pela falta de especificidade e sensibilidade dos testes de função pulmonares e de imagem, devido suas limitações técnicas, ainda é subestimada. A biópsia cirúrgica persiste sendo fundamental nesta análise, proporcionando uma combinação de informações por meio da utilização da morfometria, biomarcadores e patologia molecular

(American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Shaw et al, 2002).

Estudando-se o espectro patológico das doenças reconhecidamente bronquiolares observa-se caracteristicamente uma variedade de elementos. Estes incluem células inflamatórias (agudas, crônicas, granulomatosas, hiperplasia linfóide de localização mural ou luminal); reações mesenquimais (fibroblástico/ fibrótico) localizados em pólipos intraluminais, submucosa e áreas peribronquiolares; mudanças epiteliais (necrose e destacamento, metaplasia escamosa, metaplasia peribronquiolar/ lambertose); hipertrofia de músculo liso e espessamento da membrana basal (Travis et al, 2002a).

No heterogêneo grupo das PIIs, a pneumonia organizante criptogênica (COP) e a doença intersticial pulmonar associada a bronquiolite respiratória (RB-ILD) apresentam alterações bronquiolares que são parte integrante de suas histopatologias. Fora do rol das pneumonias idiopáticas, pode-se citar a Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC) caracterizando-se pela cronicidade e acometimento clássico das PVAs com presença de um espessamento fibroso peribronquiolar que leva a um padrão funcional obstrutivo severo (Visscher e Myers, 2006a).

1.5) As pneumonias intersticiais idiopáticas e o processo de remodelamento pulmonar com possível participação das pequenas vias aéreas (PVAs).

O processo de remodelamento pulmonar envolve um mecanismo complexo e ainda pouco compreendido de interação de vários elementos celulares e inúmeras proteínas com ações diversas, muitas vezes antagônicas que se desenvolvem após agressões no microambiente pulmonar (Parks et al, 2001; Gueders et al, 2006).

Dentre as proteínas participantes deste processo destaca-se a superfamília das metaloproteinases de matriz (MMPs) e suas inibidoras teciduais. Atualmente são descritas 28 metaloproteinases que atuam como enzimas zinco e cálcio-dependentes, com a capacidade de proporcionar a degradação dos componentes da matriz extracelular e com isso agir como moduladores do processo de remodelamento. A síntese e as funções das MMPs são reguladas em três níveis principais: transcrição, ativação de pró-enzimas e inibição. Deste modo, sinalizadores como citocinas e fatores de crescimento incluindo interleucinas, interferons, fator transformador de crescimento - β , fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento do ceratinócito, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento do endotélio vascular, fator derivado de plaquetas, fator de necrose tumoral - α , sinais derivados de integrinas, estresse físico, mudanças na forma celular e uma família de inibidores endógenos conhecidos como inibidores teciduais

de metaloproteinases (TIMPs), já foram descritos como prováveis moduladores da expressão gênica de MMPs (Gueders et al, 2006, Pardo e Selman, 2006).

Alguns estudos recentes têm relacionado as MMPs, TIMPs e TGF- β com o processo de remodelamento ocorrido nas fibroses pulmonares idiopáticas. Tem sido demonstrado que o epitélio alveolar apresenta expressões gênica e protéica altamente elevadas de MMP-1 (colagenase-1), MMP-2 (gelatinase A), MMP-7 (matrilisina), MMP-9 (gelatinase B), TIMP-1, TIMP-2 e TGF- β (Khalil et al, 1991; Fukuda et al, 1998; Suga et al, 2000; Bergeron et al, 2003; Odajima et al, 2006; Selman et al, 2006). Em geral estas proteínas também estão aumentadas no fluido do lavado broncoalveolar (Selman et al, 2000; Suga et al, 2000). No trabalho de Selman e colaboradores (2000), por exemplo, tais achados puderam ser estabelecidos através de várias técnicas de análise como imunohistoquímica, isolamento e cultura celular, citometria de fluxo, hibridização *in situ*, zimografia e reação de cadeia de polimerase, estudando seis pacientes com FPI. Neste estudo fez-se um mapeamento da expressão das MMPs e TIMPs detectando-se suas presenças além do epitélio alveolar (MMP-1, -2, -9, TIMP-2, -3, -4), em células tipo fibroblásticas como miofibroblastos, nos característicos focos fibroblásticos e na matriz extracelular (MMP-2, -9, TIMP-1, -2, -3, -4).

O Fator Transformador de Crescimento - β (TGF- β) parece ser um mediador crítico no balanço do processo de remodelamento pulmonar, estabelecendo o padrão de resposta inflamatória em várias situações de injúria ao induzir excesso de produção de matriz ou destruição tecidual aumentada (Khalil et al, 1991; Sheppard, 2006). No estudo de Khalil e colaboradores 4 pacientes com FPI apresentaram consistentemente maior expressão de TGF- β nos pneumócitos tipo II, áreas de “*honeycombing*”/ faveolamento e em macrófagos, e de modo irregular no epitélio bronquiolar (1991).

Em doenças da via aérea como a asma e a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) encontra-se bem estabelecido o papel essencial destas proteínas em suas fisiopatogênias (Holgate et al, 2000; Holgate, 2007). Na asma foi demonstrado o aumento da produção de metaloproteinases como a MMP-9 (gelatinase B) pelo epitélio das vias aéreas e que parece se relacionar com aumento do número de neutrófilos e queda do volume expiratório forçado no primeiro minuto (VEF₁) o que teria claramente impacto importante do ponto de vista clínico nestes pacientes (Gueders et al, 2006).

O conhecimento das repercussões clínicas decorrentes da maior expressão das metaloproteinases e seus inibidores teciduais na Fibrose Pulmonar Idiopática ainda é incipiente. Um dos poucos estudos que avançaram nesta direção foi desenvolvido por Vuorinen e colaboradores

(2007) que encontraram correlação negativa entre os níveis de MMP-7 no lavado bronco-alveolar e a capacidade vital expiratória forçada (CVF) ao estudar sete pacientes com FPI. De todo modo os estudos nessa linha são concordantes em postular que possivelmente uma intervenção terapêutica em alguns dos diversos pontos de interação destas proteínas poderia permitir um controle adequado do processo de remodelamento pulmonar (Gueders et al, 2006).

Uma vez que as alterações presentes na FPI/ UIP e NSIP acometem as porções distais do parênquima pulmonar é sabido que as pequenas vias aéreas não são especificamente poupadas. Porém não existem na literatura vigente estudos histológicos que descrevam quantitativamente as alterações encontradas nas pequenas vias aéreas nos pacientes portadores de PIIs, principalmente em casos de FPI/ UIP e NSIP ou enfatizem a análise da expressão de proteínas atuantes nos processos de remodelamento pulmonares no epitélio bronquiolar nestas entidades.

1.6 HIPÓTESE

As pequenas vias aéreas dos pacientes portadores de Pneumonias Intersticiais Idiopáticas, mais precisamente na Pneumonia Intersticial Usual e Pneumonia Intersticial Não-Específica, apresentam alterações estruturais e inflamatórias e possivelmente participam de forma ativa dos processos de remodelamento do microambiente pulmonar.

2) OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

2.1) Objetivos gerais

a) Estudar as alterações estruturais e inflamatórias nas pequenas vias aéreas em tecido pulmonar obtido através de biópsia de pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática/ Pneumonia Intersticial Usual (FPI/ UIP) e Pneumonia Intersticial Não-Específica (NSIP), comparando-se com tecido pulmonar obtido através de autópsia de pacientes com vias aéreas normais e com tecido pulmonar obtido através de biópsia de pacientes com Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC) - onde há o clássico envolvimento das pequenas vias aéreas.

b) Estudar a expressão protéica de metaloproteinases de matriz, suas inibidoras teciduais e do fator transformador de crescimento – β no epitélio das pequenas vias aéreas de tecido pulmonar obtido através de biópsia de pacientes com FPI/ UIP e NSIP.

2.2) Objetivos específicos

a) Verificar a existência de correlação entre as alterações estruturais, inflamatórias e de expressão de metaloproteinases de matriz, suas inibidoras teciduais e do fator transformador de crescimento - β no epitélio das

pequenas vias aéreas e as informações clínicas, funcionais e radiológicas dos pacientes com FPI/ UIP e NSIP.

b) Identificar alterações morfológicas no parênquima adjacente às vias aéreas estudadas, comparando-as nas entidades patológicas analisadas.

3) MÉTODOS

3.1) Ética

O protocolo de estudo foi submetido à avaliação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e aprovado em 28/07/05 (processo 593/05).

3.2) População estudada

A Clínica de Pneumologia do Hospital das Clínicas da FMUSP possui pacientes que foram ou estão sendo acompanhados no Ambulatório de Doenças Intersticiais Pulmonares com o diagnóstico de Pneumonia Intersticial Idiopática (PII) e que realizaram biópsias de pulmão a céu aberto no período de 1992 a 2004, sendo encaminhadas para a Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Fez-se levantamento retrospectivo das lâminas (coradas em Hematoxilina-eosina) e blocos (fixados com formalina tamponada) dos referidos casos na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP e no Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVOC). Os casos foram divididos nos seguintes grupos:

1) Grupo controle positivo (com alteração já descrita nas PVAs): constituído pelos casos de Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC).

2) Grupo controle negativo (espécimes pulmonares histologicamente preservados): formado de casos sem doença pulmonar, sem história de tabagismo, em indivíduos que foram a óbito por causas não pulmonares e tenham sido submetidos à autópsia no SVOC.

3) Grupo de UIP: composto pelos pacientes com este diagnóstico após reclassificação das biópsias existentes, de maneira multidisciplinar (clínico-radio-patológica), de acordo com o Consenso ATS/ERS 2002.

4) Grupo de NSIP: formado pelos pacientes com este diagnóstico após reclassificação multidisciplinar, de acordo com o Consenso ATS/ERS 2002.

3.2.1) Critérios de inclusão

a) Disponibilidade das informações clínicas, funcionais e radiológicas no prontuário médico.

b) Amostra tecidual pulmonar satisfatória (presença de mais que 10 campos de médio aumento/ 100x) (Rozin et al, 2005).

3.2.2) Critérios de exclusão

- a) Presença de qualquer possibilidade de fator etiológico conhecido.
- b) Doença sistêmica concomitante (em geral Doença Vascular ou do Colágeno).
- c) Biópsia considerada não-classificável segundo os critérios estabelecidos pelo Consenso ATS/ ERS 2002.
- d) Ausência de conclusão diagnóstica após revisão multidisciplinar clínico-radio-patológica.

Todos os diagnósticos foram sustentados pela história, exame físico, testes de função pulmonar e parâmetros radiológicos, sem associação com exposição ambiental a agentes fibrogênicos ou doenças do tecido conectivo.

Os diagnósticos histopatológicos foram ratificados de acordo com os critérios estabelecidos pela classificação do consenso ATS/ ERS, primeiramente com revisão das biópsias pulmonares por dois experientes patologistas e em seguida revisão diagnóstica multidisciplinar clínico-radio-patológica (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

O diagnóstico de FPI foi somente considerado quando os pacientes não apresentavam nenhuma outra causa para doença intersticial pulmonar, com achados microscópicos típicos de padrão de Pneumonia Intersticial Usual e ausência de vasculites, granulomas, ou microorganismos. Casos apresentando extenso “*honeycombing*” (faveolamento) ou padrão histológico duvidoso foram excluídos da análise.

O diagnóstico de NSIP de padrão celular ou fibrótico foi baseado principalmente em achados histológicos em pacientes que tinham um aspecto clínico-radiológico de Doença Pulmonar Parenquimatosa Difusa, com típico padrão histológico de pneumonia intersticial crônica, na qual observou-se expansão homogênea de septos alveolares pela inflamação e/ou fibrose (Visscher e Myers, 2006b). Conforme já exposto, foram excluídos os casos com associação com doença vascular do colágeno manifestadas no diagnóstico ou durante o seguimento, mínimo de dois anos, ou qualquer exposição orgânica associada com o desenvolvimento de Pneumonia de Hipersensibilidade (PH).

Pacientes com Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC) idiopática apresentaram função pulmonar obstrutiva sem causa conhecida e com sinais tomográficos característicos, tais como o padrão em mosaico e biópsia pulmonar demonstrando aspecto de bronquiolite constrictiva sem

fibrose ou inflamação intersticial e sem etiologia evidente ao exame histológico (Visscher e Myres, 2006a).

Os pacientes não foram tratados com corticosteróides ou imunossupressores até o momento da realização da biópsia.

Foram colhidas informações dos prontuários médicos de todos pacientes na Divisão de Arquivo Médico (DAM) do Hospital das Clínicas da FMUSP, seguindo formulário próprio (anexo), e em seguida armazenadas em um banco de dados.

3.3) Processamento tecidual

Todas as amostras de biópsias e/ou de autópsias obtidas na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP e no SVOC foram fixadas em formalina tamponada por 24 horas, embebidas em parafina, seccionadas a 5- μ m de espessura e coradas em hematoxilina-eosina.

3.4) Estudo morfológico: morfometria e análise semiquantitativa

Para as medidas de caráter quantitativo foi utilizado o Software Image-Pro[®] Plus 4.1 for Windows[®] (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA), conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 Color Video Camera,

Victor Company of Japan Limited, Japan) acoplado a um microscópio de luz (Leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Germany).

As medidas morfométricas foram obtidas em cortes transversais de todas as PVAs (definidas como menor que 6mm de perímetro da membrana basal) encontradas nos espécimes de cada caso (Mauad et al, 1999). Os cortes das vias aéreas foram considerados transversais quando a relação entre o menor e o maior diâmetro foi maior que 0,6 (Mauad et al, 2004).

Foram analisadas PVAs em áreas de arquitetura tecidual pulmonar preservada para a adequada identificação dos diferentes compartimentos da via aérea. Pequenas vias aéreas circundadas por extensa fibrose e/ou “*honeycombing*” (faveolamento), quando a distinção de suas camadas não era evidente, foram excluídas da análise.

Satisfazendo-se estes critérios e sem o conhecimento do grupo a que pertencia, em cada caso foram colhidas as medidas quantitativas e semiquantitativas das variáveis estudadas, considerando-se a nomenclatura e os critérios de Bai e colaboradores (1994).

Os seguintes compartimentos das vias aéreas foram acessados: área luminal, área epitelial, área interna da parede (lâmina própria), área do músculo liso da via aérea (camada muscular), área externa da parede

(adventícia) e área total da parede da via aérea (soma de todas as áreas analisadas, exceto a luminal).

O perímetro da membrana basal (PMB) foi obtido de cada via aérea. Somente áreas intactas do epitélio foram avaliadas, isto é, áreas apresentando células basais e colunares.

A área interna da parede (lâmina própria) foi definida como a região compreendida entre a membrana basal e o bordo interno da camada muscular lisa. A área externa da parede (adventícia) foi considerada como a região do bordo externo da camada muscular lisa e o bordo externo da adventícia (definida pela linha média entre o lúmen vascular e o lúmen da Va). A figura 01 ilustra o modo de delimitação destas áreas para aferição morfométrica através do software adotado.

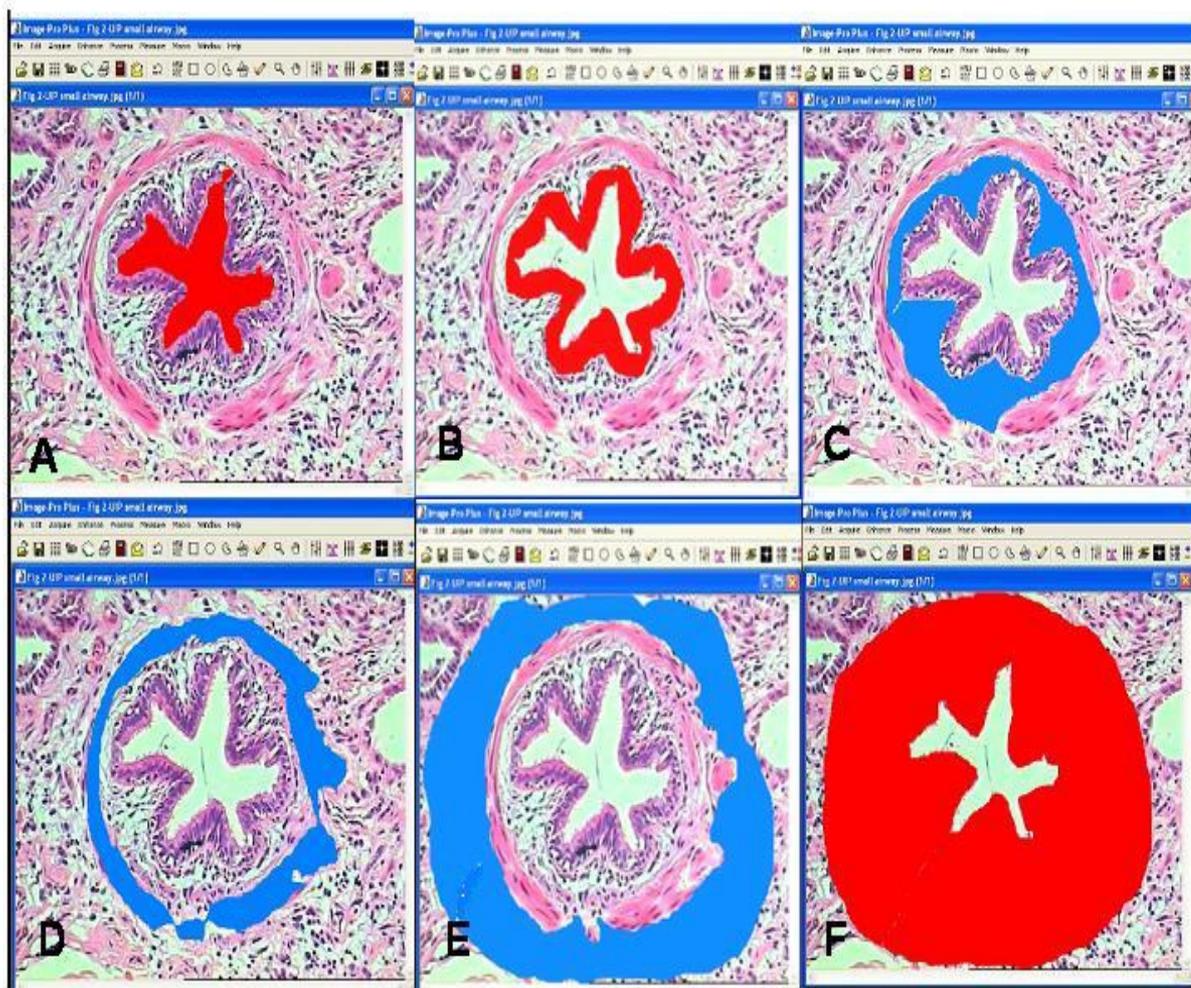


Figura 01. Exemplo de delimitação das áreas dos compartimentos estudados das pequenas vias aéreas através do software adotado. A - marcação da área luminal (em vermelho). B – marcação da área do epitélio (em vermelho). C – marcação da área da lâmina própria (em azul). D – marcação da área da camada muscular lisa (em azul). E – marcação da área da adventícia (em azul) e F – marcação da área total da espessura da via aérea (em vermelho). HE, 200x.

Os valores das áreas obtidas foram expressos como área corrigida pelo perímetro da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). Este procedimento padroniza a análise evitando possíveis variações provenientes de mudanças espaciais dependentes da área do epitélio ou do tamanho da via aérea. Isto ocorre em função do perímetro da membrana basal de uma via aérea ser relativamente constante, a despeito de variações colapsantes ou insuflantes (Bai et al, 1994; Hogg et al, 2004).

Determinou-se a média e o desvio-padrão da espessura total das pequenas vias aéreas nos controles, com a finalidade de comparar com o percentual de vias aéreas espessadas em cada grupo das doenças estudadas. Desta forma, em cada biópsia pulmonar nas doenças estudadas, as vias aéreas que apresentaram uma espessura maior que a média mais o desvio padrão do controle foram consideradas alteradas por esta variável.

Os seguintes parâmetros foram analisados semiquantitativamente: o grau de inflamação da via aérea e do parênquima peribronquiolar e o grau de fibrose peribronquiolar (peribronquiolar definido como o espaço dentro de um campo microscópico de 100x em torno do bronquíolo). Estas variáveis foram graduadas de 0-3 (0- ausente, 1- leve, 2- moderado e 3- intenso).

A presença de tecido de granulação intraluminal (pólipo intraluminal) e de mucostase nas vias aéreas também foi avaliada. No parênquima

peribronquiolar foi analisada a presença de metaplasia epitelial bronquiolar (lambrtose) (Cordier et al, 2007), espaços císticos (faveolamento/ “*honeycombing*”) e tecido linfóide associado ao brônquio (BALT). Os resultados foram expressos como o número de PVAs apresentando as alterações acima mencionadas, em relação ao número total de PVAs analisadas por grupo (%). A figura 02 exhibe alguns exemplos destas variáveis avaliadas. No quadro 01 resume-se as variáveis morfológicas estudadas, suas definições e unidades utilizadas.

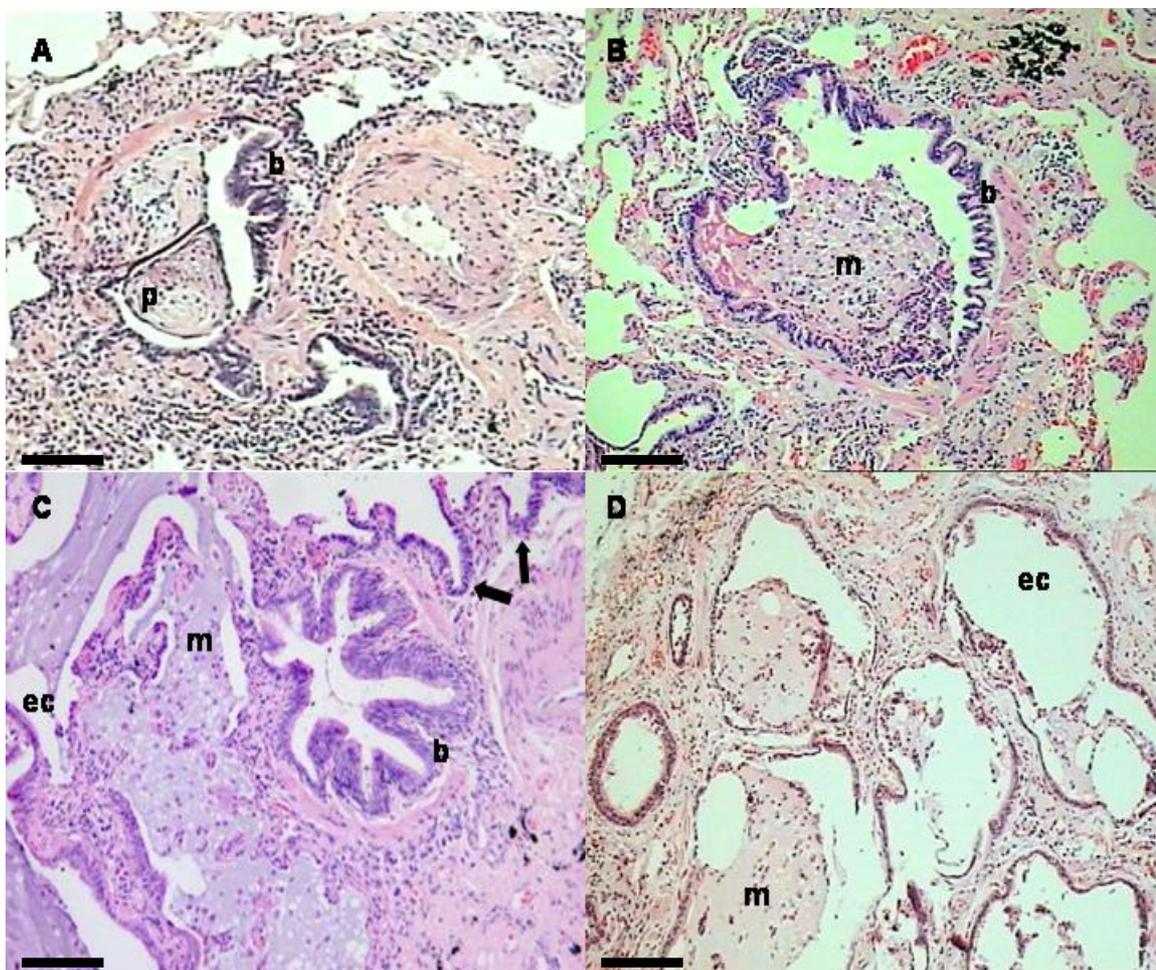


Figura 02. As variáveis categóricas avaliadas nas doenças estudadas são aqui exemplificadas pela presença de pólipos intraluminais (p) em pequena via aérea (b) em caso de Bronquiolite Constrictiva Crônica (A); mucostase (m) em via aérea (b) de Pneumonia Intersticial Não-Específica (B) e em áreas de espaços císticos (ec)/ *honeycombing*/ faveolamento em casos de Pneumonia Intersticial Usual (UIP-C e D). Na UIP (C) são ainda observadas áreas de metaplasia epitelial bronquiolar/ lambertose (setas) na região peribronquiolar como no exemplo. Hematoxilina-eosina, barra de escala= 400µm.

Quadro 01. Variáveis morfológicas semiquantitativas e quantitativas: suas definições e unidades utilizadas.

Variável estudada	Definição
Área do lúmen da via aérea (Al)	Área interna da luz da via aérea (μm^2)
Área do epitélio da via aérea (Aepi)	Área interna à membrana basal menos a Al (μm^2)
Perímetro da membrana basal (PMB)	Comprimento da extensão da mb (μm)
Área da lâmina própria (Alp)	Área entre a MB e a borda interna da muscular (μm^2)
Área da muscular (Am)	Área entre as bordas interna e externa da muscular (μm^2)
Área da adventícia (Aadv)	Área entre a borda externa da muscular e a borda externa da adventícia (definida pela linha média entre o lúmen vascular e o lúmen da Va) (μm^2)
Área total	Soma das seguintes áreas: epitelial+lâmina própria+muscular+adventícia (μm^2)
Grau de inflamação da Va	Graduando-se o infiltrado inflamatório em ausente, leve, moderado ou intenso presente na parede da Va (0, 1, 2 ou 3)
Pólipo luminal	Presença ou ausência de projeção intraluminal/subepitelial de fibroblastos jovens na via aérea (%)
Mucostase	Presença ou ausência de material mucóide intraluminal na via aérea (%)

Quadro 01. Variáveis morfológicas semiquantitativas e quantitativas: suas definições e unidades utilizadas (conclusão).

Variável estudada	Definição
Grau de inflamação do parênquima adjacente	Graduando-se o infiltrado inflamatório em ausente, leve, moderado ou intenso considerando-se concentricamente 1 campo adjacente à Va no aumento de 100x (0, 1, 2 ou 3)
Grau de fibrose do parênquima adjacente	Graduando-se a quantidade de fibrose em ausente, leve, moderado ou intenso considerando-se concentricamente 1 campo adjacente à Va no aumento de 100x (0, 1, 2 ou 3)
Metaplasia peribronquiolar do parênquima adjacente (“Lambertização”)	Presença ou não de substituição do epitélio alveolar por epitélio bronquiolar considerando-se concentricamente 1 campo adjacente à Va no aumento de 100x (%)
Espaços císticos no parênquima adjacente	Presença ou não de dilatação alveolar peribronquiolar (“ <i>honeycombing</i> ”) considerando-se concentricamente 1 campo adjacente à Va no aumento de 100x (%)
Tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) no parênquima adjacente	Presença ou não de BALT considerando-se concentricamente 1 campo adjacente à Va no aumento de 100x (%)

3.5) Imunohistoquímica

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anticorpos monoclonais anti - MMP-2 (A-Gel VC2, 1:2500, LabVision, Fremont/CA), MMP-7 (176-5F12, 1:50, Chemicon, Temecula/CA), MMP-9 (56-2A4, 1:100, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), TIMP-1 (7-6C1, 1:10, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), TIMP-2 (67-4H11, 1:25, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), e policlonal anti-TGF- β (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/CA). Sucintamente, os cortes foram silanizados e hidratados. Uma solução de H₂O₂ 3% foi aplicada por 40 minutos para inibir a atividade de da peroxidase endógena. Realizou-se incubação de uma noite com anticorpo primário; recuperação antigênica foi desenvolvida com citrato e TRIS-EDTA para TIMP-1. O complexo streptavidina-biotina (LSAB + DakoCytomation, Carpinteria, CA, Estados Unidos) foi usado para MMP-7, -9 e TIMP-2. Anticorpos secundários anticamundongo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) foram utilizados depois dos anticorpos primários. Todos os cortes foram corados dentro de uma sessão de coloração, usando anticorpos provenientes de um mesmo lote. Para controle negativo, o anticorpo primário foi omitido e substituído por um igual isótopo (anticorpo controle) de mesma espécie e com solução de bloqueio de peroxidase (PBS) como controle negativo.

A área de coloração positiva para cada anticorpo dentro do epitélio bronquiolar foi determinada por um intervalo de cor. Para este propósito,

diferentes cortes corados com cada anticorpo, tanto quanto os controles negativos, foram usados para alcançar o melhor parâmetro de positividade nos casos, os guias foram checados por três patologistas. Estes procedimentos geraram um arquivo contendo todos os dados da cor selecionada, que em seguida foram aplicados em todos os casos corados com o mesmo anticorpo. Os resultados foram expressos em área epitelial do anticorpo específico corado corrigido pelo perímetro da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). Estudos prévios já validaram esta metodologia. (Mauad et al, 1999; De Boer et al, 2001; Sont et al, 2003).

3.6) Análise estatística

Dados demográficos, clínicos e numéricos foram apresentados como mediana/intervalo interquartil (IQR) ou média/desvio-padrão (DP), dependendo de sua distribuição. Dados numéricos de distribuição não-paramétrica foram transformados em logaritmo (Log) antes da análise. Para comparação dos diferentes grupos de doenças com o grupo controle negativo, o teste T-Student foi realizado, desde que os dados tivessem distribuição normal. Comparação entre os grupos de doenças foi realizada com análise de variância (ANOVA), seguido por teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados provenientes de análise semiquantitativa (inflamação bronquiolar, inflamação do parênquima peribronquiolar e fibrose do parênquima peribronquiolar) foram estudados com Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann Whitney (por serem não-parametricamente distribuídos)

e expressos como mediana e IQR. Para análise de valores categóricos (pólipos intraluminais, mucostase, lambertose e espaços císticos), o teste exato de Fisher foi realizado. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. O pacote estatístico SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, Illinois, Estados Unidos) foi usado para realização das análises.

4) RESULTADOS

4.1) População de pacientes

Foram incluídos no estudo vinte e nove pacientes com diagnóstico de UIP, oito com NSIP (cinco de padrão celular e três de padrão fibrosante) e treze pacientes com BC. Seis pacientes foram excluídos do grupo de NSIP porque apresentaram associação com doença vascular do colágeno durante o seguimento. Dez pacientes autopsiados formaram o grupo controle negativo. Os dados demográficos, clínicos, funcionais e tomográficos são demonstrados na Tabela 1. Pacientes com FPI/UIP foram significativamente mais velhos que todos os outros grupos de doenças estudados ($p= 0,02$). Não houve diferença entre os grupos de doenças estudados em relação à frequência de tabagismo, sendo encontrados 55,2% de história positiva de fumo na UIP, 37,5% na NSIP e 46,2% na BC. Pacientes com BC apresentaram um VEF_1 ($p= 0,01$), VEF_1/CVF ($p= 0,001$) e um valor % predito do fluxo expiratório forçado entre 25%-75% do CVF ($FEF_{25-75\%}$) ($p= 0,003$) significativamente menores que todos os outros grupos de doenças estudados. Não houve diferença significativa na duração dos sintomas (até a biópsia) entre os grupos.

Tabela 01. Aspectos demográficos, clínicos, funcionais e tomográficos dos pacientes incluídos no estudo.

	UIP (n=29)	NSIP (n=8)	BC (n=13)	Controle(n=10)
Idade(anos)/Sexo	66 (49-80)/18	56* (38-69)/3	53* (31-61)/7	54* (44-63)/5
[média(amplitude)/Masculino]				
História de tabagismo+	16 (55,2%)	3 (37,5%)	6 (46,2%)	0 (0%)
Duração dos sintomas (meses) ^a	12 (16)	12 (30)	5 (9,5)	-----
CVF % predito ^b	70,6±15,1	69,8±21,5	55,8±25,7	NA
VEF ₁ % predito	79,5±15,8 [#]	78,5±26,9 [#]	48,3±31,2	NA
VEF ₁ /CVF razão	0,87±0,07 [#]	0,87±0,05 [#]	0,64±0,18	NA
FEF _{25-75%} % predito	117,3±53,1 [#]	89,7±21,9	39,3±36,4	NA
Local tomográfico das lesões				NA
Central	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	
Periférico	13 (45%)	2 (25%)	5 (38,5%)	
Difuso	16 (55%)	5 (62,5%)	8 (61,5%)	
Padrão tomográfico das lesões				NA
Opacidades reticulares	17 (58,6%)	1 (12,5%)	1 (7,7%)	
Atenuação em vidro-fosco	7 (24%)	6 (75%)	2 (15,4%)	
Atenuação em mosaico	4 (14%)	1 (12,5%)	9 (69,2%)	
Consolidação	1 (3,4%)	0 (0%)	1 (7,7%)	
Faveolamento	20 (69%)	2 (25%)	1 (8%)	

* p < 0,05 em relação a UIP.

+ Fumantes e ex-fumantes.

^a Duração dos sintomas expressos como mediana (IQR).

^b Testes de função pulmonar expressos como média ± Desvio-padrão.

p < 0,05 em relação a BC.

Abreviações: BC= Bronquiolite Constrictiva Crônica; CVF= capacidade vital forçada; FEF_{25-75%}= fluxo expiratório forçado entre 25%-75% do CVF; NA= Não avaliado; NSIP= Pneumonia Intersticial Não-Específica; UIP= Pneumonia Intersticial Usual; VEF₁= volume expiratório forçado no 1º segundo.

4.2) Dados categóricos e semiquantitativos

Espécimes biopsiados incluíram 1-3 lâminas por paciente, retirados de áreas pulmonares com diferente envolvimento pela doença. Um total de 409 pequenas vias aéreas foram analisadas, sendo 168 nas biópsias de UIP (6/caso), 29 nas NSIP (4/caso), 74 na BC (6/caso) e 138 no grupo controle (14/caso).

Exemplos representativos das patologias estudadas são apresentados na Figura 03. Os dados semiquantitativos e categóricos são demonstrados na Tabela 2. Todos os grupos de doença apresentaram inflamação bronquiolar e do parênquima peribronquiolar mais intensas, assim como fibrose do parênquima peribronquiolar em relação ao grupo controle ($p= 0,0001$). Quando os grupos das doenças foram comparados entre si, pacientes com UIP apresentaram menores níveis de inflamação bronquiolar que NSIP e BC ($p= 0,01$). A inflamação peribronquiolar foi mais proeminente em pacientes com NSIP, os quais foram diferentes significativamente de todos os outros grupos de doenças ($p= 0,0001$). Houve mais fibrose do parênquima peribronquiolar na UIP e NSIP que nos casos de BC ($p= 0,0002$).

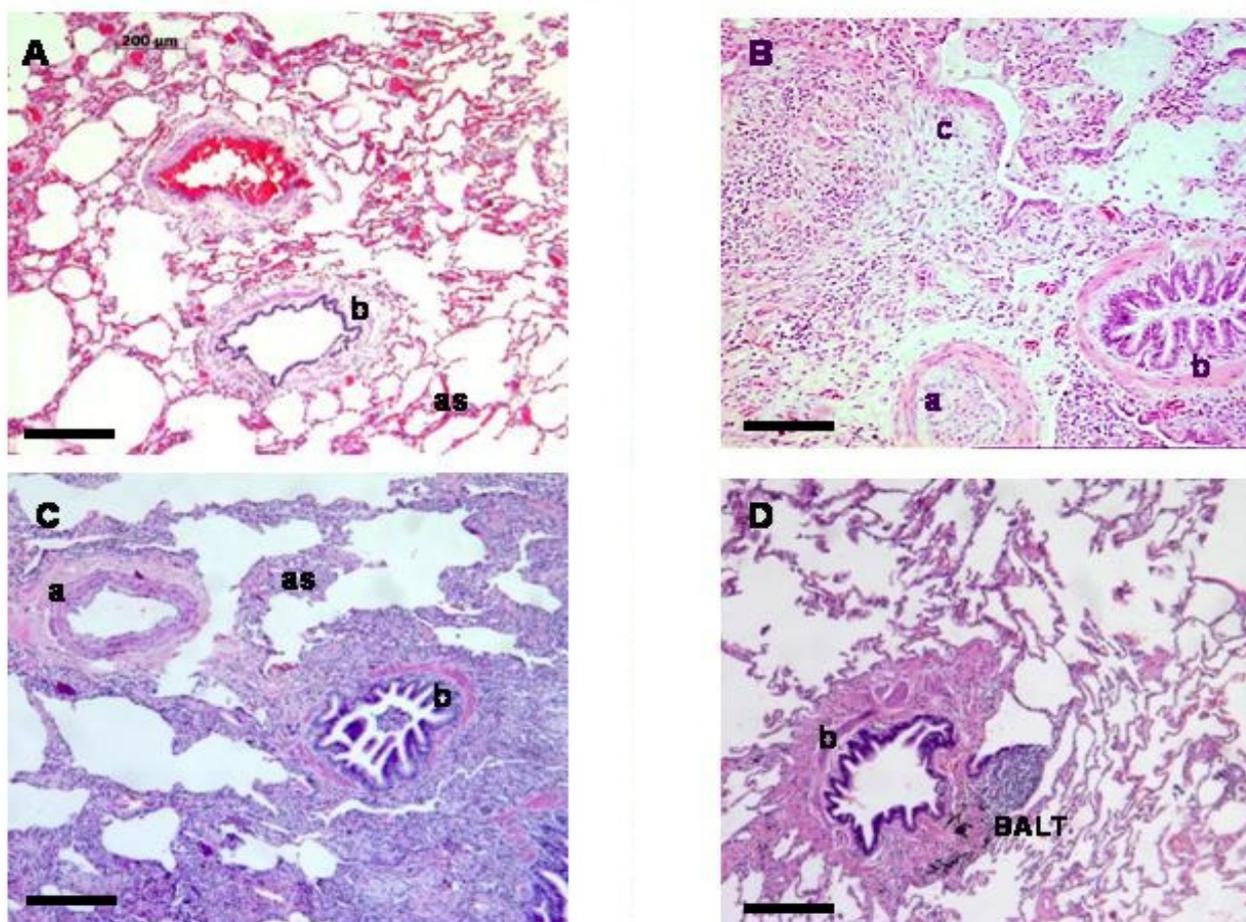


Figura 03. Exemplos representativos de vias aéreas no controle (A) e de envolvimento de vias aéreas na Pneumonia Intersticial Usual (UIP-B), Pneumonia Intersticial Não-Específica (NSIP-C) e casos de Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC-D). Há um grau variável de inflamação e fibrose das pequenas vias aéreas na UIP, NSIP e BC, com proeminente inflamação na NSIP e fibrose de via aérea na UIP e BC. Note o foco fibroblástico (c) e o espessamento da parede arterial (a) na UIP (B). A NSIP (C) mostra o típico espessamento homogêneo dos septos alveolares (as) devido a exuberante inflamação. A parede bronquiolar (b) está espessada devido à fibrose com formação de Tecido Linfóide Associado ao Brônquio (BALT) na BC (D). Os septos alveolares (as) são normais em A. Hematoxilina-eosina, A-D, barra de escala= 200μm.

Quando comparados aos controles, os grupos de doenças mostraram maior grau de mucostase, metaplasia epitelial bronquiolar (lambertose), espaços císticos (faveolamento) e BALT ($p= 0,03$). Pacientes com BC tiveram mais pólipos intraluminais que os controles ($p= 0,04$). Quando os grupos de doenças foram comparados entre si, não houve diferença significativa na frequência de pólipos intraluminais. Houve menos metaplasia epitelial bronquiolar em pacientes com Bronquiolite Constrictiva Crônica que pacientes com NSIP e UIP ($p= 0,0001$). Como esperado, pacientes com UIP tiveram mais espaços císticos no parênquima peribronquiolar que os outros grupos de doenças ($p= 0,003$). Dados apresentados na Tabela 2.

4.3) Dados morfométricos (quantitativos)

O perímetro da membrana basal foi 2216,5 ($\pm 783,1$) μm no grupo de UIP, 1831,8 ($\pm 406,2$) μm no grupo NSIP, 1602,3 ($\pm 494,1$) μm nos casos de BC e 1594,1 ($\pm 415,1$) μm nos controles. Apesar de todas as vias aéreas medidas serem classificadas como pequenas; isto é, com membrana basal (MB) menor que 6 mm, a média do perímetro da MB nos casos de UIP e NSIP foi maior que nos pacientes controles e nos casos de UIP também foi maior que nos pacientes com BC ($p= 0,03$). De acordo com Weibel, a média do diâmetro da via aérea correspondeu a bronquíolos da 14^o-15^o geração, ou seja, bronquíolos terminais, em todos os grupos estudados (1997).

Todos os grupos estudados apresentaram áreas luminais menores que os controles ($p= 0,0001$). Dados apresentados na tabela 3.

Tabela 02. Dados histopatológicos semiquantitativos e categóricos estudados.

Variável	UIP	NSIP	BC	Controle
Inflamação Bronquiolar ^a	1,25 (0,43) *	1,55 (0,87) *#	1,5 (1,05) *#	0,00 (0,05)
Inflamação do parênquima peribronquiolar ^a	1,50 (0,92) *	2,41 (0,85) *#	1,0 (1,17) *# +	0,00 (0,00)
Fibrose do parênquima peribronquiolar ^a	1,40 (1,00)*	2,00 (2,20) *	0,4 (0,75) *# +	0,00 (0,00)
Mucostase ^b	60 (35,7%)*	7 (24,1%)*	17 (23%)*	3 (2,2%)
Pólipos intraluminais ^b	2 (1,2%)	0	3 (4,1%)*	0
Metaplasia epitelial bronquiolar ^b	94 (56%)*	19 (65,5%)*	17 (23%)*# +	0
Espaços císticos ^b	58 (34,5%)*	2 (6,9%)* #	8 (10,8%)* #	0
BALT ^b	81 (48,2%)*	9 (31%)*	32 (43,2%)*	19 (13,8%)

^a Dados semiquantitativos.

* $p < 0,05$ em relação ao Controle.

$p < 0,05$ em relação a UIP.

+ $p < 0,05$ em relação a NSIP.

^b Dados categóricos.

Abreviações: BALT= Tecido Linfóide Associado ao Brônquio; BC= Bronquiolite Constrictiva Crônica; NSIP= Pneumonia Intersticial Não-Específica; UIP= Pneumonia Intersticial Usual.

NOTA: As variáveis semiquantitativas foram avaliadas por escore como 0-3 (ausente, leve, moderado, severo) e expressos como mediana e intervalo interquartil (IQR). Os dados categóricos são expressos como o número de vias aéreas apresentando a variável analisada em relação ao número total de vias aéreas estudadas por grupo, em porcentagem.

Pacientes com UIP apresentaram aumento das áreas de todos os compartimentos da via aérea, ou seja: do epitélio, da lâmina própria, da muscular, da adventícia e da área total em relação ao grupo controle ($p=0,02$). Nos pacientes com NSIP, houve o aumento somente da área do epitélio comparado com os controles ($p=0,02$). Pacientes com BC demonstraram aumento da área da lâmina própria em relação aos controles ($p=0,04$).

Quando as doenças estudadas foram comparadas entre si, não se verificaram diferenças significantes entre os compartimentos da via aérea, exceto pela área da adventícia que foi maior na UIP que na NSIP e BC ($p=0,04$), e a área total que foi maior na UIP em relação a BC ($p=0,04$). Estes dados são apresentados na Tabela 3.

Nas doenças estudadas o percentual de pequenas vias aéreas que apresentaram uma espessura maior que a média mais o desvio padrão da espessura da via aérea do controle foi de 48,8% (82 vias aéreas de 168 analisadas) na UIP; 41,4% (12 vias aéreas de 29 analisadas) na NSIP e 32,4% (24 vias aéreas de 74 analisadas) na Bronquiolite Constrictiva Crônica.

Tabela 03. Dados morfométricos na estrutura da pequena via aérea.

	UIP	NSIP	BC	Controle
Área luminal	37,9*±32,2	26,6*±13,7	25,4*±11,3	80,2±28,4
Área epitelial	23,6*±8,3	23,3*±7,8	21,3±9,3	14,8±5,8
Área da lâmina própria	23,4*±11,4	18,4±12,8	18,5*±12,0	10,7±5,7
Área da camada muscular	28,5*±14,1	25,9±18,5	23,3±16,1	19,4±7,9
Área da camada adventícia	71,3*±36,2	40,2#±15,2	46,4#±25,6	34,2±15,4
Área total	147,0*±60,3	108,0±39,1	109,7#±58,1	79,2±29,5

*p < 0,05 em relação ao Controle.

#p < 0,05 em relação a UIP.

Abreviações: BC= Bronquiolite Constrictiva Crônica; NSIP= Pneumonia Intersticial Não-Específica; UIP= Pneumonia Intersticial Usual.

NOTA: Valores expressos como média ± desvio-padrão da área (μm^2) corrigida pelo perímetro da membrana basal (μm).

4.4) Imunohistoquímica

Em alguns casos os blocos de parafina não se encontravam disponíveis ou não havia material histológico suficiente para novos recortes; desse modo a análise imunohistoquímica foi realizada em um número menor de casos (Tabela 4).

Nos controles, TGF- β foi expresso no epitélio bronquiolar e no músculo liso vascular, enquanto nos grupos das doenças estudadas, células inflamatórias e pneumócitos alveolares também foram positivos. MMP-2 estava expressa no epitélio das pequenas vias aéreas e células mesenquimais, endotélio e macrófagos, tanto nos controles como nas entidades patológicas estudadas. Nos controles, MMP-7 foi fracamente expressa no epitélio bronquiolar e macrófagos. Nos grupos das doenças, especialmente nos casos de UIP, houve marcante expressão no epitélio bronquiolar, células mesenquimais, pneumócitos reativos e vasos. MMP-9 foi expressa em neutrófilos, macrófagos e fracamente no epitélio das pequenas vias aéreas dos controles, com expressão mais forte no epitélio bronquiolar, células endoteliais e pneumócitos nos outros grupos. TIMP-1 e -2 foram expressas em células inflamatórias, principalmente macrófagos, e em vasos (músculo liso e variável no endotélio). Estas proteínas foram fracamente expressas no epitélio bronquiolar em todos os grupos analisados. Nos

grupos de doenças, a maior expressão foi observada em pneumócitos reativos e células mesenquimais.

Tabela 04. Expressão de Fator Transformador de Crescimento - β (TGF- β), Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Inibidor Tecidual de Metaloproteinases (TIMP) no epitélio das pequenas vias aéreas.

	UIP (n=11)	NSIP (n=5)	BC (n=9)	Controle (n=10)
TGF- β	1,38 \pm 1,2	0,83 \pm 0,4	1,11 \pm 0,7	0,89 \pm 0,7
MMP- 2	0,49* \pm 0,3	0,39 \pm 0,3	1,00* \pm 0,6	0,67 \pm 0,4
MMP- 7	10,21* \pm 7,7	8,60* \pm 4,9	5,59* \pm 5,4	1,42 \pm 1,6
MMP- 9	8,19* \pm 5,5	7,51* \pm 4,0	6,46* \pm 4,3	0,06 \pm 0,0
TIMP- 1	2,87 \pm 2,7	2,28 \pm 1,3	4,95 \pm 2,7	2,13 \pm 0,9
TIMP- 2	3,37 \pm 3,5	1,83 \pm 1,8	3,72* \pm 3,8	0,79 \pm 0,6

*p< 0,05 em relação ao Controle.

*p< 0,05 em relação a NSIP.

Abreviações: BC= Bronquiolite Constrictiva Crônica; MMP= Metaloproteinase de Matriz; NSIP= Pneumonia Intersticial Não-Específica; TGF- β = Fator Transformador de Crescimento - β ; TIMP= Inibidor Tecidual de Metaloproteinase; UIP= Pneumonia Intersticial Usual.

NOTA: Valores expressos como média \pm desvio-padrão da área epitelial positiva/perímetro da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

Quando comparados ao controle, todos os grupos de doenças estudados demonstraram expressão aumentada de MMP-7 ($p= 0,02$) e MMP-9 ($p= 0,0002$) no epitélio bronquiolar (Figura 04). Houve uma expressão aumentada de TIMP-2 em pacientes com BC, em relação aos controles ($p= 0,02$). Pacientes com UIP apresentaram uma expressão diminuída de MMP-2 no epitélio bronquiolar quando comparados aos controles ($p= 0,04$). Não foram encontradas diferenças significativas na expressão de TGF- β e TIMP-1 entre os grupos analisados. Estes dados são exibidos na Tabela 4.

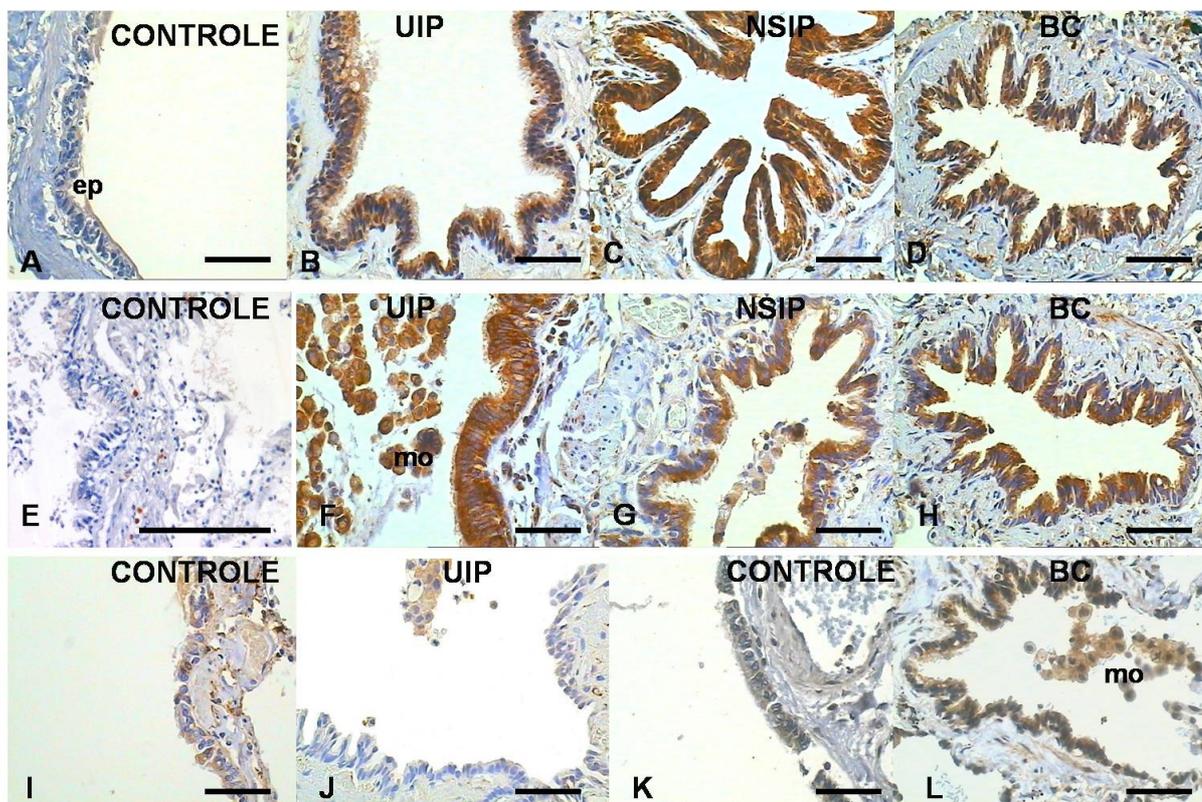


Figura 04. (A-D) Há uma expressão aumentada no epitélio da pequena via aérea (ep) de Metaloproteinase de Matriz (MMP) -7 na Pneumonia Intersticial Usual (UIP- B), Pneumonia Intersticial Não-Específica (NSIP- C) e Bronquiolite Constrictiva Crônica (BC- D) em relação aos Controles (Controle- A). (E-H) Expressão epitelial bronquiolar de MMP-9 está também aumentada na UIP (F), NSIP (G) e BC (H) quando comparados ao Controle (E). Células inflamatórias esparsas e macrófagos intraluminais (mo) estão positivos para MMP-7 e MMP-9. (I-J) Observa-se expressão epitelial diminuída de MMP-2 na pequena via aérea da UIP (J) quando comparada ao Controle (I). (K-L) Os casos de BC (L) apresentaram expressão aumentada de Inibidor Tecidual Metaloproteinase (TIMP) -2 no epitélio da pequena via aérea quando comparados ao Controle (K). Barra de escala= 25 μ m.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os diversos parâmetros estudados e a história de tabagismo em todos os grupos de doenças analisados.

O Log da expressão de Matrilisina (MMP-7) no epitélio bronquiolar correlacionou-se significativamente com o Log do valor % predito do FEF_{25-75%} ($r= 0,83$, $p= 0,01$) nos pacientes com UIP (Figura 5). Não foram identificadas outras correlações entre os parâmetros patológicos e clínico-funcionais estudados.

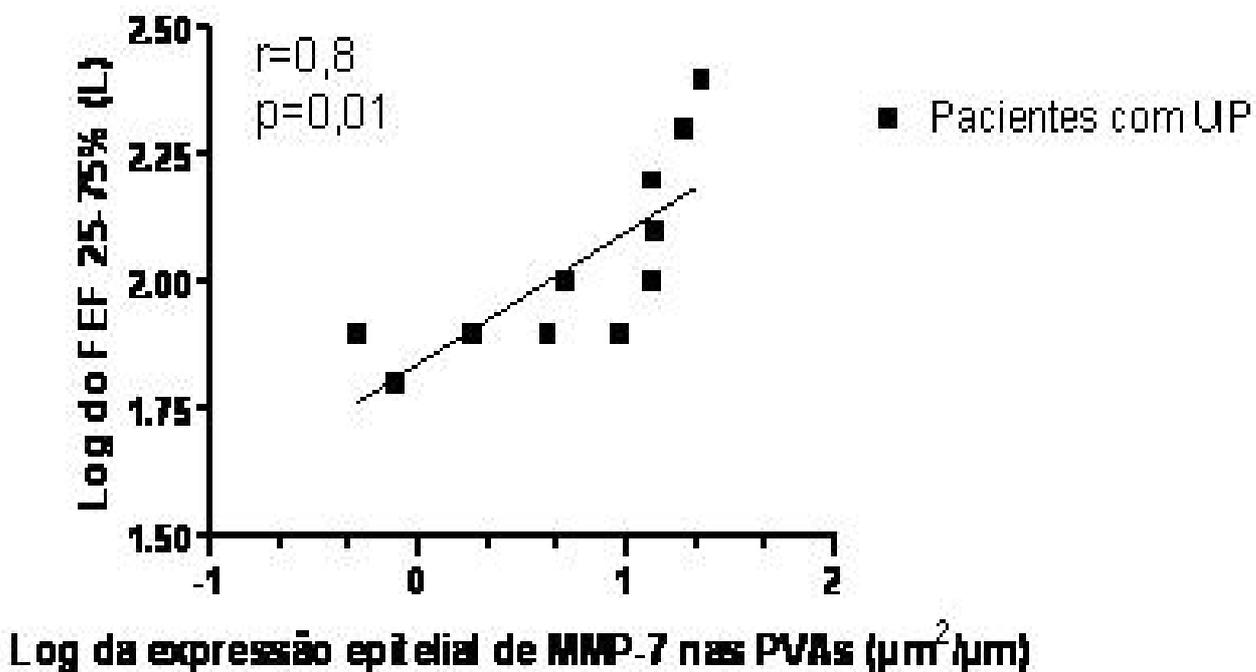


Figura 05. Gráfico da correlação entre o logaritmo (Log) da expressão de Metaloproteínase de Matriz-7 (Matrilisina/ MMP-7) no epitélio das pequenas vias aéreas (PVAs) dos pacientes com Pneumonia Intersticial Usual (UIP) e o Log do valor % predito do fluxo expiratório forçado entre 25%-75% da capacidade vital forçada (FEF_{25-75%}).

5) DISCUSSÃO

Os achados aqui expostos demonstram que alterações significativas estão presentes ao nível das pequenas vias aéreas em pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática/ Pneumonia Intersticial Usual e Pneumonia Intersticial Não-Específica. Este estudo acrescenta informação original ao relatar quantitativamente uma expressão aumentada de MMP-7 e MMP-9 no epitélio bronquiolar, sugerindo que as PVAs podem participar dos eventos patogênicos que levam ao remodelamento pulmonar nas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas.

Este é o primeiro estudo analisando quantitativamente o envolvimento das pequenas vias aéreas nas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas classificadas de acordo com o atual Consenso ATS/ERS (2002). Escassos estudos similares estão entre os anos 70 e 90 (Fulmer et al, 1977; Myre et al, 1988; Padilla et al, 1996) e analisaram histologicamente as PVAs somente através de escores semiquantitativos. A maioria destas pesquisas incluiu pacientes que, à luz do conhecimento corrente, provavelmente apresentaram distúrbios fibróticos pulmonares distintos ou tiveram pneumonias associadas com outras condições clínicas, como as doenças vasculares do colágeno. No estudo de Fulmer e colaboradores (1977), por exemplo, cinco de 18 pacientes possuíam menos de 40 anos de idade, tornando o diagnóstico de FPI/ UIP nestes indivíduos bastante improvável.

Até o momento, o presente trabalho é o primeiro estudo a avaliar o envolvimento das PVAs nos casos de NSIP. Esta é ainda uma categoria provisória, muito provavelmente representando um padrão histopatológico comum a diferentes doenças intersticiais pulmonares (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002). Foram incluídos somente pacientes com a forma idiopática da doença para evitar influências de alguma doença sistêmica e/ou local sobreposta e com repercussão pulmonar. Os resultados quantitativos e semiquantitativos aqui encontrados indicam que alterações estruturais das PVAs mais proeminentes parecem ocorrer nos pacientes com UIP que nos casos de NSIP. É interessante observar que, a intensidade de inflamação da via aérea foi menor nos casos de UIP. Conforme esperado, o componente inflamatório foi mais proeminente nos casos de NSIP e com uma magnitude semelhante a Bronquiolite Constrictiva Crônica ao nível da via aérea e aumentada ao nível do parênquima peribronquiolar.

No interstício pulmonar, é bem conhecido que os casos de NSIP podem ter um componente inflamatório alveolar mais exuberante que na UIP (American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; Flaherty e Martinez, 2006). É possível especular que as mudanças nas pequenas vias aéreas ocorram paralelamente às mudanças alveolares nos pacientes com NSIP e UIP (Padilla et al, 1996). É muito comum que as alterações nas PVAs sejam mais intensamente presentes em áreas de extenso comprometimento do parênquima e relacionadas a áreas de

bronquiectasias/bronquiolectasias de tração observadas em tomografias pulmonares, conforme mencionado anteriormente (Johkoh et al, 1999; Wilcox, 2000). Neste estudo foram analisadas as PVAs de áreas mais preservadas do pulmão, evitando regiões com intensa fibrose e distorção pulmonares, pois áreas com destruição estrutural severa impossibilitariam a identificação adequada de todos os compartimentos da via aérea.

Neste contexto, considerando-se também o fato de que somente nas PVAs do grupo UIP é que todos os compartimentos apresentaram áreas alteradas em relação ao controle, nossos dados apontam para a possibilidade que o envolvimento da pequena via aérea ocorra como parte da patogênese da doença e não somente relacionada aos possíveis efeitos do tabagismo, exposições pregressas, doença vascular do colágeno, ou ainda decorrente meramente da expansão fibrosa do parênquima.

Corroborando com estas análises, observamos que ao compararmos doenças tidas como de acometimento fundamentalmente de interstício-pulmonar (UIP e NSIP) com uma doença clássica de via aérea como a BC encontramos poucas diferenças significativas em relação aos parâmetros quantitativos e qualitativos estudados nas pequenas vias aéreas.

A detecção da expressão imunohistoquímica de MMP-7 e -9 aumentadas no epitélio das PVAs sugere que o revestimento epitelial bronquiolar pode contribuir nos eventos do remodelamento ocorridos nas

Pneumonias Intersticiais Idiopáticas. Recentemente, em um modelo experimental de fibrose induzida por bleomicina, Wu e colaboradores (2007) demonstraram que células epiteliais brônquicas têm a capacidade de passar por uma transição para o epitélio mesenquimal, reforçando a idéia que o epitélio bronquiolar pode contribuir para a expansão mesenquimal da fibrose pulmonar.

Selman e colaboradores estudando a distribuição de Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e das Inibidoras Teciduais das Metaloproteinases (TIMPs) em lavado bronco-alveolar e biópsias pulmonares de 12 pacientes com FPI/ UIP constataram uma maior expressão de TIMPs comparadas as Colagenases (MMP-1 e -8) no parênquima, sugerindo que na FPI/ UIP existiria a predominância de um microambiente não degradativo (com pouca quebra de proteínas como o colágeno, por exemplo). A expressão aumentada de MMPs sem um aumento associado de TIMPs e TGF- β ao nível bronquiolar na FPI/ UIP e NSIP, pode sugerir que, possivelmente ao contrário do ocorreria no parênquima, um ambiente indutor de degradação de elementos da matriz extracelular prevaleceria ao nível do epitélio bronquiolar nestas doenças (2000).

Em conformidade com os resultados aqui explanados, alguns trabalhos pregressos usando análise semiquantitativa em um pequeno número de pacientes com FPI/ UIP também não demonstraram expressão

significativa de TGF- β no epitélio das pequenas vias aéreas (Khalil et al, 1991). É possível que sua atuação central no fenômeno de remodelamento/fibrogênese pulmonar, diferentemente das metaloproteinases, esteja restrita ao compartimento do parênquima alveolar.

MMP-7 (Matrilisina) tem sido implicada como um possível mediador da fibrose pulmonar e o gene desta proteína é um dos genes que mais fazem a distinção entre pulmões normais e fibróticos (Dunsmore et al, 1998; Zuo et al, 2002; Selman et al, 2006).

As expressões protéicas de MMP-2 (Gelatinase A) e MMP-9 (Gelatinase B) são também consistentemente elevadas no parênquima pulmonar da UIP e NSIP (Selman et al, 2000; Suga et al, 2000; Selman et al, 2006). Aqui também foi demonstrado que a expressão imunohistoquímica de MMP-7 e MMP-9 no epitélio bronquiolar é similarmente elevada na UIP e NSIP. Isto se apresenta de acordo com achados recentemente postulados por Vuorinen e colaboradores (2007), que encontraram níveis semelhantes de MMP-7 no lavado bronco-alveolar de pacientes com UIP, sarcoidose e NSIP. Matrilisina pode ter um papel duplo nas doenças pulmonares intersticiais, assim como em outras situações de injúria pulmonar (como visto nos casos de BC aqui estudados), contribuindo para degradação da matriz e/ou podendo também estar envolvida na migração celular epitelial e reparo tanto no interstício como na via aérea (Parks et al, 2001; Cosgrove et al, 2002).

É interessante destacar que neste estudo encontrou-se uma correlação positiva entre o Log do valor % predito do $FEF_{25-75\%}$ e o Log da expressão bronquiolar de MMP-7 nos casos de UIP. Este achado se apresenta divergente a um dos poucos trabalhos que encontraram alguma correlação entre parâmetros funcionais e expressão de MMPs ou TIMPs em pacientes com PIs. Vourinen e colaboradores demonstraram (através de teste imunoenzimático/ Elisa) que quanto maior a expressão de Matrilisina no lavado broncoalveolar, menor o CVF de pacientes com FPI/ UIP, postulando que a expressão de MMP-7 é um marcador de distúrbios pulmonares (2007). Conforme mencionado anteriormente, o papel das MMPs é amplo e complexo pelas diversas interações enzimáticas existentes e inespecificidade de ações de seus fatores reguladores. Este aspecto associado às peculiaridades funcionais das doenças intersticiais, que serão novamente discutidas adiante, dificulta quaisquer reais conclusões quanto a estes achados. Entretanto podemos especular que a provável existência de um microambiente predominantemente degradativo ao nível das PVAs (sugerido pelo aumento de MMPs), poderia determinar uma repercussão maior das ações do parênquima pulmonar, principalmente no que diz respeito ao aumento da retração elástica pulmonar, embora tenha sido demonstrada diminuição da área luminal das vias aéreas estudadas. Em outras palavras, ao se avaliar um parâmetro que registra uma média de fluxo expiratório, a destruição de matriz extracelular nas PVAs possivelmente torna menor o tônus de suas espessadas paredes (como aqui evidenciado) e

intensifica o maior efeito da retração elástica associado à diminuição do volume pulmonar, mantendo a patência das PVAs e permitindo um FEF_{25-75%} mais preservado.

Pacientes com UIP apresentaram uma expressão epitelial bronquiolar diminuída de MMP-2 (Gelatinase A) quando comparados aos controles. As razões para este achado não estão claras, mas poderiam estar relacionadas à progressão da doença na FPI/ UIP. Em modelos animais de fibrose induzida por bleomicina existe uma atividade e expressão precoces das gelatinases que são progressivamente substituídas por uma elevação de seus inibidores (Manoury et al, 2006; Oggionni et al, 2006). Além disso, um estudo recente com ratos de faixa etária mais avançada demonstrou uma atividade pulmonar diminuída de MMP-1 e MMP-2 quando comparada a animais mais jovens (Calabresi et al, 2007). Considerando-se que os pacientes com FPI/ UIP foram significativamente mais velhos que os pacientes do grupo controle, a expressão diminuída de MMP-2 poderia estar relacionada com a idade.

Tabagismo parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de fibrose pulmonar (Rosas et al, 2007) e alguns dos pacientes incluídos nesta pesquisa eram fumantes ou ex-fumantes. Todos os grupos foram comparados para checar qualquer influência do cigarro nestes achados, entretanto nenhuma diferença significativa nos diversos parâmetros analisados foi encontrada. É possível que a influência do fumo na patologia

da pequena via aérea seja mais evidente nas fases mais precoces das doenças que nas fases avançadas, como presente nestes pacientes.

Estudos prévios em pacientes com transplante pulmonar associado a bronquiolite obliterante têm mostrado níveis elevados de MMPs e TIMPs no fluido broncoalveolar e no epitélio alveolar, sugerindo um papel para estas proteínas como possíveis marcadores de doença (Fukuda et al, 1998; Suga et al, 2000). Mais recentemente, Chen e colaboradores postularam a existência de expressão aumentada co-localizada de TIMP-1 e Matrilisina (MMP-7) também nas vias aéreas de pacientes submetidos a transplante pulmonar cursando com bronquiolite (2008). No presente trabalho foi evidenciado que em pacientes com BC idiopática existe uma expressão aumentada de MMP-7, MMP-9 e TIMP-2 no epitélio bronquiolar, sugerindo que estas proteínas possam estar envolvidas na patogênese da doença nestas entidades.

Um recente estudo em pacientes com fibrose pulmonar familiar com doença pulmonar intersticial precoce constatou que alguns destes pacientes exibiram biópsias de pulmão com doença intersticial com acometimento histológico das PVAs, assim como a Pneumonia Organizante e Pneumonite de Hipersensibilidade (PH) (Rosas et al, 2007). Em pacientes com PH crônica, a presença de alterações estruturais e inflamatórias nas PVAs é parte intrínseca da definição desta entidade patológica (Padilla et al, 1996; Lacasse et al, 2003). Apesar das anormalidades ventilatórias restritivas

predominarem nas alterações funcionais da PH, sinais de obstrução das vias aéreas têm sido descritos como um achado funcional frequente a longo termo nos pacientes com alguns tipos específicos de PH como, por exemplo, nas relacionadas a atividade agrícola, os chamados “pulmões de fazendeiro” (Erkinjuntti-Pekkanen et al, 1997; Chetta et al, 2004). Previamente, Myre e colaboradores (1988) detectaram sinais de obstrução de vias aéreas periféricas e fibrose peribrônquica em 8 de 11 biópsias de pacientes com estágio precoce de FPI/ UIP. Estes dados apontam que o envolvimento das PVAs já pode ocorrer em fases precoces da doença, podendo ter importantes implicações patogénicas.

Quais seriam as implicações clínicas destes achados? A relação da estrutura-função nas pequenas vias aéreas nas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas ainda não está bem esclarecida. Os resultados espirométricos controversos relatados na função das PVAs são comumente explicados pela heterogeneidade dos pacientes estudados, distribuição irregular das lesões, diferenças na idade, diagnóstico clínico, tabagismo e métodos de avaliação funcional pulmonar (Chung e Rhee, 1997). É interessante notar que apesar do espessamento da parede das vias aéreas com diminuição significativa dos seus lumens, desta vez detectados morfometricamente, os pacientes com FPI/ UIP e NSIP deste estudo não exibiram funcionalmente de forma clara este acometimento, ao menos pelos métodos convencionais de aferição da função pulmonar e que são preconizados pela “*European Respiratory Society*” (1993).

Aqui se observa que as alterações estruturais das pequenas vias aéreas nas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas parecem afetar diferentes percentagens de vias aéreas, podendo contribuir para explicar a falta de achados funcionais. Um fenómeno funcional semelhante é descrito na síndrome do enfisema e fibrose combinados, caracterizados por espirometria subnormal ou normal a despeito de enfisema e fibrose severos nos estudos de imagem (Cottin et al, 2005; Jankowich et al, 2008).

Fibrose alveolar difusa promove restrição ventilatória severa e diminuição da complacência e volume pulmonares. A extensão da fibrose para o tecido peribronquiolar possivelmente determina uma diminuição da complacência da via aérea e perda da interdependência bronquíolo-parênquima. Em doenças pulmonares obstrutivas, mudanças funcionais, como o aprisionamento do ar no VEF₁, resultam de complacência pulmonar normal ou aumentada e distensão tecidual associada com pressão de recolhimento elástico reduzida. É possível que fibrose alveolar severa determine tanto uma diminuição da complacência e volume pulmonares como uma pressão de recolhimento elástico aumentada. Neste caso, o efeito obstrutivo da fibrose da via aérea seria mascarado pela restrição pulmonar. Além do mais, tem sido aventado que a força retrátil aumentada observada em pulmões fibróticos manteria a patência das PVAs *in vivo* (Ostrow e Cherniack, 1973; Schofield et al, 1976; Tan e Tashkin, 1981; Chung e Rhee, 1997; Wilcox, 2000). Possivelmente uma avaliação funcional mais detalhada,

direcionada às pequenas vias aéreas poderia demonstrar melhor as mudanças fisiológicas secundárias a estas importantes alterações morfológicas.

Certamente o presente estudo apresenta limitações. É difícil o acesso a tecido pulmonar normal em pacientes não-fumantes, por isso optou-se por amostras de pulmões provenientes de autópsias como controle. É sabido que mudanças teciduais *post-mortem* podem ter alguma influência nos achados deste estudo, como por exemplo, na expressão de algumas proteínas pela imunohistoquímica. Entretanto, houve extremo rigor com os procedimentos de processamento deste material, com o tempo e fixação adequados com a finalidade de evitar a perda de antigenicidade. O Departamento de Patologia da FMUSP tem várias publicações prévias onde se compararam dados de imunohistoquímica e morfometria em material de autópsias e biópsias com resultados adequados (Mauad et al, 2004). Nos casos de UIP e NSIP, o perímetro da membrana basal foi maior que no grupo controle e na UIP maior que na Bronquiolite Crônica. Isto indica que provavelmente foram comparados bronquíolos de gerações diferentes. Os casos de UIP e NSIP, apresentaram bronquíolos de gerações menores (ou seja, vias aéreas de maior calibre) em relação ao controle. Apesar disso, todas as pequenas vias aéreas estudadas puderam ser classificadas como bronquíolos terminais de acordo com o postulado por Weibel (1997) e foram normatizadas pelo perímetro da MB, corrigindo suas medidas e minimizando este possível viés conforme já descrito nos métodos. Além disso, o fato de

ainda assim encontrarmos áreas luminais quantitativamente menores nos casos de UIP e NSIP (a despeito do maior calibre de suas vias aéreas) reforça que as pequenas vias aéreas estão realmente acometidas nestas entidades patológicas.

Em resumo, foi possível demonstrar que pacientes com FPI/ UIP e NSIP apresentam mudanças estruturais e inflamatórias ao nível das pequenas vias aéreas e que o epitélio bronquiolar pode participar nos eventos de remodelamento destas doenças. É essencial aprender mais sobre a relação estrutura-função das pequenas vias aéreas nas doenças pulmonares intersticiais para melhor compreender o significado funcional das desordens das pequenas vias aéreas nestas doenças.

6. CONCLUSÕES

- a. As pequenas vias aéreas (PVAs) na Fibrose Pulmonar Idiopática/ Pneumonia Intersticial Usual (FPI/ UIP) e Pneumonia Intersticial Não-Específica (NSIP) apresentaram alterações estruturais e inflamatórias (morfológicas e morfométricas) significativas quando comparadas a vias aéreas normais.
- b. As PVAs na FPI/ UIP e NSIP, quando comparadas às vias aéreas de pacientes com Bronquiolite Crônica Constrictiva, clássica doença primária de vias aéreas, demonstraram semelhanças em relação aos aspectos estruturais e de expressão protéica de metaloproteinases.
- c. Houve uma expressão quantitativamente aumentada de MMP-7 e MMP-9 no epitélio bronquiolar das doenças intersticiais estudadas, sugerindo que as pequenas vias aéreas podem participar dos eventos patogênicos que levam ao remodelamento pulmonar nas Pneumonias Intersticiais Idiopáticas.

- d. Nos pacientes FPI/ UIP houve correlação positiva significativa entre o Log do valor % predito do $FEF_{25-75\%}$ e o Log da expressão de MMP-7 no epitélio das pequenas vias aéreas.
- e. Todas as doenças analisadas também demonstraram alterações morfológicas no parênquima peribronquiolar com predomínio de inflamação (tanto peribronquiolar como bronquiolar) na NSIP, menos fibrose e inflamação peribronquiolares na BC e mais espaços císticos e lambertose na FPI/ UIP.

7) ANEXO

**Remodelamento das pequenas vias aéreas nas pneumonias
intersticiais idiopáticas**
FORMULÁRIO DE DADOS

RGH-_____ Biópsia-_____

Nome: _____

Idade:_____ Naturalidade: _____ Sexo:_____

Ocupação anterior: _____ Ocupação atual: _____

Tabagismo: S () N () ___-anos-maço Ex-tab: parou há _____ meses

Drogas lícitas e/ou ilícitas prévias: _____

Antecedentes Patológicos: _____

Antecedentes Familiares: _____

Sinais e sintomas:

1-Dispneia _____ 2-Tosse _____

3-Dor torácica _____ 4-Chiado _____

5-Hemoptise _____ 6-Outros _____

Data inicial dos sintomas: _____ Data da biópsia: _____

Dados Imagem:

Rx(__ / __ / __) _____

CT(__ / __ / __)- _____

Diag prévio: _____

Diag pós-revisão: _____

Tratamento:

1-Cortic(_____) 2-Imunossup(_____)

3-Antifibróti(_____) 4-Outros(_____)

Uso de O₂: 1-Sim Início em _____ 2-Não

**Remodelamento das pequenas vias aéreas nas pneumonias
intersticiais idiopáticas**

FORMULÁRIO DE DADOS (continuação)

Follow up: _____

Em caso de óbito: data- _____

Em caso de autópsia, dados relevantes:

Prova de Função Pulmonar

DATA	___/___/___		
	Obtido	Predito	% Predito
CVF			
VEF1			
VEF1/CVF			
FEF _{25-75%}			
VVM/PI Max			
CPT			
VR			
VR/CPT			
DCO			
DCO/VA			
SaO ₂			

Conclusão: _____

8) REFERÊNCIAS

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

Bai A, Eidelman DH, Hogg JC, James AL, Lambert RK, Ludwig MS, McDonald DM, Mitzner WA, Okazawa M, Pack RJ, Paré PD, Schellenberg RR, Tiddens HAWM, Wagner EM, Yager D. Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall. *J Appl Physiol.* 1994;7(2):1011-4.

Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, Loiseau P, Milleron B, Valeyrez D, Hance AJ, Tazi A. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF- β and IL-10. *Eur Respir J.* 2003;22: 69–76.

Calabresi C, Arosio B, Galimberti L, Scanziani E, Bergottini R, Annoni G, Vergani C. Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp Gerontol.* 2007;42:1003-11.

Chen P, McGuire JK, Hackman RC, Kim KH, Black RA, Poindexter K, Yan W, Liu P, Chen AJ, Parks WC, Madtes DK. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 moderates airway re-epithelialization by regulating matrilysin activity. *Am J Pathol.* 2008;172:1256–70.

Chetta A, Marangio E, Olivieri D. Pulmonary function testing in interstitial lung diseases. *Respiration*. 2004;71:209-13.

Chung MP, Rhee CH. Airway obstruction in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 1997;3(5):332-5.

Colby TV, Yousen SA. Lungs. In: Sternberg, SS. *Histology for pathologists*. 2nd ed. New York: Lippincott-Raven; 1997. p.433-58.

Cordier JF. Challenges in pulmonary fibrosis 2: Bronchiolocentric fibrosis. *Thorax*. 2007;62:638-49.

Cosgrove GP, Schwarz MI, Geraci MW, Brown KK, Worthen GS. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002;121(Suppl):25-26.

Cottin V, Nunes H, Brillet PY, Delaval P, Devouassoux G, Tillie-Leblond I, Israel-Biet D, Court-Fortune I, Valeyre D, Cordier JF; Groupe d'Etude et de Recherche sur les Maladies Orphelines Pulmonaires (GERM O P). Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J*. 2005;26:586-93.

Crapo JD. Respiratory structure and function. In: Bennett J.C, Goldman L, Cecil RL. *Cecil Textbook of Medicine*. 21st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p.1476-80.

De Boer WI, Hiemstra PS, Sont JK, De Heer E, Rabe KF, Van Krieken JHJM, Sterk PJ. Image analysis and quantification in lung tissue. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:504-8.

Demedts M, Costabelz U. ATS/ ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias [Editorial]. *Eur Respir J*. 2002;19:794–6.

Demedts M, Wells AU, Anto JM, Costabelz U, Hubbard R, Cullinan P, Slabbynck H, Rizzato G, Poletti V, Verbekenzz EK, Thomeer MJ, Kokkarinen J, Dalphin JC, Taylor AN. Interstitial lung diseases: an epidemiological overview. *Eur Respir J*. 2001;18(Suppl 32):2-16.

du Bois RM, Wells AU. Cryptogenic fibrosing alveolitis/ idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2001;18 (Suppl 32):43-55.

Dunsmore SE, Saarialho-kere UK, Roby JD, Wilson CL, Matrisian LM, Welgus HG, Parks WC. Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest*. 1998;102:1321–31.

Erkinjuntti-Pekkanen R, Kokkarinen JI, Tukiainen HO, Pekkanen J, Husman K, Terho EO. Long-term outcome of pulmonary function in farmer's lung: a 14 year follow-up with matched controls. *Eur Respir J*. 1997;10:2046-50.

European Respiratory Society. Standardized lung function testing. Official statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 1993;16 (Suppl):1–100.

Flaherty KR, King Jr TE, Raghu G, Lynch 3rd JP, Colby TV, Travis WD, Gross BH, Kazerooni EA, Toews GB, Long Q, Murray S, Lama VN, Gay SE, Martinez FJ. Idiopathic interstitial pneumonia: what is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):904-10.

Flaherty KR, Loire R, Chalabreysse L, Thivolet F, Cordier JF. Nonspecific interstitial pneumonitis: a new anatomoclinical entity among idiopathic diffuse interstitial pneumonias [Abstract]. *Rev Mal Respir*. 2001;18(1):25-33.

Flaherty KR, Martinez FJ. The role of pulmonary function testing in pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2000;6:404-10.

Flaherty KR, Martinez FJ. Nonspecific interstitial pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27:652-8.

Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 1998;78:687-98.

Fulmer JD, Roberts WC, Von Gal ER, Crystal RG. Small Airways in Idiopathic Pulmonary Fibrosis- comparison of morphologic and physiologic observations. *J Clin Inv.* 1977;60:595-610.

Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease – update 2008 [on line]. Disponível em: <http://goldcopd.com>.

Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:133-44.

Hasleton PS. Fibrosis Alveolitis. In: *Spencer's Pathology of the lung*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p.401-32.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004;350:2645-53.

Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;12:1233-44.

Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(Suppl):113-79.

Husain AN, Kumar V. The Lung. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.711-72.

Jankowich MD, Polsky M, Klein M, Rounds S. Heterogeneity in combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Respiration.* 2008;75:411-7.

Johkoh T, Müller NL, Ichikado K, Yoshida S, Honda O, Mihara N, Higashi M, Tomiyama N, Nakamura H, Nagareda T. Respiratory change in size of honeycombing: inspiratory and expiratory spiral volumetric CT analysis of 97 cases. *J Comput Assist Tomogr.* 1999;23(2):174-80.

Kaminski N, Belperio JA, Bitterman PB, Chen L, Chensue SW, Choi AMK, Dacic S, Dauber JH, du Bois RM, Enghild JJ, Fattman CL, Grutters JC, Haegens A, Hanford LE, Heintz N, Henson PM, Hogaboam C, Kagan VE, Keane MP, Kunkel SL, Land S, Loyd JE, Lukacs N, MacPherson M, Manning B, Manning N, Martinelli M, Moller DR, Morse D, Mossman B, Noble PW, Nowak N, Oury TD, Pardo A, Perez A, Petty TL, Phan SH, Ramos-Nino ME, Ray P, Rogers RM, Sato H, Scapoli L, Schaefer LM, Selman M, Stern M, Strollo DC, Tyurin VA, Valnickova Z, Welsh KI, Witzmann FA, Yousem SA, Strieter RM. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29 (Suppl):1–105.

Kamp DW. Idiopathic Pulmonary Fibrosis- The Inflammation Hypothesis Revisited. *Chest.* 2003;124 (4):1187-90.

Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ.* 2004;171(2):153-60.

Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;5:155-62.

Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y; HP Study Group. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:952-8.

Leslie KO, Fukuoka J. Chronic diffuse lung diseases. In: Leslie KO, Wick MR. *Practical Pulmonary Pathology- a diagnostic approach.* 1st ed. China: Churchill Livingstone; 2005. p.181-258.

Lynch DA, Godwin JD, Safrin S, Starko KM, Hormel P, Brown KK, Raghu G, King Jr TE, Bradford WZ, Schwartz DA, Webb WR, Idiopathic Pulmonary Fibrosis Study Group. High-Resolution Computed Tomography in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Prognosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:488-93.

Manoury B, Caulet-Maugendre S, Guénon I, Lagente V, Boichot E. TIMP-1 is a key factor of fibrogenic response to bleomycin in mouse lung. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006;19:471-87.

Mauad T, Saldiva PHN, Dolhnikoff M, Xavier ACG. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:968–75.

Mauad T, Schadewijk AV, Schrupf J, Hack CE, Fernezlian S, Garippo AL, Ejzenberg B, Hiemstra PS, Rabe KF, Dolhnikoff M, São Paulo BO Study Group. Lymphocytic inflammation in childhood bronchiolitis obliterans. *Pediatric Pulmonology*. 2004;38:233–9.

Myre M, Allard S, Bernard C, Martin RR. Clinical, functional and pathological correspondence in early stage idiopathic pulmonary fibrosis: evidence for small airway obstruction 1-2. *Respiration*. 1988;53(3):174-86.

Nicholson AG. Classification of idiopathic interstitial pneumonias: making sense of the alphabet soup. *Histopathology*. 2002;41(5):381-91.

Odajima N, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Itoh T, Fukuda Y, Senior RM, Nishimura M. Extracellular matrix metalloproteinase inducer in interstitial pneumonias. *Hum Pathol*. 2006;37:1058-65.

Oggionni T, Morbini P, Inghilleri S, Palladini G, Tozzi R, Vitulo P, Fenoglio C, Perlini S, Pozzi E. Time course of matrix metalloproteases and tissue inhibitors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur J Histochem*. 2006;50:317-25.

Ostrow D, Cherniack RM. Resistance to airflow in patients with diffuse interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis*. 1973;108:205-10.

Padilla RP, Gaxiola M, Salas J, Mejia M, Ramos C, Selman M. Bronchiolitis in chronic pigeon breeder's disease-morphologic evidence of a spectrum of small airway lesions in hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigens. *Chest*. 1996;110:371-7.

Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34:1534-8.

Pardo A, Selman M. Matrix Metalloproteases in Aberrant Fibrotic Tissue Remodeling. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:383-8.

Parks WC, Lopez-Boado YS, Wilson CL. Matrilysin in epithelial repair and defense. *Chest*. 2001;120:36-41.

Rosas IO, Ren P, Avila NA, Chow CK, Franks TJ, Travis WD, McCoy JP, May RM, Wu HP, Nguyen DM, Arcos-Burgos M, MacDonald SD, Gochuico BR. Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:698-705.

Rozin GF, Gomes MM, Parra ER, Kairalla RA, Carvalho CRR, Capelozzi VL. Collagen and elastic system in the remodelling process of major types of idiopathic interstitial pneumonias (IIP). *Histopathology*. 2005;46:413-21.

Rubin AS, Silva LCC, Silva LMC. Avaliação funcional e vias aéreas. In: Palombini BC, Porto NS, Araújo E, Godoy DV. *Doenças das vias aéreas - Uma visão clínica integradora (Viaerologia)*. 1a ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda;2001. p.191-201.

Salge JM. Estudo funcional do acometimento das pequenas vias aéreas nas pneumopatias intersticiais fibrosantes [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Schofield NM, Davies RJ, Cameron IR, Green M. Small airways in fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis*. 1976;113:729-35.

Scott J, Johnston I, Britton J. What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust. *Br Med J* 1990; 301: 1015-7 apud American Thoracic Society/ European Respiratory Society. International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am Respir Crit Care Med*. 2002;165:277-304.

Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:188-98.

Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:562-74.

Shaw RJ, Djukanovic R, Tashkin DP, Millar AB, du Bois RM, Orr PA. The role of small airways in lung disease. *Respir Med*. 2002;96(2):67-80.

Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:413-7.

Sont JK, De Boer WI, Van Schadewijk WAAM, Grunberg K, Van Krieken JHJM, Hiemstra PS, Sterk PJ, Asthma Management Project University of Leiden Study Group. Fully automated assessment of inflammatory cell counts and cytokine expression in bronchial tissue. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1496–1503.

Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1949-56.

Swigris JJ, Berry GJ, Raffin TA, Kuschner WG. Lymphoid interstitial pneumonia: a narrative review. *Chest*. 2002;122(6):2150-64.

Swigris JJ, Berry GJ, Raffin TA, Kuschner WG. Idiopathic Pulmonary Fibrosis challenges and opportunities for the clinician and investigator. *Chest*. 2005;127:275–83.

Tan CSH, Tashkin DP. Supernormal maximal mid-expiratory flow rates in diffuse interstitial lung disease. *Respiration*. 1981;42:200-8.

Toews GB. Interstitial lung disease. In: Bennett J.C, Goldman L, Cecil RL. *Cecil Textbook of Medicine*. 21st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p.409-19.

Travis WD, Colby TV, Koss MN, Christenson MLR, Müller NL, King TE. Bronchiolar disorders. In: *Non-neoplastic disorder of the lower respiratory tract*. 1st ed. Washington: ARP and AFIP; 2002. p.350-80.a

Travis WD, Colby TV, Koss MN, Christenson MLR, Müller NL, King TE. Idiopathic Interstitial Pneumonias and other diffuse parenchymal lung diseases. In: *Non-neoplastic disorder of the lower respiratory tract*. 1st ed. Washington: ARP and AFIP; 2002. p. 49-231.b

Visscher DW, Myers JL. Bronchiolitis: the pathologist's perspective. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:41-7.a

Visscher DW, Myers JL. Histologic spectrum of idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:322-9.b

Vourinen K, Myllarniemi M, Lammi L, Piirila P, Ryttila P, Salmenkivi K, Kinnula V. Elevated matrilysin levels in bronchoalveolar lavage fluid do not distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from other interstitial lung diseases. *APMIS.* 2007;115:969-75.

Weibel ER. Design of airways and blood vessels considered as branching trees. Weibel ER, West JB, Crystal RG. In: *The lung- Scientific Foundations.* 2nd edition. NY/Philadelphia: Lippincott- Raven; 1997:1061-71.

White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2003;201:343–54.

Wilcox AG. Small airway involvement in interstitial lung disease: radiologic evidence. *Curr Opin Pulm Med.* 2000;6(5):399-403.

Wu Z, Yang L, Cai L, Zhang M, Cheng X, Yang X, Xu J. Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an α - smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respir Res.* 2007;8:1.

Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:6292-7.

Apêndice

E-MAIL DE ACEITAÇÃO DO PAPER PARA PUBLICAÇÃO



Fw: Ms. No. 200810022, Respiration

Quarta-feira, 3 de Junho de 2009 13:47

"Thais Mauad" <tmauad@usp.br>

De:

""George Mello" <geocfdmello@yahoo.com.br>

Para:

----- Original Message -----

From: <<http://br.mc1106.mail.yahoo.com/mc/compose?to=res@karger.ch>>

To: <<http://br.mc1106.mail.yahoo.com/mc/compose?to=tmauad@usp.br>>

Sent: Wednesday, June 03, 2009 11:02 AM

Subject: Ms. No. 200810022, Respiration

> RESPIRATION
> Ms No.: 200810022
> Title: SMALL AIRWAY REMODELING IN IDIOPATHIC INTERSTITIAL PNEUMONIAS: A
> PATHOLOGICAL STUDY
>
> Dear Dr. Mauad,
>
> Thank you for submitting a 2nd revised version of your manuscript to the
> journal Respiration. We are pleased to inform you that it has now been
> accepted for publication and forwarded to the Editing and Production
> Department who will be contacting you shortly.
>
> We hope you will continue to submit work from your group to Respiration in
> the future.
>
>
> With kind regards,
>
> Linda Haas
>
> Respiration
> Editorial Office
> S. Karger AG - Medical and Scientific Publishers
>
> e: <http://br.mc1106.mail.yahoo.com/mc/compose?to=res@karger.ch>
> f: +41 61 306 1434
> t: +41 61 306 1357
> w: www.karger.com/res
>

Nenhum vírus encontrado nessa mensagem recebida.

Verificado por AVG - www.avgbrasil.com.br

Versão: 8.5.339 / Banco de dados de vírus: 270.12.52/2152 - Data de

Lançamento: 06/03/09 05:53:00

**E-MAIL DA PRODUÇÃO EDITORIAL DA *RESPIRATION* PARA
PUBLICAÇÃO DO PAPER**



Fw: Respiration 5

Quinta-feira, 4 de Junho de 2009 12:35

"Thais Mauad" <tmauad@usp.br>

De:

"George Mello" <geocfdmello@yahoo.com.br>

Para:

----- Original Message ----- From:

<<http://br.mc1106.mail.yahoo.com/mc/compose?to=s.sessler@karger.ch>>

To: <<http://br.mc1106.mail.yahoo.com/mc/compose?to=tmauad@usp.br>>

Sent: Thursday, June 04, 2009 9:56 AM

Subject: Respiration 5

> SMALL AIRWAY REMODELING IN IDIOPATHIC INTERSTITIAL PNEUMONIAS: A
> PATHOLOGICAL STUDY

>

> by Mello G.C.F. et al.

>

> Dear Dr. Mauad

>

> I am pleased to inform you that the above-mentioned paper has been accepted for
> publication and handed over to the editing and production department for copy-editing and
> typesetting. You will soon be receiving the proofs for correction together with a reprint order
> form.

>

> From now on, I will be your contact person for the further processing of your manuscript.
> Should you have any questions or need more detailed information, please do not hesitate to
> contact me, either by e-mail, phone or fax.

>

> Fax regarding page charges to follow.

>

> Yours sincerely,

>

> S. Karger AG - Medical and Scientific Publishers

> Stefan Sessler

> Production Editor

> Allschwilerstrasse 10

> CH-4009 Basel

> tel. +41 61 306 1393 (direct)

> tel. +41 61 306 1111 (main)

> fax +41 61 306 1234

> email: <http://br.mc1106.mail.yahoo.com/mc/compose?to=s.sessler@karger.ch>

> www.karger.com

Nenhum vírus encontrado nessa mensagem recebida.

Verificado por AVG - www.avgbrasil.com.br

Versão: 8.5.339 / Banco de dados de vírus: 270.12.53/2154 - Data de Lançamento:

06/04/09 05:53:00