

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PNEUMOLOGIA**

**FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA
INTRATRAQUEAL EM RATAS *WISTAR*. DESCRIÇÃO DO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DE ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA DO
ADULTO E USO DO POLISSULFATO DE PENTOSAN**

ANTÔNIO FABIANO FERREIRA FILHO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mario Rigatto

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

PORTO ALEGRE

1996

TESE DE DOUTORADO DEFENDIDA EM 28 DE OUTUBRO DE 1996.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

PROFESSOR DOUTOR CELSO MATSUMOTTO.

- Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.
- Chefe do Setor de Criopreservação de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de São Paulo.

PROFESSOR DOUTOR JORGE LIMA HETZEL

- Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da FFFCMPA
- Diretor da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

PROFESSOR DOUTOR JOSÉ DA SILVA MOREIRA

- Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da FFFCMPA.
- Membro da Comissão Coordenadora do CPG-Medicina: Pneumologia, UFRGS.

CONCEITOS EMITIDOS

PROFESSOR DOUTOR CELSO MATSUMOTTO: A

PROFESSOR DOUTOR JORGE LIMA HETZEL: A

PROFESSOR DOUTOR JOSÉ DA SILVA MOREIRA: A

- Aos meus pais, ANTÔNIO FABIANO FERREIRA* e FRANCISCA CLODES DE ANDRADE FERREIRA , pelo carinho que sempre me dedicaram.
- À LAURIMAR DA SILVA MATOS, pela bondade e riqueza de espírito demonstrada durante todos esses anos.
- À minha esposa ANGELA DIEL, pela poesia e música com que preenche a minha vida.

** In memoriam*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. **Mario Rigatto**, pela delicadeza, competência e exigência de altos padrões científicos, com que me ajudou a conduzir esta pesquisa.
- Ao Prof. Dr. **Gilberto Schwartzmann**, pela co-orientação brilhante e pela honra de desfrutar de sua amizade.
- À **Suzan Lúcia Brancher Brandão**, acadêmica do 5^o ano de medicina, que me auxiliou durante toda a realização deste trabalho, em especial durante a sua parte experimental.
- Ao Prof. Dr. **João Carlos Prolla** e ao Dr. **Vinicius Duval Silva**, do Serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujas participações foram fundamentais no processo de digitalização e análises de imagem.
- À Prof^ª Dra. **Maria Isabel Edelweiss** e à Dra. **Luise Meurer**, do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo incentivo e pela colaboração na revisão das lâminas utilizadas nesta pesquisa.
- À **Elaine Gomes Gomes, Jorge Alberto Lopes e Tereza Votarão da Silva**, funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que gentilmente realizaram a coloração das lâminas utilizadas nesta pesquisa.

- À **Direção e aos funcionários** do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que cederam o seu espaço físico e os animais para a realização desta pesquisa.

- Ao secretário **Marco Aurélio**, do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia, pelo carinho e solicitude com que sempre me tratou durante o período de preparo desta pesquisa.

- À **Direção do Instituto Kaplan de Oncologia**, por gentilmente ter cedido a bleomicina necessária para esta pesquisa.

SUMÁRIO/SUMMARY

A despeito dos avanços ocorridos na área de medicina intensiva nos últimos vinte anos, a síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) permanece como uma importante causa de mortalidade e morbidade em doentes criticamente enfermos. Novas abordagens experimentais são claramente necessárias para que o prognóstico desses pacientes seja melhorado.

O presente estudo tem como objetivos:

a) Reproduzir um modelo experimental de SARA no qual uma única instilação intratraqueal de 1,5 unidades de bleomicina intratraqueal em ratas *WISTAR* reproduz o quadro histológico encontrado na SARA em humanos.

b) Avaliar se o heparinóide polissulfato de pentosan, um inibidor do fator básico de crescimento dos fibroblastos e da angiogênese é capaz de bloquear a fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal.

No primeiro experimento foram utilizadas 36 ratas da raça *Wistar*, divididas em grupos de 6. Cada grupo constou de três animais controle e três animais que receberam o tratamento. Os grupos foram sacrificados nos seguintes intervalos após as instilações intratraqueais: 1 hora, 6 horas, 24 horas, 7 dias, 15 dias e 30 dias.

Os achados histopatológicos foram os seguintes:

- Os grupos controle possuem arquitetura pulmonar normal.

- Nos animais tratados, na primeira hora existe um quadro de mastocitose difusa nos espaços intraalveolares.

- Na sexta hora o quadro histopatológico é idêntico ao grupo anterior.

- Na vigésima-quarta hora existe uma alveolite mononuclear, quebra da barreira alvéolo-capilar, presença de inúmeros macrófagos intraalveolares, vasculite mononuclear e lesões em endotélio vascular.

- No sétimo dia inicia-se o processo de fibrose intersticial, com intenso processo de reepitelização alveolar.

- No décimo-quinto dia a fibrose pulmonar torna-se mais evidente, com áreas de distorção da arquitetura alveolar e áreas de retração pleural.

- No trigésimo dia ocorre uma diminuição do infiltrado mononuclear intersticial. Existem áreas de faveolamento e de pontes entre as áreas de fibrose.

Em uma segunda etapa avaliou-se, através de análise de imagem, o efeito do polissulfato de pentosan por via subcutânea, na dose de 25 mg/kg/dia, por 15 dias, sobre a fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal. Nesta etapa foram utilizadas 40 ratas da raça *WISTAR*, assim distribuídas em 4 grupos de 10 animais cada.

Grupo 1- Salina intratraqueal

Grupo 2- Salina intratraqueal + bleomicina

Grupo 3- Salina intratraqueal + PPS

Grupo 4- Salina intratraqueal + bleomicina + PPS

De uma maneira inesperada as ratas do grupo 4 apresentavam uma maior percentagem de fibrose pulmonar quando comparados aos ratos do grupo 2 ($p < 0,05$). As ratas dos grupos 1 e 3 não apresentavam fibrose pulmonar.

Além disso as ratas do grupo 4 perderam peso (- 59,3g em média), em discordância com os outros grupos deste estudo que ganharam peso ($p < 0,05$).

Concluimos que o modelo animal descrito neste estudo possui, em todas as suas etapas, claras semelhanças histopatológicas com a síndrome da angustia respiratória do adulto encontrado em humanos. O polissulfato de pentosan por via subcutânea na dose de 25

mg/kg/dia, por 15 dias , não protege contra a fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal e induz um quadro de caquexia.

In spite of the advances in critical care medicine, over the last twenty years, the acute respiratory distress syndrome (ARDS) remains an important cause of morbidity and mortality in critically ill patients. New therapeutic alternatives are clearly necessary in order to improve the prognosis of these patients.

The purposes of this study are:

a) To Reproduce an experimental model in which one single instillation of 1,5 units of bleomycin reproduces the histological features observed in humans with the acute respiratory distress syndrome.

b) To evaluate if the heparinoid pentosan polysulfate, an inhibitor of basic fibroblast growth factor and of angiogenesis, is able to block the pulmonary fibrosis induced by intratracheal bleomycin.

In the first experiment, thirty-six female *WISTAR* rats were divided in groups of six each. Each group contained three control animals and three animals that received the treatment. The groups were sacrificed in the following intervals after the intratracheal instillations: one hour, six hours, twenty-four hours, seven days, fifteen days and thirty days.

The histopathological findings were:

- The control groups had normal pulmonary architecture.

- In the first hour there is a diffuse mastocytosis in the alveolar spaces.

- In the sixth hour the histopathological findings are identical to the above mentioned.

- In the twenty-fourth hour there is a mononuclear alveolitis, the presence of innumerable intralveolar macrophages, a mononuclear vasculitis and lesions in the vascular endothelium.

- In the seventh day the process of pulmonary fibrosis begins, with an intense process of reepithelization of the alveolar walls.

- In the fifteenth day the pulmonary fibrosis is more evident and there are areas of scarring of the alveolar architecture and areas of pleural retraction.

- In the thirtieth day there is a decrease in the intensity of the mononuclear infiltrate. Areas of “honey combing” and the formation of bridges joining the areas of fibrosis, were also seen.

In a second phase, the action of subcutaneous pentosan polyssulfate , in the dose of of 25 mg/kg/day, for fifteen days, on the pulmonary fibrosis induced by bleomycin was studied. In this phase, forty female *WISTAR* rats were divided in the following groups of ten each.

Group 1- Intratracheal saline

Group 2- Intratracheal saline + bleomycin

Group 3- Intratracheal saline + PPS

Group 4- Intratracheal saline + bleomycin + PPS

Quite unexpectedly the rats of group four had a greater percentage of fibrosis when compared to group 2 ($p < 0.05$). Groups 1 and 3 had no evidence of pulmonary fibrosis.

Besides this, the animals of group 4 lost weight (mean of 59.3 g), a fact in discordance with the other groups of this study ($p < 0,05$).

We conclude that the animal model described in this study has a similar histopathological picture when compared with the acute respiratory distress syndrome in humans. Subcutaneously infused pentosan polysulfate in the dose of 25 mg/kg/day, for fifteen days, does not inhibit the pulmonary fibrosis induced by intratracheal bleomycin and induces cachexia in these animals.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **SARA**- Síndrome da angústia respiratória do adulto.
- **PMN**- Polimorfonucleares.
- **DAD**- Dano alveolar difuso.
- **TNF- α** - Fator de necrose tumoral-alfa.
- **IL-1**- Interleucina-1.
- **IL-8**- Interleucina-8.
- **IL-6**- Interleucina-6.
- **TGF- β** - Fator beta de crescimento tumoral.
- **PAF**- Fator de ativação plaquetária.
- **PDGF**- Fator de crescimento derivado de plaquetas.
- **bFGF**- Fator básico de crescimento dos fibroblastos.
- **aFGF**- Fator ácido de crescimento dos fibroblastos.
- **K-fgf**- Fator de crescimento dos fibroblastos derivado do sarcoma de Kaposi.
- **PPS**- Polissulfato de pentosan
- **GM-CSF**- Fator de crescimento dos macrófagos.
- **LTB₄**- Leucotrieno B₄.
- **PGD₂**- Prostaglandina D₂.
- **BAL**- Lavado bronco-alveolar

LISTA DE FIGURAS

- **FIGURA 1.** Rx de tórax de um paciente com SARA / 2.
- **FIGURA 2.** Microfotografia do dano alveolar difuso / 3.
- **FIGURA 3.** Liberação do TGF- β em sítios de injúria tecidual / 9.
- **FIGURA 4.** Produção de IL-8 por diversos tipos celulares / 12.
- **FIGURA 5.** Estrutura dimérica do fator de crescimento derivado de plaquetas / 14.
- **FIGURA 6.** Fator de ativação plaquetária / 15.
- **FIGURA 7.** Exemplo de angiogênese / 18.
- **FIGURA 8.** Estrutura química do polissulfato de pentosan / 22.
- **FIGURA 9.** Pulmão corado com picrosírius / 32.
- **FIGURA 10.** Máscara sobreposta à arquitetura pulmonar / 33.
- **FIGURA 11.** Máscara correspondendo a áreas de fibrose / 34.
- **FIGURA 12.** Equipamento de digitalização de imagens / 35.
- **FIGURA 13.** Arquitetura pulmonar normal x 100 / 41.
- **FIGURA 14.** Arquitetura pulmonar normal x 400 / 42.
- **FIGURA 15.** Pleura normal / 43.
- **FIGURA 16.** Mastocitose pulmonar / 44.
- **FIGURA 17.** Hiperplasia do epitélio brônquico / 45.
- **FIGURA 18.** Macrófagos alveolares / 46.
- **FIGURA 19.** Início do edema alveolar e intersticial / 47.
- **FIGURA 20.** Cariorrexis em uma célula endotelial / 48.

- **FIGURA 21.** Início da fibrose pulmonar e metaplasia dos pneumócitos do tipo II / 49.
- **FIGURA 22.** Edema sub-pleural / 50.
- **FIGURA 23.** Espessamento focal da pleura / 51.
- **FIGURA 24.** Células gigantes / 52.
- **FIGURA 25.** Vasculite mononuclear / 53.
- **FIGURA 26.** Retração pleural / 54.
- **FIGURA 27.** Cicatrizes fibrosas / 55.
- **FIGURA 28.** Necrose fibrinóide das paredes vasculares / 56.
- **FIGURA 29.** Nódulos fibrosos / 57.
- **FIGURA 30.** Espessamento pleural difuso / 58.
- **FIGURA 31.** “Pontes” entre as regiões de fibrose / 59.
- **FIGURA 32.** Hiperplasia da camada muscular dos vasos sanguíneos / 60.
- **FIGURA 33.** Arquitetura pulmonar normal em um rato que recebeu PPS / 61.
- **FIGURA 34.** Fibrose pulmonar, retração pleural e distorção da arquitetura pulmonar em um rato que recebeu bleomicina + PPS / 62.
- **FIGURA 35.** Média da diferença entre o peso inicial e final, em gramas, em relação aos grupos de interesse / 56.
- **FIGURA 36.** Média da área total analisada em relação aos grupos de interesse / 72.
- **FIGURA 37.** Média da proporção da área total atingida por fibrose em relação aos grupos de interesse / 74.
- **FIGURA 38.** Gráfico da proporção de fibrose em relação aos grupos desse estudo / 75.

- **FIGURA 39.** Estrutura química da bleomicina / 79.
- **FIGURA 40.** Citocinas e outros produtos secretados por macrófagos / 87.
- **FIGURA 41.** Sequência dos eventos leucocitários na inflamação / 90.
- **FIGURA 42.** citocinas produzidas por fibroblastos / 102.
- **FIGURA 43.** Componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos / 103.

LISTA DE TABELAS

- **TABELA 1.** Peso inicial e final das ratas analisadas por grupo de interesse / 63.
- **TABELA 2.** Média e erro padrão dos pesos inicial e final das ratas analisadas por grupo de interesse / 64.
- **TABELA 3.** Resultados dos testes de comparação múltipla para o teste de Kruskall-Wallis da diferença entre o peso inicial e final dos grupos / 65.
- **TABELA 4.** Média e erro padrão da média da diferença entre o peso inicial e final para os grupos de interesse / 65.
- **TABELA 5.** Quantificação da área de parênquima pulmonar avaliada e a percentagem de fibrose pulmonar nas ratas controle / 67.
- **TABELA 6.** Quantificação da área de fibrose pulmonar no grupo de ratas que recebeu PPS / 68.
- **TABELA 7.** Quantificação da área de parênquima pulmonar e de fibrose pulmonar no grupo de ratas que recebeu bleomicina intratraqueal / 69.
- **TABELA 8.** Quantificação da área de parênquima pulmonar e de fibrose pulmonar no grupo de ratas que recebeu bleomicina intratraqueal + PPS / 70.
- **TABELA 9.** Teste de Kruskall-Wallis da área total de parênquima pulmonar analisada / 71.
- **TABELA 10.** Média e erro padrão da média da área total analisada em relação aos grupos de interesse / 72.

•**TABELA 11.** Resultados dos testes de comparação múltipla para o teste de Kruskall-Wallis da proporção de área com fibrose / 73.

•**TABELA 12.** Média e erro padrão da média da proporção da área total atingida por fibrose / 74.

•**TABELA 13.** Resultados dos testes de comparação múltipla para o teste de Kruskall-Wallis da proporção de área com fibrose / 107.

•**TABELA 14.** Média e erro padrão da média da proporção da área total atingida por fibrose / 108.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Citocinas envolvidas na SARA	4
1.1.1. Fator de necrose tumoral- α	5
1.1.2. Fator beta de crescimento tumoral	7
1.1.3. Interleucina-1	10
1.1.4. Interleucina-8	11
1.1.5. Fator de crescimento derivado de plaquetas	13
1.1.6. Fator de ativação plaquetária	15
1.1.7. Fator de crescimento dos fibroblastos	16
1.2. Polissulfato de pentosan	21
1.3. Objetivos	24
2. Material e métodos	25
2.1. Delineamento	26
2.2. Amostra	26
2.3. Técnica cirúrgica	28
2.4. Variáveis do estudo	28
2.5. Análise de imagens	29
2.6. Análise estatística	36
3. Resultados	37
3.1. Descrição histológica do modelo	38

3.2. Análise estatística-----	63
3.2.1. Características da população estudada-----	63
3.2.2. Variação do peso dos animais-----	64
3.2.3. Quantificação da fibrose pulmonar-----	66
3.2.4. Análise da área total de parênquima pulmonar avaliada entre os grupos-----	71
3.2.5. Análise da área de fibrose pulmonar avaliada entre os grupos-----	72
3.2.6. Correlação entre a fibrose pulmonar e a variação de peso dos animais-----	75
4. Discussão-----	76
4.1. Bleomicina-----	78
4.2. Modelo experimental-----	81
4.3. Quadro histológico-----	82
4.3.1 Mastócitos-----	82
4.3.2 Macrófagos-----	84
4.3.3 Polimorfonucleares-----	88
4.3.4 Células endoteliais-----	92
4.3.5 Células epiteliais-----	95
4.3.6 Plaquetas-----	98
4.3.7 Linfócitos-----	99
4.3.8 Fibroblastos-----	100
4.4. Variação do peso entre os grupos-----	103
4.5. Análise da área de parênquima pulmonar avaliada-----	105
4.6. Fibrose pulmonar-----	105

4.7. Considerações finais-----	106
5. Conclusões-----	109
6. Referências bibliográficas-----	111

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA), é um termo genérico para uma insuficiência respiratória aguda de etiologias tão diversas como a síndrome séptica, a aspiração pulmonar de conteúdo gástrico, a coagulação intravascular disseminada, as pneumonias severas, as fraturas de ossos longos ou pélvicos e as politransfusões¹. Apesar de todos os progressos alcançados em Medicina Intensiva, a sua mortalidade varia de 50-60%².

As seguintes células estão envolvidas na fisiopatologia da SARA: os leucócitos polimorfonucleares (PMN), os macrófagos, as plaquetas os linfócitos, as células endoteliais, as células do epitélio alveolar e as células mesenquimais, bem como o sistema humoral representado pela ativação do complemento, mediadores lipídicos, o sistema de coagulação/fibrinolítico e a liberação de citocinas³.

A SARA geralmente caracteriza-se por uma reação imunológica violenta e aparentemente caótica que leva ao dano alveolar difuso. Apesar das múltiplas causas da SARA, as conseqüências fisiopatológicas são uniformes. Normalmente uma resposta inflamatória causa dano alveolar e endotelial, aumento da permeabilidade vascular e deterioração na troca gasosa. Uma vez iniciada, a cascata fisiopatológica causa hipoxemia arterial, hipertensão arterial pulmonar, evidência radiográfica de edema pulmonar (Fig 1), e diminuição da complacência pulmonar³.

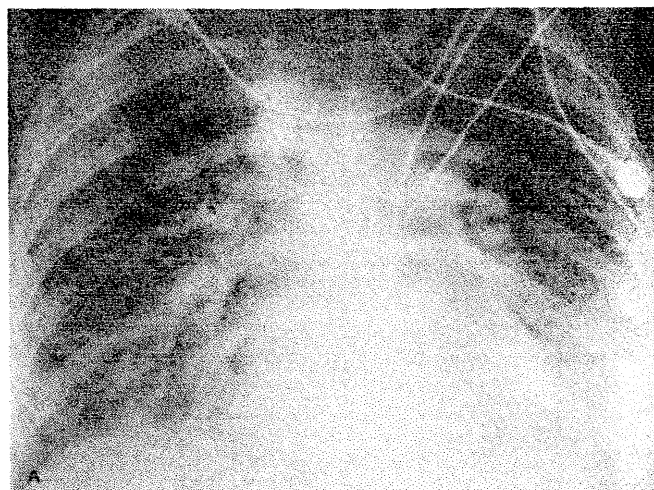


Figura 1. Raio-x de tórax de um paciente que desenvolveu a Síndrome da angústia respiratória do adulto secundária a pancreatite necro-hemorrágica (segundo Michael A. Matthay⁴).

O quadro histopatológico clássico da SARA é o dano alveolar difuso (DAD). O DAD (Fig 2), pode ser separado histopatologicamente em duas fases: a fase exudativa e a fase fibroproliferativa. O estágio mais precoce do DAD envolve a degeneração e necrose das células epiteliais de revestimento alveolar (pneumócitos do tipo I) e do endotélio; com isto há uma quebra da barreira alvéolo-capilar com um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, tendo como resultado um exudato proteináceo e a formação de *debris* celulares que são a origem das membranas hialinas. Os achados histológicos durante os primeiros dias da fase exudativa do DAD incluem: edema alveolar, membranas hialinas, edema da parede alveolar e microatelectasias. Em torno do sétimo dia, a fase reparativa do DAD já se iniciou, caracterizando-se por hiperplasia dos pneumócitos do tipo II, um infiltrado intersticial de mononucleares e um número aumentado de fibroblastos nas

paredes alveolares espessadas e em exudatos alveolares . A fibrina é invariavelmente encontrada nas paredes alveolares danificadas bem como nos espaços alveolares⁵

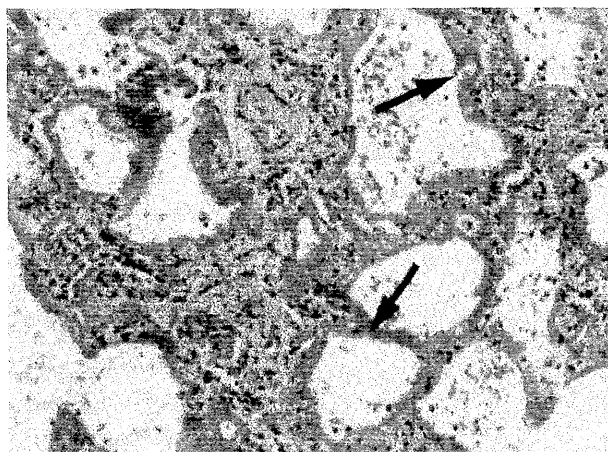


Figura 2. Microfotografia do dano alveolar difuso (DAD), encontrado na Síndrome da angústia respiratória do adulto. Alguns alvéolos apresentam-se colapsados enquanto outros se encontram distendidos. As setas demonstram membranas hialinas (segundo Lester Kobzik e Frederick J. Schoen⁶).

Em alguns pacientes com SARA ocorre uma rápida reconstituição da estrutura e função alveolares . Em outros pacientes ocorre um processo de fibrose alveolar e remodelamento que, prolonga a doença e, pode resultar em morte. Os fatores que governam a fibrose pulmonar não são bem conhecidos. Na realidade não se compreende porque uma agressão ao tecido pulmonar pode levar a uma reação fibrogênica ou a uma reconstituição *ad integrum* da arquitetura pulmonar. Está se tornando claro que os mecanismos bioquímicos e celulares envolvidos no acúmulo de colágeno e de outras

proteínas da matriz extracelular no interstício do alvéolo sejam uma exacerbação dos mesmos eventos fisiológicos envolvidos no reparo ao dano tecidual⁵⁻⁷⁻⁸.

1.1 CITOCINAS ENVOLVIDAS NA SARA

As citocinas são pequenas moléculas mensageiras intercelulares polipeptídicas mediadoras de quadros inflamatórios, produzidas por vários tipos celulares, modulando diversas respostas biológicas. O seu peso molecular varia entre 5 e 145 Kd, sendo biologicamente ativas em baixas concentrações (picomolar ou menos). Elas diferem dos hormônios clássicos uma vez que são produzidas por diversos tipos celulares e não por órgãos isolados, freqüentemente possuindo efeitos autócrinos e parácrinos. O termo citocina engloba as diferentes denominações anteriormente utilizadas para designar os peptídeos importantes para a comunicação celular tais como : fatores de crescimento, modificadores da resposta biológica, interleucinas, interferons, monocinas, linfocinas, etc. No momento as citocinas são usualmente agraciadas com um número de interleucina, após a sua seqüência gênica ser descrita. Algumas citocinas tais como os interferons α , β e γ bem como o fator de necrose tumoral estão tão arraigadas na literatura que possivelmente os seus nomes nunca irão ser alterados⁹.

As citocinas estão envolvidas direta ou indiretamente na patogênese de diversas doenças, especialmente aquelas associadas com a proliferação celular ou quadros inflamatórios locais ou sistêmicos tais como a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), SARA e a caquexia secundária a neoplasias¹⁰⁻¹¹⁻¹². Diversos trabalhos

experimentais nos fazem pensar que as citocinas estão envolvidas nas fases iniciais e fibroproliferativa da SARA ¹³.

O desafio terapêutico atual na abordagem da fibrose pulmonar que se encontra na SARA é desenvolver agentes inibidores específicos de citocinas, para avaliar a habilidade de tais agentes na prevenção da fibrose pulmonar. Certamente uma compreensão dos fatores que controlam este processo pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos de reparo da SARA e de outras doenças pulmonares. Entre as principais citocinas implicadas até o momento na gênese da SARA estão: o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-8 (IL-8), o fator beta de crescimento tumoral (TGF- β), o fator de ativação plaquetária (PAF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF) ¹³.

1. 1. 1. FATOR DE NECROSE TUMORAL- α

O TNF- α contém 157 aminoácidos, é produzido por macrófagos ativados, células endoteliais e fibroblastos. Juntamente com a interleucina-1 é uma das citocinas mais estudadas, em virtude do seu papel central na cascata de eventos da sepse e da SARA. O TNF- α desencadeia toda uma seqüência de eventos que constituem o quadro séptico, ou seja: As mudanças de temperatura, variações da resistência periférica vascular, aumento da permeabilidade vascular, redução da contratilidade miocárdica, aumento da atividade da medula óssea, degradação muscular, lipólise e anorexia ¹⁴

O TNF- α atua ligando-se a dois receptores estruturalmente pouco semelhantes, com pesos moleculares de 55 e 75 quilodaltons. Os receptores de 55 quilodaltons são mais encontrados em células epiteliais e respondem preferencialmente pelos efeitos de citólise e citotoxicidade. Já os receptores de 75 quilodaltons, localizam-se preferencialmente em células de origem linfóide. O TNF- α aumenta a permeabilidade vascular *in vitro*, e estimula os macrófagos alveolares a induzir quimiotaxia para leucócitos polimorfonucleares. Em animais, o TNF- α aparece na circulação logo após a indução de septicemia e os seus níveis se relacionam com a severidade da injúria pulmonar. A infusão de TNF- α resulta em lesões semelhantes à SARA¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶. Em humanos, níveis elevados de TNF- α têm sido encontrados no plasma de pacientes em risco para SARA, porém, ao contrário dos animais de experimentação, esses níveis não se correlacionam com a severidade da doença pulmonar. A rápida duração da secreção de TNF- α por macrófagos e monócitos, após a exposição a endotoxina bacteriana, pode explicar a razão pela qual não existe uma elevação sustentada dos níveis sanguíneos dessa citocina na SARA¹⁷.

Por outro lado, a produção local de TNF- α por fagócitos mononucleares na SARA pode ser substancialmente maior que a produção por células circulantes, e a sua elevação substancial nos BAL de pacientes com SARA, porém não no plasma desses pacientes, tem sido bem documentada¹⁸.

Quando liberado nos pulmões o TNF- α causa efeitos devastadores, causando dano rápido e difuso. Isto possivelmente deve-se a seus efeitos diretos nas células endoteliais e

granulócitos assim como a indução de outros mediadores tais como a interleucina-1 , prostaglandinas e o fator de ativação plaquetária (PAF). A injeção intravenosa em ratos de TNF- α recombinante, humano acarreta hemorragias difusas e um quadro inflamatório sistêmico. Embora o dano seja mais proeminente no nível renal e gastrointestinal, os pulmões também demonstram hemorragias *punctatas* e hiperemia ¹⁹.

Recentemente foi demonstrado o papel central do fator de necrose tumoral em um modelo experimental de fibrose pulmonar em ratos. O aparecimento de RNA mensageiro, que codifica o TNF- α , precede o aparecimento da fibrose pulmonar, e a administração de um soro anti-TNF- α bloqueia a fibrose pulmonar induzida por bleomicina neste modelo²⁰.

1.1.2. FATOR BETA DE CRESCIMENTO TUMORAL

O TGF- β é um dímero de 25 Kd que funciona como um fator anti-inflamatório vital. Três isoformas são conhecidas em humanos. O TGF- β possui efeitos pleotrópicos na diferenciação, morfogênese e proliferação celulares ²¹.

O TGF- β é o mais potente estimulador conhecido da síntese de colágeno, maximizando a quantidade de colágeno produzido através do controle de diversos pontos do metabolismo da síntese e degradação do colágeno. O TGF- β estimula a transcrição do gene do pro-colágeno, aumenta a estabilidade do RNAm que codifica o pró-colágeno,

diminui a degradação intracelular de pró-colágeno e limita a degradação do colágeno extracelular, através da inibição da produção de colagenase²²⁻²³.

O TGF- β no soro se liga a α_2 - macroglobulina (uma proteína que possui um papel na inativação de proteases e citocinas, funcionando como um regulador de retro-alimentação durante processos fisiológicos nos quais há liberação de mediadores inflamatórios), bem como a fibronectina circulante²⁴. A ligação α_2 - macroglobulina possivelmente representa o primeiro passo no processo de inativação do TGF- β que se difundiu a partir do seu sítio de liberação inicial, explicando a curta meia vida plasmática do TGF- β ($t_{1/2}$ 4 min)²⁵.

A cicatrização de uma injúria na pele, um modelo para a reparo tecidual , é uma seqüência coordenada de eventos biológicos que se inicia com a hemostase plaquetária, seguida por um influxo de células inflamatórias e fibroblastos, e a formação de uma nova matriz extracelular e vasos sanguíneos (tecido de granulação), e a proliferação de células para reconstituir o tecido. O TGF- β possui um importante papel em cada um desses eventos. As plaquetas possuem altas concentrações de TGF- β (Fig 3), e PAF, que são liberados no sítio de injúria tecidual²⁶. O TGF- β , que se localiza na matriz extracelular, pode também ser ativado após injúria tecidual. Em concentrações fentomolares, o TGF-b é quimiotáxico para PMN, células T, monócitos e fibroblastos. Ao mover-se para o local da injúria, essa células se ativam ao encontrarem concentrações maiores (picomolares) de

TGF- β . Os monócitos iniciam a secreção do bFGF, TNF- α , IL-1, e os fibroblastos aumentam a síntese de proteínas da matriz extracelular²⁷⁻²⁸⁻²⁹.

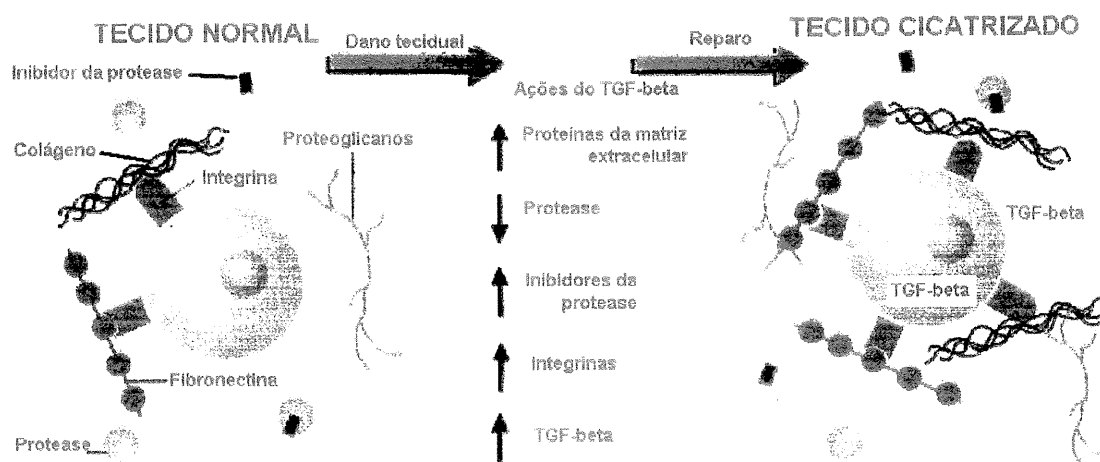


Figura 3. Liberação de TGF- β pelas plaquetas em sítios de injúria tecidual. O TGF- β Induz a deposição de matriz extracelular pela estimulação da produção de novas proteínas da matriz extracelular (colágeno, fibronectina e proteoglicanos), bloqueando a degradação da matriz extracelular através da diminuição da síntese de protease e, modulando a expressão de integrinas, aumentando a interação célula-matriz e unindo os componentes da matriz extracelular. Além disso o TGF- β também induz a sua produção, ampliando os seus efeitos biológicos (segundo Wayne A. Border E Nancy A. Noble³⁰).

Em ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal, o conteúdo de TGF- β pulmonar é diversas vezes maior que em ratos normais. O aumento da produção de TGF- β precede a síntese de colágeno, fibronectina e proteoglicanos³¹. A principal fonte celular dessa citocina é o macrófago alveolar, no qual a produção aumentada de TGF- β não pode ser suprimida pelo tratamento com altas doses de corticoesteróides, sendo essa uma

das possíveis explicações para a inefetividade deste tratamento em pacientes com fibrose pulmonar idiopática e SARA³²⁻³³.

1.1.3. INTERLEUCINA - 1

A IL-1 é um polipeptídeo de 14 a 17 kilodaltons primariamente produzido por macrófagos, sendo produzido também por tecidos epiteliais, linfóides e vasculares³⁴. Duas formas de IL-1 (α e β), são descritas, porém, elas reconhecem os mesmos receptores de superfície e compartilham diversas atividades biológicas³⁵. A IL-1 atua em uma ampla gama de células alvo envolvidas nas respostas inflamatórias e imunes. A IL-1 é quimiotáxica para PMN, e regula varios aspectos do desenvolvimento dos linfócitos T e B, incluindo a maturação dos precursores T e B tímicos, a indução de linfocinas e a síntese e expressão de receptores dessas linfocinas³⁵.

Além disso, a IL-1 estimula a produção de outras citocinas tais como a IL-2 e os interferons. A IL-1 e o TNF possuem a capacidade de estimular os linfócitos B e T, aumentar a proliferação celular, iniciar ou suprimir a expressão gênica de diversas proteínas. Ao contrário do TNF, a IL-1 pode estimular os linfócitos tanto por ativação direta quanto pela indução de outras citocinas. A IL-1 é também sinérgica com diversas outras citocinas, tais como o TNF, a IL-8 e a IL-3. Consequentemente, a IL-1 é um importante elemento da rede de citocinas que induz ao aumento ou supressão de respostas biológicas, durante respostas do indivíduo a quadros inflamatórios ou infecciosos³⁵.

Diversos estudos demonstraram o amplo espectro de efeitos da IL-1 relacionados a SARA, que incluem: a ativação do endotélio vascular com a indução de atividade procoagulante e *up-regulation* das moléculas de adesão dos leucócitos, indução da proliferação fibroblástica, ativação de PMN³⁶.

Os níveis antigênicos de IL-1 estão aumentados no lavado bronco-alveolar de pacientes com SARA, porém não no plasma destes pacientes. Em contraste com o TNF- α estes níveis mantêm-se elevados em estágios tardios da SARA³⁷.

1.1.4. INTERLEUCINA - 8

A IL-8 pertence a uma família de citocinas polipeptídicas quimiotáticas de 8 a 10 Kd que se ligam à heparina. A IL-8 é produzida maciça e rapidamente por diversos tipos celulares em resposta a estímulos inflamatórios. Os monócitos, macrófagos, células T, pneumócitos tipo II, fibroblastos e células endoteliais produzem IL-8 em resposta a IL-1 ou ao TNF- α . A IL-8 possui importante atividade quimiotática para células T, basófilos e neutrófilos *in vitro* (Fig 4). Esta citocina é também responsável pela liberação de enzimas lisossomiais pelos neutrófilos e possui um papel na adesão e migração de neutrófilos através do endotélio vascular³⁸⁻³⁹.

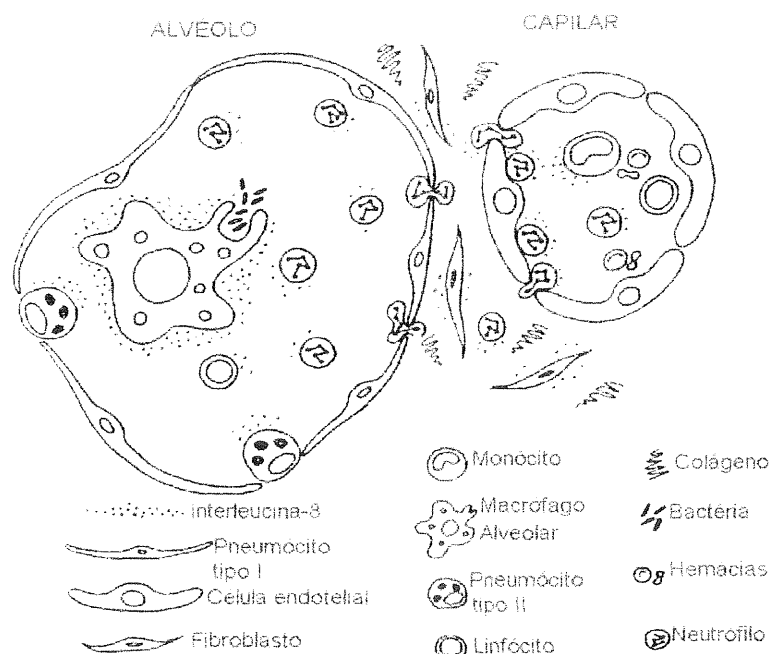


Figura 4. Produção de IL-8 por diversos tipos celulares. Quando existe um gradiente de concentração de IL-8, os neutrófilos se aderem a superfície endotelial dos capilares pulmonares e migram através do interstício para os alvéolos (segundo Christman JW⁴⁰).

Em um estudo prospectivo, 29 pacientes portadores de diversas condições de risco para o desenvolvimento da SARA (pancreatite aguda, traumas múltiplos, perfurações intestinais), tiveram amostras de lavado bronco-alveolar e soro colhidas nas primeiras 24 horas de início do quadro. Sete desses pacientes progrediram para SARA. A concentração de IL-8 no lavado bronco-alveolar (porém não no soro), foram significativamente maiores naqueles que desenvolveram SARA⁴¹. Aproximadamente 70% da atividade quimiotática para os polimorfonucleares nos lavados broncoalveolares pode ser removida através de anticorpos anti-IL-8. Tal achado é consistente com uma participação local da IL-8 no desenvolvimento da SARA. Dessa maneira a produção de IL-8 em nível alveolar participa do recrutamento de PMN que contribuem para o quadro inflamatório pulmonar,

característico das fases iniciais da SARA⁴². Não aparenta haver associação entre os níveis plasmáticos de IL-8 e o desenvolvimento de SARA.

1.1.5. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

O PDGF foi primeiramente descrito nos grânulos α das plaquetas que tinham a capacidade de estimular a proliferação dos fibroblastos e as células musculares lisas⁴³. O fator ativo de crescimento é uma glicoproteína dímica, formada por cadeias A e B (Figura 5). Essas moléculas são sintetizadas como precursores de alto peso molecular e são submetidos a processamento proteolítico. Além das plaquetas, diversos outros tipos celulares também produzem essa molécula tais como: monócitos, macrófagos células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos. A presença de grande quantidade de receptores de PDGF em células mesenquimais e células musculares lisas sugere um papel deste fator de crescimento na proliferação do tecido conjuntivo, associada a inflamação e reparo tecidual, aterosclerose e durante o desenvolvimento tumoral⁴³⁻⁴⁴

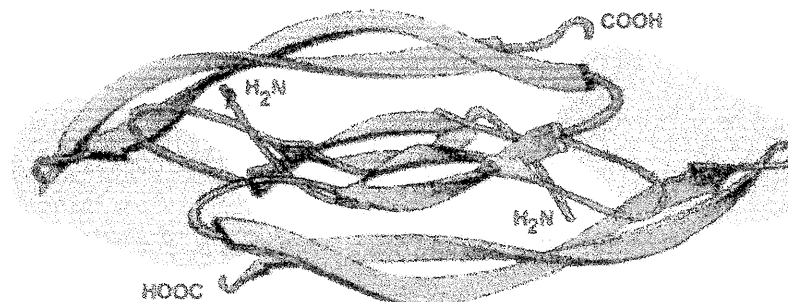


Figura 5. Estrutura dimérica do fator de crescimento derivado de plaquetas. As áreas de ligação com o seu receptor são mostradas em amarelo. A estrutura dímica é mantida por 3 pontes disulfeto (segundo Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K e Watson J D⁴⁵).

A expressão de PDGF e a sua liberação por células em sítios inflamatórios, ativando o mesênquima através da migração e proliferação de fibroblastos e células musculares lisas, tem atraído a atenção de investigadores de diversas áreas para o desenvolvimento de antagonistas que poderiam ser úteis em doenças tão diversas como a artrite reumatóide, a reestenose pós-angioplastia, as glomerulonefrites com proliferação do mesângio e a fibrose pulmonar.

Em geral, no tecido pulmonar normal em adultos, a expressão gênica do PDGF é limitada ou nula⁴⁶. Se demonstra a expressão de PDGF em diversas situações em associação com dano tecidual inflamatório ou durante a ativação de um tipo celular específico. Por exemplo, demonstrou-se que, em pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática, os macrófagos alveolares liberam, em média, quatro vezes mais PDGF que os macrófagos de indivíduos normais⁴⁷.

1.1.6. FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

O PAF foi originalmente descoberto como um potente ativador da agregação plaquetária⁴⁸. Possui uma estrutura lipídica e funciona como um potente estimulador pleiotrópico, ativando plaquetas, monócitos, linfócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos pulmonares⁴⁹ (Figura 6).

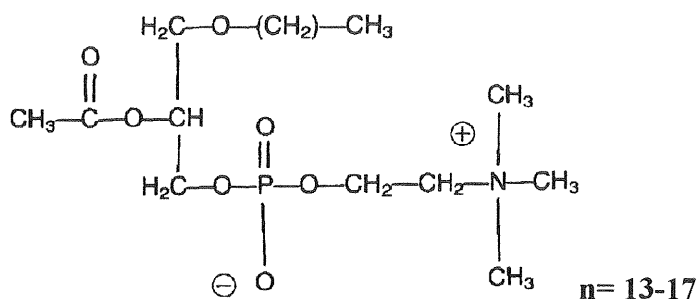


Figura 6. Fator de ativação plaquetária: 1-*O*-alquil-2-actil-*sn*-fosforil-3-fosfocolina (segundo Charles E. McCall e Joseph T. O'Flaherty⁵⁰).

As respostas fenotípicas ao PAF dependem do tipo celular. Por exemplo: o PAF causa agregação plaquetária e induz a sua degranulação, causa *up-regulation* das moléculas de adesão leucocitária, contrai a musculatura lisa, ativa linfócitos B e linfócitos T-supressores, além de induzir os macrófagos alveolares a produzirem radicais livres na forma de superóxido⁵¹.

No BAL de pacientes portadores de SARA existem níveis detectáveis de PAF⁵². Até o momento não existem estudos que correlacionem os níveis de PAF no BAL de pacientes

com SARA e a gravidade da doença. No entanto, estão sendo realizados ensaios clínicos de antagonistas do PAF em pacientes com choque séptico⁵³.

1.1.7. FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS

O fator de crescimento dos fibroblastos foi originalmente identificado como um extrato de pituitária que estimulava a proliferação de células fibroblásticas Balb/c 3T3⁵⁴. Após purificada, essa substância demonstrou ter um peso molecular de 14 a 16 Kd, com um ponto isoelétrico básico⁵⁵. Logo após, foi descoberto um segundo mitógeno com um ponto isoelétrico ácido⁵⁶. Notou-se então, que a atividade mitogênica desses fatores de crescimento dos fibroblastos não se encontrava restrita aos fibroblastos e estimulava diversos tipos celulares, incluindo as células endoteliais e os condrócitos⁵⁷. Tendo em vista que tanto os fatores de promoção da angiogênese quanto os fatores de crescimento dos fibroblastos, são mitogênicos para células endoteliais, suspeitou-se de uma semelhança estrutural. A observação de que um mitógeno de células endoteliais, extraído de um extrato tumoral, ligava-se fortemente à heparina, sugeriu que colunas de afinidade à heparina pudessem ser utilizadas para a purificação dos fatores de crescimento dos fibroblastos. De fato, ambos os fatores, ácido e básico, de crescimento dos fibroblastos ligam-se fortemente a colunas de afinidade à heparina⁵⁸⁻⁵⁹. Dessa maneira demonstrou-se que a atividade mitogênica e os fatores angiogênicos identificados em uma variedade de tecidos eram causados pelos fatores de crescimento básico e ácido. Isto reduziu uma grande lista de mitógenos pobremente caracterizados a sinônimos dos fatores de crescimento ácido e básico dos fibroblastos.

Um dos papéis propostos para os fatores de crescimento dos fibroblastos in vivo é a indução de angiogênese⁶⁰. A angiogênese ocorre fisiologicamente no desenvolvimento do sistema vascular durante o crescimento embrionário, fetal e durante a adolescência, bem como no crescimento do epitélio uterino durante o ciclo menstrual. A neo-angiogênese contribui diretamente para diversas doenças tais como a retinopatia diabética e as neoplasias⁶⁰.

A neo-angiogênese ocorre quando as células endoteliais dos capilares atravessam as suas membranas basais, migram para o ponto de indução angiogênica e proliferam, formando novos cordões de células endoteliais que finalmente se desenvolverão em novos capilares⁶¹ (Figura 7).

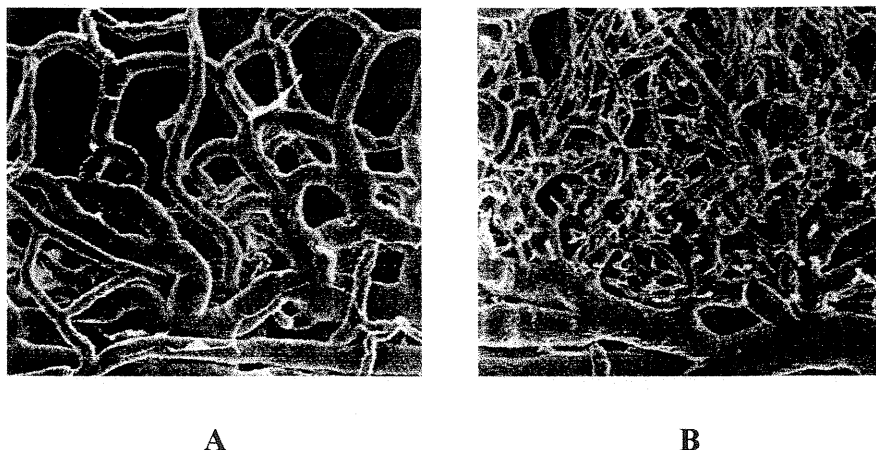


Figura 7. A - Microscopia eletrônica de vasos sanguíneos que margeiam a córnea.

B - Mesmos vasos sanguíneos, 60 horas após uma injúria a córnea. Este crescimento orientado (para cima nesta figura), demonstra uma resposta quimiotática das células endoteliais em direção a um fator angiogênico liberado no sítio da injúria (segundo Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K e Watson J D⁶²).

O fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF), induz um fenótipo invasor em células endoteliais em cultura, permitindo que as mesmas penetrem as membranas basais *in vitro*. A habilidade de penetrar a membrana basal é dependente da produção aumentada de enzimas proteolíticas, fator ativador do plasminogênio e colagenase, em resposta ao bFGF⁶³.

A partir da sua caracterização, como fatores de crescimento dos fibroblastos e fatores angiogênicos, o bFGF e o fator ácido de crescimento dos fibroblastos (aFGF) têm sido propostos como possuindo um papel importante na cicatrização de feridas, especialmente na formação do tecido de granulação e na neovascularização que a acompanha. Esta

hipótese se baseia em experimentos onde a administração exógena do bFGF aumentou a formação do tecido de granulação em feridas incisionais⁶⁴. Além disso, o bFGF melhora a cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos⁶⁵.

Um papel potencial, em quadros inflamatórios, para os membros da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos pode ser predito a partir das propriedades já conhecidas dos fatores de crescimento dos fibroblastos. Embora presente em pulmões de adultos normais, a sua liberação é mínima. O dano tecidual causado pela liberação de proteases e heparinases por macrófagos e polimorfonucleares ativados poderia levar a liberação de bFGF estocado nas membranas basais celulares. Em tal cenário, a liberação do bFGF pode estimular o crescimento e síntese de colágeno pelos fibroblastos e possuir um papel no desenvolvimento de fibrose pulmonar⁶⁶.

O bFGF é uma proteína formada por 146 aminoácidos e um peso molecular de 16 a 18 Kd e um ponto isoelétrico de 9.6. A seqüência de aminoácidos do bFGF é altamente conservada entre as espécies, havendo uma identidade de 89-95% entre os bFGFs humano, de rato e de boi. Este baixo nível de divergência sugere uma importância funcional de todas as regiões do bFGF⁶⁷⁻⁶⁸.

Os locais de ligação do bFGF ao seu receptor e à heparina foram mapeados. A atividade de ligação ao seu receptor foi encontrada em duas regiões: entre os aminoácidos 33-77 e 115-124. A ligação com a heparina é mais forte nestas mesmas regiões, porém essa

ligação ocorre também entre outras seqüências, sugerindo que a ligação da heparina ao bFGF, seja distribuída em toda a molécula⁶⁹.

No pulmão adulto normal, o bFGF tem sido encontrado, através de estudos de imunolocalização na membrana basal dos vasos sanguíneos, em células no músculo liso vascular, nas células endoteliais dos vasos sanguíneos pulmonares e em células epiteliais da traquéia e dos brônquios⁷⁰. Recentemente, foi demonstrado que o BAL da maioria dos pacientes com SARA promove angiogênese e contém o bFGF⁷¹.

O aFGF é uma proteína de 154 aminoácidos, que possui uma homologia de 55% com o bFGF⁷². A homologia se estende a toda a seqüência da molécula, exceto para os 18 aminoácidos terminais e dois aminoácidos inseridos nas posições 117-118. O aFGF possui uma distribuição mais limitada que o bFGF, tendo sido encontrado em tecido neural, rim, próstata e músculo cardíaco. A seqüência de aminoácidos que se liga à heparina é idêntica a uma das regiões de ligação do bFGF⁶⁶.

Em um modelo experimental de SARA foi demonstrado que a instilação endotraqueal de bleomicina, em ratos Wistar, causa a neo-formação de vasos-sanguíneos especialmente em áreas de fibrose pulmonar, sugerindo uma associação entre um estímulo angiogênico e a fibrose pulmonar⁷³.

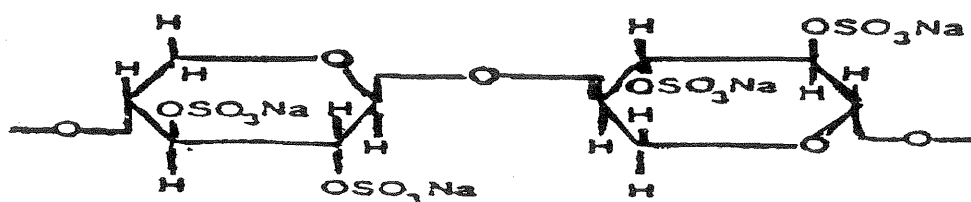
Os agentes farmacológicos com capacidade para bloquear a atividade do bFGF e a angiogênese são de muito interesse. Em princípio, um inibidor específico da angiogênese e

do bFGF teria poucos efeitos colaterais e uma ampla janela terapêutica⁶⁰, tendo em vista o fato de que a angiogênese, como a estimulação fibroblástica, só ocorrem, salvo as situações fisiológicas já citadas, em situações patológicas tais como o câncer ou processos de reparo ao dano tecidual tais como a SARA.

1.2. POLISSULFATO DE PENTOSAN

Diversos derivados heparinóides polisulfatados demonstraram inibir a neovascularização e o bFGF em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. O Polissulfato de pentosan (PPS) é um polissacarídeo heparinóide, sulfatado, semi-sintético que tem sido utilizado na prevenção de trombose venosa, sendo obtido através da sulfatação de pentosans sintéticos⁷⁴.

É uma macromolécula linear, composta por unidades de β -D xylopiranose sulfatadas. A substância pertence a uma família de macromoléculas aniônicas, endógenas (glicosaminoglicanos), que incluem a heparina e o sulfato de condroitina. O PPS contém 1,9 grupos de sulfatos por unidade de monossacarídeo e o seu peso molecular é de aproximadamente 4700 daltons⁷⁵ (Figura 8).



n= 3-6

Figura 8. Estrutura química do Polissulfato de pentosan (segundo Maffraud JP, Herbert JM, Bernat A, Defreyne G, Delabasse D, Savi P, Pinot JJ e Sampol J⁷⁶).

A excreção do PPS ocorre através de dessulfatação hepática e esplênica além de despolimerização renal, com excreção urinária de material de baixo peso molecular dessulfatado. Uma pequena percentagem da droga (4 - 8%) é excretada inalterada na urina, o que sugere um mecanismo metabólico de eliminação. Existem evidências que os mecanismos de dessulfatação e despolimerização possam ser saturados através do uso de dose farmacologicamente relevante e por longo tempo (3 meses). A eliminação em humanos sugere uma distribuição bimodal, com um rápido *clearance* de uma dose endovenosa (em torno de 80 minutos), seguida por uma meia vida terminal que varia entre 24 e 93 horas⁷⁶⁻⁷⁷.

O PPS tem potente ação inibitória sobre o b-FGF, sendo provável que atue ligando-se ao fator de crescimento, impedindo o seu acesso ao receptor celular específico⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁸⁰. Experimentos em cultura celular demonstram inibição da angiogênese, da proliferação e da quimiotaxia induzidas pelo b-FGF em células endoteliais aórticas de bovinos⁸¹. Além disso, o PPS inibe o crescimento de enxertos tumorais em ratos atímicos da linhagem celular

(SW-13/Kfgf). Esta linhagem tumoral secreta o fator de crescimento dos fibroblastos derivados do sarcoma de Kaposi (k-fgf)⁸² . Neste último estudo, demonstrou-se que doses subcutâneas de 25 à 50 mg/kg/dia, por três meses, eram seguras e sem efeitos tóxicos aparentes. Os animais que receberam doses de 100 mg/kg/dia morreram devido a sangramento.

Não existem estudos *in vivo* avaliando especificamente a resposta da administração do PPS sobre a fibrose pulmonar induzida em modelos animais experimentais.

Os modelos animais permitem um estudo progressivo, desde o início até os estágios finais da fibrose pulmonar, sem as complicações encontradas em pacientes. Thrall e colaboradores⁸³ descreveram um modelo onde, após uma única instilação intratraqueal de 1,5 unidades de bleomicina , os ratos desenvolvem uma alveolite mononuclear. Esta reação inflamatória está associada a proliferação celular nos compartimentos intersticial, bronquiolar e alveolar, levando ao desenvolvimento de fibrose pulmonar em aproximadamente 2 semanas. Diversos investigadores demonstraram semelhanças histológicas e fisiológicas entre esse modelo e a SARA em humanos⁸⁴⁻⁸⁵⁻⁸⁶⁻⁸⁷

1.3. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo são :

1- Reproduzir o modelo de fibrose pulmonar induzida pela instilação de bleomicina intratraqueal, desde as suas fases mais precoces até a fase fibroproliferativa.

2- Utilizar um inibidor do b-FGF, o polissulfato de pentosan, na tentativa de bloquear a fibrose pulmonar induzida em ratos pela bleomicina intratraqueal .

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO

Este é um estudo experimental, controlado, com dados contemporâneos, tendo como objetivos validar todas as etapas do modelo de fibrose pulmonar, induzida por bleomicina intratraqueal, em ratos *WISTAR*, bem como avaliar o efeito do polissulfato de pentosan no quadro histológico observado após a instilação de bleomicina intratraqueal.

2.2. AMOSTRA

Inicialmente foram utilizadas 36 ratas adultas da raça *Wistar*, pesando entre 175 e 225 mg, adquiridas do Laboratório de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estas ratas eram alimentadas *ad libitum*, eram livres de patógenos e foram mantidas isoladas de outros animais.

Neste primeiro experimento as ratas foram divididas em 6 grupos de 6 animais cada. Cada grupo constou de três animais controle e três animais que receberam o tratamento. Os animais controle receberam a instilação de 0,3 ml de soro fisiológico intratraqueal. O tratamento consistiu da instilação intratraqueal de 1,5 unidades de bleomicina + 0,3 ml de soro fisiológico. Os grupos foram sacrificados nos seguintes intervalos após as instilações intratraqueais (de soro fisiológico e de soro fisiológico + bleomicina): 1 hora, 6 horas, 24

horas, 7 dias, 15 dias e 30 dias. Foi realizada então análise histopatológica dos pulmões o que permitiu a caracterização do modelo experimental.

Após a caracterização do modelo, foi iniciada a segunda parte do experimento para testar a hipótese de que o PPS seria um fator protetor na fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal. Utilizou-se o 15º dia como referencial para o sacrifício, baseado nos achados no primeiro grupo de animais estudados.

Foram utilizados 4 grupos de 10 ratas com peso variando entre 175 e 225 g , com a seguinte distribuição:

GRUPO 1- (CONTROLE) - 0,3 ml de soro fisiológico intratraqueal no D1.

GRUPO 2 - (BLEOMICINA) - 0,3 ml de soro fisiológico intratraqueal + bleomicina 1,5 ui intratraqueal no D1.

GRUPO 3 - (PPS) - Polissulfato de pentosan 25 mg/kg subcutâneo por dia por 14 dias + 0,3 ml de soro fisiológico intratraqueal.

GRUPO 4 - (BLEOMICINA + PPS) - 0,3 ml de soro fisiológico intratraqueal + bleomicina 1,5 ui intratraqueal no D1 + polissulfato de pentosan 25 mg/kg subcutâneo por 14 dias.

2.3. TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais foram anestesiados com cetamine 100mg/kg por via intraperitoneal, e tiveram as suas traquéias expostas, recebendo as instilações intratraqueais . Ainda sob efeito anestésico, a ferida cirúrgica era fechada com fio cirúrgico de mononylon 4-0.

Os animais eram sacrificados nos períodos descritos acima. Para o sacrifício os animais eram anestesiados com tiopental 100 mg/kg por via intraperitoneal. A caixa torácica era aberta através de uma incisão mediana, sendo expostos os pulmões e o coração. Os ratos eram exsanguinados via ventrículo esquerdo e os pulmões eram perfundidos *in situ* com 10 ml de solução salina. O conjunto coração-pulmão-traquéia era retirado e a traquéia canulada.

Os pulmões foram perfundidos, através da traquéia com glutaraldeído a 4%, a uma pressão constante de 20 cm H₂O . Uma secção transversal do pulmão direito de cada rata foi utilizada para a análise histopatológica desses grupos. Foram empregados os métodos de coloração com hematoxilina-eosina e picrossirius⁸⁸⁻⁸⁹.

2.4. VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis estudadas neste trabalho incluem o quadro histológico progressivo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina em ratas *WISTAR*, o percentual de fibrose obtido

através de uma média da fibrose observada em 8 campos microscópicos por rata, com aumento de x200, obtidos de maneira aleatória e a variação de peso dos animais.

2.5. ANÁLISE DE IMAGEM

A quantificação da fibrose pulmonar consistiu da análise morfométrica digital (Fig 10), através de programa de análise de imagem *Image Pro Plus for Windows* versão 1.2 (MEDIA CYBERNETICS, Silver Spring, MD, EUA). As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas para análise morfométrica a partir da microscopia ótica convencional (microscópio ZEISS KF, OBERKOHEN, Alemanha), com lentes planacromáticas (ZEISS KF), fototubo com videocâmara (CCD) colorida (Câmera CK 3800 - Meiji, Japão) acoplada e placa digitalizadora (TARGA PLUS 16 - Truevision, EUA), gerando arquivos de imagem de 512x486 pixels e 65536 cores, em computador com microprocessador Intel 80486 DX2, 66 Mhz, 32 Mb de memória RAM, monitor de vídeo com 0.25 *dot pitch* de 17" e placa controladora de vídeo com 4 Mb).

Foram selecionados aleatoriamente oito campos microscópicos corados pela técnica de picrosirius a partir de cortes histológicos transversais de pulmão direito. O procedimento de seleção dos campos microscópicos foi realizado através de uma grade composta por uma matriz de nove elementos aplicada sobre a lâmina .

A digitalização das imagens foi realizada com iluminação de tipo Köhler, lâmpada halogenada à temperatura de 2800 K e alimentação com estabilizador de voltagem. As imagens foram digitalizadas com aumento microscópico de 200 vezes, através de lentes planacromáticas. A videocâmara foi conectada à placa digitalizadora Targa Plus através de cabo DIN 9, gerando sinal no padrão Super VHS. As imagens foram gravadas no formato gráfico TGA, ocupando em média 760 kBytes. Foram então convertidas para o formato 24 bits (16 milhões de cores) e armazenadas em CD-ROM gravável (PINNACLE RCD-1000, PINNACLE, Irvine, CA, EUA).

Através do programa *Image Pro Plus*, estes arquivos de imagem foram abertos , sendo realizada a seleção das áreas de interesse através dos seguintes critérios:

- a. áreas com tonalidade igual ou superior a 250 (cinza claro e branco) foram consideradas como espaços alveolares em imagens convertidas para 8 bits (256 tons de cinza);
- b. artefatos e células claramente presentes em espaços alveolares foram excluídos da mensuração por métodos interativos de computação gráfica;
- c. áreas ocupadas por hemácias foram selecionadas através da coloração (vermelho escuro) destas células e eliminadas da mensuração por método semi-interativo;

A área total de septos interalveolares, estruturas vasculares e de condução da árvore respiratória foram convertidas para formato bimodal (preto e branco), onde o branco corresponde a espaço alveolar e estruturas excluídas da mensuração (descritas em b. e c.) e mensuradas.

Após, as imagens foram reconvertidas para cores de 24 bits, sendo selecionadas por método semi-interativo as áreas de fibrose, de coloração vermelha clara e criada uma máscara de imagem contendo apenas as áreas de coloração e disposição correspondente a tecido fibrótico, sendo então incluídas as áreas correspondentes aos núcleos de fibroblastos, de tonalidade mais escura e não específica. Estas áreas foram então mensuradas (Figs. 9, 10 e 11).

Todas as mensurações foram expressas em micrômetros ao quadrado. As escalas foram aferidas através da digitalização de imagem de régua micrométrica de vidro sob a ampliação das lentes utilizadas neste trabalho.

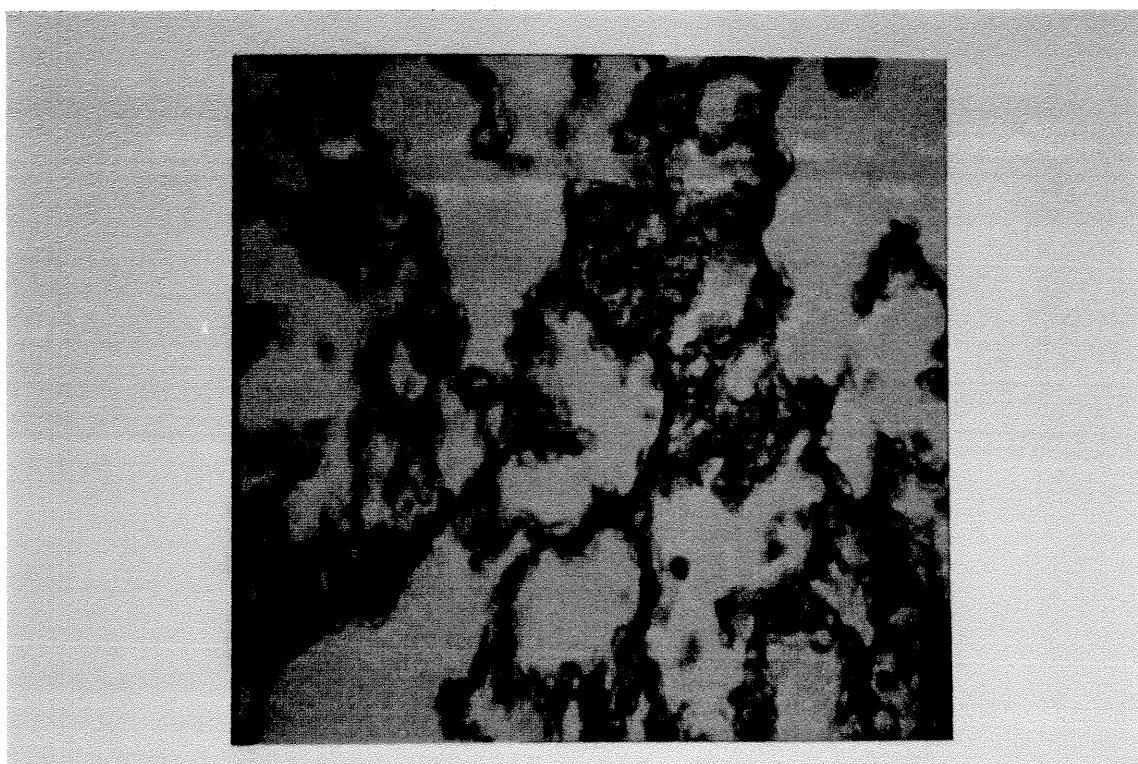


Figura 9. Espécime pulmonar 15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Coloração de picrosirius. Ampliação x 200.

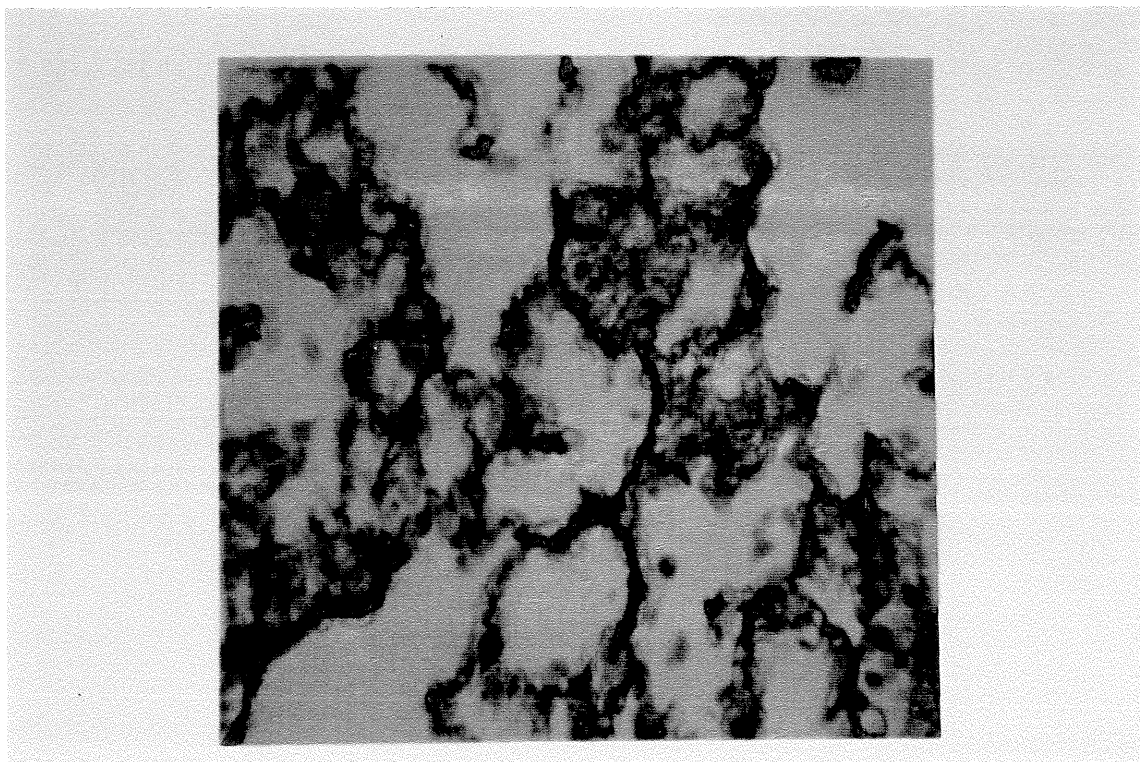


Figura 10. Espécime pulmonar 15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Máscara (em vermelho), correspondendo às áreas de fibrose sobreposta à arquitetura pulmonar. Coloração de picrosirius x 200.

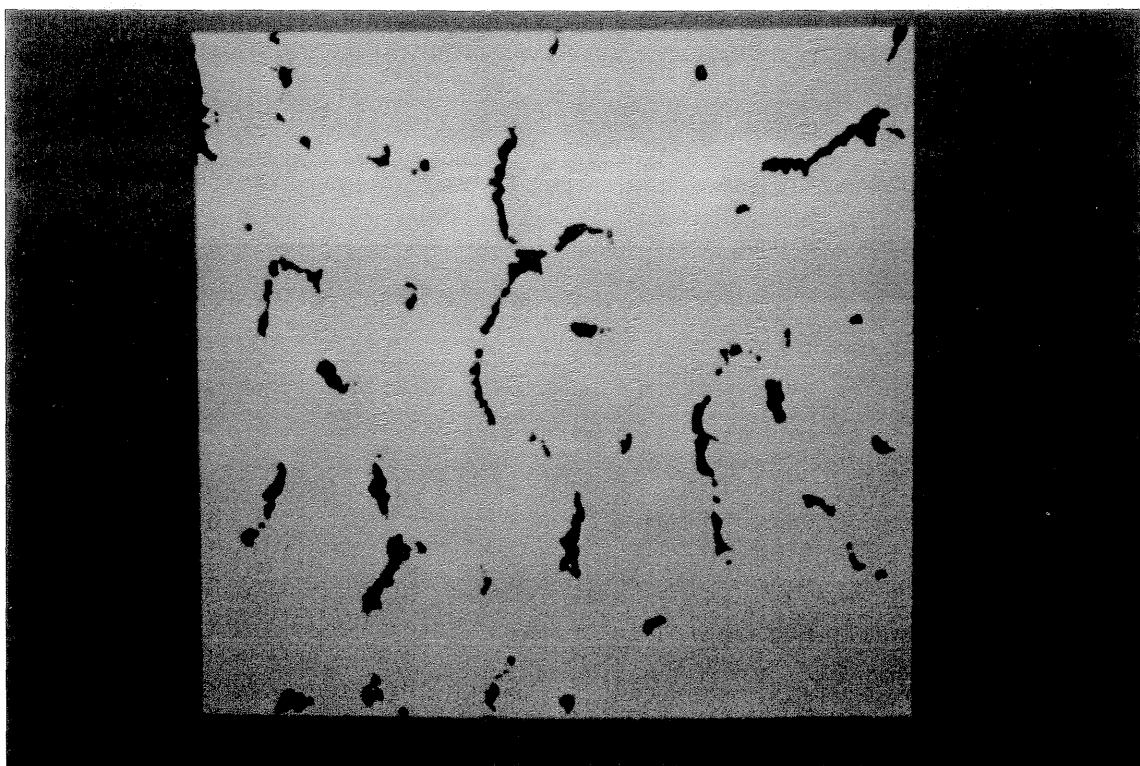


Figura 11. Máscara (vermelho), correspondendo as áreas de fibrose.

Aumento x 200.

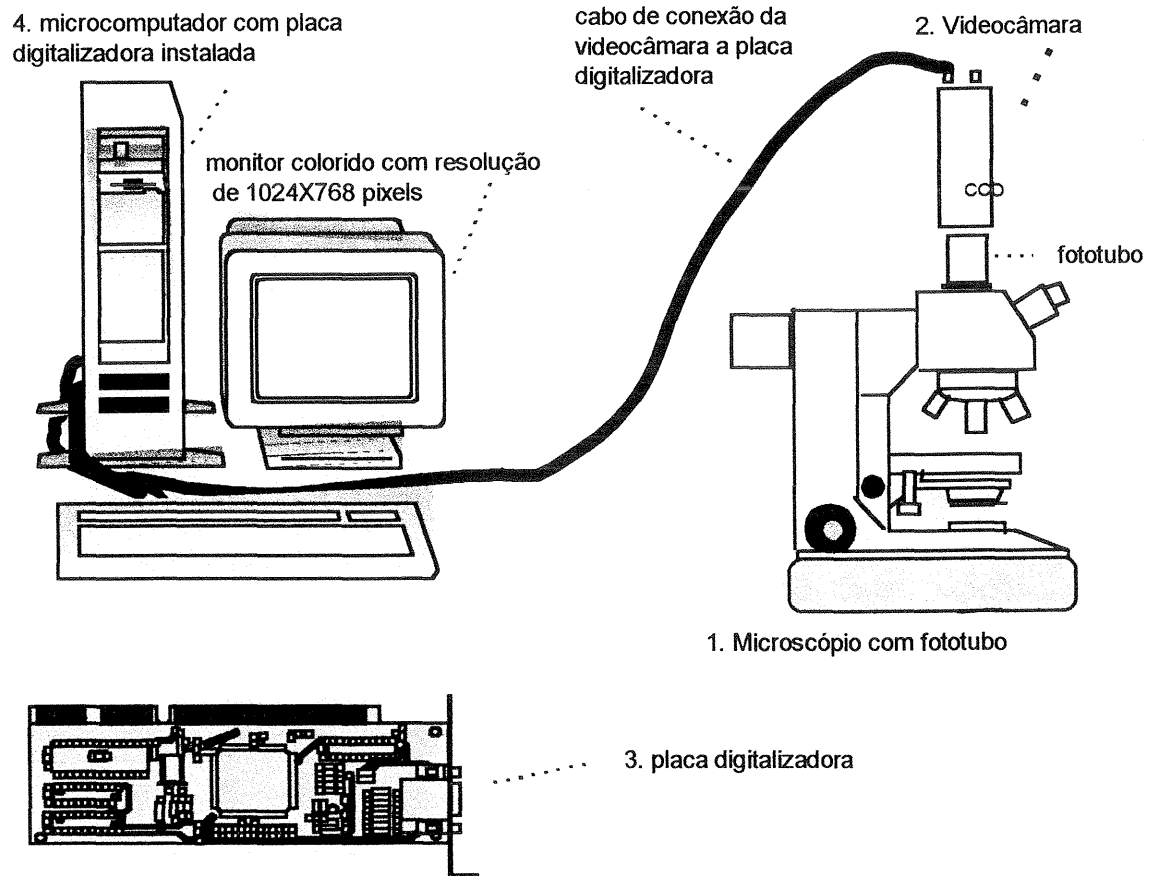


Figura12. Equipamento de digitalização de imagem.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 6.0. A amostra foi caracterizada através da estatística descritiva. Foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis⁹⁰ e teste de comparações múltiplas para verificar possíveis diferenças entre os grupos estudados nas variáveis Peso Inicial, Diferença entre Peso Inicial e Final e Proporção de fibrose. Foi também utilizado o coeficiente de correlação de Spearman, que permitiu estudar a correlação entre o grau de fibrose observado com a variação de peso dos animais durante o experimento. Para propósito de significância estatística, o erro α foi fixado em 5%.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DO MODELO

Todos os ratos controle que receberam apenas soro fisiológico intratraqueal possuíam epitélio alveolar normal, composto por pneumócitos do tipo I, com a eventual presença de polimorfonucleares e macrófagos, tanto na luz alveolar como no espaço intersticial (Fig 13, 14). Não se observaram alterações pleurais (Fig 15).

Uma hora após a exposição a bleomicina intratraqueal, os pulmões dos ratos demonstravam a presença de mastócitos distribuídos difusamente nos espaços intraalveolares (Fig 16).

Os pulmões dos ratos que receberam bleomicina intratraqueal demonstravam, na sexta hora, um quadro histológico semelhante à primeira hora.

O quadro histológico sofre uma importante mudança na vigésima-quarta hora, quando se observa proeminência do epitélio bronquiolar com hiperplasia reacional. (Fig 17). Aparece, também uma grande quantidade de macrófagos intraalveolares com grande quantidade de citoplasma (Fig 18). Os pulmões demonstram áreas de intenso edema intersticial (Fig 19). As células endoteliais dos vasos de pequeno calibre demonstram necrose e picnose nuclear (Fig 20).

No sétimo dia da instilação intratraqueal de bleomicina, há o início da formação de fibrose intersticial (Fig 21). Observa-se um intenso processo regenerativo, com a presença de fibroblastos jovens e macrófagos. Neste mesmo momento, existem evidências de reepitelização demonstrada pela presença de pneumócitos tipo II que recobrem a superfície alveolar (Fig 21). O espaço subpleural demonstra grandes áreas de edema alveolar (Fig 22) e a pleura demonstra espessamentos em alguns pontos de sua extensão (Fig 23). Permanece a presença de muitos macrófagos alveolares com eventuais células gigantes nas áreas de maior dano tecidual (Fig 24). Também se demonstra um quadro de vasculite mononuclear (Fig 25)

No décimo-quinto dia após a instilação de bleomicina, existem áreas de retração pleural secundária a fibrose no parênquima pulmonar (Fig 26) . Há formação de verdadeiras cicatrizes fibrosas parenquimatosas, com distorção da arquitetura pulmonar normal (Fig 27). Alguns vasos demonstram necrose fibrinóide das paredes vasculares, permanecendo o infiltrado inflamatório mononuclear, porém com menor intensidade (Figs. 27 e 28).

No trigésimo dia a fibrose pulmonar se torna ainda mais manifesta, com áreas de faveolamento (Fig 29). Há um espessamento pleural difuso (Fig 30).

As áreas de fibrose pulmonar são agora confluentes, havendo a formação de pontes entre elas (Fig 31) .Os vasos sanguíneos demonstram hiperplasia da camada muscular com diminuição do seu calibre (Fig 32).

Os animais que receberam o polissulfato de pentosan na dose de 25 mg/kg/dia por 15 dias demonstravam arquitetura alveolar preservada com raros focos de infiltrado mononuclear perivascular. O epitélio brônquico, os vasos sanguíneos e as pleuras tinham aspecto normal (Fig 33).

O uso do PPS na dose de 25 mg/kg/dia não impediu a formação de fibrose pulmonar (Fig 34). Os animais assim tratados demonstravam, no décimo quinto dia, as mesmas características dos ratos não tratados, a saber: fibrose confluyente, presença de macrófagos intraalveolares, retração pleural e edema alveolar e intersticial.

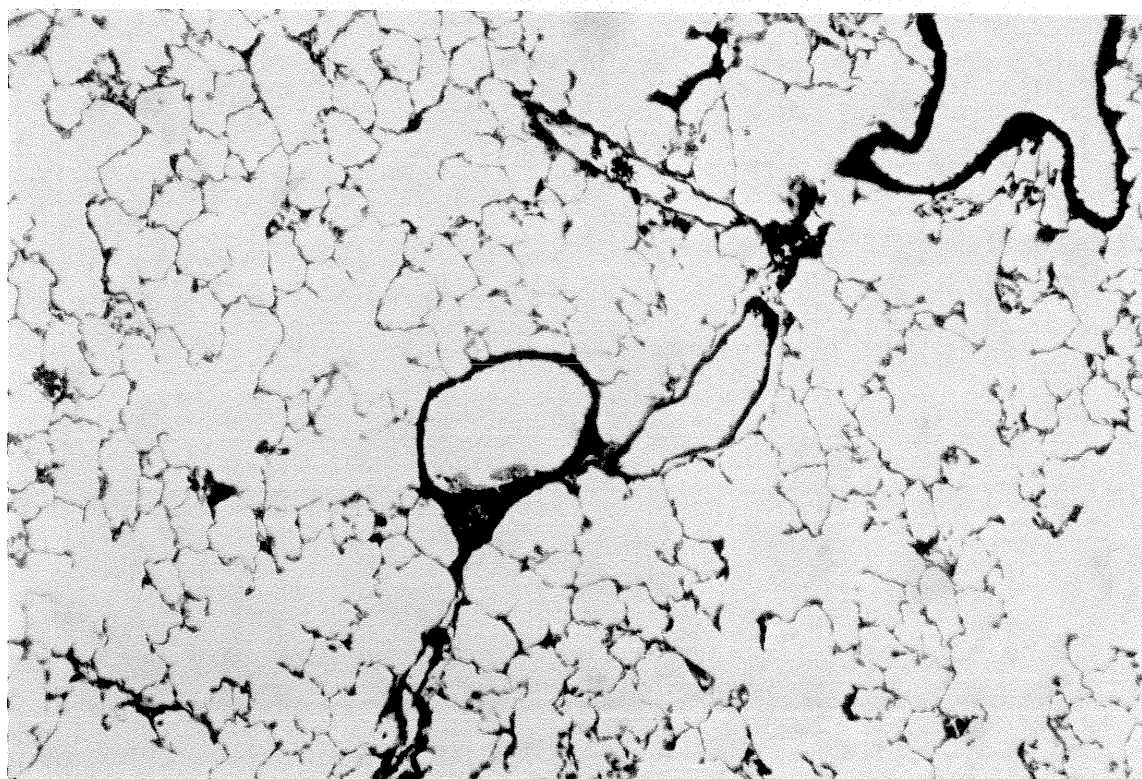


Figura 13. Espécime pulmonar de um rato controle demonstrando estrutura alveolar, vasos sanguíneos e epitélio brônquico preservados. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 100.

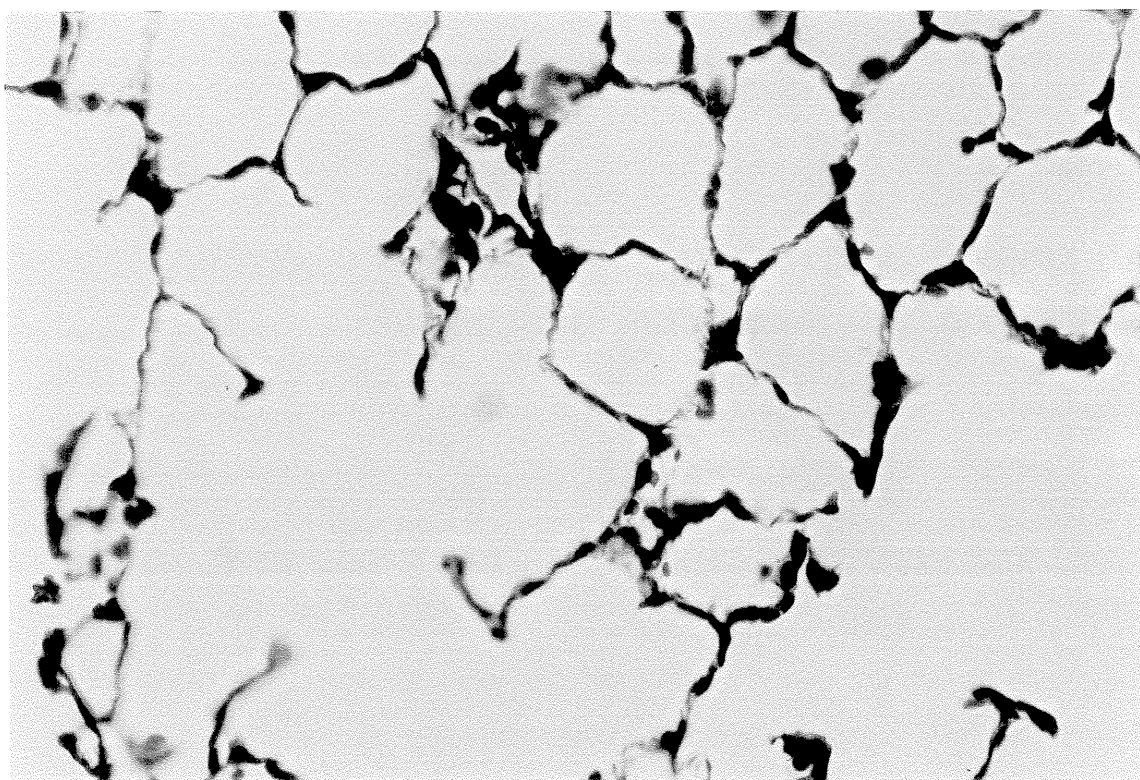


Figura 14. Espécime pulmonar de um rato controle demonstrando macrófagos intraalveolares não ativados, epitélio alveolar normal, composto basicamente por epitélio do tipo I e um eventual polimorfonuclear. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 400.

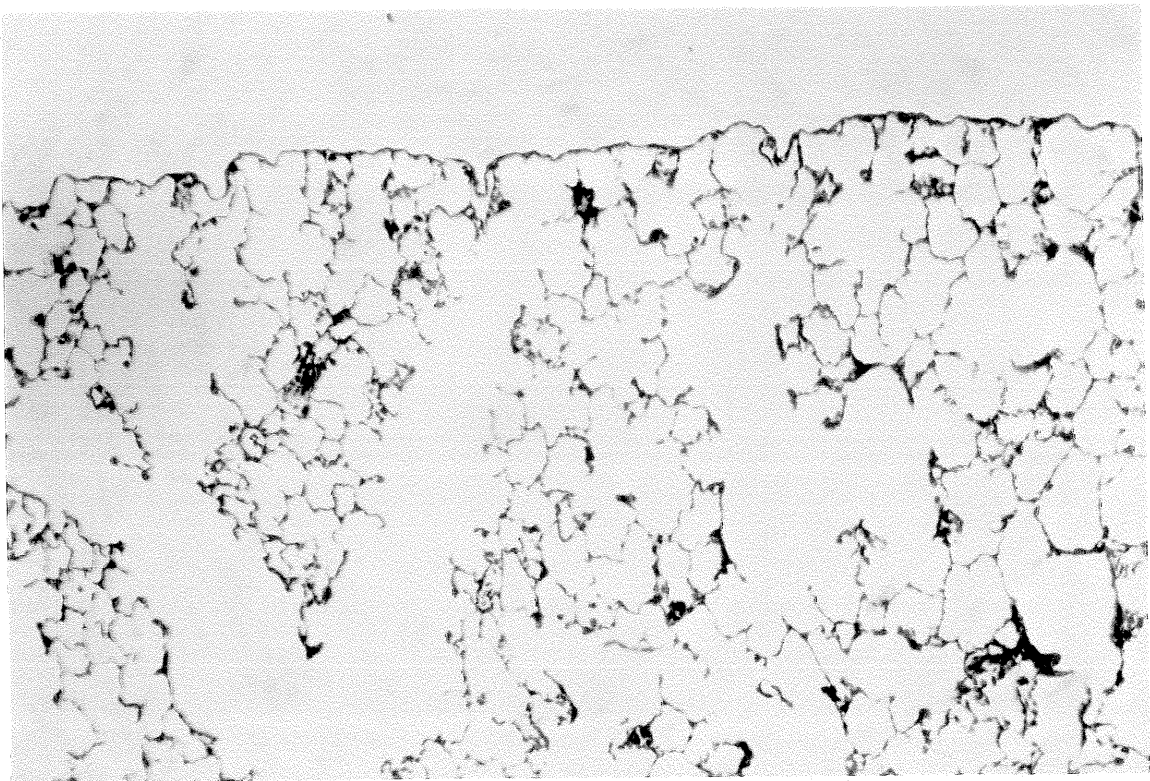


Figura 15. Espécime pulmonar de um rato controle demonstrando o aspecto de uma pleura normal. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 100.

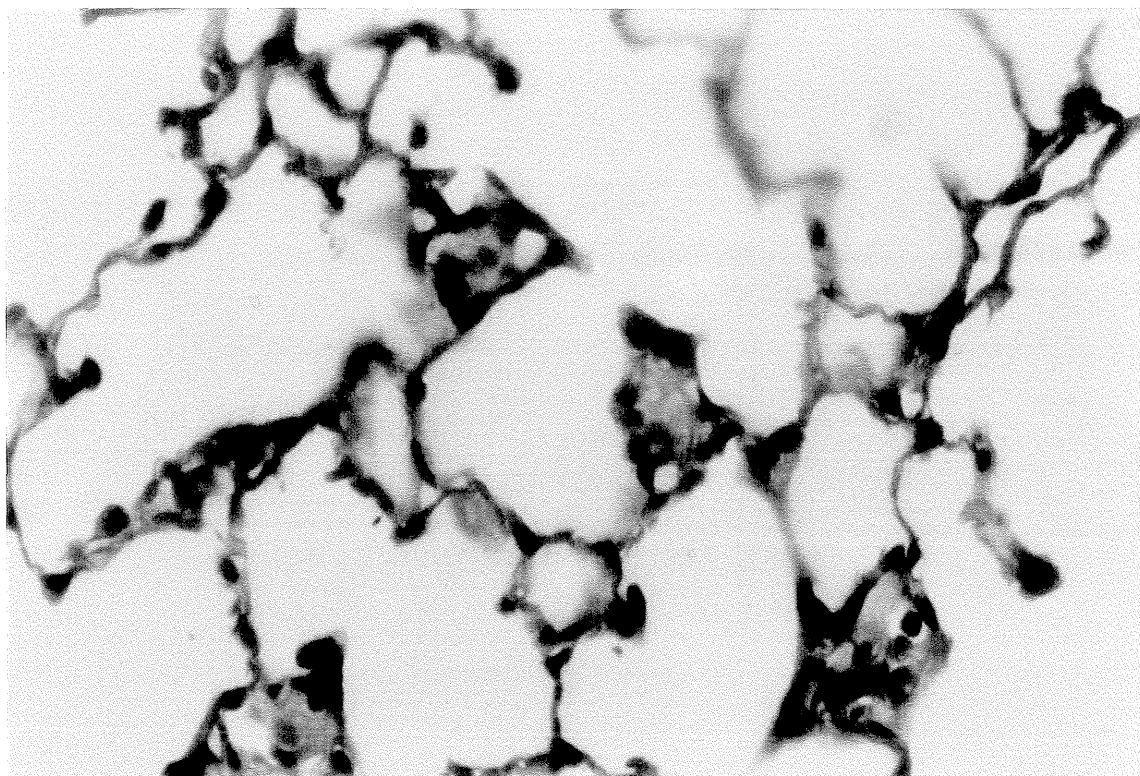


Figura 16. Espécime pulmonar 1 hora após a instilação de bleomicina intratraqueal. Existe uma mastocitose difusa nos espaços intraalveolares, com a presença de macrófagos intraalveolares ocasionais. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.



Figura 17. Espécime pulmonar 24 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal. Proeminência do epitélio bronquiolar com hiperplasia reacional. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

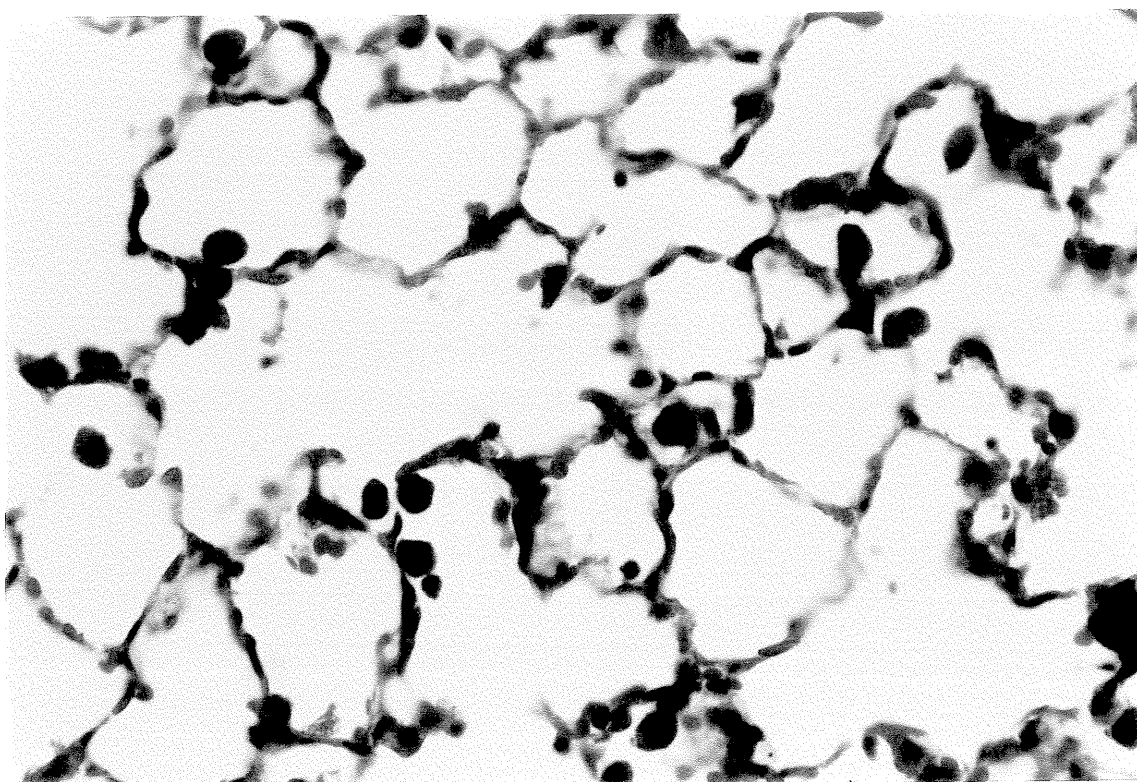


Figura 18. Espécime pulmonar 24 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de um grande número de macrófagos alveolares com aumento do seu citoplasma e eventualmente com vacuolizações . Persiste um grande número de mastócitos intraalveolares. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

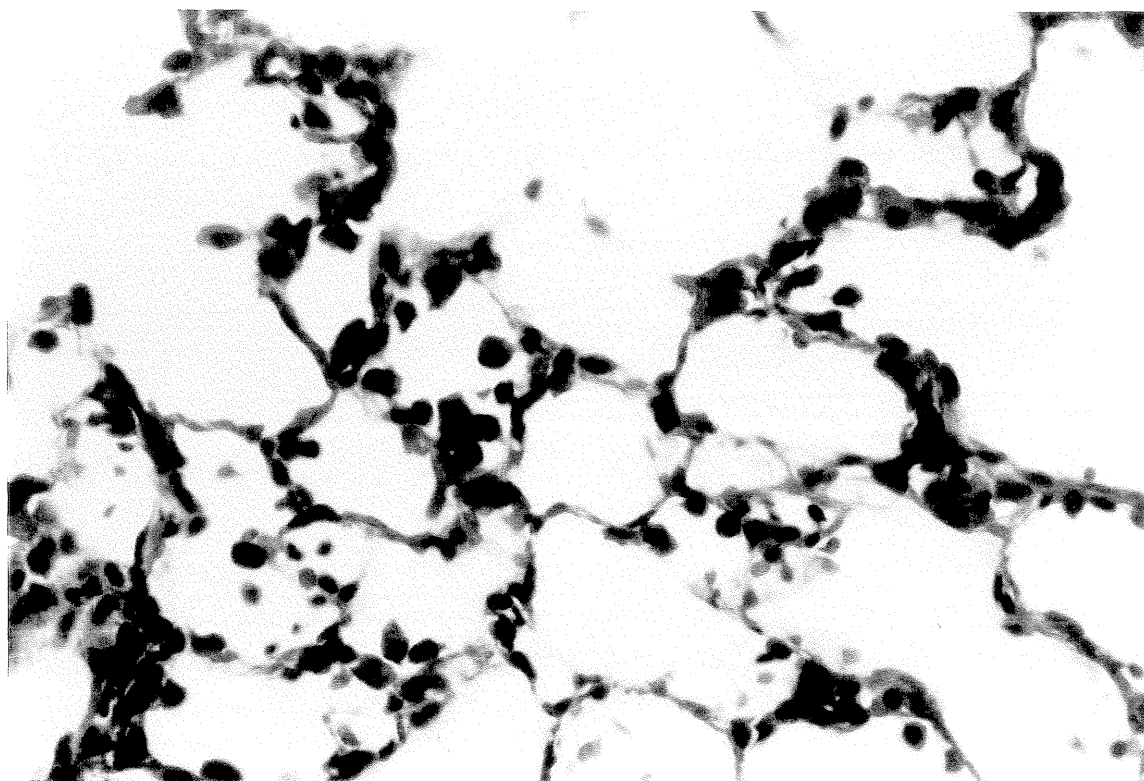


Figura 19. Espécime pulmonar 24 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal. Início de edema alveolar e intersticial. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

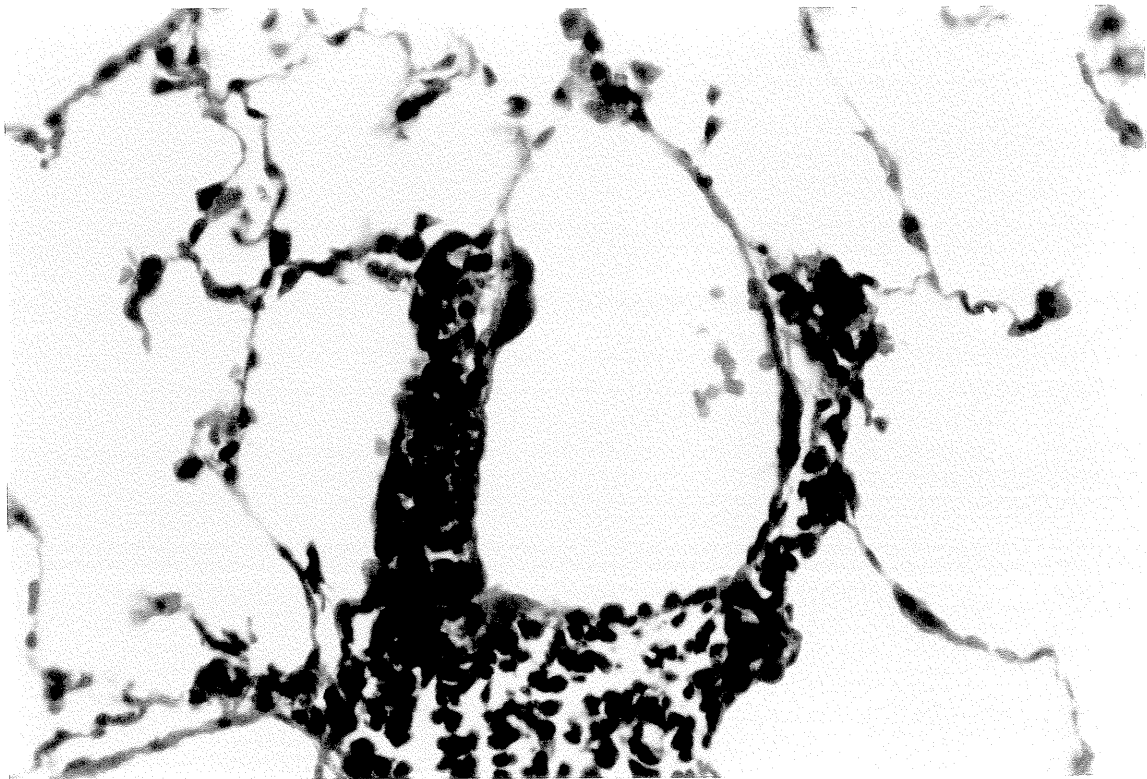


Figura 20. Espécime pulmonar 24 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de necrose e cariorrexis em uma célula endotelial e de um infiltrado mononuclear perivascular. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

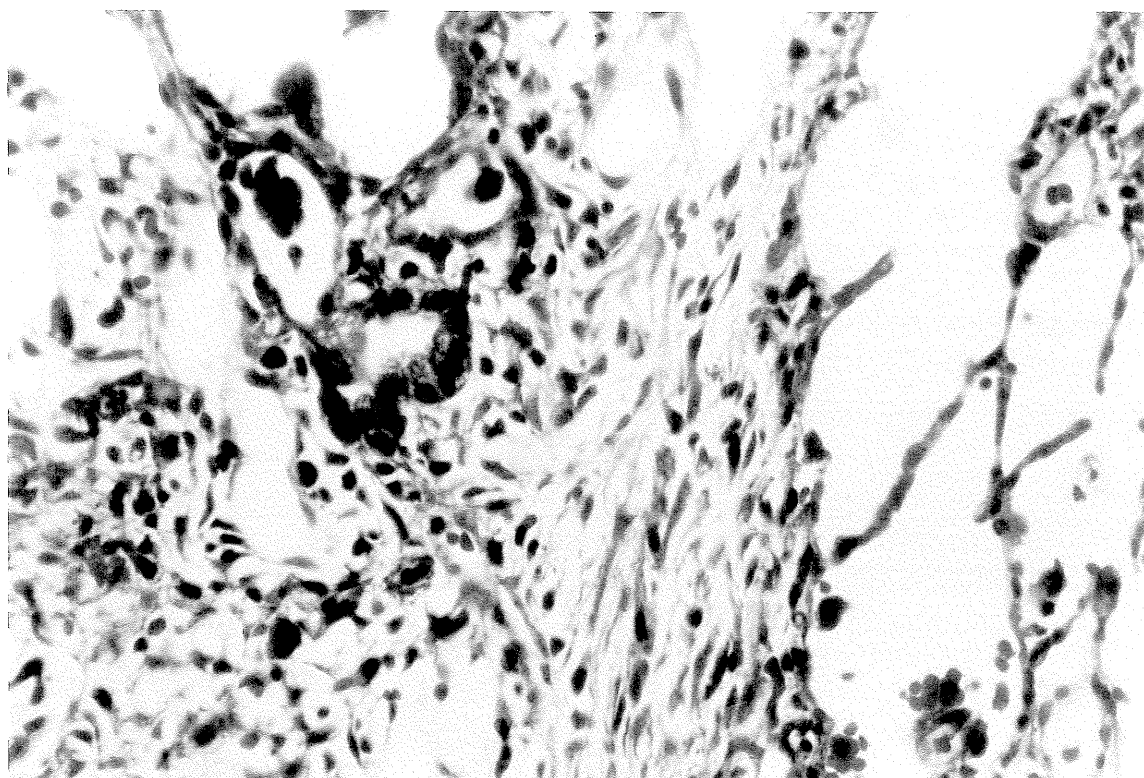


Figura 21. Espécime pulmonar 7 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de intenso processo regenerativo, com o início da formação de fibrose intersticial. A superfície alveolar está coberta por células cubóides do tipo II. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

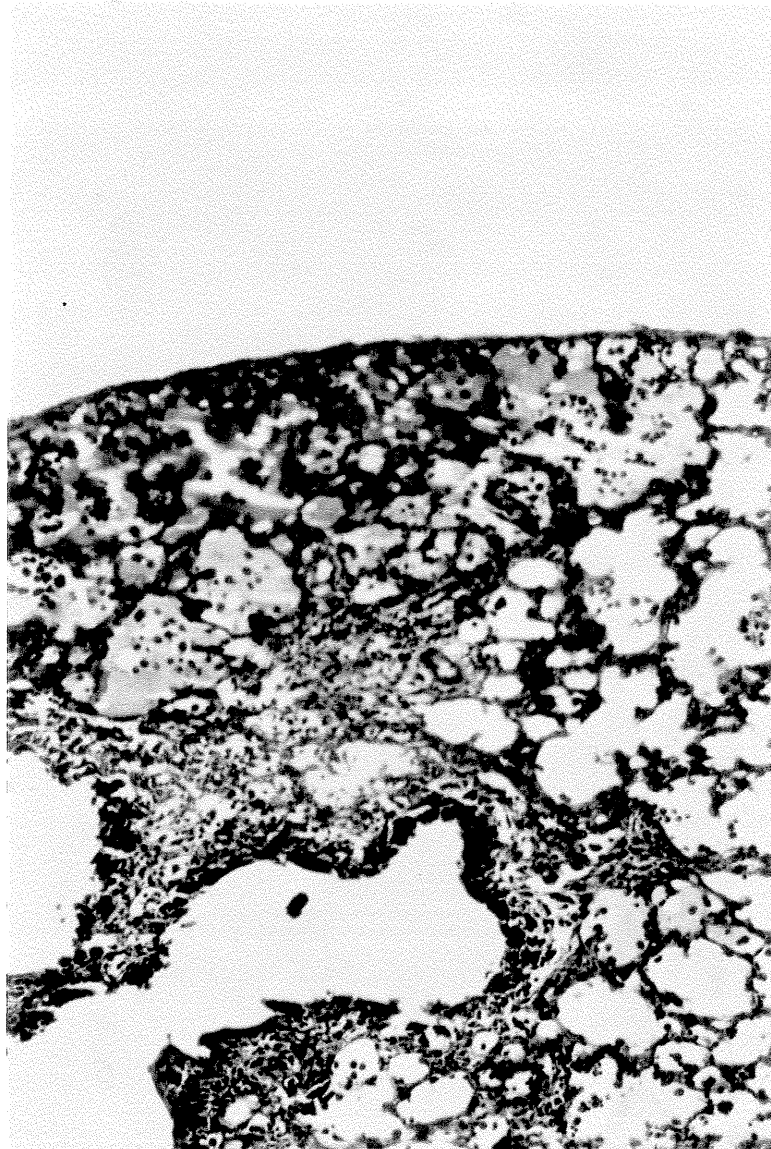


Figura 22. Espécime pulmonar 7 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de acentuado edema subpleural. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

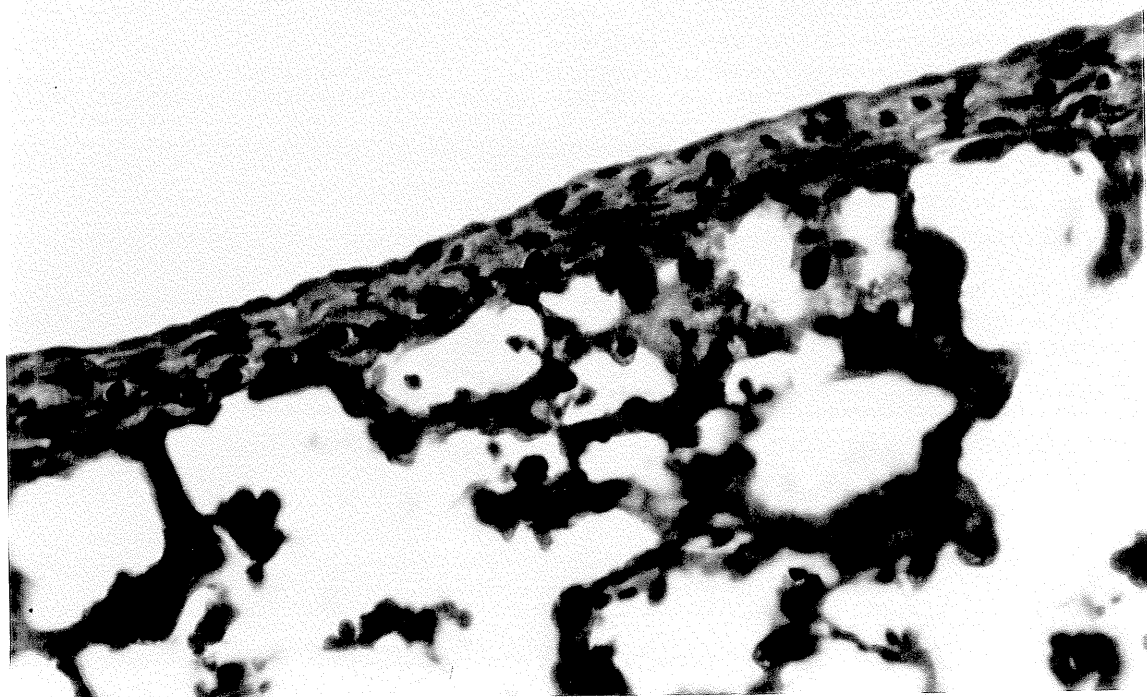


Figura 23. Espécime pulmonar 7 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Espessamento focal da pleura. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

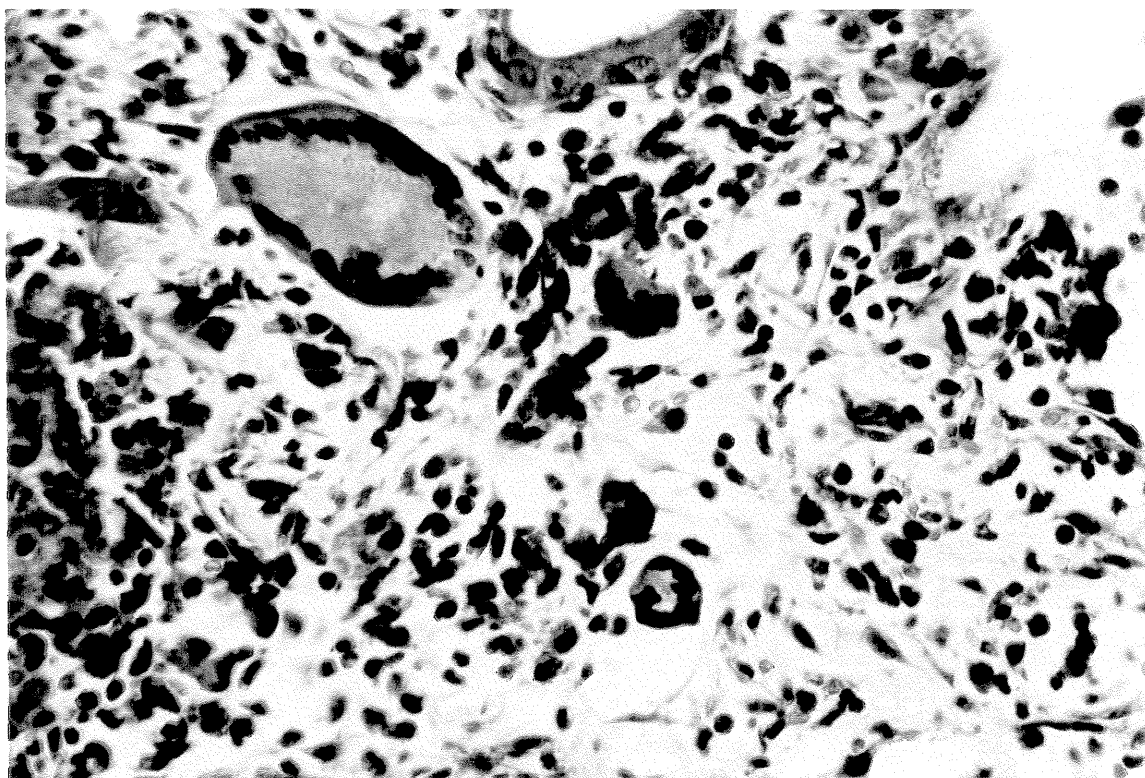


Figura 24. Espécime pulmonar 7 dias após a instilação intratraqueal de bleomicina. Nas áreas de maior dano tecidual se demonstra a presença de células gigantes e numerosos macrófagos intraalveolares e intersticiais. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

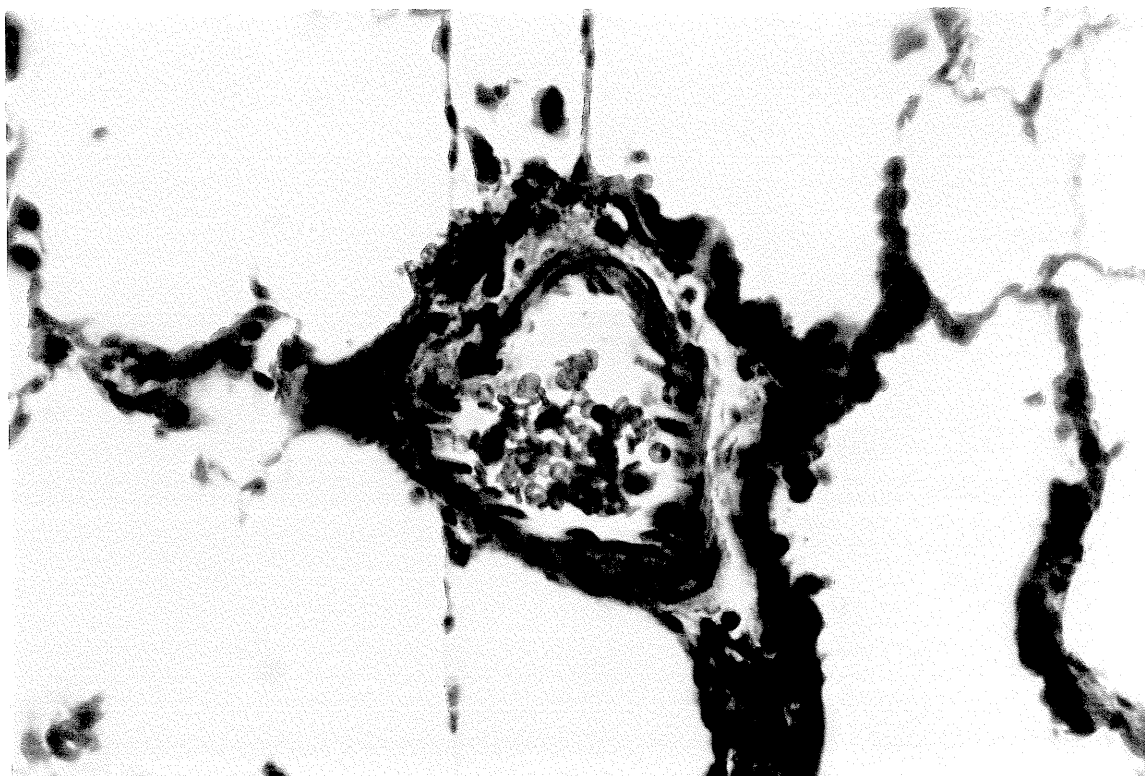


Figura 25. Espécime pulmonar 7 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de vasculite mononuclear. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 400.

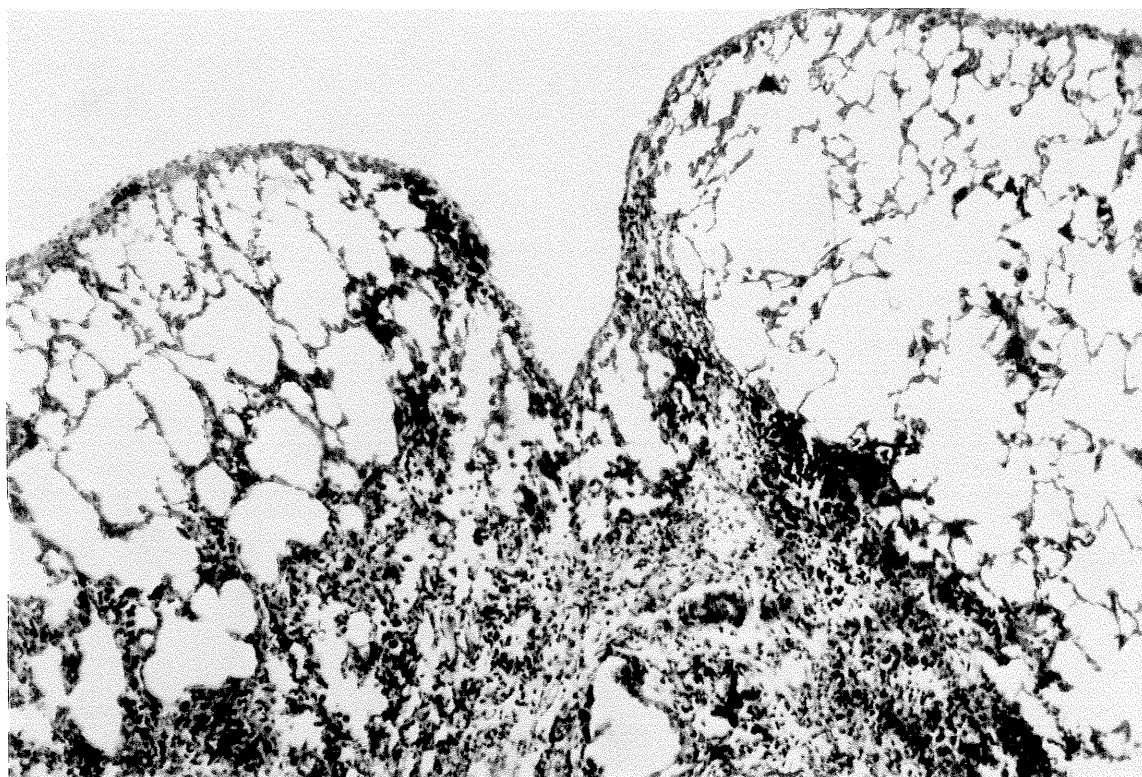


Figura 26. Espécime pulmonar 15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Nota-se retração pleural secundária a fibrose no parênquima pulmonar. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 100.

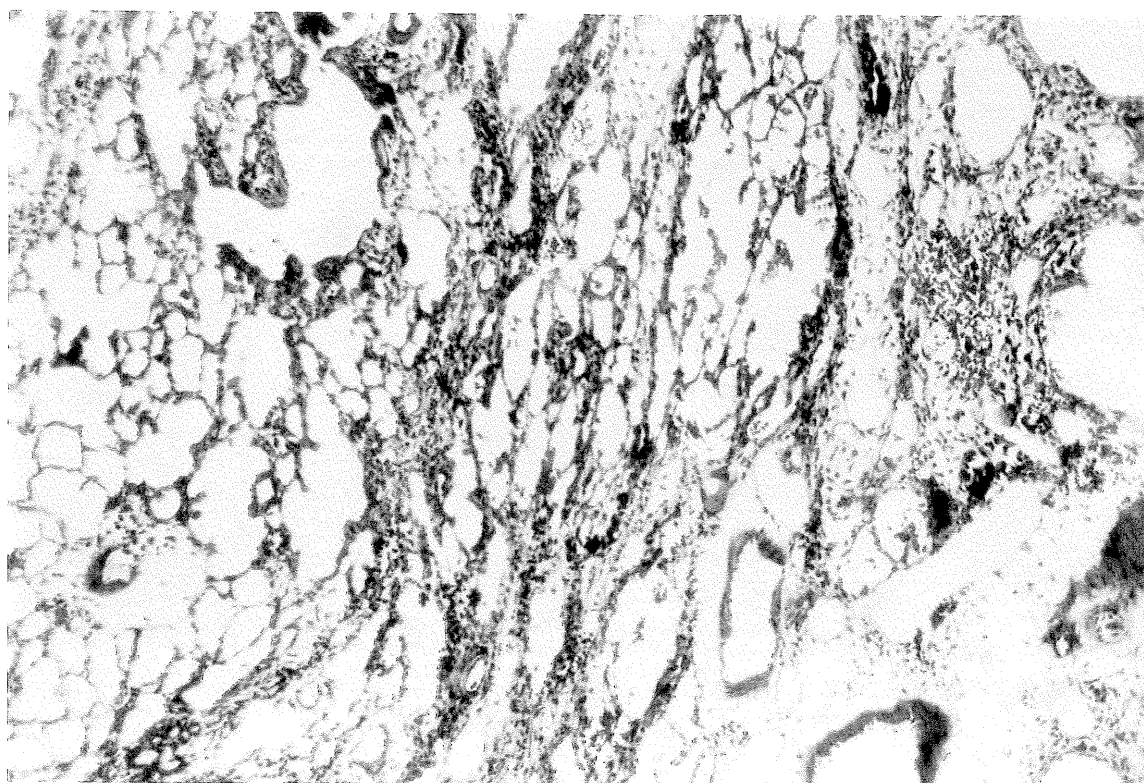
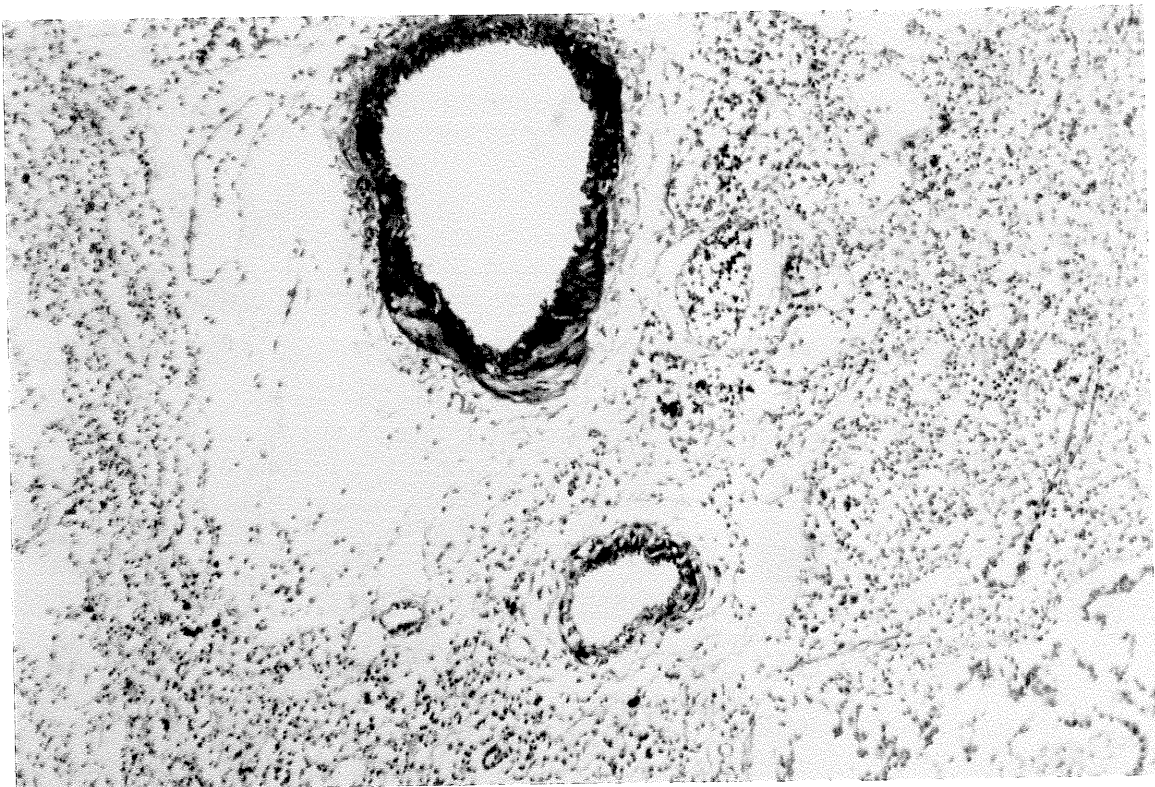


Figura 27. Espécime pulmonar 15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Persistência do infiltrado mononuclear intersticial, com a formação de cicatrizes fibrosas e necrose fibrinóide das paredes vasculares. O infiltrado intersticial é menos intenso do que no sétimo dia. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 100.

Figura 28. Espécime pulmonar 15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de necrose fibrinóide nas paredes vasculares. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 100.



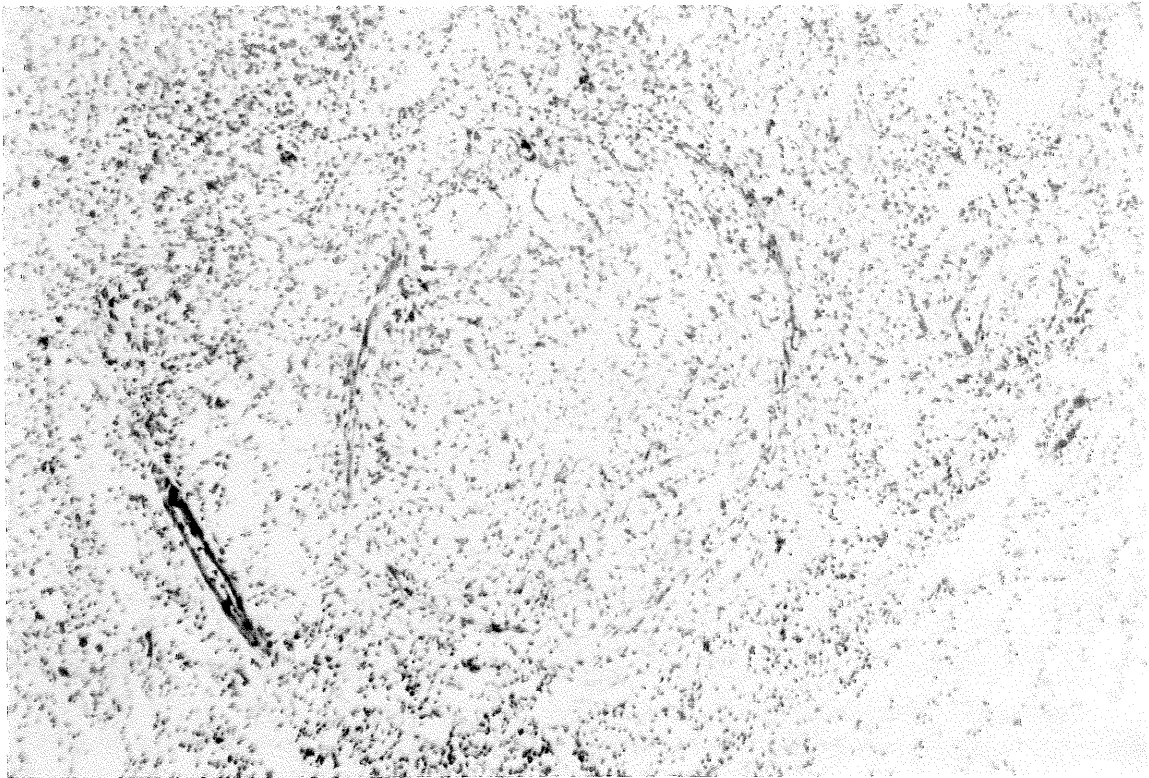


Figura 29. Espécime pulmonar 30 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de nódulos fibrosos tipo “faveolamento”. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 100.

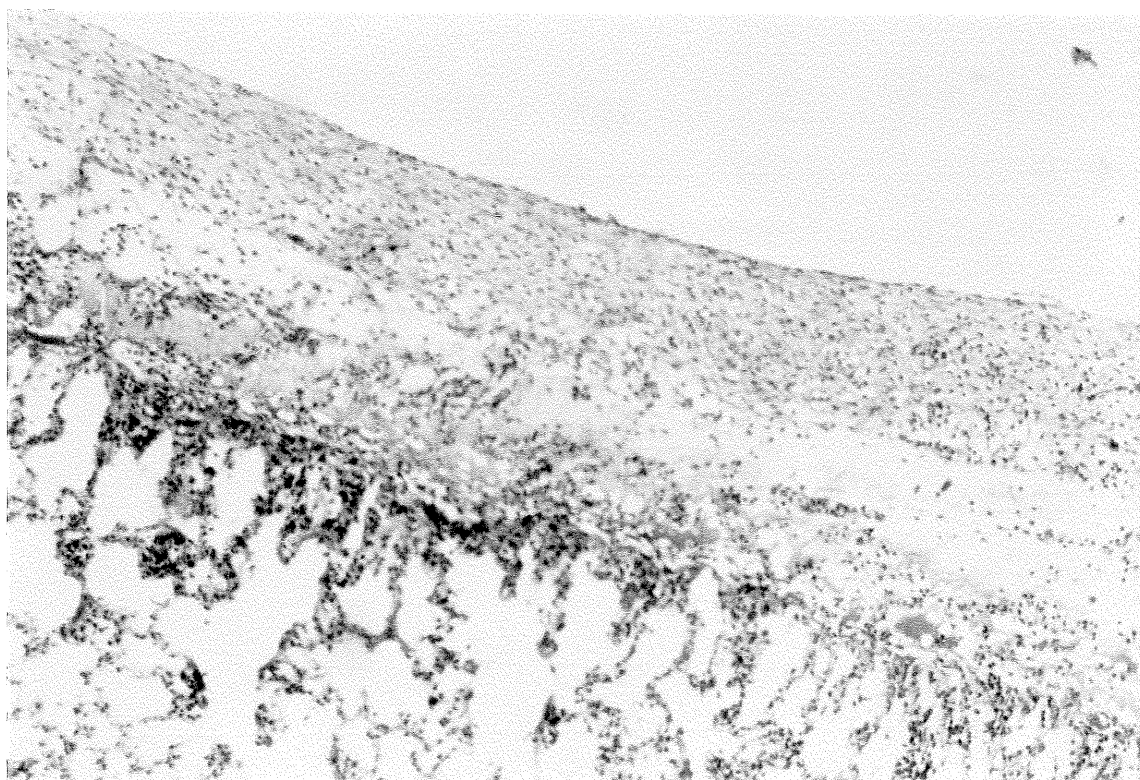


Figura 30. Espécime pulmonar 30 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Espessamento pleural difuso. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 100.

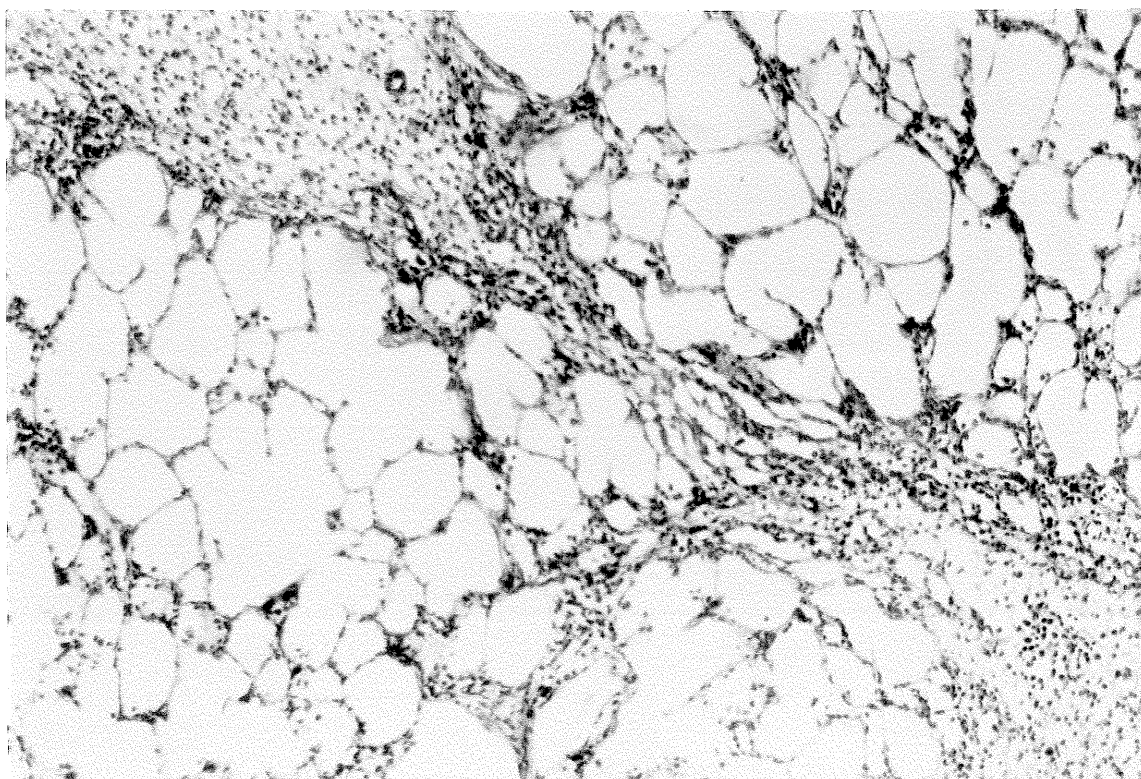


Figura 31. Espécime pulmonar 30 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Presença de “pontes” entre as regiões de fibrose. Nesta fase, há uma diminuição do infiltrado intersticial e alveolar. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 100.

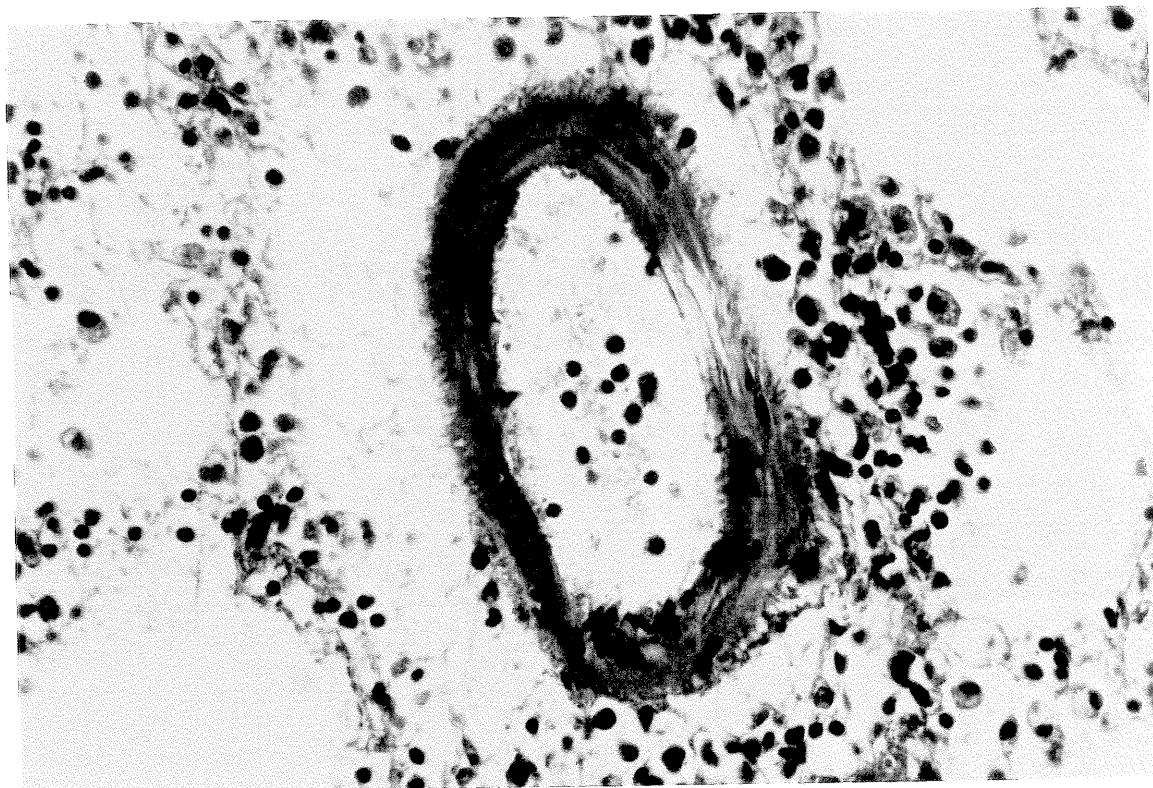


Figura 32. Espécime pulmonar 30 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal. Existe uma hiperplasia da camada muscular dos vasos sanguíneos , persistindo o quadro de vasculite. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x 400.

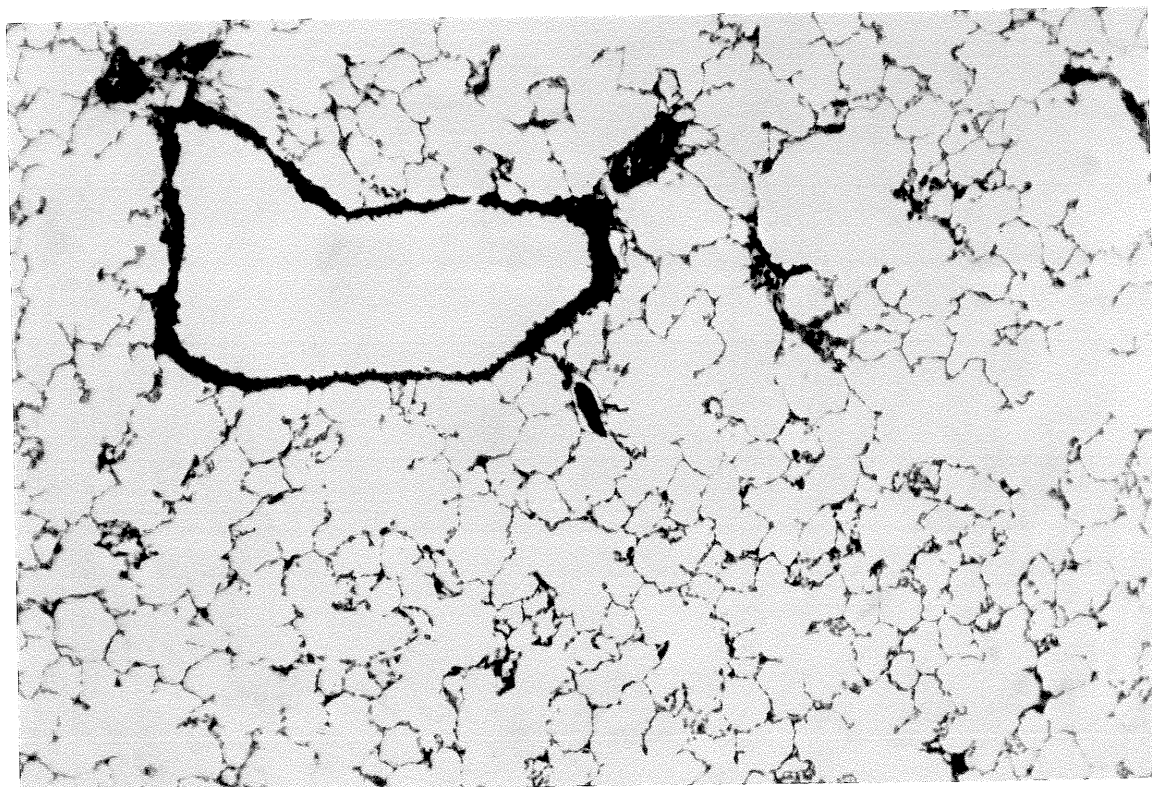


Figura 33. Espécime pulmonar no 15^o dia de uso do PPS subcutâneo na dose de 25 mg/kg/dia. Arquitetura pulmonar normal. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação de x 100.

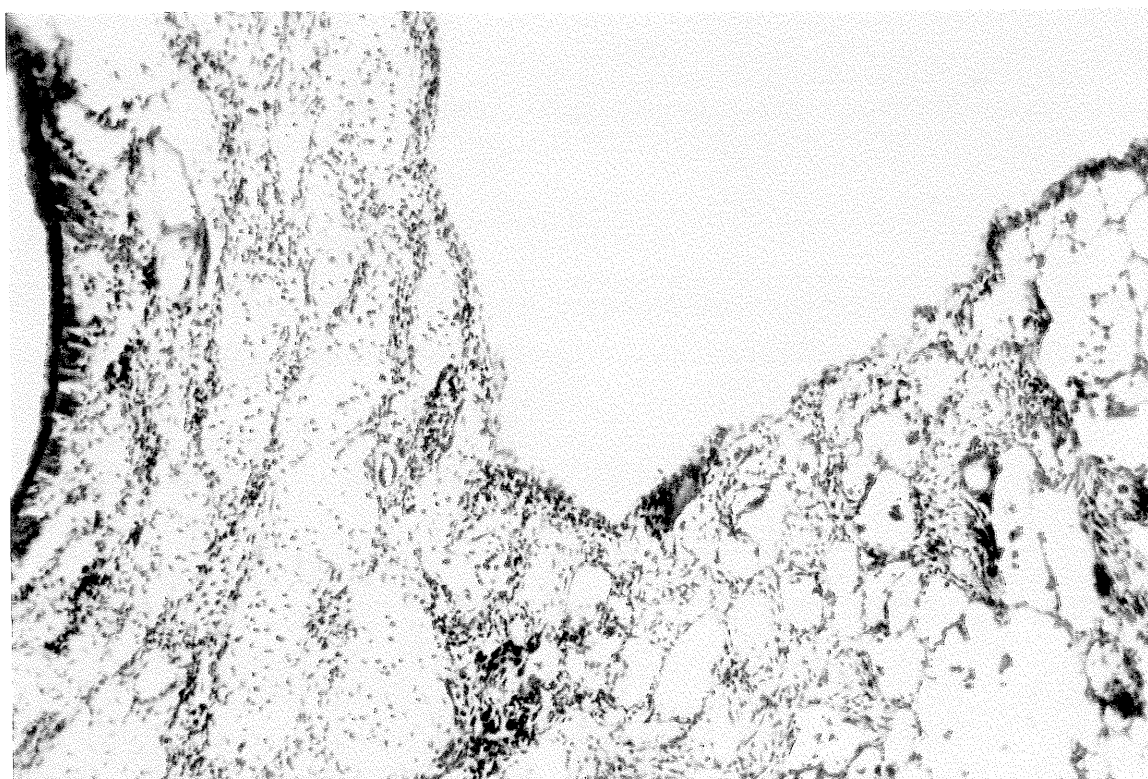


Figura 34. Espécime pulmonar no 15^o dia pós instilação de bleomicina intratraqueal e uso de PPS subcutâneo na dose de 25mg/kg/dia. Presença de fibrose pulmonar, retração e espessamento pleural e distorção da arquitetura alveolar normal. Coloração de hematoxilina e eosina. Ampliação x100.

3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.2.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A segunda parte do experimento utilizou 40 ratas da raça Wistar com peso variando entre 175 e 225g. Não havia diferença estatística entre os quatro grupos de 10 ratas cada, quando comparados em relação ao peso inicial ($p = 0,3066$). Tabelas 1 e 2.

Os grupos de ratas controle e PPS não apresentaram mortalidade. O grupo de ratas que recebeu bleomicina intratraqueal + PPS apresentou três óbitos assim distribuídos: 1 óbito no 2^o dia, 1 óbito no 11^o dia e 1 óbito no 13^o dia. O grupo de ratas que recebeu bleomicina intratraqueal apresentou 1 óbito no 2^o dia.

Tabela 1. Peso inicial e final das ratas analisadas por grupo de interesse

Rato	Controle		PPS		Bleomicina		PPS + Bleomicina	
	PI*	PF**	PI	PF	PI	PF	PI	PF
1	220	240	180	195	215	240	195	140
2	215	230	175	195	225	230	175	110
3	190	200	180	200	215	205	220	180
4	220	235	190	215	215	230	200	150
5	225	245	215	230	190	205	210	140
6	220	230	210	225	190	200	215	140
7	180	200	225	240	200	225	180	120
8	190	210	210	225	215	220		
9	205	225	175	185	190	190		
10	200	215	190	205				

* Peso Inicial

** Peso Final

Tabela 2. Média e erro padrão da média dos pesos inicial e final das ratas analisadas por grupo de interesse

Grupos	Peso Inicial		Peso Final	
	Média	EP*	Média	EP
Controle	206,5	5,00	223,0	5,07
Polissulfato de pentosan	195,0	5,82	211,5	5,73
Bleomicina	206,1	4,55	215,6	5,58
PPS + Bleomicina	199,3	6,49	140,0	8,45

* Erro Padrão da Média

3.2.2. VARIACÃO DO PESO DOS ANIMAIS

A análise de variância não-paramétrica demonstrou diferença na variação de peso entre os grupos ($p = .0004$). Através do teste de comparação múltipla observou-se que os grupos que os grupos controle , PPS não diferiram em relação a diferença entre o peso inicial e o peso final . O grupo que recebeu bleomicina ganhou menos peso quando comparado aos grupos controle e PPS. O grupo que recebeu bleomicina + PPS perdeu peso de uma maneira estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. (Tabelas 3 e 4 e Fig. 35).

Tabela 3. Resultados dos testes de comparação múltipla para o teste de Kruskal Wallis da diferença entre o peso inicial e o final dos grupos

Grupos	$ \bar{T}_i - \bar{T}_j $	H	Diferença
Controle e PPS	5,50	8,15	
Controle e Bleomicina	76,47	8,37	*
Controle e PPS+Bleomicina	212,00	8,98	*
PPS e Bleomicina	70,97	8,37	*
PPS e PPS+Bleomicina	206,50	9,98	*
Bleomicina e PPS+Bleomicina	135,53	9,19	*

* - Diferença estatisticamente significante

Tabela 4. Média e erro padrão da média da diferença entre o peso inicial e o final para os grupos de interesse

Grupos	Média	Erro Padrão
Controle	16,5	1,30
Polissulfato de pentosan	16,5	1,30
Bleomicina	10,0	3,82
PPS + Bleomicina	-59,3	4,56

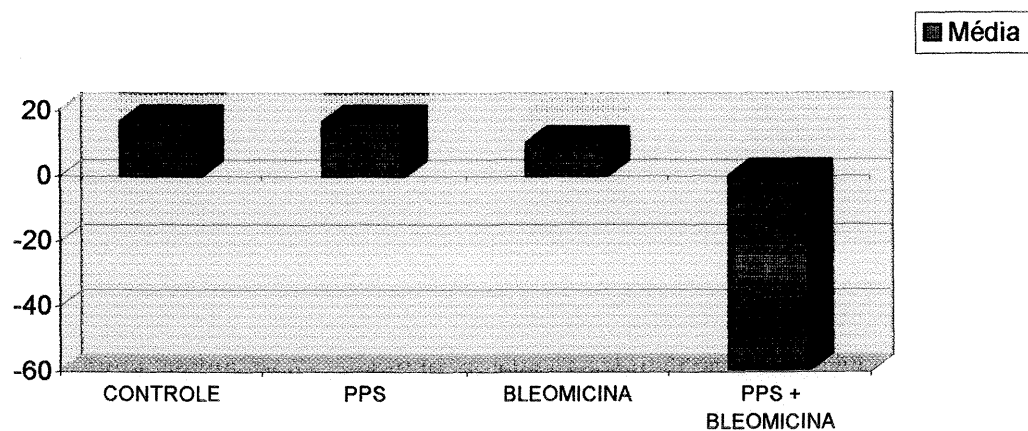


Figura 35. Média da diferença entre o peso inicial e o final, em gramas, em relação aos grupos de interesse

3.2.3. QUANTIFICAÇÃO DA FIBROSE PULMONAR

As tabelas 5,6,7 e 8 demonstram os valores das áreas totais de parênquima pulmonar examinadas e de fibrose pulmonar, a partir da análise das imagens obtidas aleatoriamente.

Tabela 5. Quantificação da área de parênquima estudada e a percentagem de fibrose pulmonar nas ratas controle

Rata	AT* (μ^2)	AF** (μ^2)	Rata	AT (μ^2)	AF (μ^2)
1	414985	0	6	618183	0
1	612328	0	6	618831	0
1	934285	0	6	701371	0
1	523987	0	6	681318	0
1	487235	0	6	601831	0
1	536798	0	6	685713	0
1	722876	0	6	595284	0
1	711754	0	6	591738	0
2	695532	0	7	601831	0
2	598765	0	7	918381	0
2	732198	0	7	701398	0
2	725331	0	7	736481	0
2	731570	0	7	762618	0
2	730187	0	7	701833	0
2	736221	0	7	719234	0
2	789344	0	7	721937	0
3	901876	0	8	732454	0
3	654122	0	8	743321	0
3	701981	0	8	750923	0
3	791655	0	8	789128	0
3	346221	0	8	702435	0
3	704001	0	8	690123	0
3	495123	0	8	710239	0
3	501789	0	8	509392	0
4	456987	0	9	701939	0
4	432789	0	9	692831	0
4	403129	0	9	500344	0
4	403344	0	9	490021	0
4	698765	0	9	598673	0
4	701423	0	9	602912	0
4	699762	0	9	873741	0
4	872001	0	9	509284	0
5	742617	0	10	639588	0
5	719172	0	10	498579	0
5	827361	0	10	834760	0
5	651902	0	10	839027	0
5	426819	0	10	507352	0
5	427316	0	10	729097	0
5	618381	0	10	680903	0
5	817316	0	10	549753	0

*Área total

** Área com fibrose

Tabela 6. Quantificação da área de parênquima avaliada e de fibrose pulmonar no grupo de ratas que recebeu PPS

Rata	AT* (μ^2)	AF** (μ^2)	Rata	AT (μ^2)	AF (μ^2)
1	698002	0	6	563924	0
1	723456	0	6	802498	0
1	765849	0	6	652748	0
1	802837	0	6	627488	0
1	720319	0	6	750394	0
1	689324	0	6	753627	0
1	650942	0	6	762536	0
1	648281	0	6	781399	0
2	657382	0	7	634617	0
2	702942	0	7	702982	0
2	719283	0	7	729284	0
2	723884	0	7	648392	0
2	734249	0	7	749303	0
2	692848	0	7	763848	0
2	802492	0	7	802482	0
2	838429	0	7	839294	0
3	619293	0	8	583829	0
3	568924	0	8	503228	0
3	721449	0	8	827474	0
3	509814	0	8	1034824	0
3	709812	0	8	472284	0
3	801183	0	8	921848	0
3	753829	0	8	503924	0
3	734245	0	8	694929	0
4	802848	0	9	359294	0
4	682949	0	9	308742	0
4	838484	0	9	704382	0
4	824774	0	9	837278	0
4	502499	0	9	702984	0
4	400392	0	9	837274	0
4	390982	0	9	756352	0
4	709248	0	9	735624	0
5	802948	0	10	526472	0
5	720949	0	10	654839	0
5	746562	0	10	582840	0
5	729824	0	10	294842	0
5	786398	0	10	763995	0
5	675929	0	10	832848	0
5	602949	0	10	788472	0
5	759248	0	10	827472	0

* Área Total

** Área com Fibrose

Tabela 7. Quantificação da área de parênquima pulmonar e de fibrose pulmonar no grupo de ratas que recebeu bleomicina intratraqueal

Rata	AT * (μ 2)	AF ** (μ 2)	Rata	AT** (μ 2)	AF (μ 2)
1	1187361	198172	6	798731	23774
1	987234	90876	6	698382	0
1	897372	89843	6	747723	340
1	976524	09824	6	982714	49837
1	1002847	123482	6	1092834	79384
1	1203945	234201	6	1182737	84728
1	998744	97281	6	502837	0
1	1203873	189823	6	1287172	87827
2	1008323	78965	7	608283	0
2	1156745	65423	7	708293	0
2	1208374	56423	7	1009827	56473
2	943123	34563	7	698374	0
2	897626	67894	7	998172	90928
2	1102384	101342	7	1223728	89017
2	890283	23643	7	1092833	56002
2	502834	34976	7	700827	0
3	1121451	0	8	780526	0
3	756890	45765	8	692013	0
3	987640	58765	8	892831	0
3	1123453	74532	8	707838	0
3	1230032	110873	8	837428	0
3	543654	0	8	764829	0
3	965976	76876	8	802847	0
3	1134563	87654	8	782942	0
4	1231126	77642	9	893202	34293
4	1156724	54876	9	909283	23647
4	991827	77929	9	102837	56473
4	793841	34248	9	873623	43622
4	543622	133	9	637273	23748
4	489292	0	9	1192837	40626
4	673642	0	9	1108283	120382
4	578348	0	9	675893	0
5	893827	45928			
5	1128374	67583			
5	562711	241			
5	1272834	87364			
5	1087482	79827			
5	1392734	99783			
5	998762	34762			
5	543672	0			

* Área Total

** Área com Fibrose

Tabela 8. Quantificação da área de parênquima pulmonar e de fibrose pulmonar no grupo de ratas que recebeu Bleomicina intratraqueal + PPS

Rata	AT* (μ^2)	AF** (μ^2)	Rata	AT (μ^2)	AF (μ^2)
1	897362	43283	5	992342	89304
1	1102384	78465	5	1098242	90283
1	987364	67584	5	9287424	101983
1	1093874	87543	5	1374612	135627
1	780653	12983	5	973628	90182
1	890372	99837	5	794829	68338
1	989493	121002	5	1173842	120834
1	978323	48657	5	782944	12934
2	902834	42192	6	983742	78237
2	890283	36785	6	937421	68376
2	908273	33782	6	738429	97273
2	110283	39847	6	598543	0
2	828344	36398	6	1024727	89483
2	736426	22837	6	1102844	72384
2	927347	42474	6	938249	54300
2	938824	33424	6	900028	83842
3	792842	0	7	952842	78576
3	827427	741	7	654739	3492
3	982472	28737	7	56392	7838
3	837427	73759	7	903842	83742
3	992784	80283	7	983672	78394
3	984829	82834	7	1101823	98374
3	834333	76254	7	1000383	99826
3	927842	54362	7	908274	70398
4	893482	33563			
4	901842	30287			
4	910920	31932			
4	783742	23415			
4	754623	22019			
4	793842	40928			
4	738422	44953			
4	691823	12938			

* Área Total

** Área com Fibrose

3.2.4. ANÁLISE DA ÁREA TOTAL DE PARÊNQUIMA PULMONAR AVALIADA ENTRE OS GRUPOS

A análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença na área de parênquima pulmonar analisada ($p = .0000$). Através do teste de comparação múltipla observou-se que os grupos tratados com bleomicina e bleomicina + PPS tiveram maior área de parênquima pulmonar analisado, quando comparados aos grupos controle e PPS. Os grupos controle e PPS não diferiram em relação a esse parâmetro (Tabelas 9 e 10 e Fig 36).

Tabela 9. Teste de Kruskal-Wallis da área total de parênquima pulmonar analisada

Grupos	$ \bar{T}_i - \bar{T}_j $	H	Diferença
Controle e PPS	22,45	28,05	
Controle e Bleomicina	99,41	28,82	*
Controle e PPS+Bleomicina	110,64	30,91	*
PPS e Bleomicina	76,96	28,82	*
PPS e PPS+Bleomicina	88,19	30,91	*
Bleomicina e PPS+Bleomicina	11,23	31,61	

* Diferença estatisticamente significativa.

Tabela 10. Média e erro padrão da média da área total analisada em relação aos grupos de interesse

Grupos	Média	Erro Padrão
Controle	656425,6	14750,50
Polissulfato de pentosan	094806,5	14970,09
Bleomicina	907750,3	29184,02
PPS + Bleomicina	1033480,4	152556,12

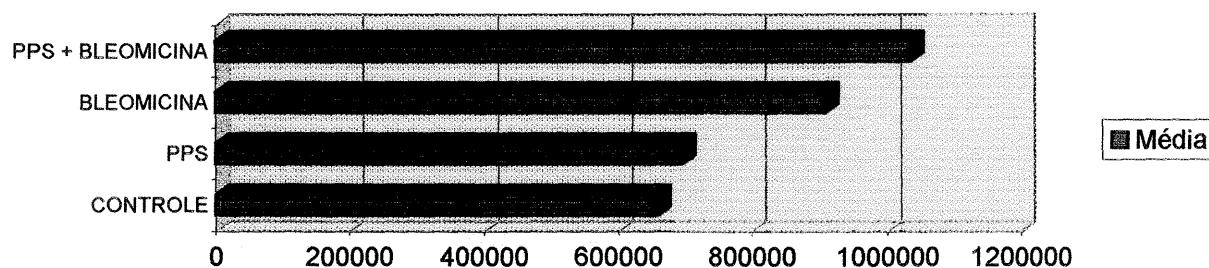


Figura 36. Média da área total (em μ^2) analisada em relação aos grupos de interesse.

3.2.5. ANÁLISE DA ÁREA DE FIBROSE PULMONAR AVALIADA ENTRE OS GRUPOS

A análise de variância não paramétrica permitiu concluir que o grupo tratado com bleomicina + PPS, além de não ser protegido contra a fibrose pulmonar, apresentou maior proporção de fibrose comparativamente ao grupo que recebeu apenas bleomicina

intratraqueal. As ratas controle e as que receberam polissulfato de pentosan não demonstraram fibrose (Tabelas 11 e 12 e Fig 37 e 38).

Tabela 11. Resultados dos testes de comparação múltipla para o teste de Kruskal-Wallis da proporção de área com fibrose

Grupos	$ \bar{T}_i - \bar{T}_j $	H	Diferença
Controle e PPS	0,00	28,05	
Controle e Bleomicina	102,11	28,82	*
Controle e PPS+Bleomicina	138,71	30,91	*
PPS e Bleomicina	102,11	28,82	*
PPS e PPS+Bleomicina	138,71	30,91	*
Bleomicina e PPS+Bleomicina	36,60	31,61	*

- Diferença estatisticamente significativa.

Tabela 12. Média e erro padrão da média da proporção da área total atingida por fibrose

Grupos	Média	Erro Padrão
Controle	0,0	0,00
Polissulfato de pentosan	0,0	0,00
Bleomicina	5,5	0,87
PPS + Bleomicina	6,7	0,70

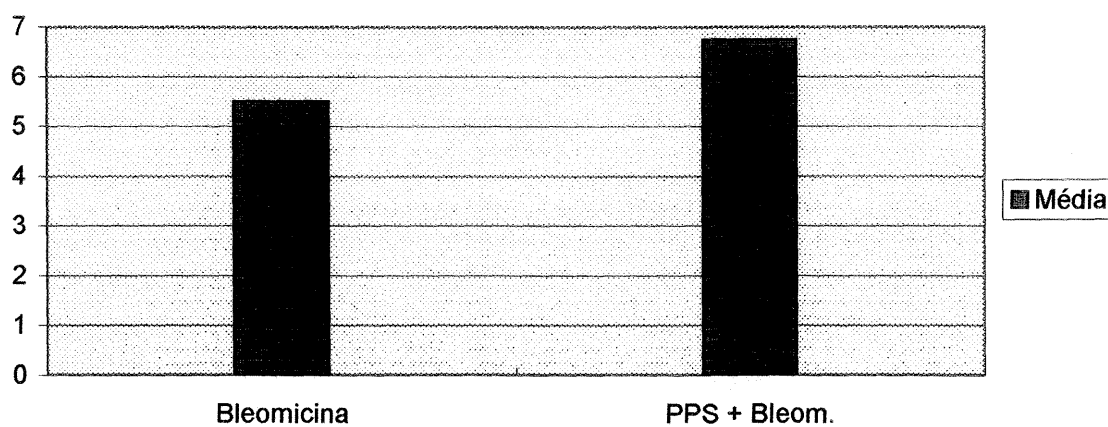


Figura 37. Média da proporção da área total analisada atingida por fibrose em relação aos grupos de interesse. Os demais grupos (controle e PPS) não aparecem no gráfico acima, pois seus valores foram constantes (zero) e, conseqüentemente, não tiveram variabilidade.

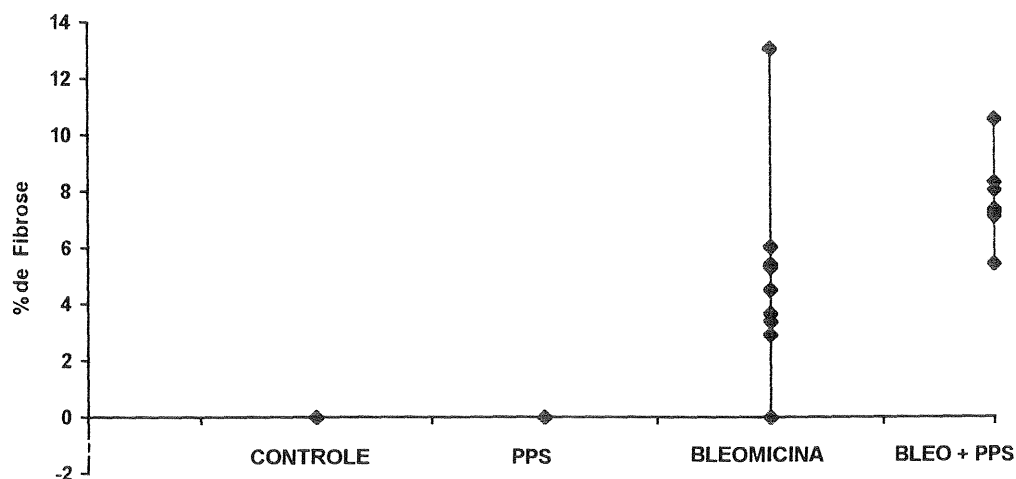


Figura 38. Gráfico da proporção de fibrose em relação aos grupos desse estudo

3.2.6. CORRELAÇÃO ENTRE A FIBROSE PULMONAR E A VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS

Utilizando o coeficiente de correlação de Spearman, demonstra-se que há uma correlação inversa, significativa, entre a proporção de fibrose e a variação de peso dos animais estudados ($r=-0.5648$; $p=0.0000$).

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

“O melhor objeto de estudo da humanidade é o próprio homem”⁹¹. Tal frase seria facilmente endossada pela maioria dos investigadores. Infelizmente a humanidade é avessa a ser devidamente estudada, especialmente quando doente. Tal fato complica a investigação do desenvolvimento e do quadro evolutivo das doenças humanas, uma vez que frequentemente lesões subclínicas não podem ser detectadas ou medidas devidamente *ex vivo*. Tais dados seriam cruciais para se compreender a patogênese e formular-se estratégias para possíveis intervenções terapêuticas em diversas situações.

Conseqüentemente, os modelos experimentais são muito importantes para o avanço científico. Os modelos *in vitro* são úteis para a análise da contribuição de populações celulares individuais em relação a um processo fisiológico ou patológico. O pulmão, no entanto, é um órgão no qual as interações entre os diferentes tipos celulares são dependentes da sua própria organização espacial. Além disso, o efeito de um agente tóxico ao pulmão é em parte determinado pela via de administração do agente e da susceptibilidade genética do organismo a esse agente. Dessa maneira muitas questões clinicamente relevantes sobre a patogênese das doenças pulmonares e das vias respiratórias só podem ser abordadas através de modelos experimentais em animais.⁸³

Na maioria dos modelos animais de injúria pulmonar fibrogênica, as lesões são causadas pela exposição a um agente tóxico. O modelo pulmonar de SARA mais utilizado é

o da instilação de uma dose única de bleomicina intratraqueal. Esse modelo possui diversas vantagens sobre os modelos que utilizam a bleomicina via parenteral, tais como: um desenvolvimento mais rápido e previsível de fibrose pulmonar e uma distribuição não homogênea das lesões , o que é compatível com o quadro de SARA que ocorre em humanos⁸³⁻⁸⁷⁻⁹².

4.1. BLEOMICINA

A bleomicina é um importante agente antitumoral descoberto por Umezana e colegas como um produto da fermentação do fungo *Streptomyces verticillus*⁹³ (Fig 39). A bleomicina possui significativa ação antitumoral numa gama de neoplasias humanas tais como: os linfomas, os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e os carcinomas de testículo. Este importante agente quimioterápico causa uma mielossupressão e toxicidade gastrointestinal mínimas , possuindo um importante papel curativo (em linfomas e carcinomas de testículo) em esquemas de poliquimioterapia⁹⁴.

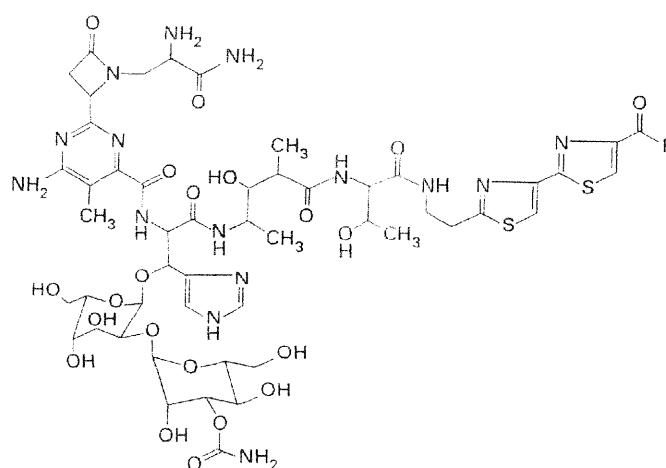


Figura 39. Estrutura química da bleomicina (segundo Riggs C E Jr.⁹⁵).

Após a formação de um complexo com o cobre, ferro, níquel ou manganês, a bleomicina reduz o oxigênio molecular a radicais superóxido e hidroxila, que depois causarão dano ao DNA⁹⁶. A bleomicina causa seu efeito citotóxico através da fragmentação do DNA, causando um acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular, o que, em células com o aparelho de *apoptosis* intacto(sem alteração na função do gene p53, por exemplo), levará à morte celular programada das células tumorais⁹⁷.

A bleomicina é distribuída rapidamente no organismo após a administração parenteral. As maiores concentrações da droga são alcançadas nos rins, fígado, pele, linfonodos e pulmões. Os efeitos tóxicos da bleomicina são bem conhecidos. A pele e os pulmões são os órgãos mais afetados. Existe uma correlação direta entre os baixos níveis da enzima bleomicina hidroxilase e a toxicidade cutânea e pulmonar da droga⁹⁸⁻⁹⁹⁻¹⁰⁰.

A reação adversa mais séria à bleomicina é a toxicidade pulmonar que pode se manifestar agudamente como uma reação de hipersensibilidade caracterizada por angioedema, urticária e broncoespasmo (sendo esta a razão para realizar-se uma dose teste de 1mg EV), ou crônicamente como fibrose pulmonar progressiva.

A toxicidade crônica se manifesta clinicamente por uma tosse seca, estertores crepitantes finos e um infiltrado pulmonar difuso bibasal no exame de raio-x pulmonar. Os achados radiográficos podem ser sugestivos de um quadro infeccioso, de recidiva ou de progressão tumoral, podendo progredir para cavitação, atelectasia, colapso lobar ou mesmo consolidação pulmonar¹⁰¹⁻¹⁰².

Aproximadamente 10% dos pacientes que recebem bleomicina desenvolvem toxicidade pulmonar clínica e cerca de 1-2% vem a falecer em decorrência dessa complicação. Na maioria dos pacientes que se recuperam, existe uma melhora significativa da função pulmonar, porém a fibrose pode ser irreversível. Infelizmente os testes de função pulmonar não são de valor preditivo para se detectar o início precoce dessa complicação¹⁰³. A capacidade de difusão do dióxido de carbono (CO), declina nos pacientes que recebem uma dose total cumulativa maior de 250 unidades¹⁰⁴

O risco de desenvolvimento de fibrose pulmonar secundária ao uso de bleomicina correlaciona-se com a dose total cumulativa (> 300 UI), com a utilização de radioterapia prévia , com idade (> 70 anos), com comprometimento da função renal e com o tabagismo. O uso de corticoesteróides é controverso nesta situação. Na realidade, até o

momento não existe terapia específica de valor comprovado para o dano pulmonar causado pela bleomicina, exceto o tratamento sintomático e de suporte¹⁰⁵⁻¹⁰⁶.

4.2. MODELO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento da injúria pulmonar neste modelo experimental, após a instilação de uma dose única de bleomicina intratraqueal, pode ser dividido em três estágios: (1) um estágio inflamatório agudo (1-7 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal), caracterizado por um influxo de células inflamatórias, edema alveolar e a ativação e elaboração de uma pleora de mediadores inflamatórios. Neste fase aguda o quadro histológico não demonstra evidências de reparo. (2) um estágio sub-agudo (7-15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal), na qual a resposta inflamatória ainda é intensa porém existem claras evidências de reparo (tais como a proliferação das células epiteliais do tipo II como tentativa de regeneração do epitélio alveolar e a presença de fibrose pulmonar). Um terceiro estágio marcado pela diminuição do infiltrado inflamatório (15 - 30 dias), que é dominado pelo metabolismo do tecido conjuntivo ou seja fibrose pulmonar, e pela reepitelização e reendotelização.

4.3. QUADRO HISTOLÓGICO

4.3.1. MASTÓCITOS

Os mastócitos são células que estão amplamente distribuídas nos pulmões em situações fisiológicas e patológicas. Elas representam cerca de 2 - 9% das células do parênquima pulmonar que são recolhidas após dispersão enzimática¹⁰⁷. Os pulmões possuem as mais altas concentrações de mastócitos e seus precursores do que qualquer outro tecido. Um grama de tecido pulmonar humano contém aproximadamente 10^6 mastócitos, sendo que a sua maior densidade é encontrada nas paredes alveolares¹⁰⁸⁻¹⁰⁹.

Os mastócitos representam apenas 0,04 - 0,6% das células hematológicas nucleadas presentes nos BALs de voluntários normais, devido ao fato que essas células não possuem a tendência de migração para o lúmen alveolar¹¹⁰. O número de mastócitos no pulmão e em outros tecidos aumenta através do influxo de precursores circulantes ou através da sua própria proliferação *in situ*. Normalmente, residem no tecido conjuntivo, particularmente sob as superfícies epiteliais e margeando os vasos sanguíneos. Os mastócitos são derivados de precursores hematopoiéticos e exceto uma pequena população medular, essa linhagem completa o seu programa de maturação nos tecidos¹¹¹.

A mais importante amina biogênica presente nos mastócitos é a histamina. A interação da histamina com receptores de superfície nas células endoteliais leva a vasodilatação e permeabilidade vascular aumentada. A histamina tem sido implicada como um possível

mediador em eventos fibróticos, sendo mitogênica para os fibroblastos, de pulmões normais. Em cultura, porém, tal atividade é de menor expressão quando comparada a outros fatores de crescimento dos fibroblastos. Os pacientes com fibrose pulmonar idiopática tem altos níveis de histamina em amostras do BAL, cujos níveis se correlacionam com a atividade da patologia¹¹²⁻¹¹³.

A ativação imunológica dos mastócitos leva a uma liberação sustentada de TNF- α , que permite aos mastócitos promoverem um processo inflamatório local após a sua ativação. Existem fortes evidências que a liberação de TNF- α pelos mastócitos leva à indução da expressão de moléculas de adesão leucocitária pelas células endoteliais¹¹⁴⁻¹¹⁵. Outros mediadores liberados pelos mastócitos incluem: triptase, catepsina-D, interleucinas 3,4 e 5, o fator de crescimento dos macrófagos (GM-CSF), PAF, mediadores lipídicos (LTB₄, PGD₂) e heparina¹¹⁶. Além disso os mastócitos podem influenciar os fibroblastos e vice-versa, perpetuando a cascata inflamatória. Um exemplo dessa interação seria a ativação dos fibroblastos pelo TNF- α liberado pelos mastócitos. Os fibroblastos assim ativados passam a secretar IL-8 e GM-CSF e o fator de crescimento dos mastócitos (c-kit ligand)¹¹⁷⁻¹¹⁸.

Neste modelo experimental, em um momento hiper-agudo (1 - 6 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal), as primeiras células a invadirem os alvéolos pulmonares foram os mastócitos. Este quadro estaria de acordo com a reação de hipersensibilidade manifestada clinicamente através de urticária e broncoespasmo, observado em alguns pacientes que recebem bleomicina por via endovenosa. O quadro de

mastocitose se mantém durante todo o período de acompanhamento do modelo, sendo particularmente exuberante até o sétimo dia após a instilação intratraqueal de bleomicina.

4.3.2. MACRÓFAGOS

A maioria dos macrófagos pulmonares são derivados de monócitos circulantes que entram no pulmão em resposta a estímulos inflamatórios e se diferenciam em macrófagos teciduais ou alveolares. Esta observação é suportada pela presença de muitos macrófagos pequenos, “tipo monocitário”, que expressam um fenótipo monocitário nos tecidos, em áreas de inflamação ativa em pacientes com fibrose pulmonar¹¹⁹.

Os macrófagos e os seus produtos secretórios possuem um papel central na defesa do hospedeiro contra micróbios patogênicos, no desenvolvimento da imunidade, na patogênese do choque séptico, na fisiopatologia da cicatrização, no remodelamento tecidual. Parece haver alguma replicação dessas células no pulmão porém, em sua grande parte estas células são derivadas de precursores da medula óssea que transitam no sangue periférico na forma de monócitos¹²⁰⁻¹²¹. Em comparação com macrófagos de outros sítios (por exemplo macrófagos peritoneais), os macrófagos alveolares possuem adaptações para o ambiente aeróbio dos pulmões¹²².

O papel central dos macrófagos na resposta tecidual à injúria foi elegantemente demonstrado em trabalhos utilizando animais monocitopênicos onde a cicatrização ocorre de uma maneira retardada em relação a animais controle¹²³.

As mudanças histológicas e funcionais associadas à ativação dos macrófagos incluem: um aumento do seu tamanho, vacuolização do seu citoplasma, aumento das enzimas hidrolíticas, aumento da produção de radicais livres e um aumento na expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade do tipo II. Entre os fatores capazes de causar ativação dos macrófagos estão, entre outros : frações de componentes do sistema complemento (C5a), endotoxinas, interferon- γ e o fator de crescimento dos macrófagos (GM-CSF)¹²⁴¹²⁵.

A investigação da interação entre o sistema imune e as células mesenquimais expandiu-se do estudo da cicatrização de feridas para as desordens fibróticas pulmonares. Estas células se caracterizam pela produção de uma ampla gama de citocinas e outros produtos secretórios (Fig 40). A habilidade dos macrófagos de regular o funcionamento de outras células do parênquima pulmonar, combinada com a sua capacidade de liberar proteases capazes de degradar os componentes da matriz extracelular, sugerem que essa célula seja crucial na regulação do reparo ao dano tecidual que ocorre na SARA¹²⁵.

Neste modelo experimental, os macrófagos aparecem em um grande número no espaço alveolar, na fase aguda de injúria. Estes macrófagos demonstram um citoplasma abundante e vacuolização, o que sugere a sua ativação. No sétimo dia, nas áreas de maior dano tecidual, se encontram diversas células multinucleadas de Langhans. Neste caso essas células podem ser formadas devido à persistência de complexos imunes, no contexto de uma alveolite alérgica. Estas células possuem diversos núcleos porém estes se encontram na periferia do citoplasma. Em nível de microscopia eletrônica, demonstram pouco retículo

endoplasmático e as suas mitocôndrias e lisossomos aparentam estar sofrendo degeneração. As células gigantes podem representar um estágio final de diferenciação da linhagem monócito/macrocitária¹²⁶. A partir do 15^o dia, o número de macrófagos diminui paralelamente ao aparecimento da fibrose pulmonar.

Fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs)
Fator de necrose tumoral-alfa
Fator de crescimento tumoral-beta
Interleucina -1
Interleucina - 8
Interleucina - 6
Interferon - alfa
Interferon - beta
Interferon - gama
Superóxidos
Óxido nítrico
Ativador do plasminogênio
Fatores da via intrínseca da coagulação: IX,X,V. Protrombina
Fatores da via extrínseca da coagulação: VII
Fosfolipase A2
Proteases
Componentes do complemento: C1, C4, C2, C3, C5, properdina, inativador do C3b
Fator de ativação plaquetária (PAF)
Fibronectina
Prostaglandina E ₂
Leucotrieno B ₄ , C, D, E
Fator indutor da monocitopoiese
Eritropoietina
Fatores de crescimento dos neutrófilos e macrófagos (GM-CSF e G-CSF)

Figura 40. Citocinas e outros produtos secretados por macrófagos

4.3.3. POLIMORFONUCLEARES

Há mais de um século, Metchnikoff¹²⁷ especulou que os polimorfonucleares (PMN) poderiam causar dano tecidual devido a uma liberação excessiva de substâncias tóxicas. O organismo humano possui uma abundância natural de mecanismos anti-inflamatórios, localizados no plasma e em tecidos orgânicos, para contrabalançar tais processos. No entanto, em determinadas situações, estes mecanismos são superados e o dano endotelial e tecidual causado por polimorfonucleares pode contribuir para uma ampla variedade de desordens clínicas, tais como a SARA¹²⁸.

Durante um quadro de injúria pulmonar inflamatória, os PMN migram do espaço vascular para o parênquima pulmonar, em resposta a agentes quimiotáticos. Frequentemente, os primeiros leucócitos a serem recrutados são os PMN. A quimiotaxia inicia-se no momento da ligação de moléculas sinalizadoras a receptores específicos, na membrana plasmática do PMN. Diversos agentes quimiotáticos distintos tanto quanto à sua origem bem como à composição bioquímica foram identificados. Entre eles estão: C5a, LTB₄, PAF e a IL-8. Muitos fatores quimiotáticos podem induzir e aumentar as respostas funcionais dos PMN, incluindo aderência endotelial, produção de radicais livres, produção de mediadores lipídicos e a sua degranulação. A resposta dos PMN aos fatores quimiotáticos varia de acordo com o estímulo específico. Por exemplo, a estimulação de polimorfonucleares com baixas concentrações (10^{-8} M) de fator quimiotático inicia a migração celular orientada. Em concentrações maiores (10^{-6} M), a quimiotaxia é inibida e

a degranulação e secreção de mediadores inflamatórios tais como radicais livres , proteases e substâncias vasoativas é aumentada ¹²⁹⁻¹³⁰.

A aderência dos PMN ao endotélio vascular desempenha um papel crítico na resposta inflamatória aguda¹³¹. Inicialmente nos sítios inflamatórios os PMN são vistos deixando o fluxo laminar da corrente sangüínea e "rolando" ao longo da parede endotelial das vênulas pós capilares. Ocorre um período de firme aderência ao endotélio, seguido de diapedese e migração dos PMN. Uma vez firmemente aderido ao endotélio, forma-se um microambiente, na parte inferior dos PMN aderidos ao endotélio, no qual as suas proteases, radicais livres e outras substâncias tóxicas podem causar dano ao endotélio , de uma maneira inacessível a agentes anti-inflamatórios circulantes. Apenas na década passada, mais de uma dezena de moléculas envolvidas na interação PMN-endotélio foram identificadas imunologicamente¹³². Esta recente explosão do conhecimento no campo das moléculas de adesão celular originou-se de estudos de uma deficiência genética conhecida como deficiência de adesão leucocitária, na qual os pacientes manifestam susceptibilidade a infecções bacterianas recorrentes e uma inabilidade para montar uma resposta supurativa ¹³³.

Basicamente essas moléculas de adesão são classificadas em dois grandes grupos. A primeira categoria compreende os receptores de integrina, que interagem com ligantes na célula endotelial ¹³⁴. Esta interação causa firme adesão dos PMN ao endotélio em sítios de inflamação, bem como a sua diapedese e subsequente emigração. A segunda categoria são os receptores da selectina, que são proteínas que contêm lecitina e que reconhecem

estruturas específicas de carboidratos¹³⁵. A adesão mediada por selectinas é normalmente mais fraca. Dessa maneira a adesão mediada por selectinas é encontrada em situações de fluxo leucocitário, enquanto a mediada por integrinas ocorre em condições de fluxo leucocitário nulo (Fig 41). O dano endotelial causado por PMN aglomerados e ativados pode resultar em perda da integridade microvascular, com edema, hemorragia ou trombose, tendo como ponto final a hipoperfusão tecidual e a disfunção orgânica. Uma vez que haja a migração tecidual, os PMN podem continuar a liberar produtos tóxicos que causam mais dano ao parênquima tecidual¹³⁶⁻¹³⁷.

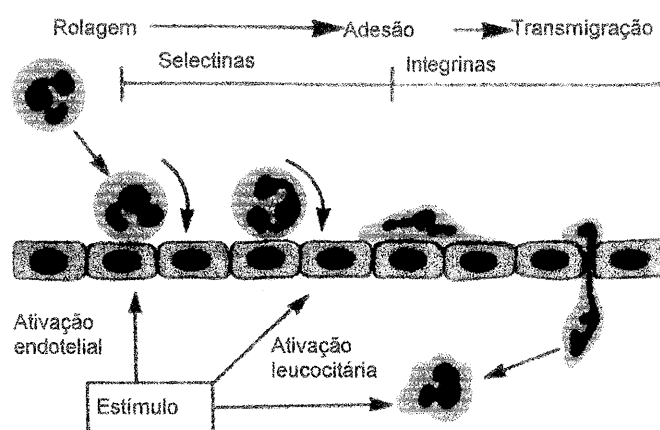


Figura 41. Seqüência dos eventos leucocitários na inflamação. Os polimorfonucleares primeiro são vistos *rolando*, depois param e aderem ao endotélio, depois transmigram através das junções intercelulares e membrana basal, atraídos por agentes quimiotáxicos oriundos da fonte de injúria. O papel das selectinas, integrinas e agentes ativadores são mostrados (segundo John S e Franz V L¹³⁸).

O exame de biópsias pulmonares obtidas de pulmões de pacientes em risco para o desenvolvimento de SARA, de tecido pulmonar de pacientes que faleceram com SARA, e do BAL de pacientes com SARA, confirmam um grande influxo de PMN para os pulmões¹³⁹⁻¹⁴⁰. Estas observações sugerem a hipótese de que produtos liberados pelos polimorfonucleares participam da fisiopatologia da SARA.

Apesar de todas as evidências de sua participação no processo de fibrose pulmonar, esta célula não parece ser necessária para a sua ocorrência. Pacientes deficientes em PMN (na neutropenia pós-quimioterapia, por exemplo) também podem desenvolver SARA, indicando que o PMN não é estritamente necessário para a ocorrência de fibrose pulmonar¹⁴¹.

Neste modelo experimental, os PMN em nenhum momento aparecem como células proeminentes. Durante o quadro agudo e sub-agudo, eventuais focos de polimorfonucleares são vistos nos alvéolos pulmonares.

Este achado estaria de acordo com trabalhos onde a depleção de PMN com soro anti-PMN, além de não inibir a formação de fibrose pulmonar, aparentemente a aumentou. Em nível bioquímico, houve um substancial acréscimo no conteúdo total de colágeno pulmonar, verificado uma semana após a instilação de bleomicina intratraqueal¹⁴².

Estas observações sugerem que os PMN possam, na realidade, atuar como agentes protetores da produção excessiva de fibrose pulmonar, através da degradação do colágeno

por proteases e do remodelamento da matriz extracelular, impedindo a acumulação excessiva de colágeno nos pulmões dos animais.

4.3.4. CÉLULAS ENDOTELIAS

As células endoteliais representam um dos primeiros alvos dos vários modos de injúria pulmonar, devido estarem estrategicamente interpostas entre a circulação sistêmica e o espaço alveolar e intersticial¹⁴³.

O dano endotelial é um precursor comum da fibrose pulmonar, geralmente combinado a perturbação do sistema fibrinolítico da coagulação. As células endoteliais participam no processo hemostático através da produção de fatores de coagulação e enzimas que catalizam a dissolução dos coágulos bem como promovendo uma superfície, cuja alteração patológica, resultará na ativação da coagulação e sistema fibrinolítico. As anormalidades associadas à diminuição da degradação da fibrina podem ser um fator importante no acúmulo de colágeno¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. A presença de fibrina, produtos de degradação da fibrina e microtrombos nos pulmões de pacientes com SARA suportam essa possibilidade¹⁴⁶. Existem diversas evidências de dano endotelial na SARA e em vários modelos animais. Morfologicamente estas células demonstram edema, seguido por degeneração e necrose. A presença de fenestrações entre as células endoteliais têm sido observadas, nesta situação¹⁴⁷.

Fisiologicamente, a permeabilidade vascular está aumentada. A perda das barreiras entre o endotélio normal e os alvéolos e o interstício leva a uma entrada de células e de

mediadores para os espaços intersticiais e alveolares, com subsequente ativação fibroblástica resultando em um aumento da deposição de matriz intersticial e perda da função pulmonar normal¹⁴⁷.

A ativação endotelial pode ser um resultado direto da toxicidade do agente indutor (tal como ocorre na fibrose pulmonar induzida por bleomicina), ou através da liberação monocitária de IL-1 e TNF- α ¹⁴⁸. As células endoteliais ativadas podem, elas mesmas, produzir citocinas fibrosantes tais como b-FGF, TGF- β , IL-8, além de moléculas de adesão leucocitária.

O aparecimento das moléculas de adesão dos granulócitos, na membrana plasmática das células endoteliais, aumenta quando existe estímulo através de citocinas, tais como o TNF- α , o interferon- γ e a IL-1. *In vitro* a exposição de células endoteliais da artéria pulmonar de ratos à bleomicina causa uma secreção dose-dependente do TGF- β , que especificamente aumenta a síntese de colágeno pelos fibroblastos de pulmões de rato¹⁴⁹⁻¹⁵⁰⁻¹⁵¹.

A possibilidade de sinais ativadores e/ou citocinas virem do compartimento intersticial representa outra possibilidade de ativação endotelial. No pulmão, estes sinais podem vir de células adjacentes tais como os fibroblastos intersticiais, perícitos, células epiteliais e macrófagos alveolares. Existem claras evidências de que um estímulo tóxico aplicado no lado alveolar, através de uma instilação intratraqueal, possa causar ativação celular e dano,

sugerindo que o agente tóxico e/ou citocinas, juntamente com outros mediadores, possam atravessar a membrana basal endotelial, tendo um impacto na célula endotelial¹⁵²⁻¹⁵³.

As alterações endoteliais observadas na histologia deste modelo experimental nas primeiras 24 horas, demonstram áreas caracterizadas por edema e necrose de coagulação onde o núcleo das células endoteliais apresenta uma cromatina fortemente basofílica, rompido em vários fragmentos menores, dispersos pelo citoplasma, caracterizando um quadro de picnose e cariorrexis.

Na fase aguda observa-se também um quadro de vasculite composto principalmente por células monocitóides e linfócitos, quadro esse que permanece intenso até o 7º dia.

Em uma fase sub-aguda e crônica, juntamente com a fibrose pulmonar, existe necrose fibrinóide das paredes das artérias pulmonares, bem como hipertrofia da camada muscular dos vasos de pequeno calibre, sugerindo um quadro de hipertensão pulmonar secundária.

As conseqüências da quebra da barreira de permeabilidade se relacionam à entrada de mediadores solúveis, fibrina e células inflamatórias para o interstício e o espaço alveolar. Agudamente, o dano ao endotélio vascular pode contribuir para o quadro de edema pulmonar, podendo ser fatal devido ao impedimento das trocas gasosas.

Existem evidências que os pulmões podem responder a essa injúria através da reendotelização de áreas desnudas pela morte de células endoteliais. O mecanismo através

do qual esse reparo ocorre é incerto, uma vez que existem dados conflitantes se as células endoteliais sobreviventes podem se proliferar para cobrir as áreas desnudas adjacentes¹⁵⁴.

Neste estudo não foram observadas figuras de mitose em células endoteliais que pudessem ajudar no esclarecimento dessa questão.

O quadro sugestivo de hipertensão pulmonar apresentado neste modelo aparenta ser multifatorial. O dano funcional do endotélio causa uma diminuição na sua produção de prostaciclina (agente vasodilatador), expondo os vasos sanguíneos a diversos mediadores puramente vasoconstritores tais como o PDGF e o PAF¹⁵⁵⁻¹⁵⁶. Além disso, o remodelamento e a distorção mecânica do parênquima pulmonar contribui para o quadro de hipertensão pulmonar. Uma vez instalada a hipertensão pulmonar, a diminuição da perfusão tecidual pode criar condições para intensificação do dano tecidual e aumento da fibrose pulmonar.

4.3.5. CÉLULAS EPITELIAIS

Existem diversas evidências histológicas que demonstram profundas alterações no epitélio alveolar nos pacientes portadores de SARA. Estas alterações são encontradas tanto nas células do tipo I como do tipo II, que recobrem a superfície alveolar normal.

Noventa e cinco por cento da superfície alveolar é recoberta por células finas e delicadas , que são as células alveolares do tipo I. Uma única célula do tipo I usualmente

contribui para a cobertura da superfície de diversos alvéolos, através de extensões citoplasmáticas para alvéolos adjacentes. A sua geometria é ideal para a troca gasosa entre os alvéolos e os capilares e de suma importância para impedir o vazamento de plasma e a migração celular do interstício para o espaço alveolar¹⁵⁷.

As células alveolares epiteliais do tipo I são muito sensíveis à bleomicina, ocorrendo necrose precoce dessas células quando expostas à bleomicina pela via intratraqueal. As explicações possíveis para essa maior sensibilidade seriam a localização dessas células que funcionam como primeira barreira alveolar para insultos tóxicos, a sua vasta superfície de exposição ou uma maior sensibilidade intrínseca à bleomicina¹⁵⁸.

As células alveolares do tipo II são célula cubóides, compactas que recobrem os 5% restantes da superfície alveolar¹⁴⁴. As células alveolares do tipo II possuem diversas funções necessárias para manter a integridade alveolar: produzir o surfactante pulmonar; servir como células progenitoras, em caso de dano às células alveolares do tipo I¹⁵⁹; transportar sódio ativamente para fora dos alvéolos através da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ ¹⁶⁰, servir como células apresentadoras de antígenos para os linfócitos, influenciando o início ou a supressão das reações inflamatórias¹⁶¹, produzir o fator quimiotático para monócitos bem como GM-CSF, atraindo, mantendo e amplificando o número de macrófagos alveolares, durante episódios inflamatórios¹⁶².

Durante o processo de dano alveolar, as células alveolares do tipo I são danificadas, deixando áreas desnudas da membrana basal. Os componentes plasmáticos vazam para o

compartimento alveolar, formando uma matriz fibrinóide. Os fibroblastos migram em direção ao exudato, através de poros na membrana basal, e secretam colágeno, convertendo o exudato rico em fibrina em uma cicatriz que se torna reepitelizada por células do tipo II¹⁵⁸.

Neste modelo, as evidências de dano epitelial aparecem precocemente, 24 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal. Neste momento, apesar de histologicamente não ser possível demonstrar diretamente o dano aos pneumócitos do tipo I (devido as deficiências da microscopia óptica no estudo dessas células), a presença de edema alveolar e o influxo de macrófagos para os espaços alveolares demonstram claramente o dano do epitélio pulmonar do tipo I e a quebra da barreira alvéolo-capilar. Interessantemente, algumas áreas do epitélio bronquiolar demonstra algumas áreas focais de hiperplasia.

No 7^o dia após a instilação de bleomicina intratraqueal, ainda permanecem os sinais de edema alveolar, porém, concomitantemente com o aparecimento da fibrose pulmonar, os alvéolos agora estão parcialmente recobertos por células cubóides.

Diversos estudos demonstraram a inabilidade dos pneumócitos do tipo I sofrerem mitose, representando essas células um estágio final de desenvolvimento. Uma das causas seria uma impossibilidade física de duplicação do seu citoplasma devido às suas grandes projeções citoplasmáticas para alvéolos adjacentes¹⁶³.

Dessa maneira, essas células cubóides representam pneumócitos do tipo II que sobreviveram ao insulto tóxico causado pela bleomicina. Estas células proliferaram e se alastraram em áreas que ainda possuíam membranas basais preservadas, em uma tentativa de reepitelização. Neste momento, os pneumócitos do tipo II possuem diversas funções, entre elas: a produção de urocinase para “digerir” a fibrina intraalveolar¹⁶⁴, modular a resposta dos linfócitos e dos macrófagos, funcionando como uma célula apresentadora de antígenos, por possuir em sua superfície antígenos do complexo de histocompatibilidade do tipo II¹⁵⁸.

O edema alveolar diminui progressivamente após o início da reepitelização pulmonar, até se tornar mínimo no 30º dia ,após a instilação de bleomicina intratraqueal.

4.3.6. PLAQUETAS

Nas fases iniciais de um dano pulmonar agudo, um número aumentado de plaquetas é encontrado nos capilares alveolares, nos espaços alveolares e intersticiais. As plaquetas produzem citocinas fibrosantes e quimiotáticas para polimorfonucleares, tais como o PDGF e TGF- β . Ambas citocinas regulam o crescimento de células mesenquimais e a síntese de proteínas da matriz extracelular¹⁶⁵⁻¹⁶⁶⁻¹⁶⁷.

Neste modelo não foram observados trombos plaquetários nos capilares pulmonares dos ratos que receberam bleomicina intratraqueal. Um estudo com esse mesmo modelo, utilizando um anticorpo anti-plaquetário, não obteve qualquer efeito no desenvolvimento da

lesão pulmonar aguda (48 horas após a instilação de bleomicina intratraqueal). Os pacientes plaquetopênicos também podem desenvolver um quadro de SARA, sugerindo que as plaquetas não sejam essenciais para o desenvolvimento de fibrose pulmonar experimental ou clínica¹¹⁵⁸⁻¹⁶⁷.

4.3.7 LINFÓCITOS

Os linfócitos T são capazes de gerar fatores quimiotáticos para os fibroblastos e produzirem fatores tais como a IL-1 e o TNF- α , que influenciam a proliferação fibroblástica e a síntese de colágeno. Os linfócitos T também são fontes de interferon- γ que funciona como um ativador dos macrófagos¹⁶⁸. Claramente tem sido estabelecida a presença de linfócitos em modelos de experimentação. Foi demonstrada uma inversão na taxa normal de 1:1 entre os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T supressores em nível pulmonar. Tal relação se altera para 2:1 no momento de maior síntese de colágeno e sofre uma inversão para 1:2 quando a síntese de colágeno diminui, sugerindo uma associação entre as mudanças nas populações de linfócitos e a síntese de colágeno. Neste mesmo estudo, a relação entre o BAL e os achados histopatológicos foi concordante nas fases iniciais porém tornaram-se discordantes nas fases subaguda e crônica. Possivelmente com o processo de estabilização do epitélio pulmonar nas fases sub-aguda e crônica, o acesso desses linfócitos aos espaços aéreos e ao BAL tenha sido bloqueado, enquanto ainda estão ocorrendo mudanças no interstício. O tratamento de ratos que receberam bleomicina intratraqueal, com baixas doses de ciclofosfamida (para eliminar a população de células T supressoras),

causou um aumento da fibrose pulmonar, corroborando a idéia de que os linfócitos T auxiliares estimulam a produção de colágeno pelos fibroblastos¹⁶⁹.

Neste modelo experimental se verifica uma alveolite formada por células monocitárias e linfócitos nas fases agudas (1 - 7 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal), bem como um quadro de vasculite com a participação de linfócitos. Esse infiltrado inflamatório tende a diminuir com a cronificação do processo.

4.3.8 FIBROBLASTOS

No pulmão normal a atividade dos fibroblastos está limitada à renovação da matriz extracelular, onde o conteúdo em colágeno é mantido constante através de um equilíbrio entre os fenômenos de síntese e de degradação dessa proteína. Em caso de agressão tecidual, o pulmão reage como os outros órgãos (pele, rim, etc.), iniciando os fenômenos de reparo tecidual. Obviamente, o fenômeno de cicatrização é, na maioria das vezes, benéfico como, por exemplo, no encarceramento de patógenos, como o bacilo de Koch. Entretanto, quando tal processo se torna auto-sustentável, pode impedir o funcionamento adequado de órgãos como o pulmão, levando a um quadro de fibrose pulmonar.

Os fibroblastos participam da resposta inflamatória, estimulando a proliferação linfocitária, aumentando a sobrevivência dos eosinófilos, e amplificando a produção de mediadores por outras células¹⁷⁰⁻¹⁷¹, uma vez que os fibroblastos tenham migrado, através de descontinuidades na membrana basal epitelial, sob a ação de substâncias quimiotáticas e

fatores de crescimento produzidos por macrófagos, células epiteliais e endotélio pulmonar, tais como o TGF- β e bFGF e TNF- α . Esses fibroblastos alteram a sua morfologia e o seu citoesqueleto bem como a sua capacidade secretória de citocinas e componentes da matriz extracelular (Figs 42 e 43).

Em modelos experimentais demonstrou-se que os fibroblastos de pulmão de ratos tratados com bleomicina têm uma maior transcrição de RNA mensageiro do TGF- β , que poderia agir como um fator autócrino na produção da fibrose pulmonar¹⁷².

O BAL de pacientes após 3 dias do início da SARA, demonstra uma marcada capacidade de estimular a migração e proliferação de fibroblastos *in vitro*. Em contraste, o líquido do lavado bronco-alveolar de pacientes criticamente enfermos, porém sem SARA, não demonstra tal capacidade⁸.

Além da presença de fatores de crescimento em pulmões de pacientes com SARA, existem evidências que as células mesenquimais exibem um fenótipo de proliferação aumentada. Os fibroblastos isolados dos alvéolos do tecido de granulação, presentes em pulmões de pacientes com estágios avançados da SARA, porém não naqueles isolados de pulmões normais, proliferam em um meio de cultura sem fatores de crescimento. Apesar deste fenótipo de proliferação aumentado, os fibroblastos de pulmões com SARA, não aparentam serem "neoplásicos", e respondem à adição de fatores peptídicos de crescimento¹⁷³.

Recentemente foi demonstrado que o BAL de pacientes em fase de recuperação da SARA estimula a *apoptosis* em células endoteliais e fibroblastos, o que sugere que, em pulmões em fase de remodelamento por SARA, existam mecanismos que, quando ativados, podem por fim à resposta fibroproliferativa¹¹⁷⁴.

Neste modelo o aparecimento dos fibroblastos e colágeno iniciou-se a partir do 7º dia, com uma distribuição não homogênea o que dificulta a quantificação de fibrose neste modelo. A fibrose possuía uma distribuição preferencial nas áreas perivasculares. A partir deste momento, existe também um espessamento pleural progressivo, com distorções e depressões na sua arquitetura.

Nos estágios crônicos, existe um aumento progressivo na fibrose associada com à diminuição do infiltrado inflamatório, causando faveolamento e “pontes” fibrosas entre nódulos fibróticos regenerativos, sugerindo um quadro de “cirrose pulmonar”.

TGF- β
PDGF
IL-1
IL-8
IL-6
GM-CSF
Fator de crescimento “tipo” insulina (IGF-1)

Figura 42. Citocinas produzidas pelos fibroblastos

Elastina
Fibronectina
Laminina
Proteoglicanos
Betaglicanos
Ácido hialurônico
Fibromodulina

Figura 43. Componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos

4.4. VARIACÃO DO PESO ENTRE OS GRUPOS

A caquexia e a maior mortalidade encontrada no grupo de ratas que recebeu o PPS juntamente com a bleomicina, foram achados absolutamente inesperados neste experimento. Uma possível explicação para tais fatos, seria a potencialidade da heparina de dissociar o TGF- β , o TNF- α , a IL - 1 e o b-FGF do seu inibidor natural *in vivo*, a α_2 -macroglobulina¹⁷⁸.

Múltiplos mecanismos são necessários para restringir os efeitos dos mediadores responsáveis pela inflamação, resposta imune e reparo tecidual. A α_2 -macroglobulina é uma proteína que regula a distribuição e atividade de várias citocinas (TGF- β , TNF- α , IL-1, b-FGF, entre outras)¹⁷⁹. O TGF- β e o TNF- α , se ligam de forma não covalente às α_2 -macroglobulinas que tenham sido modificadas por proteinases tais

como a plasmina. Desta maneira, estas citocinas não causam dano tecidual, além do sítio inflamatório inicial. Estes complexos (citocinas / α_2 -macroglobulinas) são rapidamente removidos da circulação por receptores hepáticos da α_2 -macroglobulina. No entanto, estas ligações, não covalentes, são reversíveis, podendo a heparina deslocar as citocinas das α_2 -macroglobulinas plasmáticas¹⁸⁰.

Se o heparinóide PPS possuir o mesmo efeito sobre a α_2 -macroglobulina (fato ainda não testado), o TGF- β e o TNF- α então teriam suas meias vidas aumentadas, podendo tal fato induzir perda de peso severa, de acordo com estudos que apontam essas citocinas como indutoras de caquexia¹⁸¹⁻¹⁸²⁻¹⁸³.

Obviamente, pode-se apenas especular a participação do TGF- β e do TNF- α no quadro de caquexia apresentado por esse grupo de ratas, uma vez que os níveis séricos dessas citocinas não foram dosados.

Esses achados paradoxais enfatizam a absoluta necessidade do teste de novas abordagens terapêuticas em modelos animais de patologias pulmonares, antes de sua experimentação em humanos.

4.5. ANÁLISE DA ÁREA DE PARÊNQUIMA PULMONAR AVALIADA

O fato dos grupos que receberam a bleomicina intratraqueal, com e sem PPS, terem apresentado uma maior área de parênquima pulmonar, quando comparados com os grupos controle que receberam apenas o PPS, não causa surpresa. Tal achado deve-se, possivelmente, a um aumento da espessura dos septos alveolares pelo processo inflamatório e fibrose pulmonar. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois primeiros grupos citados.

4.6. FIBROSE PULMONAR

Neste modelo o PPS não obteve os efeitos antifibróticos esperados. Uma explicação teórica seria que, durante quadros inflamatórios, o bFGF liberado interage com os proteoglicanos presentes na matriz extracelular e a moléculas “tipo” heparina que estão presentes nas membranas basais *in vivo*¹⁷⁵. Esta ligação previne que o bFGF se difunda livremente para sítios distantes da injúria inicial.

Este é um dos mecanismos fisiológicos que não permitem a propagação indiscriminada do processo inflamatório em situações normais. Poderia ser levantada a hipótese que a adição de heparinóides (PPS), além de protegerem o bFGF da degradação proteolítica¹⁷⁶, poderiam servir como carreadores do bFGF, aumentando o seu raio de difusão e, a médio prazo, manter a formação de fibrose pulmonar causada pela bleomicina intratraqueal¹⁷⁷.

4.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração de bleomicina intratraqueal em animais é um modelo experimental útil para a investigação da patogênese da fibrose pulmonar na SARA. Até o momento não se encontrou uma droga que pudesse abolir totalmente a fibrose pulmonar neste modelo. Isto não é surpreendente uma vez que praticamente todas as células pulmonares e células inflamatórias têm sido implicadas neste modelo, bem como diversas citocinas, metabólitos do ácido aracdônico, a formação de radicais livres, o sistema complemento e o sistema de coagulação. A complexidade da resposta inflamatória neste modelo torna impossível se determinar um certo tipo celular ou um mediador inflamatório como o maior determinante na patogênese desse processo fibrótico.

Infelizmente na prática clínica não existe a possibilidade de se intervir terapêuticamente de forma concomitante com o insulto pulmonar. Desse modo, talvez seja interessante em futuros experimentos tentar-se intervir em fases mais tardias, em situações semelhantes à encontrada na prática médica diária.

A síntese de tecido conjuntivo faz parte do processo de reparo ao dano pulmonar. É necessário reconhecer-se o estágio da injúria pulmonar (fase precoce x fase tardia), e então decidir-se por uma intervenção terapêutica. Por exemplo os agentes anti-inflamatórios utilizados na atualidade inibem ambas as fases do processo. Teoricamente uma inibição não seletiva do reparo na fase aguda poderia interferir na reepitelização alveolar, impedindo o reparo da barreira alvéolo-capilar e mantendo ou ampliando o quadro de edema pulmonar.

A partir desse modelo pode-se especular que um momento interessante para intervenções terapêuticas seria na fase sub-aguda, por volta do 7^o dia, quando o processo de reepitelização já se encontra em estágio avançado, e o maior risco é a perpetuação do quadro inflamatório e a ativação dos fibroblastos.

A tabela 5 demonstra que a rata número 8, que recebeu bleomicina intratraqueal, não apresenta fibrose pulmonar. A razão não é clara. Esta rata pode ser intrinsecamente resistente à ação da bleomicina intratraqueal, ou, mais provavelmente, durante a instilação de bleomicina, a traquéia foi trespassada. A exclusão deste animal não altera as conclusões desta pesquisa, conforme demonstrado nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Resultados dos testes de comparação múltipla para o teste de Kruskal-Wallis da proporção de áreas com fibrose

Grupos	$T_i - T_j$	H	Diferença
Controle e PPS	22,10	33,79	
Controle e Bleomicina	99,67	35,85	*
Controle e PPS + Bleomicina	105,87	37,25	*
PPS e PPS + Bleomicina	77,89	35,85	*
PPS e PPS + Bleomicina	84,09	37,25	*
Bleomicina e PPS + Bleomicina	6,20	39,13	

*Diferença estatisticamente significativa.

** Excluída a rata número 8.

Tabela 14. Média e erro padrão da média da proporção da área total atingida por fibrose.

Grupos	Média	Erro Padrão
Controle	0,0	0,00
Polissulfato de pentosan	0,0	0,00
Bleomicina	6,1	0,95
PPS + Bleomicina	6,7	0,70

* Excluída a rata número 8.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1- O modelo de instilação intratraqueal de bleomicina, em ratos *Wistar*, possui claras semelhanças com a SARA em humanos:

a) Este modelo permite estudar todas as fases de reparo à injúria pulmonar, desde a fase de alveolite até a fibrose pulmonar estabelecida.

b) Este modelo permite o estudo de alterações da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar.

c) Este modelo permite o estudo do reparo ao dano das células alveolares do tipo I.

d) Este modelo pode ser útil para o estudo de quadros de hipertensão pulmonar.

2- O polissulfato de pentosan, na dose de 25mg/kg/dia, por via subcutânea, não inibe a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em ratos *Wistar*.

a) O grupo que utilizou o polissulfato de pentosan associado a bleomicina intratraqueal perdeu peso quando comparado aos outros grupos desse estudo.

b) Existe uma correlação inversa entre o peso dos ratos e a percentagem de fibrose pulmonar.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Reynolds HY. Interstitial Lung Diseases. In Wilson JD, Braunwald E (Eds.) Harrison's Principles of Internal Medicine. New York, Mc Graw - Hill, 1082-1087, 1991.
- 2) Suchyta MR, Clemmer TP, Elliot CG, Orme CG, Orme JF Jr., Weaver LK. The adult respiratory distress syndrome: A report of survival and modifying factors. Chest 101:1074,1992.
- 3) Trottier SJ, Taylor RW. Adult respiratory distress syndrome, in Shoemaker/Ayres/Grenvik/Holbrook, Textbook of Critical Care. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 811-821,1995,
- 4) Michael A. Matthay. Acute hypoxemic respiratory failure: pulmonary edema and ARDS. In Ronald BG, Richard WL, Michael AM, Richard AM (Eds) Chest Medicine. Baltimore, Willians and Wilkins, 593-608, 1995
- 5) Hasleton PS: Adult respiratory distress syndrome - Review. Histopatology 7:307, 1983.
- 6) Lester K, Frederick JC. In Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ (Eds) Robbins Pathological basis of disease. Philadelphia, W.B. Saunders, 673-734, 1994.

- 7) Carré Ph., Léophonte P. Cytokines et fibroses pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires*. 10: 193-207,1993.
- 8) Snyder LS, Hertz MI, Peterson MS, Harmon KR, Marinelli WA, Henke CA, Greenheck JR, Chen B, Bitterman PB. Acute lung injury. Pathogenesis of intraalveolar fibrosis. *J Clin Invest* 88: 663-673,1991.
- 9) Daniel G. Remick and Laura E. De Forge; Cytokines and Pulmonary Fibrosis in: *Pulmonary Fibrosis* by Sem Hin Phan and Roger Thrall, 599-626,1995.
- 10) Levine B, Kalman J, Mayer L. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe heart failure. *N Engl J Med* 323:336,1990.
- 11) Parillo JE: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328:1471,1993 .
- 12) Beutler B, Cerami A: Cachetin: more than a necrosis factor. *N Engl J Med* 316: 279, 1987.
- 13) Kelley J: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141: 765-788,1990.
- 14) Beutler B. Endotoxin, tumor necrosis factor, and related mediators: New approaches to shock. *New Horizons* 1: 3, 1993.

- 15) Rich EA, Panuska JR, Wallis RS. Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophage. *Am Rev Resp Dis* 130: 1010-1016, 1989.
- 16) Goldblum SE, Sun WL. Tumor necrosis factor augments pulmonary arterial trans endothelial albumin flux in-vitro. *Am J Physiol*; 258: L57-L67, 1990.
- 17) Leeper SK, Carey PB, Byrne K, Jenkins JK, Fischer BJ, Blocher L, Sugerman HJ, Fowler AA. Tumor necrosis factors alpha and betha subtypes appear in circulation during onset of sepsis induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 143: 1076-1082, 1991.
- 18) Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Resp Dis* 144: 268-271, 1991.
- 19) Remick DG, Kunkel AG, Larrick JW, Kunkel SL. Acute in vivo effects of recombinant tumor necrosis factor. *Lab Invest* 56: 583-90, 1987.
- 20) Phan Sh, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 18: 29-43, 1992.
- 21) Roberts AB, Sporne RK, Assoian JM, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga U, Kehrl JH. Transforming growth factor type betha: rapid induction of

- fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl. Acad. Sci. USA 4167-4171, 1983.
- 22) Bruijn J A, Roos A, deGuees B, deHeer E. Transforming growth-factor- β and the glomerular extracellular matrix in renal pathology. J Lab Clin Med 123 : 34-47, 1994.
- 23) Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth-beta factor. In Spor MB, Roberts AB, eds. Peptid growth factors and their receptors. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 95, Berlin: Springer-Verlag, 419-472, 1990.
- 24) Sottrup-Jensen L. Alpha-2 Macroglobulins: Structure, shape and mechanism of proteinase complex formation. J. Biol. Chem. 264: 11539-11542, 1990.
- 25) La Marre J, Hayes M. A, Wollenberg GK, Hussani I, Hall SW, Gonias SL. An α_2 - macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor β_1 in mice. J. Clin. Invest. 87 : 39-44, 1991.
- 26) Assoian JM, Komoriya CA, Meyers DM, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor betha in human platelets. J. Biol Chem 258:7155, 1983.
- 27) Piguet PF. Cytokines involved in pulmonary fibrosis. Int Rev Exp Pathol 34B: 173-181, 1993.

- 28) Ganz T. Macrophage function. *New Horizon* 1: 23, 1993.
- 29) Cromath DT, Mustoe TA: Current concepts in wound healing: Growth factor and macrophage interaction. *J Trauma* 30: S129-S133, 1990.
- 30) Border WA, Noble A N. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286 - 1292, 1994.
- 31) Nasreen K, Oliver B, Michael S, Arnold G. Macrophage production of transforming growth factor β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 170: 727-737, 1989.
- 32) Nasreen K, Carol W, Li Z. Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor betha secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. *J Clin Invest* 92: 1812-1818, 1993.
- 33) Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, Murray JF. Ineffectiveness of high-dose methyl-prednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis* 138: 62-69, 1988.
- 34) Dinarello CA. Biology of interleukin-1. *FASEB J* 2: 108-115, 1988.

- 35) Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652, 1991.
- 36) Schlee RR, Bevilacqua MP, Sawdry M, Gimbrone MA Jr. Cytokine activation of the vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type-I plasminogen activator inhibitor. *J Biochem* 263: 5797-5803, 1988.
- 37) Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA, Webster RO. Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* 15: 881-894, 1989.
- 38) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84:1045, 1989.
- 39) Baggioli M, Clark-Lewis I. Interleukin-8: A chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS* 307: 97, 1992.
- 40) Christian J W. Pulmonary host defense and inflammatory lung disease. In Ayres SM, Grenvik A, Holbrook PR, Shoemaker WC (Eds). *Textbook of Critical Care*. Philadelphia W.B. Saunders, 848 - 858, 1995.
- 41) Donnely SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson R, Carther DL, Grant IS, Pollok AJ, Haslett L. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 341: 643-647, 1993.

- 42) Miller EJ, Cohen AB, Negao S, Griffith D, Maunder RJ, Martin TR, Weiner-Kromish JP, Sticherling M, Christophers E, Mathay MA. Elevated levels of NAP-1/Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis* 146: 427-432, 1992.
- 43) Ross R: Peptide regulatory factors. Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1:1179, 1989.
- 44) Madtes DK, Raines EW, Ross R: Modulation of local concentrations of platelet-derived growth factor. *Am Rev Resp Dis* 140: 1118, 1989.
- 45) Albert B, Bray JL, Raff M, Robert K, Watson JD. Cell signaling. In *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Publishing Inc, 721 - 785, 1994.
- 46). Fabsiak JP, Kelley J: Platelet-derived growth factor in Cytokines of the lung. Edited by Jason Kelley. New York, Marcel Dekker, Inc, pp 3-39, 1993.
- 47) Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 85 : 2023 - 2027 ,1990.
- 48) Benveniste J, Henson P, Cochrane C. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and a platelet activating factor. *J Exp Med* 136 : 1356 - 1376,1972.

- 49) O'Flaherty JT, Platelet-activating factor: mechanisms of cellular activation. In: Snyder F, ed. Platelet-Activating Factor and related lipid matters. New York: Plenum Press, 1987.
- 50) Mc Call CH, O'Flaherty JT. Platelet-activating factor and lung. In Phan SH, Thrall RS (Eds) Pulmonary fibrosis. New York, Marcel Dekker, 675 - 714, 1995.
- 51) O'Flaherty JT, Wykle RL. Biology and biochemistry of platelet-activating factor. Clin Rev Allergy 1:353-367, 1988.
- 52) Chang S-W. Endotoxin-induced lung vascular injury: the role of platelet activating factor, tumor necrosis factor and neutrophils. Clin Res 40:528-536, 1992.
- 53) Chang S-W, Fernyak S, Voelkel NF. Beneficial effect of a platelet-activating factor antagonist, WEB 2086, on endotoxin-induced lung injury. Am J Physiol 258:H 153-158, 1990.
- 54) Gospodarowicz D, Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature 249: 123-127, 1974.
- 55) Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J Biol. Chem. 250: 2215-2520, 1975.

- 56) Thomas KD, Rios - Candeloe M, Fitzpatrick S. Purification and characterizaion of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 357-361, 1984.
- 57) Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialack H, Zetter BR. Factors involved in the modulation of cell proliferation *in vivo* and *in vitro* : The nature of fibroblast and epidermal growth factor in the fibroproliferative response of mammalian cells. In Vitro 14: 85-118, 1978.
- 58) Shing Y, Folkmann J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: Purification of tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 233 : 1296-1299, 1984.
- 59) Maciag T, Mehlman T, Friesel R, Schreiber AB. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. Science 225:932-935, 1984.
- 60) Folkman J, and Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science 235: 442-447, 1987.
- 61) Ausprunk DH and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Res. 14: 53-65, 1977.
- 62) Albert BB, Bray JL, Raff M, Robert K, Watson JD. Differentiated cells and the maintenance of tissues. New York, Garland Publishing Inc, 1139 - 1191, 1994

- 63) Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J and Rifkin DB. Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol. Cell. Biol.* 6:4060-4066, 1986.
- 64) McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, Barbour R, Demetriou AA. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J. Surg. Res.* 45: 145-153, 1988.
- 65) Tsuboi R and Rifkin DB. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J. Exp. Med.* 172: 245-251, 1990.
- 66) David Moscatelli. Fibroblast growth factors. In Jason Kelley (ed.), *Cytokines of the lung*. New York: Marcel Dekker, Inc, 41-76, 1993.
- 67) Esch F, Baird A, Ling N, Veno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal ssequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6507-6511, 1985.
- 68) Kurokawa T, Seno M, Igarashi H. Nucleotide sequence of rat basic fibroblast growth factor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 16:5201, 1988.

- 69) Baird A, Schubert D, Ling N, Guillemin R. Receptor- and heparin-binding domains of fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2324-2328, 1988.
- 70) Gonzalez AM, Buscaglia M, Ong M, Baird A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol.* 110: 753-765, 1990.
- 71) Henke C, Fiegeg V, Peterson M, Wick M, Knighton D, Mc Carthy J, Bitterman P. Identification and partial characterization of angiogenesis bioactivity in the lower respiratory tract after acute lung injury. *J Clin Invest* 88: 1386-1395, 1991
- 72) Harper JW, Strydom DJ, Lobby RR. Human class I heparin-binding growth-factor: Structure and homology to bovine acidic brain fibroblast growth factor. *Biochemistry* 25: 4097-4103, 1986.
- 73) Peão MN, Águas AP, De Sá CM, Grande NR. Neof ormation of blood vessels in association with rat lung fibrose induced by bleomycin. *The Anat Rec* 1994; 238: 57-67, 1993.
- 74) Joffe S. Drug prevention of postoperative deep vein thrombosis. A comparative study of calcium heparinate and sodium pentosan polysulfate. *Arch Surg*; 111, 7-40, 1976.

- 75) Cadroy Y, Dol F, Caranobe C, Sié P, Houin G, Picard C, Pereillo JM, Maffrand JP, Boneu B. Pharmacokinetics of 125 I - Pentosan polysulfate in the rabbit. *Thrombosis Research* 48; 373-378, 1987.
- 76) Maffrand JP, Herbert JM, Bernat A, Defreyn G, Delebassee D, Savi P, Pinot JJ, Sampol J. Experimental and clinical pharmacology of pentosan polysulfate. *Semin Thromb Hemost.* 17 Suppl 2: 186-98, 1991.
- 77) MacGrego I R, Dawes J, Paton L , Pepper DS, Prowse CV, Smith M. Metabolism of sodium pentosan polysulfate in man - catabolism of iodinated derivatives. *Thromb Haemostas* 51: 321-5, 1984.
- 78) Zugmaier G, Lippman ME, Wellstein A. Inhibition of pentosan polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals. *J Natl Cancer Inst* 84: 1716-1724, 1992.
- 79) Wellstein A, Zugmaier G, Califano. Xylanopolyhydrogensulfate inhibits fibroblast growth factor-dependent growth factor-dependen growth of human tumor cells. *Cancer Res* 49:2320,1989.
- 80) Klein-Soyer C, Beretz A, Cazenave JP. Sulfated Polysaccharides modulate effects of acidic and basic fibroblast growth factors on repair of injured confluent human vascular endothelium. *Atherosclerosis* 9: 147-153, 1989.

- 81) Herbert JM, Cottineau M, Driot F. Activity of pentosan polysulfate and derived compounds on vascular endothelial cell proliferation and migration induced by acidic and basic FGF *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 37: 4281-4288, 1988.
- 82) Wellstein A, Zugmaier G, Califano J A, Kern F, Paik S, Lippman ME. Tumor growth-dependent on Kaposi's sarcoma -derived Fibroblast growth factor inhibited by pentosan polysulfate. *J Natl Cancer Inst* 83; 716 - 720, 1991.
- 83) Thrall RS, McCormick JR, Jack RM , Mc Reynolds RA, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol* 95:117-128, 1979.
- 84) Pakesh K. Kumar. Experimental models in pulmonary pathology. *Pathology*. 27; 130 - 132, 1995.
- 85) McAnulty R J and Laurent G J. Collagen and its regulation in pulmonary fibrosis. In *Pulmonary Fibrosis*, by Sem Him Phan and Roger Thrall (eds.) New York, Marcel Dekker, Inc, 136 - 171, 1995.
- 86) Zapol WM, Trelstad RL, Coffey JW, Tsai I, Salvador RA. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis* 119: 54- 554, 1979.
- 87) McCullough B, Collins JF, Johanson WG, Grover FL. Bleomycin-induced diffuse interstitial pulmonary fibrosis in baboons. *J Clin Invest* 61:79-88, 1978

- 88) Banchet JD, Cook HC (Eds) . Manual of histological techniques. Edimburg, Churchill Livingstone, 1984.
- 89) Pickering JG, Boughner DR. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. *Am J Pathol* 138: 1225-1231, 1991.
- 90) Fonseca JS, Martins GA (Eds). Curso de estatística, São Paulo, Editora Atlas, 223-247, 1995.
- 91) Pope A . An essay on man. Epistle 11, 1773.
- 92)Barbas CS, Amato MB, Lorenzi GF, Rodrigues MJ. Ventilação mecânica aplicada. Em Knobel Elias (Ed) . *Conduas no paciente grave*, Atheneu, 347-365, 1995.
- 93) Umezawa H, Suhara Y, Takita T, Maeda K. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Ser A)*, 19:200-209, 1966.
- 94) Yagoda A, Mukherji B, Young C , Etcubanas E, Lamonte C, Smith JR, Tan CT, Krakoff IH. Bleomycin, an antitumor antibiotic. *Ann Intern Med* 77:861-870, 1972.
- 95) Riggs CE Jr. Antitumor antibiotics and related compounds. In Perry Michael C. (Ed). *The chemotherapy sourcebook*. Baltimore, Willians and Wilkins, 318-358, 1992.

- 96) Petering DH, Byrnes RW, Antholine WE. The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem Biol Interact* 73:133-182,1990.
- 97) Barraco SC, Humphrey RM, The effects of bleomycin on survival and cell progression in Chinese hamster cells in vitro. *Cancer Res* 31: 1218-1223, 1971.
- 98) Blum RH, Carter SK, Agre K. A clinical review of bleomycin - a new antineoplastic agent. *Cancer* 31:903-914, 1973.
- 99) Comis RL. Bleomycin pulmonary toxicity. In: Carter SK, Umezawa H, Crooke ST, eds. *Bleomycin - Current Status and new development*. New York: Academic Press 179-191, 1978.
- 100) Umezawa H, Takeuchi T, Hori S, Sawa T, Masaaki I, Ichikawa T, Komai T. Studies on the mechanism of anti-tumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *J Antibiot* 25:409-420, 1972.
- 101) Osanto S, Buckman A, Hoeck F, Sterk PJ, De Laat JA, Hermans J. Long-term effects of chemotherapy in patients with testicular cancer. *J Clin Oncol* 10: 574-579, 1992.
- 102) Zucker PK, Khoury NF, Rosenhein NB. Bleomycin-induced pulmonary nodules: A variant of bleomycin pulmonary toxicity. *Bynecol Oncol* 28:284-291, 1987.

- 103) McKeage MJ, Evans BD, Atkinson C, Perez D, Forgeson GV, Dady PJ. Carbon monoxide diffusing capacity is a poor predictor of clinically significant bleomycin lung. *J Clin Oncol* 8(5): 779-783, 1990.
- 104) Comis RL. Detecting bleomycin pulmonary toxicity: a continued conundrum. *J Clin Oncol* 8(5):765-767, 1990.
- 105) Goldiner PL, Carlon GC, Critkovic E, Schweizer O, Howland WS. Factors influencing post-operative morbidity and mortality in patients treated with bleomycin. *Br Med J* 1: 1664-1667, 1978.
- 106) Bauer KA, Skarin AT, Balikian JP, Garnick MB, Rosenthal DS, Canellos GP. Pulmonary complications associated with combination chemotherapy programs containing bleomycin. *Am J Med* 74:557-563, 1983.
- 107) Schulman ES, Kagey-Sobotka A, MacGrashan. Heterogeneity of human mast cells. *J Immunol* 131: 1936-1941, 1983.
- 108) Schulman ES, MacGlashan DW, Peters SP, Schleimer RP, Newball HH, Lichtenstein LM. Human lung mast cells: purification and characterization. *J Immunol* 129: 2662-2670, 1982.

- 109) Craig SC, DeBois G, Schwartz LB. Mast cells in human keloids, small intestine and lung by an immunoperoxidase technique using a murine monoclonal antibody against tryptase. *Am J Pathol* 124: 427-435, 1986.
- 110) Kirby JG, Hargreave FE, O'Byrne PM. Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 136: 379-383, 1987.
- 111) Kirschenbaum AS, Kesler SW, Goff JK, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD 34⁺ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 146: 1410-1415, 1991.
- 112) Cavanah DK, Casale TB. Histamine. In: Kaliner MA, Metcalfe DD, eds. *The Mast Cell in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 321-342, 1993.
- 113) Casale TB, Trapp S, Zehr B, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 138: 1604-1608, 1988.
- 114) Gordon JR, Galli J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachetin. *Nature* 346: 274-276, 1990.
- 115) Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis alpha, which induces endothelial adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4220-4224, 1991.

- 116) Ruoss SJ, Caughey GH. Mast cells, basophils and eosinophils in the evolution of pulmonary fibrosis. In: Phan SH, Thrall RS (eds). Pulmonary Fibrosis. New York: Marcel Dekker, 445-480, 1995.
- 117) Miller MD, Kraugel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12: 17-46, 1992.
- 118) Kupper TS. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 86: 1783-1789, 1990.
- 119) Gail DB, Lenfant CJ. Cells of the lung: biology and clinical implications. *Am Rev Respir Dis* 127: 366-387, 1983.
- 120) Brain JD, Sorokin SP, Godleski JL. Quantification, origin, and fate of pulmonary macrophages. In: Brain JD, Proctor DF, Reid LM (eds.). *Respiratory defense mechanisms vol II*. New York: Marcel Decker, 849-891, 1977.
- 121) Mason RJ. Metabolism of alveolar macrophages. In: Brain Jd, Proctor DF, Reid LM (eds). *Respiratory defence mechanisms. Vol II*. New York: Marcel Decker, 893-926, 1977.
- 122) Ronald BG, Andrew LC, Stephen IR: Functional anatomy of the respiratory system in: *Chest Medicine. Essentials of pulmonary and critical care*. Ronald B, Richard WL, Michael AM, Richard AM (Eds) Baltimore, Willians and Wilkins 3-23, 1995,.

- 123) Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 12: 17-23, 1991.
- 124) Johnston RB Jr: Monocytes and macrophages. *N. Engl J Med* 318: 747-752, 1988.
- 125) Shaw R, Kelley J. Macrophages / Monocytes. In: Phan SH and Thrall RS (eds.). *Pulmonary Fibrosis*. New York: Marcel Dekker, 405 - 433, 1995.
- 126) Lydyard P, Grossi C. Cells involved in the immune response. In: *Immunology*. Rott I, Brostoff J and Male D (eds.), London, Mosby, 2.1-2.18, 1995.
- 127) Metchnikoff E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Ann Inst Pasteur* 1:321, 1887.
- 128) Harlan JM: Neutrophil-mediated vascular injury. *Acta Med Scand Suppl* 715: 123-129, 1987.
- 129) Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 397-418, 1982.
- 130) Sacks T, Moldow C, Craddock P, Bowers TK, Jacob HS: Oxygen radical mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes: An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 1161 - 1167, 1978.

- 131) Movat HZ. The role of endothelium in leukocytes emigration. The views of Cohnheim, Metchnikoff and their contemporaries. *Pathol Immunopathol Res* 8: 35-41, 1989 .
- 132) Carlos TM, Harlan JM. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev* 114: 5-28, 1990.
- 133) Anderson DL, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: An inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med* 38: 175 -194, 1987.
- 134) Lobb RR. Integrin-Immunoglobulin superfamily interactions in endothelial leukocyte adhesion. In: *Adhesion. It's role in inflammatory disease*. Harlan JM, Liu DY (Eds). New York, DH Freeman 1-18, 1992.
- 135) Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J Clin Invest* 91:379-387, 1993.
- 136) Tate RM, Repive JE. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Ver Resoir Dis* 128: 552, 1983. .
- 137) Zimmerman G, Renzetti A, Hill R. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress sybdrome. *Am Ver Respir Dis* 127: 290, 1983.

- 138) Samuelson JE, Lichtenberg F . Inflammation and repair. In Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (Eds) Robbins Pathological basis of disease. Philadelphia, W.B. Saunders company, 51-92, 1994.
- 139) Bernardy GR, Korley V, Chee P, Swindel B, Ford-Hutchinson AW, Tagari P. Persistent generation of peptide leukotienes in patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Am Rev Resp Dis* 144: 263-267, 1991.
- 140) Bachofen M, Weiber ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 3: 35-56, 1982.
- 141) Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE. Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 315: 547-551, 1986.
- 142) Thrall RS, Phan SH, Mc Cormick JR, Ward PA. The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in neutrophil-depleted and complement-depleted rats. *Am J Pathol* 105: 76-81, 1981.
- 143) Block ER. Pulmonary endothelial cell pathobiology: implications for acute lung injury. *Am J Med Sci* 304: 136-144, 1992.

- 144) Bertozzi P, Astedt B, Zenius C, Lynch K, Lemair F, Zapow W, Chapman HA. Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 322: 890-897, 1990.
- 145) Idell S, James KK, Levin EG, Schwatz BS, Manchada N, Maunder RJ, Martin TR, Mc Carthy J, Fair DS. Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predisposes alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 84: 695-705, 1989.
- 146) Rinaldo J, Rogers RM. Adult respiratory distress syndrome: Changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 306:900-909, 1982.
- 147) Phan SH. Diffuse interstitial fibrosis. In: Massaro D, ed. *Lung cell biology*. New York: Marcel Dekker, 907-980, 1989.
- 148) Phan SH, Gharaee-Kermani M, Mc Garry B, Kunkel SL, Wolber FW. Regulation of rat pulmonary artery endothelial cell transforming growth factor β production by IL-1 β and TNF- α . *J Immunol* 149: 103-106, 1992.
- 149) Pober JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathol* 133: 426-433, 1988.

- 150) Phan SH, Gharaee- Kermani M, Wolber F, Ryan US. Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *J Clin Invest* 87: 148-154, 1991.
- 151) Kunkel SL, Standford T, Kasahara K, Strieter RM. Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. In Westnick J, ed. : *Chemotactic cytokines*. New York: Plenum Press 65-71, 1991.
- 152) Karmiol S, Phan SH. Fibroblast and cytokines. In: Kunkel SL, Remick DG, eds. *Cytokines in Health and disease*. New York: Marcel Dekker, 271-296, 1992.
- 153) Adamson IYR, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 77: 185-198, 1974.
- 154) Adamson IYR, Bowden DH. Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 112: 224-230, 1983.
- 155) Brenner BM, Troy JL, Baltemann BJ. Endothelium-dependent vascular responses: mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 84: 1373-1380, 1989.
- 156) Zimmer GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 13: 93-100, 1992.

- 157) Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126:332-337, 1982.
- 158) Thrall RS, Scalise PJ. Bleomycin. In: Phan SH and Thrall RS eds. *Pulmonary Fibrosis*. New York: Marcel Dekker, 231-292, 1995.
- 159) Adamson IY, Bowden DH. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodinamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30: 35-42, 1974.
- 160) Mattay MA, Wiener-Krusmish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 142: 1250-1257, 1990.
- 161) Kallenberg CG, Schilizzi BM, Beaumont F, Poppema S. Expression of class II MHC antigens on alveolar epithelium in fibrosinb alveolitis. *Clin Exp Immunol* 67: 182-190, 1987.
- 162) Nakata K, Akagawa KS, Fukayama M, Hayashi Y, Kadokura M, Tokunaga T. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor promotes the proliferation of human alveolar macrophages in vitro. *J Immunol* 147: 1266-1272, 1991.
- 163) Weiber ER. A note on differentiation and visibility of alveolar epithelial cells. *Chest* (Suppl) 195-215, 1974.

- 164) Gross TJ, Simon RH, Kelly CJ, Strin RG. Rat alveolar epithelial cell concomitantly express plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase. *Am J Physiol* 260: L 286-295, 1991.
- 165) Jacob HS, Moldow CF, Flynn PJ. Therapeutic ramifications of the interaction of complement, granulocytes and platelets in the production of acute lung injury. In: Malik AB, Staud NC. Eds. *Mechanisms of lung microvascular injury*. New York, New York Academy of Sciences. 489-495, 1982.
- 166) Dehmling RH. The pathogenesis of respiratory failure after trauma and sepsis. *Surg Clin North Am* 60: 1373-1390, 1980.
- 167) Evans TW, McAnulty RJ, Rogers DF, Chung KF, Barnes PJ, Laurent GJ. Bleomycin-induced lung injury in the rat. Effects of the platelet-activating factor (PAF) receptor antagonist BN 52021 and platelet depletion. *Environ Health Perspect* 85: 65-69, 1990.
- 168) Postlethwalte AE, Smith GH, Mainard CL. Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro. Stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. *J Immunol* 132: 2470-2477, 1984.
- 169) Thrall RS, Barton RW, D'Amato DA, Sulavik SB. Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am Rev Respir Dis* 126: 488-492, 1982.

- 170) Phipps RP, Penney DP, Keng P, Silvera M, Harkins S, Dedak S. Immune functions of subpopulations of lung fibroblasts. *Immunol Res* 9: 275-286, 1990.
- 171) Vancheri C, Gauldie J, Bienenstock J et al. Human lung fibroblast-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) mediates eosinophil survival in vitro. *Am J Resp Cell Mol Biol* 280-295, 1989.
- 172) Eutroneok K, Breen E, Absher M, Phan S. Bleomycin regulation of transforming growth factor beta mRNA in rat lung fibroblasts and subpopulations. *Chest* 37: 65, 1991.
- 173) Chen B, Polunovsky V, White J, Blazar B, Nakhleh R, Jessuron J, Peterson M, Bitterman P. Mesenchymal cells isolated after acute lung injury manifest an enhanced proliferative phenotype. *J Clin Invest* 90: 1778-1785, 1992.
- 174) Polunovsky VA, Chen B, Henki C, Snover D, Wendt C, Ingbar DH. Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J Clin Invest* 92: 388 - 397, 1993.
- 175) Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O, Rifkin DB. The role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long term stimulation of plasminogen activator production and synthesis. *J Cell Physiol* 140: 75-81, 1990.

- 176) Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB. Endothelial cell-derived heparin sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 107: 743-751, 1988.
- 177) Flaumenhaft R, Moscatelli D and Rifflin DB. Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of bFGF. *J Cell Biol* 11: 1651-1659, 1990.
- 178) McCaffrey TA, Falcone DJ, Brayton CF, Agarwal LA, Welt FGP, Weksler BH. Transforming growth factor- β activity is potentiated by heparin via dissociation of the transforming growth factor β / α_2 -macroglobulin inactive complex. *J Cell Biol* 109: 441-448, 1989.
- 179) Wollenberg GK, La Marre J, Rosendal S and Hayes MA. Binding of tumor necrosis factor alpha to activated forms of human plasma alpha 2 macroglobulin. *Am J Pathol* 138: 265-272, 1991.
- 180) La Marre J, Wollenberg GK, Gonias SC, Hayes MA. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2 - macroglobulins. *Lab Invest* 65: 3-14, 1991.
- 181) Zugmaier G, Paik S, Wilding G, Knabbe C, Bano M, Lupo R, Deschauer B, Simpson S, Dickson RB, Lippman M. Transforming growth factor β_1 induces cachexia and systemic fibrosis without an antitumor effect in nude mice. *Cancer Res* 51: 3590-3594, 1991

- 182) Torti FM, Torti SV, Larrick JW, Ringold GM. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor β . *J Cell Biol* 108: 1105-1113, 1989.
- 183) Tracey KJ, Wei H, Monogue KR. Cachetin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J Exp Med* 167: 1211-1227, 1988.