

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

**FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR BLEOMICINA**  
**INTRATRAQUEAL EM RATOS WISTAR:**  
**USO DO INTERFERON- $\alpha$ -2b EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE**  
**SÍNDROME DA DISTRIBUIÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA**  
**- SDRA -**

**JOSÉ ROBERTO FREITAS ROSSARI**

**ORIENTADOR: Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Prolla**

**PORTO ALEGRE**

**2004**

R823f **Rossari, José Roberto Freitas**

Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos wistar: uso do interferon- $\alpha$ -2b em um modelo experimental de síndrome da distrição respiratória aguda / José Roberto Freitas Rossari; orient. Antonio Fabiano Ferreira Filho; co-orient. João Carlos Prolla. Porto Alegre : UFRGS, 2004.

99f. il.

Dissertação(Mestrado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia.

1. SÍNDROME DA DISTRIÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA ( SDRA). 2. FIBROSE PULMONAR . 3. BLEOMICINA INTRATRAQUEAL. 4. INTERFERON- $\alpha$ -2b. I. Ferreira Filho, Antonio Fabiano. II. Prolla, João Carlos. III. Título.

C.D.D. 616.21

Ruth Oliveira CRB10/501

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **José Luiz Novo Rossari e Maria de Fátima Freitas Rossari**, e à minha irmã, **Michele Freitas Rossari**, pelo apoio e carinho que sempre me dedicaram.

## AGRADECIMENTOS

**Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho** – Oncologista Clínico, Preceptor da Residência de Cancerologia do Hospital Santa Rita – Complexo Hospitalar Santa Casa, por sua grande amizade, pelo conhecimento e inspiração científica transmitidos, e pela brilhante orientação deste estudo;

**Prof. Dr. João Carlos Prolla** - Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina - Pneumologia, UFRGS, Professor Titular da Faculdade de Medicina da UFRGS e Responsável pela Unidade de Citopatologia do HCPA, pela dedicação aos alunos e ao Curso de Pós-Graduação em Medicina – Pneumologia, e pela importante co-orientação deste trabalho;

**Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva** – Patologista do Hospital São Lucas da PUCRS, Professor da Faculdade de Medicina da PUCRS, pela concessão de material e espaço de seu laboratório, boa vontade em colaborar com este projeto e pelo tempo despendido nesta tarefa, tendo auxiliado durante a revisão das lâminas e na escrita da seção de Materiais e Métodos deste estudo;

**Prof. Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso** – Chefe do Laboratório de Medicina Experimental, Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – Disciplina de Cirurgia Torácica, pela concessão de espaço e tempo irrestritos no Laboratório de Medicina Experimental;

**Sr. Marco Aurélio da Silva** – Secretário do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia – UFRGS, pelo carinho e interesse demonstrados durante todo o período de execução desta pesquisa;

**Sr. Alex Renato Borba Pereira** – Vendedor Especialista ETHICON – Johnson & Johnson, pelo oferecimento dos fios de sutura utilizados neste estudo;

**Sr. Tiago Giuliani Lopes** – Técnico do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo esmero e pela qualidade na confecção das lâminas para análise histológica do material pulmonar dos animais;

**Sr. Alan Rodrigues Birck** – Consultor de Bioestatística da Unidade de Apoio à Pesquisa, pelo solícito auxílio durante a análise estatística;

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **SDRA** – Síndrome da Distrição Resiratória Aguda
- **LPA** – Lesão Pulmonar Aguda
- **PaO<sub>2</sub>** – Pressão Parcial de Oxigênio Arterial
- **FiO<sub>2</sub>** - Fração Inspirada de Oxigênio
- **IL-1** – Interleucina 1
- **IL-4** - Interleucina 4
- **IL-6** – Interleucina 6
- **IL-8** – Interleucina 8
- **IL-10** – Interleucina 10
- **TNF  $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$
- **FAP** – Fator Ativador de Plaquetas
- **PEEP** – Pressão Positiva Expiratória Final
- **HE** – Hematoxilina e Eosina
- **CTAP III** – Peptídeo Ativador do Tecido Conjuntivo III
- **$\beta$ -TG** -  $\beta$ -Tromboglobulina
- **NAP-2** – Peptídeo Ativador de Neutrófilos 2
- **FCT- $\beta$ 1** – Fator de Crescimento Transformante  $\beta$ 1
- **IFN** – Interferon
- **IFN- $\alpha$**  - Interferon- $\alpha$
- **IFN- $\beta$**  - Interferon- $\beta$
- **IFN- $\gamma$**  - Interferon- $\gamma$

- **NK** – (células) *Natural Killers*
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- **RNA<sub>m</sub>** – Ácido Ribonucléico mensageiro
- **FFCMPA** – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre
- **SPSS** – *Statistical Package for Social Sciences*

## LISTA DE FIGURAS

- **FIGURA 1** – Radiografias de tórax de pacientes com SDRA /20
- **FIGURA 2** – Tomografias computadorizadas de tórax de pacientes com SDRA /21
- **FIGURA 3** – Células do revestimento do epitélio alveolar /23
- **FIGURA 4** – Formação de membranas hialinas na fase aguda da SDRA /25
- **FIGURA 5** – Modelo de alvéolo normal *versus* danificado na fase aguda /26
- **FIGURA 6** – Achado histológico na fase de alveolite fibrosante /28
- **FIGURA 7** – Início do edema alveolar e intersticial /32
- **FIGURA 8** – Início da fibrose pulmonar e metaplasia dos pneumócitos tipo II /33
- **FIGURA 9** – Cicatrizes fibrosas /34
- **FIGURA 10** - Papel das quimiocinas na migração leucocitária /38
- **FIGURA 11** – Estrutura tridimensional do interferon- $\alpha$  /45
- **FIGURA 12** – Diagrama demonstrando o desenho do estudo /50
- **FIGURA 13** – Fêmea da raça *Wistar* /51
- **FIGURA 14** – Exposição traqueal para instilação de bleomicina /52
- **FIGURA 15** – Equipamento de digitalização de imagem /56
- **FIGURA 16** – Microfotografia de tecido pulmonar corado com picrossirius /57
- **FIGURA 17** – Microfotografias demonstrando vários graus de fibrose /58
- **FIGURA 18** – Gráfico da proporção de fibrose desenvolvida entre os grupos estudados /62
- **FIGURA 19** – Estrutura molecular das bleomicinas /66



- **FIGURA 20** – Radiografia de tórax de um paciente com fibrose pulmonar secundária à bleomicina /69

## LISTA DE QUADROS

- **QUADRO 1** – Critérios para definição de SDRA /17
- **QUADRO 2** – Lista das quimiocinas  $\alpha$  e  $\beta$  /37
- **QUADRO 3** – Principais citocinas envolvidas na LPA e SDRA /41
- **QUADRO 4** – Fatores de risco para fibrose pulmonar associada à bleomicina /68

## ÍNDICE

1. Introdução-----	14
1.1. Fundamentação Teórica-----	16
1.1.1. Síndrome da Distrição Respiratória Aguda-----	16
1.1.2. Epidemiologia da SDRA-----	18
1.1.3. Características Clínicas e Radiológicas-----	19
1.1.4. Condições Clínicas Associadas a LPA e SDRA-----	21
1.1.5. Achados Histo-patológicos-----	22
1.1.5.1. Epitélio Alveolar Normal-----	23
1.1.5.2. Dano Agudo-----	24
1.1.5.3. Reparo Tecidual-----	27
1.1.6. Terapêutica-----	29
1.1.7. O Modelo Experimental de Fibrose Pulmonar-----	31
1.1.8. Citocinas Envolvidas na SDRA-----	35
1.1.8.1. Citocinas-----	35
1.1.8.2. Citocinas e Angiogênese-----	41
1.1.9. Interferons-----	42
1.10 Objetivo do Estudo-----	47
2. Materiais e Métodos-----	49
2.1 Delineamento do estudo-----	49
2.2 Animais-----	51
2.2.1. Comitê de Ética-----	51
2.3. Modelo Animal de Fibrose Pulmonar Induzida pela Bleomicina-----	52

2.3.1 Administração de Bleomicina e Técnica Cirúrgica-----	52
2.4. Administração do Interferon- $\alpha$ -2b-----	53
2.5. Histologia Pulmonar-----	54
2.6. Variáveis do Estudo-----	54
2.7. Análise de Imagem-----	55
2.8. Amostra e Análise Estatística-----	58
3. Resultados-----	61
3.1. Testes Estatísticos-----	61
3.2. Mortalidade-----	61
3.3. Peso dos Animais-----	62
3.4. Fibrose Pulmonar Induzida pela Bleomicina-----	62
<b>4. Discussão-----</b>	<b>65</b>
4.1. Bleomicina-----	66
4.2. O Interferon- $\alpha$ -2b na Fibrose Pulmonar Induzida pela Bleomicina-----	69
4.3. Perspectivas Futuras-----	71
<b>5. Conclusão-----</b>	<b>77</b>
<b>6. Referências Bibliográficas-----</b>	<b>79</b>

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Distrição Respiratória aguda (SDRA) é uma entidade clínica comum, caracterizada pelo comprometimento pulmonar agudo e severo, devido ao edema pulmonar secundário ao aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (1).

Após o insulto inicial, em fases mais tardias do desenvolvimento do quadro inflamatório pulmonar, alguns pacientes evoluem com progressão para um quadro de fibrose pulmonar (alveolite fibrosante) (2,3). O achado histológico de alveolite fibrosante correlaciona-se com um aumento do risco de óbito (4).

Entretanto, apesar dos recentes avanços da Terapia Intensiva, tais como a ventilação artificial com baixo volume corrente, a mortalidade da SDRA ainda permanece excessivamente elevada, na faixa de 40 – 50% (5). Nenhuma estratégia de modulação farmacológica confirmou benefícios claros na sobrevida dos pacientes com SDRA.

Os interferons (IFNs) humanos são proteínas naturais que constituem-se em potentes citocinas com capacidade de interagir com as células, resultando em efeitos e ações antivirais, antiproliferativas, reguladoras de diferenciação e crescimento, imunomoduladoras e anti-angiogênicas (6). Em modelos experimentais de fibrose hepática em animais, o IFN- $\alpha$  reduziu a síntese de colágeno, a expressão do RNAm dos pró-colágenos I e III, e a deposição dos colágenos I e III no tecido hepático (7). Outros estudos experimentais comprovaram a capacidade do IFN- $\alpha$  de inibir o desenvolvimento da fibrose hepática (8) e de reverter a

fibrose hepática induzida pela obstrução biliar (9). Além disso, o IFN- $\alpha$  possui propriedades de modulação inflamatória, inibindo a ação do fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) (10).

A partir da revisão teórica que sugere uma modulação da formação de fibrose, e dos interessantes resultados iniciais dos interferons em pacientes e em modelos experimentais de fibrose pulmonar e hepática, resolvemos explorar o efeito do IFN- $\alpha$  em um modelo experimental bem estabelecido de fibrose pulmonar induzida pela instilação de bleomicina intratraqueal, em ratos *Wistar*.

## **1.1. Fundamentação Teórica**

### **1.1.1. Síndrome da Distrição Respiratória Aguda**

Primeiramente descrita por Ashbaugh e colegas, em 1967 (11), a Síndrome da Distrição Respiratória do Adulto é hoje conhecida como Síndrome da Distrição Respiratória Aguda (SDRA), devido ao fato de que, além de acometer adultos, a síndrome também ocorre em pacientes pediátricos (1,12). Trata-se de uma síndrome clínica comum e grave, de comprometimento pulmonar agudo, caracterizada por uma falência respiratória aguda, devido a edema pulmonar secundário ao aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. A SDRA representa a mais grave manifestação de um espectro de possíveis respostas à Lesão Pulmonar Aguda (LPA), sendo que estas respostas ocorrem como complicações de uma reação imunológica sistêmica ao dano agudo.

Uma vez que suas definições iniciais careciam de critérios específicos que pudessem ser usados para identificar sistematicamente os pacientes, existia controvérsia quanto a sua incidência, história natural e mortalidade associada.

Na tentativa de estabelecer critérios mais específicos para o diagnóstico de SDRA e sua diferenciação com estados inflamatórios sistêmicos menos graves, este tema foi o alvo de uma conferência para a criação do Consenso Americano-Europeu, em 1994. As definições criadas neste consenso possuem vantagens sobre as que vigoravam até então, pois foram simplificadas, tornando-se, assim, mais aplicáveis na rotina clínica. Uma outra vantagem dos



novos critérios foi o fato de que nos permitiu reconhecer, de modo mais claro, que a gravidade da injúria pulmonar pode ser variável.

Aceita-se o diagnóstico de LPA em uma situação em que uma hipoxemia severa de início agudo é acompanhada pelo achado de opacidades difusas bilaterais em uma radiografia de tórax frontal, quando o aumento da pressão capilar pulmonar e/ou atrial esquerda houverem sido excluídos. A SDRA é diferenciada da LPA pela severidade da hipoxemia, e é definida como a razão entre a  $PaO_2$  e a fração inspirada de oxigênio ( $PaO_2/FiO_2$ )  $<$  ou  $=$  200mmHg (1,12,13,14) (Quadro 1).

---

**Quadro 1. Critérios para Definição de Síndrome da Distrição Respiratória Aguda**

---

Início agudo

Infiltrado bilateral na radiografia de tórax

Pressão da artéria pulmonar  $<$  ou  $=$  18mmHg, ou ausência de evidência clínica de hipertensão atrial esquerda

Lesão pulmonar aguda considerada presente se  $PaO_2/FiO_2 <$  ou  $=$  300

SDRA considerada presente se  $PaO_2/FiO_2 <$  ou  $=$  200

---

\* $PaO_2$ : Pressão parcial de oxigênio arterial;  $FiO_2$ : Fração de oxigênio inspirada (14)

Apesar da distinção entre LPA e SDRA, dois estudos que utilizaram o valor de  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$  para determinar LPA mostraram que, embora com grau menos grave de oxigenação, a LPA apresenta mortalidade tão alta quanto 58% (15,16). Estes dados demonstram que as definições de SDRA, que requerem critérios mais graves de oxigenação, não necessariamente definem diferentes populações de pacientes (1). Além disso, existem evidências de que a incidência de falência orgânica não pulmonar seja semelhante entre pacientes com  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$  ou com  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$  (17).

Assim, embora os critérios recomendados pelo Consenso Americano-Europeu de 1994 sejam aceitos atualmente para definir diagnósticos de injúria pulmonar aguda, é provável que métodos adicionais sejam necessários para a classificação dos pacientes nestas condições (12). Uma crítica aos critérios do Consenso é o fato de não especificar qual desordem clínica, ou *desordens clínicas*, está ou estão associadas ao desenvolvimento da injúria pulmonar (por exemplo: sepse, pneumonia, trauma, aspiração de conteúdo gástrico, etc). Este pode ser um ponto potencialmente relevante, visto que, por exemplo, estudos comprovam que a injúria pulmonar e a SDRA induzidas pela sepse apresentam maior mortalidade (15,18,19).

### **1.1.2. Epidemiologia da SDRA**

Um estudo epidemiológico prospectivo levando em conta os critérios estabelecidos pelo Consenso de 1994 está em andamento. Entretanto, hoje, aceita-se a estimativa de que surjam, nos Estados Unidos, cerca de 75 casos por 100.000 habitantes, por ano (1). É possível

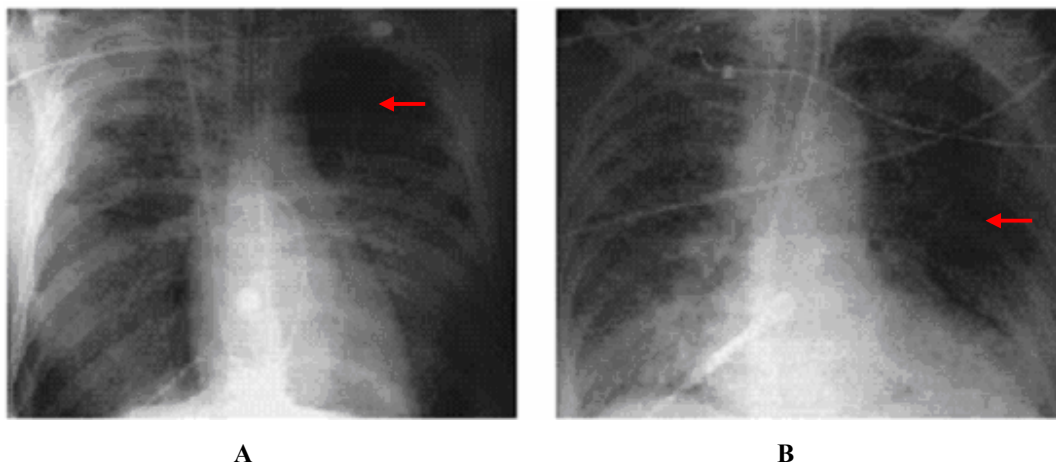
que, anualmente, entre 40.000 e 70.000 pacientes morram em consequência da SDRA, nos EUA (12).

### **1.1.3. Características Clínicas e Radiológicas**

Durante sua fase aguda, ou exsudativa, a SDRA se manifesta através de uma insuficiência respiratória de rápido início, em um paciente com fatores de risco para esta condição. A hipoxemia arterial refratária ao tratamento com oxigênio suplementar é um aspecto clínico característico desta entidade (20).

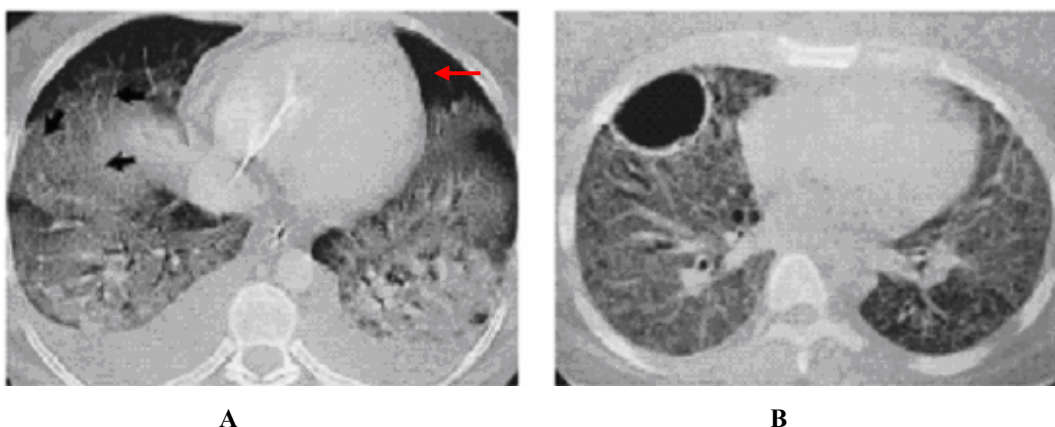
Do ponto de vista funcional, as anormalidades associadas à SDRA não são homoganeamente distribuídas pelos pulmões. Em essência, os pulmões dos pacientes podem ser divididos em áreas infiltradas, consolidadas, ou colabadas (portanto pouco aeradas e pouco complacentes), e regiões com níveis praticamente normais de ventilação e complacência (2).

Radiograficamente, os achados podem ser indistinguíveis daqueles presentes no edema pulmonar cardiogênico, apresentando infiltrados bilaterais, podendo incluir a presença de derrames pleurais. A opacificação observada no radiograma de tórax é secundária a um edema não-hidrostático, resultante de uma alteração da permeabilidade da membrana alveolocapilar (20) (Figura 1).



**Figura 1.** Achados radiográficos da Fase Aguda, ou exsudativa (Painel A) e da fase de Alveolite Fibrosante (Painel B) da Lesão Pulmonar Aguda e da Síndrome da Distrição Respiratória Aguda. Modificado de Ware LB & Matthay MA (1). As setas vermelhas demonstram áreas radiologicamente poupadas, demonstrando o padrão heterogêneo do infiltrado pulmonar.

Exames de tomografia computadorizada têm sido crescentemente utilizados na investigação de rotina da SDRA, e são úteis na avaliação da extensão e distribuição da lesão pulmonar. Geralmente, o preenchimento alveolar, as consolidações e as atelectasias ocorrem predominantemente em zonas pulmonares pendentes, enquanto outras áreas podem ser relativamente poupadas (Figura 2) (1,21,22,23). Entretanto, a análise dos lavados bronco-alveolares de regiões radiograficamente livres e não pendentes também podem apresentar substancial presença de células e marcadores inflamatórios (24).



**Figura 2.** Achados tomográficos da Fase Aguda, ou exsudativa (Painel A) e da fase de Alveolite Fibrosante (Painel B) da Lesão Pulmonar Aguda e da Síndrome da Distrição Respiratória Aguda. As setas negras indicam os septos interlobulares espessados, consistente com a presença de edema pulmonar. Modificado de Ware LB & Matthay MA (1). A seta vermelha demonstra uma região radiologicamente poupada.

#### 1.1.4. Condições Clínicas Associadas a LPA e SDRA

A evolução da SDRA é influenciada por diversos fatores, tais como o estado de saúde prévio do paciente, e a natureza da condição clínica que precipitou seu desenvolvimento

(25,26). Considerando-se a sua alta taxa de mortalidade associada, é importante a identificação de pacientes em risco para o desenvolvimento de LPA ou SDRA.

As desordens clínicas comumente associadas podem ser divididas em um grupo relacionado diretamente ao insulto pulmonar (ex. pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, contusão pulmonar, embolia gordurosa), e em um segundo grupo, causador de injúria pulmonar, indiretamente, através de processos sistêmicos (ex. sepse, politraumatismos, politransfusões, pancreatite aguda) (1).

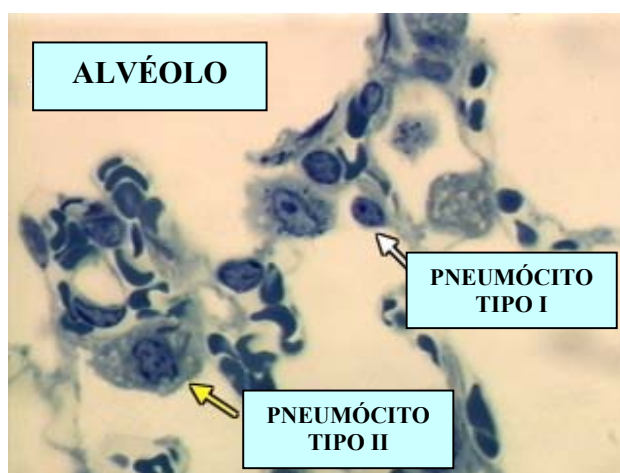
Mais do que a causas respiratórias primárias, a maioria dos óbitos é atribuída à sepse ou à falência de múltiplos órgãos, embora a redução da mortalidade com a utilização de ventilação mecânica com baixo volume corrente possa indicar que em alguns casos, o êxito letal esteja diretamente relacionado ao dano pulmonar.

#### **1.1.5. Achados Histo-patológicos**

A estrutura microscópica das paredes alveolares (septos alveolares) inclui: 1) epitélio endotelial; 2) tecido intersticial e membrana basal, que separam o endotélio das células de revestimento epitelial do alvéolo; 3) epitélio alveolar; 4) revestimento tensoativo (surfactante); e 5) macrófagos alveolares (2, 27).

### 1.1.5.1. Epitélio Alveolar Normal

Dois tipos principais de células constituem o epitélio alveolar: os pneumócitos tipo I, que possuem forma plana e cobrem cerca de 90-95% da superfície alveolar; e os pneumócitos tipo II, cubóides, que apesar de mais numerosos, revestem apenas os 5-10% restantes da superfície alveolar (2,27) (Figura 3). Estas células são mais resistentes aos danos, e têm as funções de produzir surfactante, realizar o transporte de íons, e de proliferação e diferenciação em pneumócitos tipo I, quando esses são lesados. Os pneumócitos tipo II podem ser considerados progenitores para a re-epitelização de um epitélio alveolar desnudo, pois proliferam-se para cobrir a membrana basal desnuda, e então diferenciam-se em células do tipo I, re-estabelecendo a arquitetura alveolar normal e aumentando a capacidade de transporte de fluidos do epitélio alveolar.



**Figura 3:** Espécime pulmonar mostrando alvéolo e seu revestimento epitelial, composto de pneumócitos tipo I e tipo II. Modificado (28).

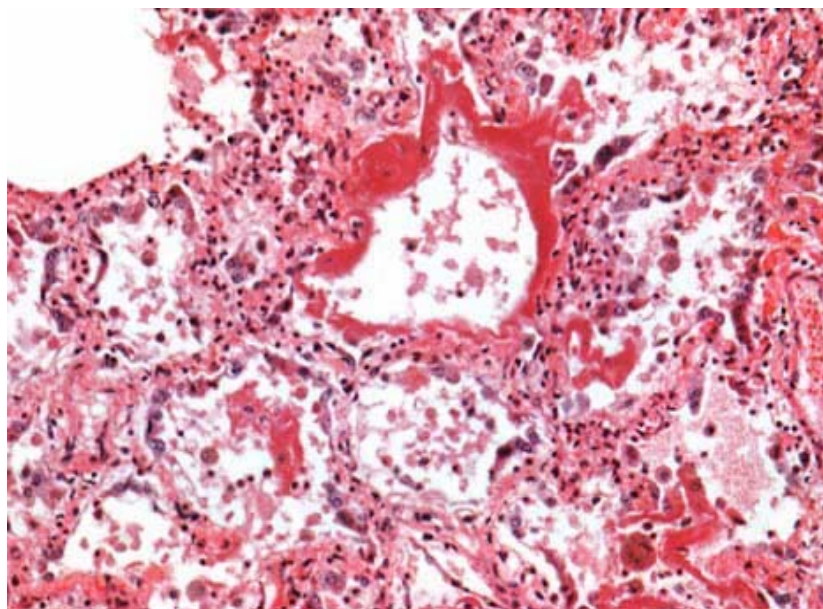
Além dos pneumócitos I e II, existe a presença dos macrófagos alveolares, que se encontram unidos às células epiteliais ou soltos de forma livre no interior dos espaços aéreos, adjacentes à camada de surfactante que cobre as células do epitélio alveolar.

#### **1.1.5.2. Dano Agudo**

A perda da integridade do epitélio, na LPA e na SDRA, tem diversas conseqüências. Em condições normais, a barreira epitelial é muito menos permeável que a barreira endotelial, portanto, danos ao epitélio podem aumentar esta permeabilidade, e contribuir para a penetração de líquido nos espaços alveolares. Danos aos pneumócitos tipo II, além de causar uma redução na produção de surfactante, causam um desequilíbrio do transporte de fluidos, deteriorando a capacidade de absorção do edema, e permitindo que este se estabeleça nos espaços alveolares. Além disso, se a agressão ao epitélio alveolar for muito severa, e o reparo epitelial não se desenvolver suficientemente, e de uma maneira organizada, este processo pode levar à fibrose pulmonar (1,29).



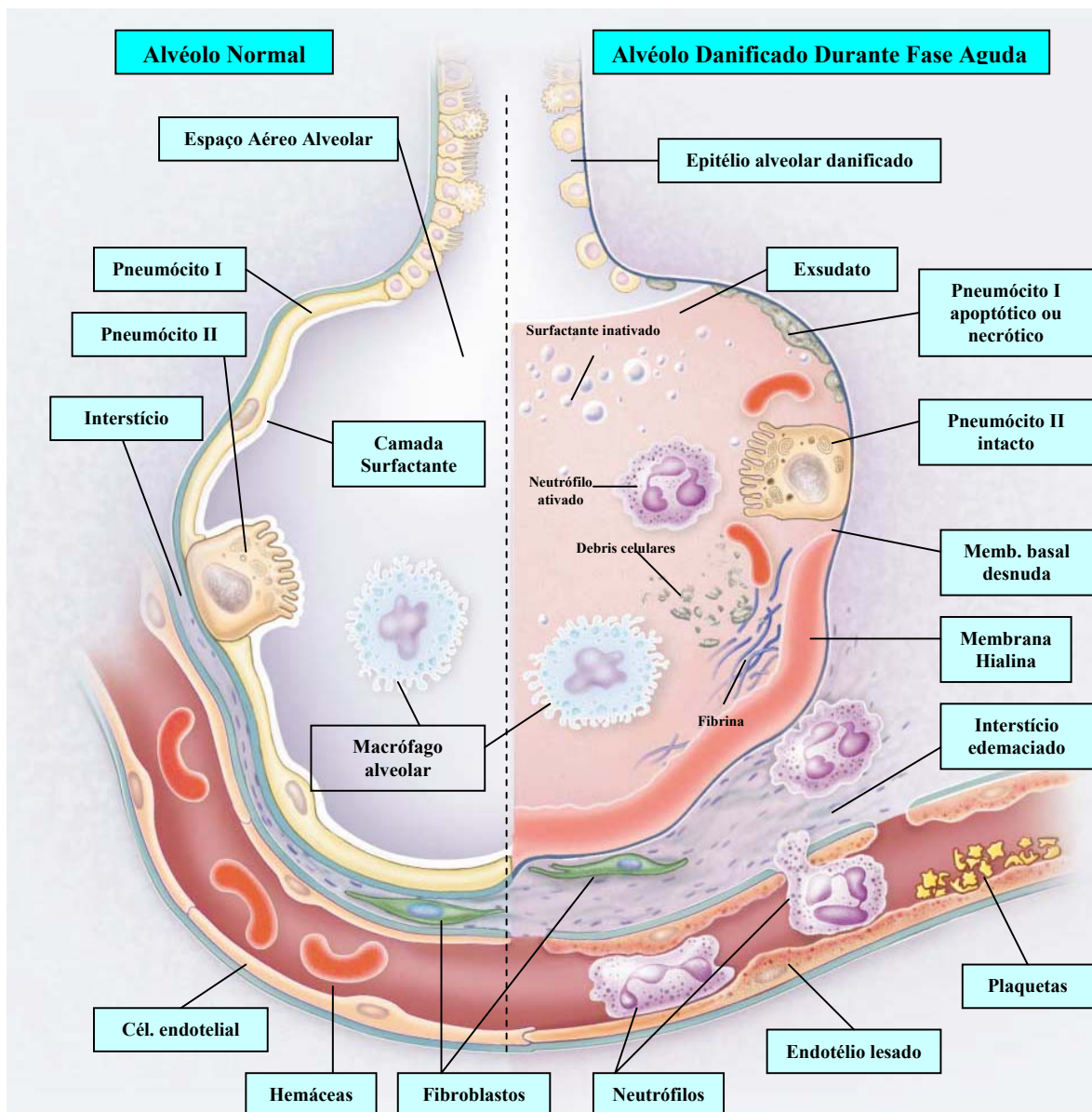
A fase aguda da injúria pulmonar aguda e da SDRA caracteriza-se histologicamente pelo influxo de um exsudato para o interior dos espaços aéreos, secundário ao aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar devido à perda de pneumócitos do tipo I e ao dano capilar difuso. Este exsudato, rico em proteínas, fibrina e debris celulares, começa a organizar-se sob a forma de membrana hialina, depositando-se sobre a parede alveolar, destituída de seu revestimento epitelial normal (Figura 4).



**Figura 4:** Dois a quatro dias após o insulto inicial, a fase aguda caracteriza-se pelo influxo de exsudato para o interior dos espaços aéreos. Há organização do exsudato em membrana hialina, com depósito sobre as paredes alveolares. Modificado (30).

Após o influxo deste exsudato para o interior dos espaços aéreos, o alvéolo é invadido por neutrófilos, oriundos do interstício após penetrarem o endotélio capilar danificado. Estes neutrófilos são atraídos e ativados por citocinas (interleucinas – IL – 1, 6, 8, 10 e fator de necrose tumoral alfa – TNF- $\alpha$ ) que são secretadas por macrófagos presentes no interior do

alvéolo. Neste momento, a IL-1 estimula, também, a produção de matriz extracelular por fibroblastos.



**Figura 5:** Alvéolo normal (à esquerda) e o alvéolo danificado durante a fase aguda da LPA ou da SDRA (à direita).

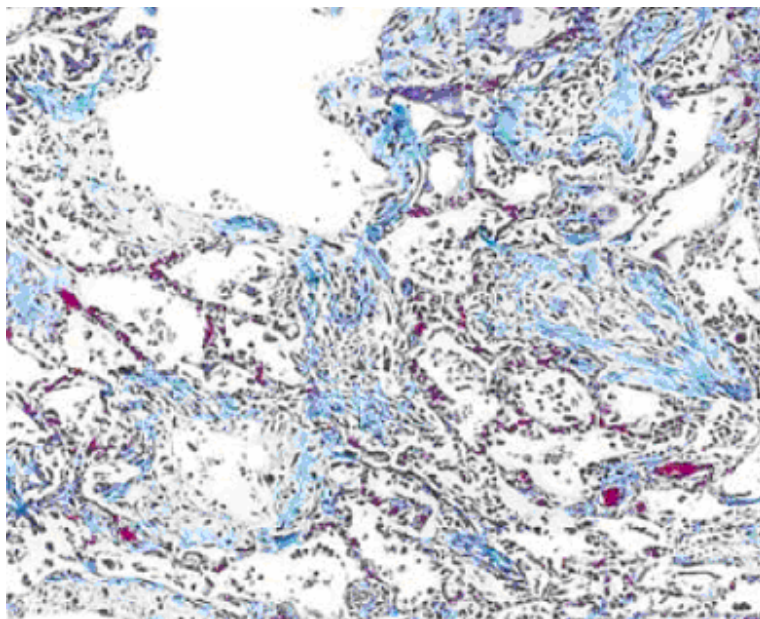
A figura apresenta os elementos presentes em cada uma das situações. Os macrófagos intra-alveolares, durante a fase aguda, secretam citocinas (interleucinas, IL-1, 6, 8 e 10, e FNT $\alpha$ ) que agem localmente estimulando a quimiotaxia e a ativação dos neutrófilos, atraindo-os do interior dos capilares, para o interior dos espaços aéreos. Estes neutrófilos são responsáveis pela secreção de leucotrienos, radicais oxidantes, proteases e algumas moléculas pró-inflamatórias, como o fator ativador de plaquetas – FAP. Modificado de Ware LB & Matthay MA (1).

### **1.1.5.3. Reparo Tecidual**

Alguns pacientes apresentam uma rápida resolução do quadro de SDRA; outros evoluem com progressão para um quadro de fibrose pulmonar (alveolite fibrosante), que pode ser observado histologicamente após o 7<sup>o</sup> dia do insulto pulmonar. O espaço alveolar se torna repleto de células mesenquimais e de seus produtos, juntamente com vasos sanguíneos recém formados (neo-angiogênese).

Nesta fase, os fibroblastos se ativam e produzem colágeno, o que transforma o exsudato intra-alveolar fibrinoso em uma matriz de tecido conjuntivo mixóide. Esta fibroproliferação, somada à deposição de colágeno, determinará um remodelamento da estrutura parenquimatosa pulmonar, com marcado espessamento dos septos alveolares (2,3,31).

O achado histológico de alveolite fibrosante correlaciona-se com um aumento do risco de óbito, e os pacientes, quando autopsiados, apresentam um acúmulo de colágeno e fibronectina nos pulmões (Figura 6). Níveis elevados de pró-colágeno III, um precursor da síntese do colágeno, podem ser encontrados no compartimento alveolar precocemente na evolução da doença (4,32), além disso, a detecção precoce de um elevado nível de pró-colágeno III nos espaços alveolares está associada à uma evolução desfavorável do quadro, e maior risco de morte (32,33).



**Figura 6:** Achado histológico na fase de alveolite fibrosante da LPA ou SDRA. Há depósito de colágeno (áreas azuis) no tecido de granulação, consistente com a deposição de matriz extracelular no compartimento alveolar (Coloração Tricromo, x60) Modificado de Ware LB & Matthay MA (1).

### 1.1.6 Terapêutica

O tratamento da SDRA é complexo e difícil, e, com frequência, esta desordem clínica apresenta um desfecho fatal. Apesar da crescente compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da SDRA ter levado a comunidade médica e científica a desenvolver diversas novas estratégias para o tratamento específico desta síndrome, muitas destas novas abordagens terapêuticas não se mostraram benéficas, ou não se traduziram em uma melhora significativa do prognóstico destes pacientes.

Sabendo-se que durante a evolução da SDRA, a produção de surfactante é reduzida, e baseando-se no fato de que a administração de surfactante exógeno tenha seu benefício comprovado em pacientes neonatais (34), alguns estudos foram realizados para verificar sua aplicação em adultos (35,36,37). Embora com alguns resultados preliminares encorajadores (35), o uso de surfactante exógeno não obteve sucesso no aumento da sobrevida de pacientes adultos com SDRA (36,37).

Os glicocorticóides e outros agentes antiinflamatórios foram amplamente avaliados, sem atingir resultados animadores (38,39,40). A exceção se faz a um pequeno estudo randomizado, com apenas 24 pacientes, que avaliou o papel da metilprednisolona durante a fase de alveolite fibrosante, e que demonstrou redução da mortalidade (41). A interpretação dos resultados deste estudo se torna difícil devido ao número limitado de pacientes, e ao *crossover* que houve dos pacientes que não haviam sido tratados e que migraram para o braço da metilprednisolona. Desta forma, apenas 4 pacientes não receberam o tratamento em estudo.

Assim, os resultados deste estudo carecem de comprovação em estudos maiores, e não autorizam a utilização da metilprednisolona de maneira rotineira nestes pacientes.

Uma miscelânea de outros agentes (tais como óxido nítrico, prostaglandina E1, prostaciclina e cetoconazol) foram estudados em pacientes com SDRA, sem demonstrar benefícios concretos (42,43,44,45,46,47).

Nos últimos trinta anos, diversos estudos foram conduzidos abordando diferentes técnicas de ventilação mecânica em pacientes com SDRA (5,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60). Apenas um estudo demonstrou redução da mortalidade associada à SDRA. Este estudo comparou a ventilação artificial com baixo volume corrente (6ml/Kg), com a ventilação usando o volume corrente tradicional de 12ml/Kg, e demonstrou redução da mortalidade dos pacientes com SDRA ventilados com baixo volume corrente (5). Recentemente, um outro estudo concluiu que os resultados clínicos são semelhantes quando a pressão positiva expiratória final (*PEEP*) é usada em valores baixos ou mais altos, desde que a ventilação seja mantida com volume corrente de 6ml/Kg (60).

Atualmente, embora centros isolados relatem indícios de possíveis melhoras dos resultados com pacientes portadores de SDRA (61,62), as estatísticas gerais não têm melhorado. Ainda hoje, a despeito dos avanços alcançados em Terapia Intensiva, tais como melhores técnica e suporte nutricionais (63,64), melhorias no manejo de fluidos (65,66,67), antibióticos mais potentes e a acima mencionada ventilação artificial com menor volume corrente, a mortalidade da SDRA ainda permanece em torno de 40% a 50%, eventualmente



superando os 70% (5,68). Nenhuma estratégia de modulação farmacológica confirmou benefícios claros na sobrevida de pacientes com SDRA.

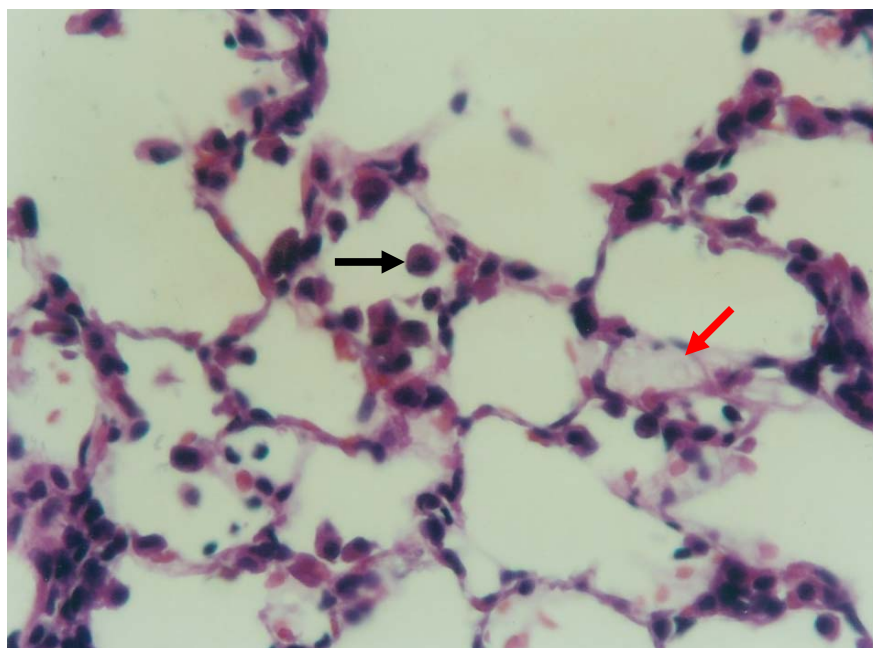
### **1.1.7. O Modelo Experimental de Fibrose Pulmonar**

Thrall et al (69), em 1979, desenvolveram um modelo animal de fibrose pulmonar utilizando a administração de bleomicina intratraqueal em ratos. Este modelo reproduzia os achados histo-patológicos das reações pulmonares, já descritas na época, em hamsters, e estes achados mostravam que o rato é um modelo confiável e útil para o estudo da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Em nosso meio, Ferreira Filho (70), reproduziu o mesmo modelo em sua tese de doutoramento.

Na maioria dos modelos experimentais de injúria pulmonar fibrogênica, as lesões são causadas pela exposição a um agente tóxico. O modelo animal de SDRA mais utilizado é o da instilação de uma única dose de bleomicina intratraqueal (70). Este modelo apresenta vantagens sobre aqueles que utilizam a bleomicina por via parenteral, uma vez que o desenvolvimento da fibrose pulmonar ocorre de forma mais rápida e previsível, compatível com o quadro de SDRA que ocorre em humanos (69,70).

O desenvolvimento da injúria pulmonar neste modelo experimental, após a instilação de uma dose única de bleomicina intratraqueal, pode ser dividido em três estágios. Um estágio inflamatório agudo (que se estende do primeiro ao sétimo dia após a instilação da bleomicina), caracterizado pelo influxo de células inflamatórias, edema alveolar e intersticial, e a ativação e

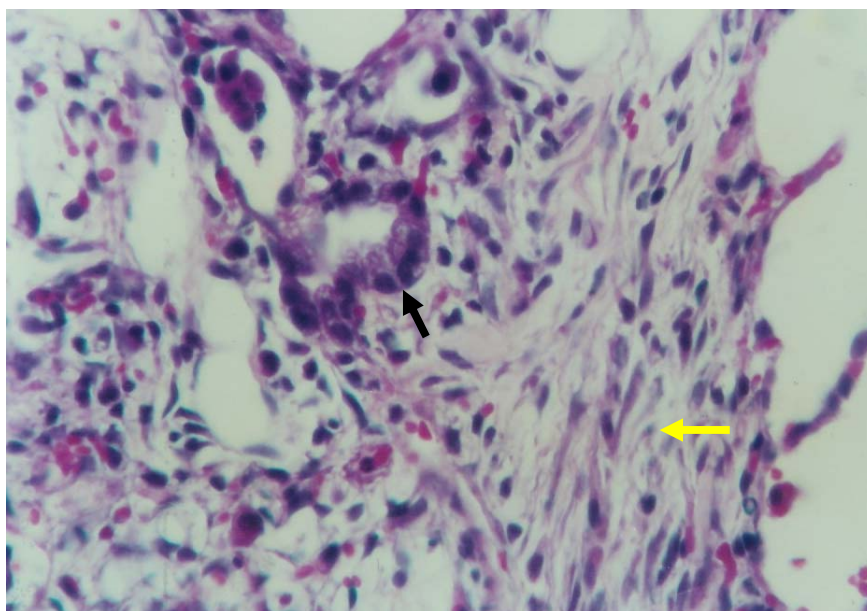
elaboração de uma rede de mediadores inflamatórios (Figura 7). Nesta fase aguda o quadro histológico não demonstra qualquer evidência de reparo dos danos.



**Figura 7:** Após 24 horas da agressão pulmonar, há grande número de macrófagos alveolares (seta preta). Início do edema alveolar e intersticial (seta vermelha). HE, x400 (70).

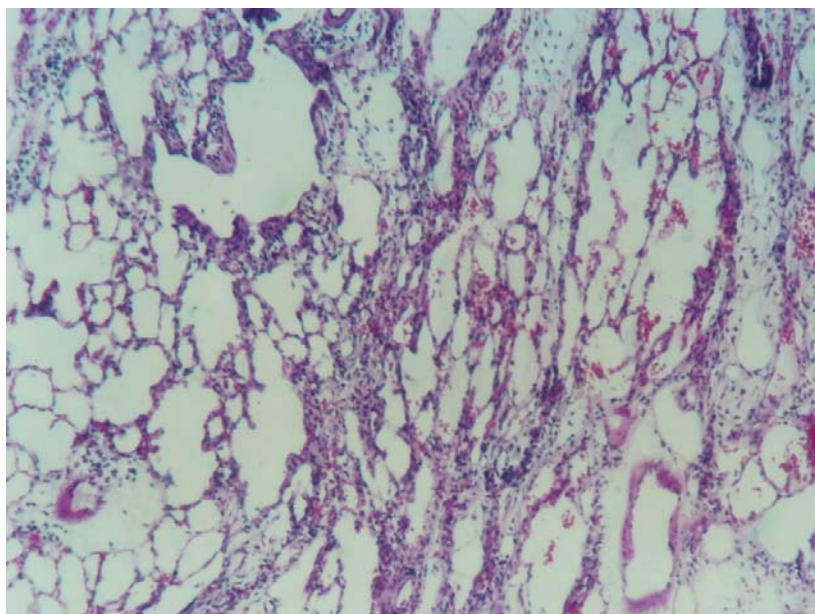


O estágio subagudo (7 a 15 dias após o insulto inicial), no qual a resposta inflamatória ainda é intensa, porém já se observam evidências de reparo, tais como proliferação das células epiteliais cubóides do tipo II, com o objetivo de regenerar o epitélio alveolar, e a presença de fibrose pulmonar (Figura 8).



**Figura 8:** Espécime pulmonar 7 dias após injúria pulmonar. Há intenso processo regenerativo, com início da formação de fibrose intersticial (seta amarela). A superfície alveolar já se encontra coberta por células cubóides do tipo II (seta preta). HE, x400 (70).

O estágio de resolução (15-30 dias após a instilação da bleomicina), marcado pela diminuição do infiltrado inflamatório, que é dominado pelo metabolismo do tecido conjuntivo, com fibrose pulmonar (Figura 9), e pela reepitelização alveolar e reendotelização capilar (70).



**Figura 9:** No 15° dia, é evidente o depósito de colágeno no tecido de granulação dentro dos espaços aéreos distais, e há formação de cicatrizes fibrosas. O infiltrado intersticial é menos intenso. HE, x100 (68).

Desta forma, este é um modelo confiável e particularmente útil, pois, reproduzindo o quadro histológico encontrado em todas as fases da LPA e da SDRA, nos permite avaliar em experimentos, a efetividade de novas abordagens terapêuticas sobre o quadro de lesão pulmonar, no tempo evolutivo de interesse.

Sugere-se que o melhor momento para se realizar a avaliação e quantificação da fibrose pulmonar seja 14 dias após a instilação intratraqueal da bleomicina. Esta orientação

baseia-se no fato de que no 14º dia os animais já apresentam extensa fibrose, porém com menos variabilidade na resposta fibrótica e menor mortalidade do que no 21º dia (71).

Como efeito colateral, neste modelo animal de fibrose pulmonar os animais que recebem bleomicina intratraqueal podem apresentar perda de peso (72).

### **1.1.8. Citocinas Envolvidas na SDRA**

O funcionamento adequado das respostas imunes resulta na eliminação do agente agressor, e no retorno da homeostase imunológica tão logo este estímulo tenha sido anulado (73). Neste processo, um grupo de mediadores inflamatórios apresenta papel fundamental na SDRA.

#### **1.1.8.1. Citocinas**

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, secretadas principalmente pelas células das imunidades inata e adquirida, que medeiam diversas funções dessas células. São produzidas em resposta aos microorganismos e a outros antígenos, e diferentes citocinas estimulam diversas respostas das células envolvidas na imunidade e na inflamação (74,75,76).

Estas proteínas possuem propriedades de *pleiotropismo* e *redundância*, ou seja, uma mesma citocina pode agir sobre diferentes tipos celulares (pleiotropismo), e diversas citocinas podem produzir os mesmos efeitos funcionais (redundância). Desta forma, as citocinas

compõem uma complexa rede de comunicação intercelular que, juntamente a outros componentes pró-inflamatórios, iniciam e amplificam a resposta inflamatória, e diversos outros efeitos biológicos, durante a LPA e a SDRA.

Estas citocinas podem ser produzidas localmente nos pulmões, pelas células inflamatórias, epiteliais ou pelos fibroblastos, sendo os macrófagos intra-alveolares a principal fonte da secreção destas citocinas inflamatórias na fase inicial.

Algumas citocinas compõem uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, que compartilham a habilidade de induzir a migração de populações específicas de leucócitos para áreas afetadas. Estas citocinas especializadas, as *quimiocinas*, possuem um papel crítico na formação da inflamação celular, tanto nas respostas contra patógenos invasores, quanto em processos patológicos associados a infecções e doenças imuno-mediadas. As quimiocinas são mais do que simples fatores quimiotáticos, uma vez que elas estão também implicadas na ativação dos leucócitos, na angiogênese, e possuem algumas funções antimicrobianas (77).

As quimiocinas podem, ainda, ser subdivididas em uma subfamília  $\alpha$  (ou CXC), na qual as duas primeiras cisteínas da molécula estão separadas por um resíduo aminoácido, e uma subfamília  $\beta$  (ou CC), na qual as duas primeiras cisteínas estão adjacentes. Estas distinções estruturais são importantes, pois estão associadas à habilidade de agir sobre populações particulares de leucócitos. Dessa forma, as  $\alpha$ -quimiocinas, que têm a IL-8 como protótipo, agem predominantemente sobre os neutrófilos, enquanto as  $\beta$ -quimiocinas agem sobre linfócitos, monócitos, mastócitos e eosinófilos. Geralmente, as quimiocinas têm sua

secreção induzida por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  e um subproduto bacteriano, o lipopolissacarídeo.

---

### QUADRO 2: Lista das quimiocinas $\alpha$ e $\beta$

---

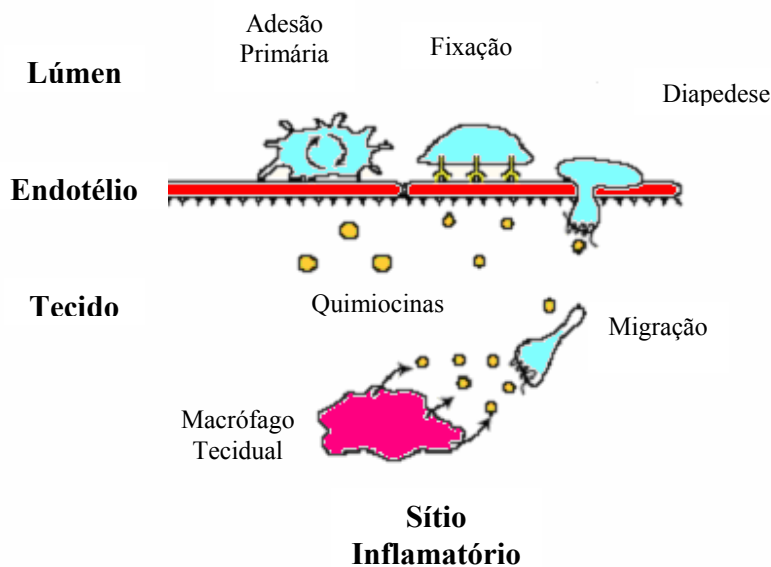
$\alpha$ - QUIMIOCINAS	$\beta$ - QUIMIOCINAS
Interleucina-8	Proteína 1 quimiotática monocítica (MCP-1)
Oncogenes relacionados ao crescimento (GRO $\alpha/\beta$ )	Proteína 2 quimiotática monocítica (MCP-2)
Proteína-10 indutível pelo interferon (IP10)	Proteína 3 quimiotática monocítica (MCP-3)
Atraente de neutrófilos derivado do epitélio (ENA 78)	Proteína 4 quimiotática monocítica (MCP-4)
Proteína-2 quimiotática granulocítica (GCP-2)	Eotaxina
Monocina induzida por IFN- $\gamma$ (HuMIG)	Proteína 1 $\alpha$ inflamatória macrofágica (MIP-1 $\alpha$ )
Fator plaquetário 4	Proteína 1 $\beta$ inflamatória macrofágica (MIP-1 $\beta$ )
Proteínas básicas plaquetárias (CTAP III, $\beta$ -TG, NAP-2)	Regulada pela ativação de célula T normal expressa e secretada (RANTES)
Fator 1 derivado de células estromais	I309
	Linfotaxina

---

CTAP III: Peptídeo ativador do tecido conjuntivo III;  $\beta$ -TG:  $\beta$ -Tromboglobulina; NAP-2: Peptídeo ativador de neutrófilos-2. (77)

A propriedade das quimiocinas de promover a migração de leucócitos é a função biológica mais estudada e, provavelmente, mais importante das mesmas. Elas contribuem para o recrutamento leucocitário, inicialmente, através da ativação de *integrinas* (moléculas expressas nos leucócitos, que medeiam a adesão às células endoteliais e proteínas da matriz extracelular); e em seguida, promovendo a migração destes leucócitos, pelo endotélio e

através da matriz extracelular (Figura 10). A IL-8 foi a primeira quimiocina a ter demonstrada sua função de promotora de adesão leucocitária.



**Figura 10:** Papel das quimiocinas na interação leucócito-endotélio, e subsequente migração tecidual. Modificado de Adams DH & Lloyd AR (77).

Embora a grande maioria dos trabalhos tenha sido inicialmente desenvolvida com o estudo do direcionamento dos neutrófilos para os sítios de infecção e inflamação, hoje em dia está claro que todos os leucócitos, incluindo os linfócitos, utilizam este dispositivo de localização (78).

As citocinas mais importantes na iniciação e manutenção da inflamação, durante a SDRA, são as interleucinas 1, 6 e 8, e o FNT- $\alpha$ . De fato, em um modelo experimental, a atividade da IL-1 atinge seu pico entre 6h e 12h após injúria pulmonar induzida pela bleomicina (79). Estas citocinas inflamatórias ativam e atraem os neutrófilos dos capilares

sanguíneos para o interior dos espaços aéreos, onde estes, por sua vez, mantêm o quadro inflamatório através da secreção de leucotrienos, proteases, radicais superóxido e outros agentes pró-inflamatórios. Estas atividades desempenhadas pelos neutrófilos também são estimuladas pelas citocinas, especialmente a IL-8.

Além de ser secretado pelos macrófagos alveolares, o FNT- $\alpha$  também pode ser liberado pelas células do epitélio pulmonar (12). Algumas das vias de transdução de sinais de FNT- $\alpha$  ativam o fator nuclear- $\kappa$ B, um importante modulador da resposta inflamatória. Além disso, os efeitos da transcrição sinalizada pelo FNT- $\alpha$  parecem se sobrepor aos da IL-1.

Na injúria pulmonar, a IL-6 está presente em abundância na área de inflamação, sendo que grande parte encontra-se ligada ao seu receptor, GP130. Interessantemente, a IL-6 é um exemplo de uma citocina que, quando ligada ao receptor, apresenta um efeito agonista, e não antagonista (12). Apesar desta observação, o papel da IL-6, e a sua rede de efeitos biológicos, ainda não são completamente definidos.

Observa-se que, na verdade, durante o processo inflamatório desencadeado na LPA ou na SDRA, o que ocorre é uma “tempestade de citocinas”. Diversas outras citocinas tem sido constantemente descritas, embora os mecanismos que norteiam sua produção e neutralização ainda estejam incompletamente desvendados.

Além das citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 e o FNT- $\alpha$ , também existem citocinas inibidoras do processo inflamatório no plasma e nos espaços aéreos dos pulmões.

Nestas circunstâncias, o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e antiinflamatórios é fundamental, e diversos mediadores endógenos, que inibem as ações das citocinas inflamatórias, já foram descritos, incluindo o receptor antagonista da IL-1, o receptor solúvel (extracelular) do FNT- $\alpha$ , auto-anticorpos contra IL-8 e citocinas antiinflamatórias, como o Fator de Crescimento Transformante  $\beta$  (FCT- $\beta$ ) e as IL-4, 10 e 11 (1,12,77).

Desta forma, as citocinas fazem parte de um orquestrado código de sinais, que dirige os leucócitos a um determinado local e os ativa. A regulação precisa do recrutamento e ativação leucocitária, pelas citocinas, é essencial para permitir que uma resposta inflamatória se desenvolva prontamente, e que a mesma possa ser freada uma vez que a ameaça tenha sido removida, prevenindo, assim, a amplificação e a manutenção do dano tecidual.

Estudos *in vitro* e experimentos em animais sugerem que a modificação da resposta inflamatória, após uma agressão pulmonar, pode afetar o grau de fibrose pulmonar, e reduzir, por exemplo, o desenvolvimento de granulomas (80). Uma das mais importantes citocinas envolvidas no desenvolvimento da fibrose pulmonar é o FCT- $\beta$ 1, devido à sua potente capacidade de ativação do crescimento mesenquimal, e à sua habilidade de modular a imunidade celular (6).



**Quadro 3: Principais citocinas envolvidas na LPA e SDR**

<b>Citocina</b>	<b>Fonte</b>	<b>Ação</b>
Interleucina-1	Macrófagos	Ativação imune, induz resposta inflamatória
Interleucina-4	Células T auxiliares (Th-2)	Fator de crescimento de linfócitos
Interleucina-6	Fibroblastos	Promove crescimento de células B, induz resposta na fase aguda
Interleucina-8	Principalmente macrófagos	Quimiotaxia
Interleucina-10	Células CD4, monócitos ativados	Inibe a produção de IFN- $\alpha$ , IL-1, IL-6, FNT- $\alpha$ e pára a apresentação de antígenos
FNT- $\alpha$	Macrófagos	Estimula a ativação imune generalizada e a necrose tumoral
FCT- $\beta$	Plaquetas	Inibidor imunológico, mas estimula crescimento do tecido conjuntivo e a formação de colágeno

FNT- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , FCT- $\beta$ : Fator de Crescimento Transformante- $\beta$  (75).

### 1.1.8.2. Citocinas e Angiogênese

A organização da inflamação crônica e subsequente recuperação tecidual são importantes componentes da resposta inflamatória. O crescimento e penetração de novos vasos sanguíneos (neo-angiogênese), nos locais de inflamação, têm um papel vital neste processo, e podem ser diretamente afetados pela ação das citocinas.

Uma porção estrutural dentro das  $\alpha$ -quimiocinas determina a capacidade das mesmas de inibir, ou promover, a angiogênese. Assim, o Fator Plaquetário-4, por exemplo, contém uma porção aminoácido glutamina-leucina-arginina, e inibe a angiogênese, enquanto outras  $\alpha$ -quimiocinas, como a IL-8, que não possuem esta porção, estimulam a angiogênese (12,76).

Portanto, o equilíbrio local destas citocinas torna-se importante na regulação da angiogênese em áreas inflamatórias.

### 1.1.9 Interferons

Os interferons (IFNs) humanos são proteínas naturais que compõem uma família heterogênea e complexa, dividida em duas classes, os interferons tipo I (interferons  $\alpha$  e  $\beta$ ) e II (IFN- $\gamma$ ). Constituem-se em potentes citocinas que interagem com as células através de receptores de superfície celular de alta afinidade, resultando em múltiplos efeitos, possuindo ações antivirais, antiproliferativas, reguladoras de diferenciação e crescimento, imunomoduladoras e antiangiogênicas (6).

Os efeitos dos IFNs resultam primariamente do aumento da expressão de um grupo de genes e proteínas nas células responsivas, que são envolvidas nas atividades inflamatórias e antimicrobiana.

Os IFNs do tipo I são secretados principalmente por fibroblastos, monócitos e células infectadas por vírus, e medeiam a resposta imune inata imediata às infecções virais (6,75). O termo “interferon”, inclusive, deriva da capacidade dessas citocinas de interferir na infecção viral (81).

Os IFNs do tipo I compõem-se de dois grupos distintos de proteínas designadas IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . O IFN- $\alpha$  é composto por uma família de cerca de 20 polipeptídeos estruturalmente

relacionados, cada um codificado por um gene separado. A principal fonte de IFN- $\alpha$  é uma subpopulação de fagócitos mononucleares. O IFN- $\beta$  é uma proteína única, produzida por diversas células, tais como fibroblastos, e é também conhecida como interferon fibroblástico.

O IFN- $\gamma$  (classificado como interferon do tipo II) é uma proteína homodimérica produzida pelas células *natural killers* (NK), pelas células T (CD4+ Th1 e T CD8+) e pelos macrófagos. Constitui-se na principal citocina ativadora dos macrófagos, e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade específica mediada pela célula.

Comparado aos IFNs- $\alpha$  e  $\beta$ , o IFN- $\gamma$  tem menos atividade antiviral, porém, mais potentes efeitos imunomoduladores, particularmente sobre a ativação de macrófagos, expressão de antígenos de histo-compatibilidade principal de classe II, e mediação de respostas inflamatórias. Atua, portanto, basicamente, como uma citocina efetora de respostas imunes. O IFN- $\gamma$  tem estrutura diferente, e liga-se a um receptor diverso dos IFNs tipo I. Além disso, o gen do IFN- $\gamma$  situa-se em outro cromossomo (6).

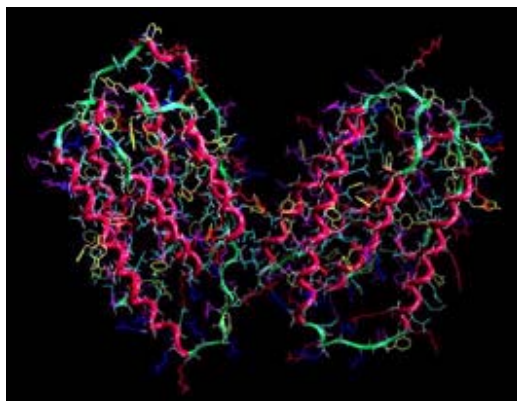
Apesar dos diferentes receptores de superfície, a transdução de sinais intracelulares dos interferons parece se sobrepor, interagindo entre si mutuamente. O IFN- $\alpha$ , a primeira citocina a ser produzida através da tecnologia de DNA recombinante, tem emergido como um importante regulador de diferenciação e crescimento celular. Originalmente descoberto como uma substância antiviral, o IFN- $\alpha$  tem demonstrado eficácia no tratamento de pacientes com doenças malignas, virais, imunológicas, angiogênicas, inflamatórias e fibróticas.

Alguns estudos sugerem que a síntese de colágeno seja inibida pelo IFN- $\gamma$  (82,83,84,85,86). Estudos *in vitro* demonstraram que o IFN- $\gamma$  inibe a proliferação de fibroblastos pulmonares, assim como a síntese protéica dos mesmos (82,84). O IFN- $\gamma$  também reduz a síntese de colágenos I e III (84) e regula a transcrição do gene do fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (FCT- $\beta$ 1) (87), conforme foi demonstrado em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Este fator de crescimento mostrou-se importante na indução da fibrose pulmonar induzida em outro modelo experimental, onde ratos foram submetidos à superexpressão (tendo adenovírus como vetores) desta citocina (88).

Em outro modelo animal, o fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (FCT- $\beta$ 1) mostrou capacidade de induzir o aumento da expressão de proteoglicanos pelos fibroblastos. A ativação destes fibroblastos, pelo FCT- $\beta$ 1, promove a deposição anômala desses proteoglicanos no tecido fibrótico pulmonar. O IFN- $\gamma$  inibe a expressão do FCT- $\beta$ 1, portanto, é capaz de reduzir a ativação dos fibroblastos e a consequente deposição de proteoglicanos no pulmão (86).

Desta forma, um estudo preliminar com IFN- $\gamma$  e prednisolona foi realizado em pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática, resultando em melhora clínica (aumento da capacidade pulmonar e da pressão parcial de oxigênio arterial) nos pacientes do grupo que usou IFN- $\gamma$  por 12 meses (89).

Por sua vez, o IFN- $\alpha$  tem sido testado em modelos experimentais de fibrose hepática.



**Figura 11.** Estrutura tridimensional do interferon- $\alpha$

Em um estudo pré-clínico, a proliferação e a síntese de colágeno pelas células estreladas hepáticas foram reduzidas pelo uso de IFN- $\alpha$ , demonstrando-se também uma diminuição da expressão do RNAm dos pró-colágenos I e III e da deposição dos colágenos I e III no tecido hepático fibrótico dos ratos tratados (7). A redução dos pró-colágenos alfa-1 III e IV pelo IFN- $\alpha$ -2a também foi evidenciada em outro estudo experimental de fibrose hepática, induzida por colestase, no qual, após análise histológica, demonstrou-se que o IFN- $\alpha$ -2a promoveu a resolução da fibrose (90).

A hipótese de que o interferon atue na prevenção da fibrose também foi levantada. Um recente estudo demonstrou que o IFN- $\alpha$  foi capaz de inibir o desenvolvimento de fibrose hepática nos ratos infectados pelo helminto *Capillaria hepatica*, que usualmente evolui com fibrose septal difusa do fígado (8). Um outro estudo experimental com ratos, utilizando interferon- $\alpha$ -2b na dose de 100.000U/dia, por 15 dias, evidenciou a reversão da fibrose hepática induzida pela obstrução biliar (9).

O IFN- $\alpha$  também possui propriedades de modulação inflamatória. Estas propriedades podem ser devidas à sua capacidade de induzir e/ou liberar uma forma solúvel (extracelular) do receptor p55 do TNF (um antagonista natural da inflamação induzida pelo TNF), e de suprimir a síntese, induzida pela IL-1, deste fator, pelas células mononucleares (10). O aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  mostrou-se relacionado ao desenvolvimento de lesão pulmonar em um estudo de fibrose pulmonar com modelos animais (91).

A partir da revisão teórica que sugere uma modulação da formação de fibrose, e dos interessantes resultados iniciais dos interferons em pacientes e em modelos experimentais de fibrose pulmonar e hepática, resolvemos explorar o efeito do IFN- $\alpha$  em um modelo experimental bem estabelecido de fibrose pulmonar induzida pela instilação de bleomicina intratraqueal, em ratos *Wistar*.

#### **1.1.10. Objetivo do Estudo**

O objetivo do estudo é avaliar, de forma quantitativa, através de tecnologia de análise de imagem digital, o efeito protetor ou deletério, em nível pulmonar, do uso do interferon-alfa-2b em um modelo experimental de fibrose pulmonar induzida pela instilação de bleomicina intratraqueal em ratos da raça *Wistar*.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**



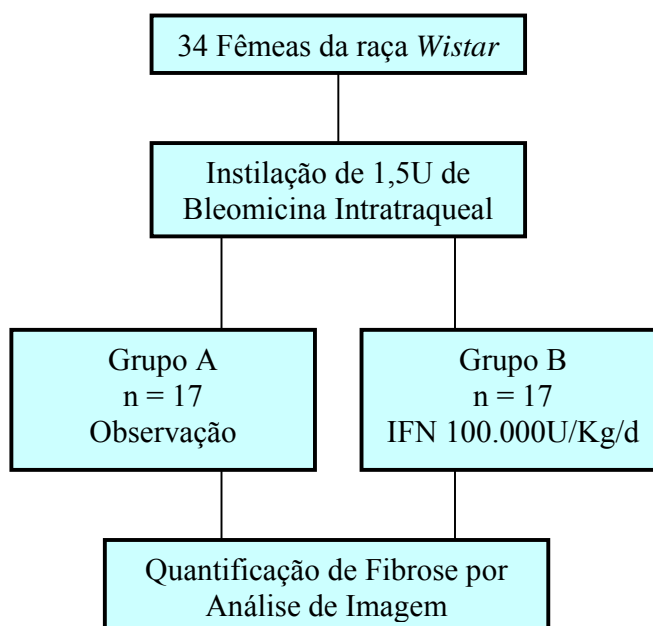
## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento do Estudo

Este é um estudo experimental, controlado, com dados contemporâneos, que tem como objetivo primário avaliar o efeito do interferon-alfa-2b no desenvolvimento da fibrose pulmonar, no 15º dia após a instilação de bleomicina na dose de 1,5U via intratraqueal, através da quantificação de fibrose por meio de análise de imagem.

Foram utilizados 2 grupos de ratos. Um grupo (A) recebeu solução salina e bleomicina intratraqueal no D1, e foi observado por 14 dias; o outro grupo (B) recebeu solução salina e bleomicina intratraqueal no D1, e interferon- $\alpha$ -2b na dose de 100.000U/Kg/d, por via subcutânea, por 14 dias. Não tivemos um grupo controle, utilizando apenas solução fisiológica, porque o estudo de Ferreira Filho (70) havia demonstrado previamente que os animais que recebiam apenas solução fisiológica não desenvolviam fibrose pulmonar. Desta forma, a inclusão de um grupo controle não foi considerada eticamente correta pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FFFCMPA.

Os ratos foram sacrificados 15 dias após a instilação de bleomicina intratraqueal e tiveram os lobos médios dos pulmões avaliados histologicamente.

**DELINEAMENTO ESQUEMÁTICO DO ESTUDO**

**Figura 12.** Diagrama demonstrando o desenho do estudo

Os grupos foram divididos e tratados da seguinte maneira:

**GRUPO A - ( BLEOMICINA + Solução Fisiológica )** – Contendo 17 ratos, que receberam 0,2 ml de soro fisiológico intratraqueal + bleomicina 1,5U intratraqueal no D1 + observação por 14 dias.

**GRUPO B - ( BLEOMICINA + Solução Fisiológica + IFN- $\alpha$ -2b )** – Contendo 17 ratos, que receberam 0,2 ml de soro fisiológico intratraqueal + bleomicina 1,5U intratraqueal no D1 + interferon-alfa-2b 100.000U/kg/dia por via subcutânea por 14 dias.

## 2.2 Animais

Trinta e quatro fêmeas (33 avaliadas) da raça *Wistar*, com diferentes idades e pesando entre 160-270g, provenientes do Biotério da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), foram obtidas para a realização deste estudo. As ratas foram mantidas em gaiolas apropriadas, contendo no máximo três animais por gaiola, no Biotério da FFFCMPA, com ciclo noite/dia de 12hs, e acesso livre a ração e água *ad libitum*.



**Figura 13.** Fêmea da raça *Wistar*

### 2.2.1. Comitê de Ética

Todos os experimentos foram submetidos para análise e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FFFCMPA.

## 2.3 Modelo Animal de Fibrose Pulmonar Induzida por Bleomicina

### 2.3.1 Administração de Bleomicina e Técnica Cirúrgica

Após o registro de seus pesos, as ratas foram anestesiadas utilizando cetamina (Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 100mg/kg, via intraperitoneal. Uma incisão longitudinal mediana foi feita na região cervical dos animais, e a traquéia foi exposta através de uma dissecação não traumática (Figura 14).



**Figura 14.** Exposição traqueal para instilação de bleomicina.

Foi realizada a instilação de sulfato de bleomicina (Biosintética, São Paulo, Brasil), na dose de 1,5U, junto a 0,2ml de solução fisiológica, nos pulmões dos animais através da inserção, sob visualização direta, de uma agulha de insulina, na traquéia das ratas (n = 34).

Ainda sob efeito anestésico, a ferida cirúrgica foi fechada com fio cirúrgico de mononylon 4-0 (ETHICON, Johnson & Johnson, Somerville, NJ, USA).

As ratas foram sacrificadas no 15º dia após a injeção de bleomicina. Para o sacrifício, os animais foram anestesiados com tiopental (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) na dose de 100mg/kg, por via intraperitoneal.

A caixa torácica foi aberta através de uma incisão mediana, sendo expostos os pulmões e o coração. As ratas foram exsangüinadas via ventrículo esquerdo, e os pulmões foram perfundidos, *in situ*, com 10ml de solução salina, via ventrículo direito. O conjunto coração-pulmões-traquéia foi retirado em bloco, e a traquéia canulada. Os pulmões foram então perfundidos com glutaraldeído a 2%, a uma pressão constante de 20cm de H<sub>2</sub>O. O bloco coração-pulmões-traquéia foi conservado em formol. A análise histológica pulmonar foi realizada conforme descrito nas sessões seguintes.

O peso dos animais foi registrado no dia da instilação de bleomicina, e no dia do sacrifício dos mesmos.

#### **2.4 Administração do Interferon- $\alpha$ -2b**

O interferon- $\alpha$ -2b (Laboratório Pablo Cassará, Buenos Aires, Argentina) foi aplicado na região dorsal dos animais por via subcutânea, na dose de 100.000U/kg/dia (n=17). A primeira dose de IFN foi dada logo após a instilação de bleomicina intratraqueal, e foi repetida uma vez ao dia, até o 14º dia.

## 2.5 Histologia Pulmonar

Para a análise histológica do tecido pulmonar, foi escolhido o lobo médio, conforme estudos prévios (70,72,92). Todo o lobo médio foi incluído em parafina e cortes de 4µm de espessura foram realizados no sentido crânio-caudal. Em seguida, foram empregados os métodos de coloração com hematoxilina-eosina e picrossirius.

O picrossirius, corante específico para material colagenoso, foi utilizado para a coloração das fibras de colágeno, que, sob luz polarizada, apresentam-se birrefringentes, possibilitando a quantificação das áreas fibróticas (93).

## 2.6 Variáveis do Estudo

A variável estudada neste trabalho inclui a quantificação da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina em ratas *WISTAR*, no 15º dia, através de análise de imagem. Esta avaliação foi realizada, quantificando-se as áreas fibróticas (com colágeno) com birrefringência sob luz polarizada. Foram quantificadas e somadas as áreas de fibrose obtidas através da avaliação de 30 campos microscópicos por rato, com aumento de 100x, obtidos de maneira aleatória.

As áreas birrefringentes foram quantificadas em elementos de imagem *-pixels-*, utilizando o mesmo padrão de cores, em todos os casos.

## 2.7 Análise de Imagem

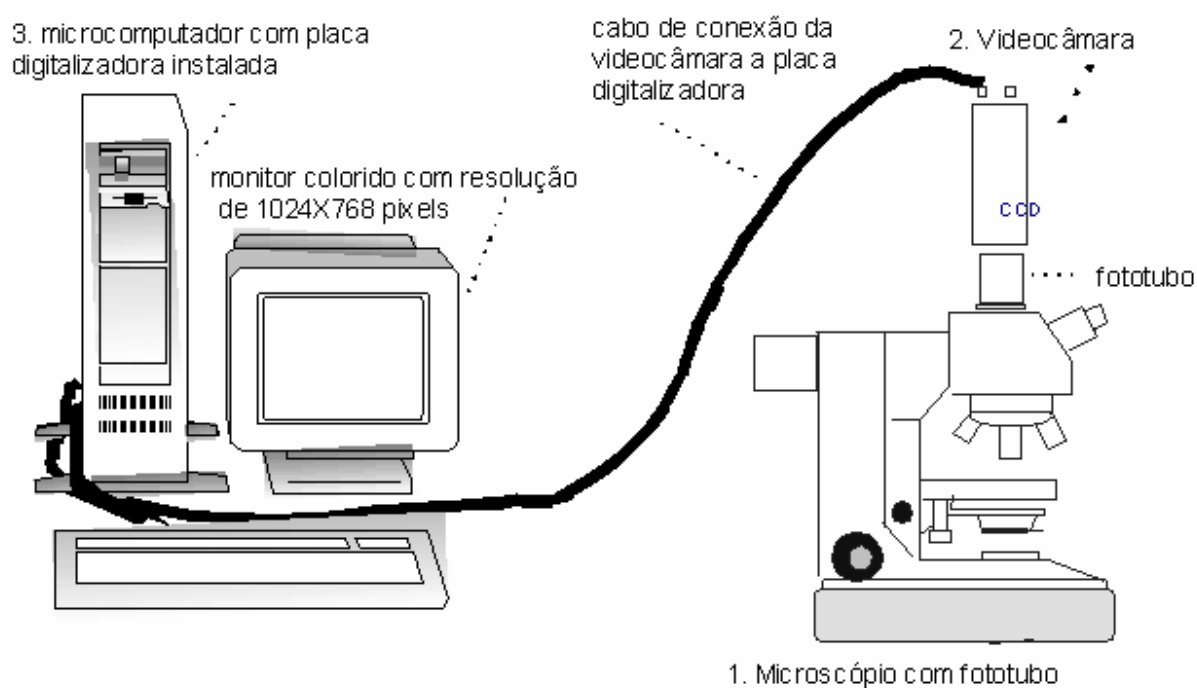
Foram realizadas capturas aleatórias e seqüenciais, evitando a sobreposição de campos, das imagens de trinta campos microscópicos, com aumento de x100, a partir de cortes histológicos crânio-caudais do lobo médio do pulmão direito, corados pela técnica de picrosirius.

A quantificação da fibrose pulmonar consistiu da análise morfométrica digital (Figura 15), através de programa de análise de imagem *Image Pro Plus for Windows* versão 4.5 (MEDIA CYBERNETICS, Silver Spring, MD, EUA). As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas para análise morfométrica a partir da microscopia ótica convencional (microscópio ZEISS AXIOSKOP 40, OBERKOHEN, Alemanha), com objetivas Plan-NEOFLUARES, 10X, AN 0,30 e sistema de polarização, e fototubo com vídeocâmara colorida COOLSNAP PRO CF Color (MEDIA CYBERNETICS).

A digitalização das imagens foi realizada com iluminação de tipo Köhler, lâmpada halogenada à temperatura de 5200 K e alimentação com estabilizador de voltagem. As imagens foram digitalizadas com aumento microscópico de 100 vezes, sob luz polarizada, e gravadas em formato TIFF sem compressão.

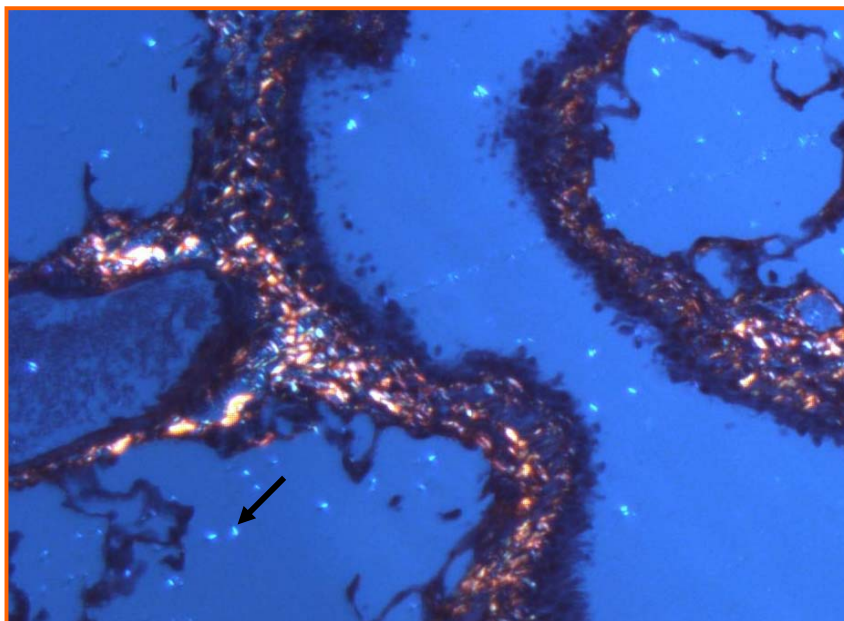
Através do programa *Image Pro Plus* para Windows, estes arquivos de imagem foram abertos, sendo realizada a seleção interativa das áreas de interesse, por seleção de cores com armazenamento dos valores de tonalidade para calibração.

Estas áreas foram segmentadas e contadas pelo analisador de imagem, considerando a escala de  $1\mu\text{m}:2,15$  pixels. Todas as mensurações foram expressas em pixels.

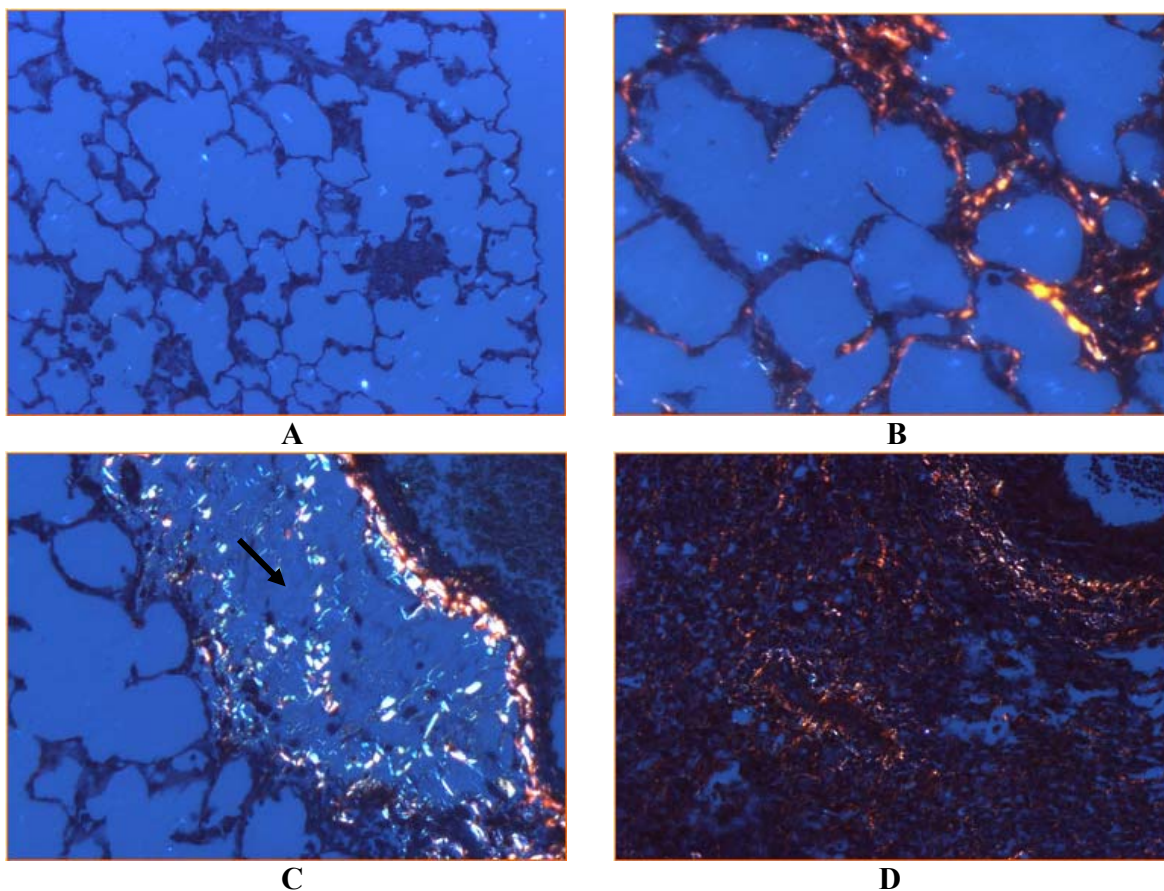


**Figura 15.** Equipamento de digitalização de imagem. Modificado de Da Silva VD & Prolla JC (94).





**Figura 16.** Corte histológico do lobo médio do pulmão direito dos ratos (picrosirius, x100). As áreas de colágeno mostram-se em tons de amarelo, laranja e vermelho. A seta indica um exemplo de artefato com birrefringência, não selecionado para fins de quantificação de fibrose.



**Figura 17:** Cortes histológicos corados com picrosirius (x100). A) Presença de infiltrado inflamatório sem depósito de colágeno (ausência de áreas birrefringentes); B) Depósito de colágeno nas paredes alveolares; C) área de edema (seta) perivascular, com depósito de colágeno; D) Intenso infiltrado inflamatório com desorganização das arquiteturas alveolares, e depósito difuso de colágeno.

## 2.8 Amostra e Análise Estatística

Uma amostra de 17 ratos em cada grupo define um poder estatístico de 80%, para rejeitar a hipótese nula de que não existe uma diferença de 35% na proporção de fibrose entre os dois grupos em estudo.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 8.0. Para fins de significância estatística, o erro alfa foi fixado em 5%.

Foi utilizado o RUNSTEST com avaliação bicaudal para testar a aleatorização das medidas de dados em cada um dos grupos.

O teste KS (*One Sample Kolmogorov-Smirnov test*), bicaudal, foi empregado para determinar a normalidade dos dados.

# **RESULTADOS**

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Testes Estatísticos**

Para o RUNSTEST, tendo-se a hipótese nula de que as medidas tenham sido realmente aleatórias, obteve-se  $p = 0,211$  para o grupo A (sem interferon) e  $p = 0,724$  para as amostras do grupo B (com interferon), indicando que a hipótese nula não poderia ser rejeitada.

O teste KS resultou em  $p = 0,213$  no grupo A, e  $p = 0,183$  no grupo B, indicando uma tendência normal das curvas, para os dados de cada grupo.

O teste de Levene para igualdade de variâncias foi estatisticamente significativo, e obteve  $p = 0,001$ , indicando que a variância dos dados, nos dois grupos, eram diferentes.

Estes resultados nos permitiram realizar a análise estatística deste estudo utilizando o teste T de Student para amostras independentes, com variâncias diferentes.

#### **3.2. Mortalidade**

Houve um óbito no grupo A (sem IFN), enquanto o grupo que recebeu IFN- $\alpha$ -2b não apresentou mortalidade.

### 3.3. Peso dos Animais

No grupo A, a média inicial do peso dos animais, previamente ao tratamento, era de 227,64g, e no grupo B, 194,29g,  $p = 0,0004$ . Após o tratamento, a perda média de peso dos animais do grupo A foi de 9,96g, enquanto no grupo B, a perda média de peso foi de 10,94g,  $p = 0,74$ .

### 3.4. Fibrose Pulmonar Induzida pela Bleomicina

A média da área de fibrose, em *pixels*, no grupo A, foi de 131.631; no grupo B a média foi 41.048,94 ( $p = 0,037$ ), com a média de diferença = 90.582,06.

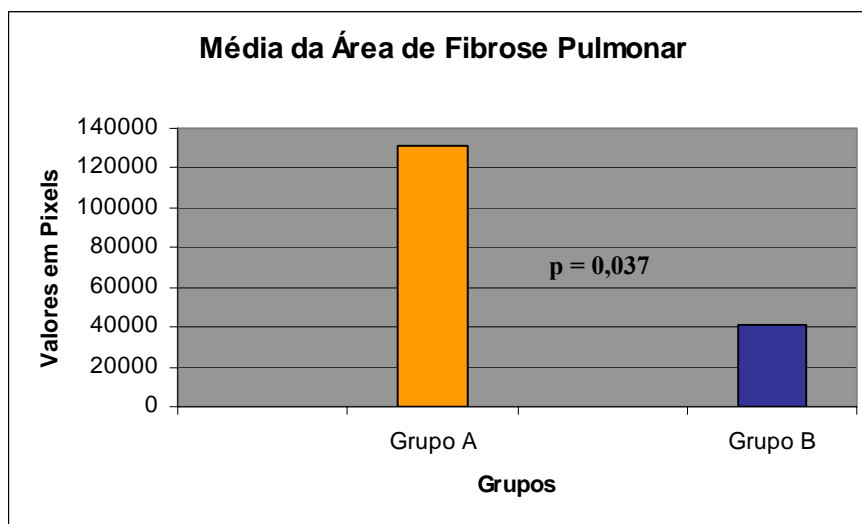


Figura 18: Média das áreas de fibrose pulmonar dos animais dos grupos A e B.

Para fins de análise estatística, também foram realizadas as análises estatísticas atribuindo ao caso óbito, do grupo A, o valor avaliado da área de fibrose pulmonar (medida

em *pixels*) do melhor e do pior casos do mesmo grupo. As análises mantiveram os resultados com significância estatística, quando comparados ao grupo B.

# DISCUSSÃO



#### 4.DISCUSSÃO

Constantemente nos deparamos com novos conhecimentos nas áreas científica e clínica. Novas drogas e estratégias terapêuticas freqüentemente surgem, e, felizmente, algumas se mostram promissoras. No entanto, inicialmente, quando todas informações são apenas oriundas de pesquisas laboratoriais e pré-clínicas, tudo o que temos são dados que, quando analisados em conjunto, e postos sob uma mesma perspectiva, nos fornecem não mais do que o embasamento teórico para a continuação das pesquisas em uma determinada área.

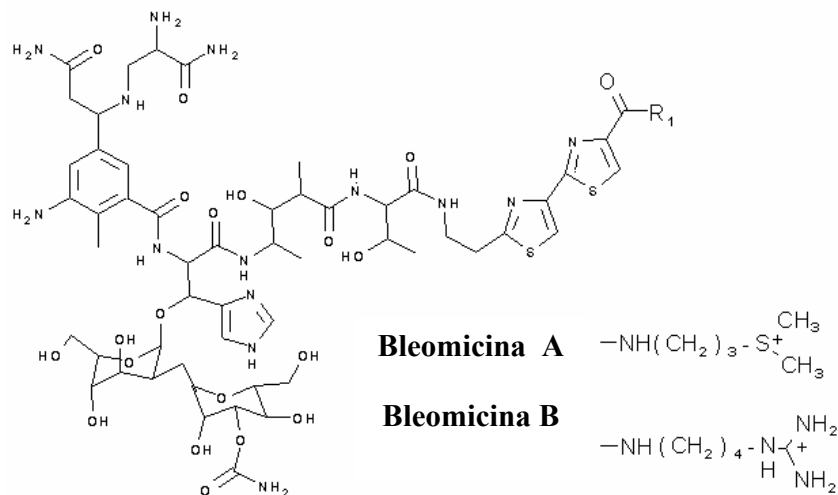
A evolução no desenvolvimento de técnicas terapêuticas, normalmente, percorre etapas de experimentação em animais, visto que, até que determinada estratégia de tratamento tenha sua eficácia e segurança suficientemente testadas e confirmadas, para justificar sua aplicação em seres humanos, esta prática deve ser considerada eticamente incorreta.

Desta maneira, o desenvolvimento de modelos experimentais é essencial para o avanço científico. Além disso, muitas questões clinicamente relevantes sobre a patogênese das doenças só podem ser abordadas através de modelos experimentais em animais (70).

Neste estudo, a escolha de animais fêmeas foi devida, basicamente, à maior disponibilidade deste gênero no Biotério da FFFCMPA, mas intencionou a eliminação de um possível viés de confusão, caso machos e fêmeas fossem incluídas.

#### 4.1 Bleomicina

As bleomicinas são um grupo de glicopeptídeos originalmente extraídos como produtos da fermentação do fungo *Streptomyces verticillus*, descritas primeiramente por Umezana e colegas (95). O agente mais ativo é um conjunto de peptídeos atualmente conhecido como Bleomicina (96).



**Figura 19:** Estrutura molecular das bleomicinas

Inicialmente descrita como antibiótico (95), a bleomicina possui importante ação antineoplásica em diversos tumores, especialmente em linfomas, carcinomas de testículo e carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, bem como cérvix uterina (96,97).

A ação primária da bleomicina é produzir uma quebra do DNA de única ou dupla fita. Após a formação de um complexo Fe(II)-bleomicina, há a liberação de radicais livres, que se

intercalam entre fitas opostas de DNA, causando danos ao mesmo. As células neoplásicas são mais sensíveis à ação da bleomicina durante as fases G2 e M do ciclo celular.

A bleomicina é lentamente absorvida pelas células, e é inativada por uma aminohidrolase encontrada tanto em células normais quanto em células malignas. Níveis mais baixos da hidrolase são encontrados, geralmente, na pele e nos pulmões, os dois órgãos mais suscetíveis à toxicidade da bleomicina.

Alguns pacientes, particularmente aqueles em tratamento para linfomas, podem desenvolver um quadro de hipersensibilidade aguda, com urticária, edema peri-orbital e broncoespasmo. Mais raramente, podem ocorrer casos de insuficiência respiratória aguda, que não é dose-dependente.

A toxicidade dose-limitante da bleomicina é a fibrose pulmonar, que acomete de alguma forma, entre 4 a 10% dos pacientes (96,98). Alguns fatores aumentam o risco do desenvolvimento de fibrose pulmonar, como a idade acima de 70 anos, doses cumulativas acima de 360U, tabagismo, radioterapia torácica prévia ou concomitante, hiperóxia, uso de bleomicina em combinação a outros agentes com potencial toxicidade pulmonar, especialmente a ciclofosfamida, e a presença de doença pulmonar subjacente (96,99,100,101,102,103). Doses cumulativas acima de 450-500U apresentam aumento exponencial da incidência de fibrose pulmonar, embora relatos de toxicidade pulmonar fatal já tenham sido descritos com doses tão baixas quanto 100U (104).

---

**Quadro 4: Fatores de Risco para Fibrose Pulmonar Associada à Bleomicina**

---

Idade > 70 anos

Doses cumulativas > 360-400

Radioterapia torácica (prévia ou concomitante)

Alta concentração de O<sub>2</sub> inspirado

Doença pulmonar subjacente

Combinação com drogas com potencial toxicidade pulmonar

Tabagismo

---

O início dos sintomas geralmente é insidioso, e os primeiros exames físicos e raios-x podem ser normais. Eventualmente, estertores, roncos e atrito pleural podem ser notados, e a diminuição da capacidade pulmonar é detectada. Durante a evolução, os raios-x podem revelar aumento das marcas intersticiais, infiltrados retículo-nodulares, consolidações e nódulos, que podem desenvolver cavitações. As biópsias não apresentam resultados específicos.

Nestes pacientes, após a descontinuação do tratamento com bleomicina, a reversão do quadro pode levar meses, e a fibrose pode ser apenas parcialmente reversível. Cerca de 1-2% dos pacientes vêm a falecer.

A utilização de testes de função pulmonar para a avaliação de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina é controversa. A capacidade de difusão do monóxido de carbono (CO) declina nos pacientes que recebem uma dose total cumulativa maior que 250 unidades, entretanto, os testes de função pulmonar não têm valor preditivo para a detecção do início precoce desta complicação (105,106).



**Figura 20:** Radiografia de um paciente com fibrose pulmonar secundária a bleomicina.

#### **4.2. O Interferon- $\alpha$ -2b na Fibrose Pulmonar Induzida por Bleomicina**

No presente estudo, encontramos uma diferença estatisticamente significativa no grau de fibrose pulmonar, entre os grupos estudados ( $p = 0,03$ ). O grupo de animais que foi observado por 14 dias após a instilação de bleomicina, apresentou uma magnitude aproximadamente três vezes maior de fibrose pulmonar do que o grupo B, tratado com 100.000U/Kg/d de IFN- $\alpha$ -2b, por 14 dias seguidos.

Houve um óbito entre os animais do grupo A, no sexto dia após a instilação da bleomicina intratraqueal. Não foram realizadas a retirada e a análise histológica dos pulmões deste caso.

Para obtermos um maior grau de homogeneidade entre os grupos, previamente ao início do estudo, havíamos planejado a inclusão de animais na faixa de 180-250g de peso, entretanto, devido às disponibilidades reduzidas de animais e drogas para a realização dos experimentos dentro dos prazos estipulados, decidimos aceitar animais de peso tão elevado quanto 270g, e tão baixo quanto 160g.

Em humanos, quando utilizados por via sistêmica, os interferons podem apresentar efeitos adversos, tais como sintomas gripais e toxicidades cutânea, neurológica, endócrina e imunológica. O IFN- $\alpha$ , por sua vez, pode resultar em astenia, febre, perda de apetite e perda de peso.

Uma análise não idealizada previamente foi realizada para conferir o efeito do uso do IFN- $\alpha$ -2b sobre o peso dos animais. Observamos uma diferença significativa da média de peso dos animais do grupo A (227,64g), em relação à do grupo B (194,29g), no início do tratamento,  $p = 0,0004$ . Entretanto, a perda média de peso em cada um dos grupos não foi diferente (grupo A = 9,96g x grupo B = 10,94,  $p = 0,74$ ).

O grupo B, tratado por 14 dias com IFN- $\alpha$ -2b, tinha em média, cerca de 30g menos que a média de peso do grupo A, e isto, como já descrito anteriormente, diferencia os dois

grupos, entretanto, não acreditamos que este fato possa modificar nossas conclusões sobre a diferença na quantidade de fibrose pulmonar encontrada entre os grupos, principalmente se levarmos em conta as seguintes considerações:

- Segundo dados obtidos de Ferreira Filho et al (70), existe uma correlação inversa entre o peso dos ratos e a percentagem de fibrose pulmonar desenvolvida. Desta forma, seria razoável supor que a bleomicina, na dose de 1,5U, instilada via intratraqueal nos pulmões de ratos mais leves pudesse resultar em um grau mais elevado de fibrose pulmonar do que em animais mais pesados, entretanto, o grupo B, tratado com IFN- $\alpha$ -2b, embora significativamente mais leve, apresentou menor quantidade de fibrose.
- Além disso, se aceitarmos a hipótese de que a relação peso inicial/grau de fibrose possa não ser linear, ainda assim seria difícil justificar que o grupo A, com média de peso aproximadamente 17% superior à do grupo B, pudesse desenvolver um grau de fibrose 220% maior. Estes achados, na verdade, fortalecem nossa hipótese inicial.

### **4.3 Perspectivas Futuras**

Possivelmente, futuros estudos clínicos deverão avaliar a utilidade potencial de outras estratégias antiinflamatórias direcionadas às citocinas que recrutam neutrófilos para os espaços aéreos pulmonares. Um potencial alvo para esta abordagem seria a IL-8, o agente

quimiotático mais importante dos neutrófilos nos pulmões. Esta abordagem, entretanto, poderia reduzir as propriedades protetoras da resposta inflamatória do hospedeiro, e aumentar o risco de infecções (12).

Em nosso estudo, detectamos que o IFN- $\alpha$ -2b é capaz de reduzir o desenvolvimento de fibrose pulmonar dos ratos, quando administrado no início da agressão pulmonar. Apesar disto, ainda resta sabermos se o uso do IFN- $\alpha$ -2b seria capaz de reverter um quadro de fibrose pulmonar já estabelecido, ou com o processo inflamatório já em estados mais avançados, na forma como a SDRA habitualmente se apresenta em humanos.

Reconhecer o início do desenvolvimento da SDRA nos pacientes é clinicamente muito difícil, o que impossibilitaria, na maioria das vezes, o uso do IFN- $\alpha$ -2b como uma abordagem de profilaxia da fibrose pulmonar para pacientes que chegam às unidades de Terapia Intensiva já com um quadro estabelecido de SDRA.

Chesnutt et al (32) demonstraram em seu estudo, que, tão cedo quanto 24 horas após a intubação traqueal por insuficiência ventilatória devido à injúria pulmonar aguda, alguns pacientes já apresentam níveis elevados de pró-colágeno III no fluido do edema pulmonar, e que, estes pacientes, apresentam um pior prognóstico e uma evolução com maior risco de óbito. Assim, concluem que a elevação dos níveis de pró-colágeno III no fluido do edema pulmonar, em pacientes com injúria pulmonar aguda, seja um fator prognóstico negativo. Além disso, o estudo se propunha a determinar que, através deste marcador biológico da



síntese de colágeno, se pudesse identificar pacientes com maior risco de morte e que pudessem se beneficiar de novas modalidades terapêuticas.

Uma vez que não se conhecem outros fatores prognósticos e preditivos de evolução para fibrose, nos pacientes com SDRA, estes pacientes que apresentam precocemente elevação dos níveis de pró-colágeno, poderiam ser, eventualmente, candidatos ao uso do IFN- $\alpha$ -2b em futuros estudos.

Outras questões a serem levantadas são a dose de IFN- $\alpha$ -2b a ser oferecida e a via de administração. Em nosso estudo, obtivemos uma diminuição da fibrose pulmonar nos ratos *Wistar* tratados com IFN- $\alpha$ -2b na dose de 100.000U/Kg/dia, por 14 dias, via subcutânea. Como contraponto, dois outros estudos experimentais em que o efeito do IFN- $\alpha$  sobre a fibrose pulmonar induzida pela bleomicina foi avaliado, os resultados foram negativos. Em um destes estudos, foram testadas as apresentações do IFN- $\alpha$ -2a e o IFN- $\alpha$ -A/D, em camundongos, via intraperitoneal, por 15 dias, começando 1 dia antes da instilação de bleomicina. Os ratos tratados com IFN- $\alpha$ -2a desenvolveram mais fibrose pulmonar que os ratos controle, enquanto aqueles que foram tratados com o IFN- $\alpha$ -A/D não apresentaram qualquer modificação na evolução da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Concluíram, assim, que diferentes preparações do IFN- $\alpha$  podem ter diferentes efeitos sobre a fibrose pulmonar induzida pela bleomicina, e que o IFN- $\alpha$ -2a pode, inclusive, aumentar o grau de fibrose provocada (107).

O segundo estudo, do mesmo autor, testou o IFN- $\alpha$  nas doses fixas de 20.000U e 100.000U, via intraperitoneal, por 28 dias, em hamsters sírios, e observou que o IFN- $\alpha$  em baixas doses causou um aumento da fibrose e dos níveis de hidroxiprolina pulmonares, e que o grupo de animais que fez uso do IFN- $\alpha$  em altas doses também apresentou níveis mais altos de hidroxiprolina (108). A partir destes dados, o estudo sugere, em sua conclusão, que a fibrose pulmonar induzida pela bleomicina seja aumentada pelo IFN- $\alpha$ , mas que este efeito é complexo e não segue um padrão simples dose-dependente.

Os estudos acima apresentam resultados conflitantes com aqueles que obtivemos em nosso estudo, porém, observamos algumas significativas diferenças de metodologia entre eles: 1) os dois estudos de Berkman et al utilizam a via intraperitoneal para a administração do IFN- $\alpha$ ; 2) as apresentações do IFN- $\alpha$  são diferentes e, conforme descrito anteriormente, as diferentes apresentações podem resultar em diferentes efeitos sobre o desenvolvimento da fibrose pulmonar; 3) nos três estudos, os animais utilizados para os experimentos eram diferentes entre si, e possivelmente existam particularidades de cada espécie, que impeçam a comparação dos efeitos do tratamento entre elas; 4) em um dos estudos, os animais foram sacrificados apenas no 28º dia após a instilação de bleomicina; e 5) as doses do IFN- $\alpha$ , ainda que em apresentações diversas, também foram diferentes.

Em nosso estudo, optamos pela via subcutânea para a administração do IFN, conforme dois outros estudos (9,90). Esta via nos parece a mais adequada, visto que, na prática clínica diária, na maioria dos pacientes que fazem uso do IFN- $\alpha$  para tratamentos do câncer ou hepatites virais, o IFN é administrado por via subcutânea ou endovenosa.

Diferentes espécies de animais podem, eventualmente, apresentar diferentes suscetibilidades, tanto genética quanto imunológica, à injúria pulmonar. De fato, mesmo entre animais da mesma espécie, porém de linhagens diferentes, podem haver padrões heterogêneos de ativação de citocinas, o que pode ocasionar variadas respostas à injúria causada pela bleomicina (109).

Com relação à dose do IFN- $\alpha$ , Berkman et al obtiveram maior grau de fibrose nos animais que fizeram uso do IFN em doses mais baixas (20.000U). Nossos animais foram tratados com IFN- $\alpha$ -2b na dose de 100.000U/Kg/d, mas tinham peso médio de 194g, ou seja, também receberam cerca de 20.000U/d de IFN- $\alpha$ -2b. Portanto, há uma diferença importante entre os resultados obtidos nos dois estudos, e esta diferença é difícil de ser explicada, a não ser pelas considerações feitas acima, em relação às metodologias dos estudos.

# CONCLUSÃO

## 5.CONCLUSÃO

Em um modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos *Wistar*, o tratamento com interferon- $\alpha$ -2b, na dose de 100.000U/Kg/dia, por 14 dias, reduz o desenvolvimento de fibrose pulmonar.

A partir dos promissores resultados obtidos neste estudo, acreditamos que o interferon- $\alpha$ -2b mereça ser considerado em futuros estudos abordando o tratamento da SDRA.

**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 342:18, 1334-49, 2000.
2. Kobzik L. The lung. Em: *Robbins Pathologic Basis Disease.* 6<sup>th</sup> Ed. Pp.697-755, 1999.
3. Meduri GU, Eltorky M, Winer-Muran HT. The fibroproliferative phase of late adult respiratory distress syndrome. *Sem Respir Infec.* 10:154-175, 1995.
4. Zapol WM, Trelstad RL, Coffey JW, Tsai I, Salvador RA. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis.* 119:547-54, 1979.
5. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 342:18, 1301-8, 2000.
6. Antoniou KM, Ferdoutsis E, Bouros D. Interferons and their application in the diseases of the lung. *Chest.* 123:209-16, 2003.

7. Zhang Q, Wang J, Hu M. Effects of interferon-alpha on the mRNA expression of procollagen type I and III of hepatic stellate cells and the deposition of collagen type I and III in fibrotic liver of rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 79(9):695-8, 1999.
8. Souza MM, Parana R, Trepo C, Barbosa AA Jr, Oliveira I, Andrade ZA. Effect of interferon-alpha on experimental septal fibrosis of the liver – study with a new model. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96(3):343-8, 2001.
9. Moreno MG, Muriel P. Remission of liver fibrosis by interferon alpha-2b. *Biochem Pharmacol*. 50(4):515-20, 1995.
10. Tilg H, Vogel W, Dinarello CA. Interferon-alpha induces circulating tumor necrosis factor receptor p55 in humans. *Blood*. 85:433-35, 1995.
11. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 2(7511):319-23, 1967.
12. Matthay MA. Conference summary: acute lung injury. *Chest*. 116:Suppl:119S-26S, 1999.
13. Honig EG, Ingram Jr. RH. Acute Respiratory Distress Syndrome. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Harrison TR, 14<sup>th</sup> ed. Pg.1483-6, 1998.



14. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trials coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 149:818-24, 1994.
15. Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, Wiener-Kronish JP, Matthay MA. Identification of patients with acute lung injury predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 152:1818-24, 1995.
16. Zilberberg MD, Epstein SK. Acute lung injury in medical ICU. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1159-64, 1998.
17. Parsons PE, NIH/NHLBI ARDS Network. The incidence of nonpulmonary organ failure is independent of the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:716a, 1999.
18. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:293-301, 1995.

19. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Ann Intern Med.* 98:593-7, 1983.
20. Teixeira PJZ, Kalil CAN, Torelly AP. Síndrome da distrição respiratória aguda. Em: *Condutas em Pneumologia.* 1ªEd. Pp.833-41, 2001.
21. Pelosi P, Crotti S, Brazzi L, Cattinoni L. Computed tomography in adult respiratory distress syndrome: what has it taught us? *Eur Respir J.* 9:1055-62, 1996.
22. Desai SR, Hansell DM. Lung imaging in the adult respiratory distress syndrome: current practice and new insights. *Intens Care Med.* 23:7-15, 1997.
23. Owens CM, Evans TW, Keogh BF, Hansell DM. Computed tomography in established adult respiratory distress syndrome: correlation with lung injury score. *Chest.* 106:1815-21, 1994.
24. Pittet JF, MacKersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognosis and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:1187-203, 1997.

25. Wyncoll DA, Evans TW. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet*. 354:497-501, 1999.
26. Gattionini L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary diseases: different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med*. 158:3-11, 1998.
27. Porto N, Silva LCC. Conceitos básicos de anatomia do tórax. Em: *Conduas em Pneumologia*. 1ª Ed. Pp.3-9, 2001.
28. <http://kotan.ec.hokudai.ac.jp/~sawatana/histology/res/res04.html>
29. Bitterman PB. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *Am J Med*. 92:39S-43S, 1992.
30. <http://pathhsw5m54.ucsf.edu/overview/acute.html>
31. Harleston PS. Adult respiratory distress syndrome. Em: *Spencer's Pathology of the Lung*. 5<sup>th</sup> Ed. Pp. 375, 1996.

32. Chesnutt AN, Matthay MA, Tibayan FA, Clark JG. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury: pathogenic and prognostic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:840-5, 1997.
33. Clark JG, Milberg JA, Steinberg KP, Hudson LD. Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Ann Intern Med.* 122(1):17-23, 1995.
34. Long W, Thompson T, Sundell H, Schumacher R, Volberg F, Guthrie R. Effects of two rescue doses of a synthetic surfactant on mortality rate and survival without bronchopulmonary dysplasia in 700- to 1350-gram infants with respiratory distress syndrome. *J Pediatr.* 118:595-605, 1991.
35. Walmrath D, Gunther A, Ghofrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F, Seeger W. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:57-62, 1996.
36. Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventos AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS, Pattishall EN.

Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 334:1417-21, 1996.

37. Spragg RG, Lewis JF, Walmrath HD, Johannigman J, Bellingan G, Laterre PF, Witte MC, Richards GA, Rippin G, Rathgeb F, Häfner D, Taut FJH, Seeger W. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 351:884-92, 2004.

38. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, Kariman K, Higgins S, Bradley R, Metz CA. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 317:1565-70, 1987.

39. Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, Murray JF. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis.* 136:62-8, 1988.

40. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH, et al. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock: a prospective, controlled study. *N Engl J Med.* 311:1137-43, 1984.
41. Meduri GU, Headley AS, Golden E, Carson SJ, Umberger RA, Kelso T, Tolley EA. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 280:159-65, 1998.
42. Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, Straube RC, Hauser DL, Criner GJ, Davis K Jr, Hyers TM, Papadakos P. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. *Crit Care Med.* 26:15-23, 1998.
43. Payen D, Vallet B, Genoa Group. Results of the French prospective multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial on inhaled nitric oxide in ARDS. *Intensive Care Med.* (Abstract) 25:Suppl:S166, 1999.
44. Abraham E, Baughman R, Fletcher E, Heard S, Lamberti J, Levy H, Nelson L, Rumbak M, Steingrub J, Taylor J, Park YC, Hynds JM, Freitag J. Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome: a controlled, randomized, double-blind, multicenter

- clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group. *Crit Care Med.* 27:1478-85, 1999.
45. Bone RC, Slotman G, Maunder R, Silverman H, Hyers TM, Kerstein MD, Ursprung JJ. Randomized double-blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with the acute respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 Study Group. *Chest.* 96:114-9, 1989.
46. Radermacher P, Santak B, Wust HJ, Tarnow J, Falke KJ. Prostacyclin for the treatment of pulmonary hypertension in the adult respiratory distress syndrome: effects on pulmonary capillary pressure and ventilation perfusion distributions. *Anesthesiology.* 72:238-44, 1990.
47. NIH ARDS Network. Ketoconazole does not reduce mortality in patients with the acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 283:1995-2002, 2000.
48. Kirby RR, Downs JB, Civetta JM, Modell JH, Dannemiller FJ, Klein EF, Hodges M. High level positive end respiratory pressure (PEEP) in acute respiratory insufficiency. *Chest.* 67(2):156-63, 1975.
49. Zapol WM, Snider MT, Hill JD, Fallat RJ, Bartlett RH, Edmunds LH, Morris AH, Peirce EC 2nd, Thomas AN, Proctor HJ, Drinker PA, Pratt PC, Bagniewski A, Miller RG Jr. Extracorporeal membrane oxygenation

- in severe acute respiratory failure: a randomized prospective study. *JAMA*. 242(20):2193-6,1979.
50. Carlon GC, Howland WS, Ray C, Miodownik S, Griffin JP, Groeger JS. High-frequency jet ventilation: a prospective randomized evaluation. *Chest*. 84:551-9, 1983.
51. Pepe PE, Hudson LD, Carrico JC. Early application of positive end-expiratory pressure in patients at risk for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 311:281-6, 1984.
52. Lessard MR, Guerot E, Lorino H, Lemaire F, Brochard L. Effects of pressure-controlled with different I:E ratios versus volume-controlled ventilation on respiratory mechanics, gas exchange, and hemodynamics in patients with adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 80:983-91, 1994.
53. Morris AH, Wallace CJ, Menlove RL, Clemmer TP, Orme JF Jr, Weaver LK, Dean NC, Thomas F, East TD, Pace NL. Randomized clinical trial of pressure-controlled inverse ratio ventilation and extracorporeal CO<sub>2</sub> removal for adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 149:295-305, 1994.



54. Hirschl RB, Pranikoff T, Wise C, Overbeck MC, Gauger P, Schreiner RJ, Dechert R, Bartlett RH. Initial experience with partial liquid ventilation in acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 275:383-9,1996.
55. Fort P, Farmer C, Westerman J, Johannigman J, Beninati W, Dolan S, Derdak S. High-frequency oscillatory ventilation for adult respiratory distress syndrome – pilot study. *Crit Care Med*. 25:937-47,1997.
56. Mure M, Martling C-R, Lindahl SGE. Dramatic effect on oxygenation in patients with severe acute lung insufficiency treated in the prone position. *Crit Care Med*. 25:1539-44,1997.
57. Nakos G, Tsangaris I, Kostanti E, Nathanail C, Lachana A, Koulouras V, Kastani D. Effect of the prone position on patients with hydrostatic pulmonary edema compared with patients with acute respiratory distress syndrome and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 161:360-8, 2000.
58. Stewart TE, Meade MO, Cook DJ, Granton JT, Hodder RV, Lapinsky SE, Mazer CD, McLean RF, Rogovein TS, Schouten BD, Todd TR, Slutsky AS. Evaluation of a ventilation strategy to prevent barotraumas in patients at high risk of acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 338:355-61, 1998.

59. Brochard L, Roudot-Thoraval F, Roupie E, Delclaux C, Chastre J, Fernandez-Mondejar E, Clementi E, Mancebo J, Factor P, Matamis D, Ranieri M, Blanch L, Rodi G, Mentec H, Dreyfuss D, Ferrer M, Brun-Buisson C, Tobin M, Lemaire F. Tidal volume reduction for prevention of ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome. The Multicenter Trial Group on Tidal Volume reduction in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:1831-8, 1998.
60. The National Heart, Lung and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 351(4):327-36, 2004.
61. Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. *JAMA.* 273:306-9, 1995.
62. Abel SJC, Finney SJ, Brett SJ, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW. Improved survival in association with ARDS. *Thorax.* 53:292-4, 1998.
63. Frost P, Edwards N, Bihari D. Gastric emptying in the critically ill - the way forward? *Intens Care Med.* 23:243-45, 1997.

64. Gadek J, Demichele S, Karistad M. Specialized enteral nutrition improves clinical outcome in patients with or at risk of ARDS: a prospective, blinded, randomized controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* (Abstract)157:A677, 1998.
65. Mitchel JP, Schuller D, Caladrino FS, Schuster DP. Improved outcome based on fluid management in critically ill patients requiring pulmonary artery catheterization. *Am Rev Respir Dis.* 145 (5):990-8,1992.
66. Humphrey H, Hall J, Sznajder I, Silverstein M, Wood L. Improved survival in ARDS patients associated with a reduction in pulmonary capillary wedge pressure. *Chest.* 97:1176-80, 1990.
67. Schuster DP. Fluid management in ARDS: "Keep them dry" or does it matter? *Intens Care Med.* 21:101-3, 1995.
68. Jerng JS, Yu CJ, Liaw YS, Wu HD, Wang HC, Kuo PH, Yang PC. Clinical spectrum of acute respiratory distress syndrome in a tertiary referral hospital: etiology, severity, clinical course, and hospital outcome. *J Formos Med Assoc.* 99(7):538-43, 2000.

69. Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, McReynolds RA, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol.* 95(1):117-30, 1979.
70. Ferreira Filho, AF. Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intra-traqueal em ratos *Wistar*. Descrição do modelo experimental de Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto e uso do Polissulfato de Pentosan. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia. UFRGS, 1996.
71. Özyurt H, Sögüt S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Armutçu F, Temel I, Özen S, Uzun A, Akyol Ö. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin Chim Acta.* 339(1-2):65-75, jan, 2004.
72. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 83(3):111-9, 2002.
73. Ito M, Suwabe A, Suzuki T, Tominaga M, Takahashi K. The effects of surfactant-TA on bleomycin-induced lung injury and lung fibroblast proliferation (abstract). *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 35(11):1163-72, 1997.

74. Delves PJ, Roitt IM. The immune system – second part. *N Engl J Med.* 343(2):108-17, 2000.
75. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. Em: *Imunologia Celular e Molecular*. Abbas AK. 4a ed. Pg. 235-69, 2003.
76. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet.* 357:1777-89, 2001.
77. Delves PJ, Roitt IM. The immune system – first part. *N Engl J Med.* 343(1):37-49, 2000.
78. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet.* 349:490-5, 1997.
79. von Adrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration – two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 343:1020-34, 2000.
80. Jordana M, Richards C, Irving LB, Gauldie J. Spontaneous in vitro release of alveolar-macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats. Characterization and kinetic studies. *Am Rev Respir Dis.* 137(5):1135-40, 1998.

81. Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW. Th1 and Th2 responses regulate experimental lung granuloma development. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 13(2):120-8, 1996.
82. Hayden FG. Antimicrobial agents – Antiviral agents. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9<sup>th</sup> ed. Pg 1191-1223, 1996.
83. Elias JA, Freundlich B, Kern JA, Rosenbloom J. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* 97:1439-45, 1990.
84. Bienkowski RS, Gotkin MG. Control of collagen deposition in mammalian lung. *Proc Soc Exp Biol Med*, 209:118-40, 1995.
85. Sempowski GD, Derdak S, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-gamma discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblasts subsets. *J Cell Physiol.* 167:290-6, 1996.
86. Okada T, Sugie I, Aisaka K. Effects of gamma-interferon on collagen and histamine content in bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Lymphokine Cytokine Res.* 12(2):87-91, 1993.

87. Venkatesan N, Roughley PJ, Ludwig MS. Proteoglycan expression in bleomycin lung fibroblasts: role of transforming growth factor- $\beta$ 1 and interferon-gamma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283(4):L806-14, 2002.
88. Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon-gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF- $\beta$  and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res.* 21:791-808, 1995.
89. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor  $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest.* 100:768-76, 1997.
90. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 341:1264-69, 1999.
91. Bueno MR, Daneri A, Armendariz-Borunda J. Cholestasis-induced fibrosis is reduced by interferon alpha-2a and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol.* 33(6):915-25, 2000.

92. Thrall RS, Vogel SN, Evans R, Shultz LD. Role of tumor necrosis factor-alpha in the spontaneous development of pulmonary fibrosis in viable motheaten mutant mice. *Am J Pathol.* 151(5):1303-10, 1997.
93. Adachi K, Suzuki M, Sugimoto T, Yorozu K, Takai H, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on bleomycin-induced lung injury of varying severity. *Toxicol Pathol.* 31(6):665-73, nov-dec, 2003.
94. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 11(4):447-55, 1979.
95. Da Silva VD, Prolla JC. Estudo comparativo entre microscopia ótica convencional e imagens microscópicas digitalizadas de derrames serosos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia. UFRGS, 1995.
96. Umezawa H, Suhara Y, Takita T, Maeda K. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot.* 19:200-9, 1966.
97. Cheson BD. Miscellaneous chemotherapeutics agents. Em: *Cancer Principles and Practice of Oncology*. DeVita VT. 6<sup>th</sup> ed. Pg. 452-9, 2001.



98. Yagoda A, Mukherji B, Young C, Etcubanas E, Lamonte C, Smith JR, Tan CT, Krakoff IH. Bleomycin, an antitumor antibiotic: clinical experience in 274 patients. *Ann Intern Med.* 77:861-70, 1972.
99. De Lena M, Guzzon A, Monfardini L, Bonadonna G. Clinical, radiologic, and histopatologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin. *Cancer Chemother Rep.* 56:343, 1972.
100. Parvinen LM, Kilkku P, Makinen E, Liukko P, Gronroos M. Factors affecting the pulmonary toxicity of bleomycin. *Acta Radiol Oncol.* 22:417, 1983.
101. Waid-Jones MI, Coursin DB. Preoperative considerations for patients treated with bleomycin. *Chest.* 99:993-9, 1991.
102. Allen SC, Riddell GS, Butchart EG. Bleomycin therapy and anesthesia: the possible hazards of oxygen administration to patients after treatment with bleomycin. *Anesthesia.* 36(1):60-3, 1981.
103. Cooper JA Jr, White DA, Matthay RA. Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs. *Am Rev Respir Dis.* 133(2):321-40, 1986.

104. Lacerda MA. Quimioterapia e anesthesia. *Rev Bras Anesthesiol.* 51(3):250-70, 2001.
105. Iacovino JR, Leitner J, Abbas AK. Fatal pulmonary reaction from low doses of bleomycin: na idiosincratic tissue response. *JAMA.* 235(12):1253-5, 1976.
106. Comis RL. Detecting bleomycin pulmonary toxicity: a continued cunundrum. *J Clin Oncol.* 8(5):765-7, 1990.
107. 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):779-83, 1990.
108. Berkman N, Kremer S, Or R, Lossos IS, Christensen TG, Goldstein RH, Breuer R. Human recombinant interferon-alpha2a and interferon-alphaA/D have different effects on bleomycin-induced lung injury. *Respiration.* 68(2):169-77, 2001.
109. Berkman N, Golstein RH, Breuer R. Bleomycin-induced lung injury is enhanced by interferon-alpha. *Life Sci.* 60(26):415-21, 1997.

110. Gur I, Or R, Segel MJ, Shriki M, Izbicki G, Breuer R. Lymphokines in bleomycin-induced lung injury in bleomycin-sensitive C57BL/6 and –resistant BALB/c mice. *Exp Lung Res.* 26(7):521-34, 2000.