PAOLO JOSÉ CESARE BISELLI

**Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo
de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos**

C57/BI6

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

Área de Concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

São Paulo

2008

A Deus.

À minha filha e esposa, que me fazem seguir em frente.

À minha família, que me apóia incondicionalmente.

Agradecimentos

Ao Professor Milton, por saber ouvir, por ajudar-me a conduzir este trabalho para sua conclusão, por discutir minhas dúvidas, por me deixar e fazer pensar.

À Thaís Mauad, pelas incontáveis reuniões e checagens de lâminas.

Ao Professor Saldiva, pelas inúmeras provocações que me fizeram pensar mais e que permitiram melhorar muitos aspectos deste trabalho.

À Fernanda Lopes, que me ajudou em todos os passos deste trabalho, tornando-o possível.

À Dolores, que me ajudou muito no início e foi sempre muito gentil.

À Fernanda Arantes, que sempre esteve disponível para qualquer problema que aparecesse.

À Cristina e à Ângela, sempre muito competentes e dispostas a ajudar.

À Alessandra Choqueta, que me ajudou muito em várias discussões e na contagem das células epiteliais.

Ao Rodolfo, sempre animado, sempre disposto a discutir idéias novas.

Aos demais integrantes do LIM20, que conviveram comigo nestes anos e me ajudaram de inúmeras formas.

À Vivian, minha esposa, que me apoiou sempre, mesmo quando não concordava comigo.

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

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

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

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

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Definição	2
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Fisiopatologia	5
1.3.1 Alteração mecânica pulmonar	5
1.3.2 Desequilíbrio protease antiprotease	6
1.3.3 Inflamação pulmonar	7
1.3.4 Mecanismos não inflamatórios	10
1.4 Histopatologia.....	12
1.5 Modelos animais	14
1.5.1 Modelos de DPOC.....	14
1.5.2 Modelos usando poluição	16
1.6 Medidas de enfisema e bronquite	17
2. Objetivos.....	20
3. Métodos.....	22
3.1 Animais.....	23
3.2 Exposição à suspensão de poluente (ROFA).....	24
3.3 Exposição à fumaça de cigarro	26
3.4 Avaliação da mecânica pulmonar.....	29
3.5 Histologia pulmonar – preparação.....	30
3.6 Imuno-histoquímica	31
3.7 Morfometria	32
3.8 Análise das células inflamatórias	34

3.9	Análise de fibras e estresse oxidativo	37
3.10	Parede da via aérea e células epiteliais	40
3.11	Análise estatística	41
4.	Resultados.....	42
4.1	Mecânica pulmonar	43
4.2	Histologia – medidas de enfisema pulmonar.....	45
4.3	Histologia – células inflamatória em parênquima	49
4.4	Histologia – análise das fibras elásticas e colágenas.....	51
4.5	Histologia – parede de via aérea e células epiteliais.....	53
4.6	Histologia – Análise do estresse oxidativo	57
5.	Discussão	58
5.1	Desenvolvimento do enfisema	60
5.2	Células inflamatórias	63
5.3	Mecânica pulmonar e alterações epiteliais.....	66
5.4	Remodelamento, estresse oxidativo e muco.....	69
5.5	Limitações do estudo	70
5.6	Considerações finais	72
6.	Conclusões	73
7.	Bibliografia.....	75

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição da ROFA HU analisada pelo método de ativação de nêutrons.....	25
Tabela 2 – Composição do cigarro marca Derby Vermelho, Souza Cruz....	28

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema ilustrativo da caixa de exposição	27
Figura 2 – Esquema usado para a medição do Lm radial.....	34
Figura 3 – Exemplo de foto com espaço peribroncovascular	35
Figura 4 – Esquema da análise eletrônica das fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar	38
Figura 5 – Esquema da análise eletrônica das fibras colágenas e elásticas em via aérea	39
Figura 6 – Mecânica pulmonar nos 4 grupos de exposição.....	44
Figura 7 – Fotografias das regiões central e periférica pulmonar de animais representando os 4 grupos analisados	46
Figura 8 – Histologia – Lm tradicional.....	47
Figura 9 – Histologia – Lm radial	48
Figura 10 – Macrófagos marcados com Mac-2 em parênquima pulmonar e no espaço peribroncovascular	49
Figura 11 – Neutrófilos marcados com anticorpos anti-neutrófilos de camundongos em parênquima pulmonar e no espaço peribroncovascular	50
Figura 12 – Macrófagos expressando MMP12 no parênquima pulmonar....	51
Figura 13 – Fibras elásticas e colágenas em parênquima pulmonar	52
Figura 14 – Fibras elásticas e colágenas na via aérea	52
Figura 15 – Exemplos de fotografias das regiões de via aérea e parênquima pulmonar.....	53

Figura 16 – Espessura da parede de via aérea medida de maneira automatizada	54
Figura 17 – Exemplos de vias aéreas fotografadas nas lâminas coradas com Picrossírius	55
Figura 18 – Análise das células epiteliais em microscópio óptico por contagem de pontos	56
Figura 19 – Análise do estresse oxidativo usando anti-Isoprostano 8	57

Lista de siglas

ANOVA	Análise de variância
DATASUS	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EGF	Fator de crescimento da epiderme
ENA78	Peptídeo epitelial ativador de neutrófilos
FEV1	Volume expiratório forçado em 1 segundo
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
GRO α	Oncogene relacionado ao crescimento α
Gtis	Resistência de tecidos
Htis	Elastância de tecidos
HU	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
Iaw	Inertância da via aérea
IgG	Imunoglobulina
IL	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INF γ	Interferon γ
Lm	Intercepto linear médio
Lm radial	Intercepto linear médio medido a partir de uma distância da via aérea
LTB4	Leucotrieno B4
MCP1	Proteína quimiotática de macrófagos
MMP	Metaloproteinase de matriz

NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
NIH	“National Institute of Health”
π	3,14159
PAS/AB	Ácido Periódico de Shiff (PAS) e Azul Alciano (AB)
PDGFA	Fator de crescimento derivado de plaquetas A
Raw	Resistência de vias aéreas
ROFA	“Residual Oil Fly Ash” – resíduo de óleo diesel
SLPI	Inibidor das leucoproteases
TGB β	Fator de crescimento transformador β
TIMP	Inibidores das metaloproteinases de matriz
TNF α	Fator de necrose tumoral α
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
Z(f)	Impedância

Resumo

Biselli PJC. **Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos C57/Bl6** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

Vários mecanismos que participam do desenvolvimento da DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) não são ainda bem esclarecidos. Neste estudo, expusemos camundongos C57/Bl6, por 2 meses, à fumaça de cigarro e/ou à ROFA (resíduo de óleo diesel). Os animais expostos à fumaça de cigarro desenvolveram aumento da resistência de grandes vias aéreas, provavelmente por espessamento da sua parede, resultante de alterações nas células epiteliais. Estes animais também desenvolveram enfisema inicial, com distensão de espaços aéreos em algumas regiões pulmonares. Não houve recrutamento de células inflamatórias, alteração de fibras elásticas ou colágenas ou aumento do estresse oxidativo, medido pelo Isoprostano 8. Este trabalho sugere que há uma lesão pulmonar inicial que se caracteriza por alterações nas células epiteliais e algum grau de enfisema, que pode ser mediado pelas próprias células epiteliais.

Descritores: Doença pulmonar obstrutiva crônica/fisiopatologia, tabaco, poluição ambiental, enfisema pulmonar, camundongos.

Summary

Biselli PJC. **Effects of the exposure to cigarette smoke and residual oil fly ash (ROFA) in lungs of C57/Bl6 mice** [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008.

Many of the mechanisms leading to CPOD (Chronic Pulmonary Obstructive Disease) are not completely understood. In the present study, we exposed C57/Bl6 mice, for two months, to cigarette smoke and/or ROFA (Residual Oil Fly Ash). Animals exposed to cigarette smoke had an increased in proximal airways resistance, probably due to the thickening of airways walls that followed changes in epithelial cells. These animals also had a small degree of emphysema, once air spaces enlargement could be noticed in circumscribed lung areas. We observed no inflammatory cells recruitment, elastic or collagen fibers deposition or increases in oxidative stress, measured by staining Isoprotane⁸. This study shows an early stage of the CPOD development, in which we can detect changes in epithelial cells and a small degree of emphysema, which could be mediated by these same epithelial cells.

Descriptors: Pulmonary disease, chronic obstructive/physiopathology, tobacco, environmental pollution, pulmonary emphysema, mice.

1. Introdução

1.1 Definição

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma síndrome caracterizada por limitação ao fluxo aéreo não completamente reversível, geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal a partículas ou gases tóxicos. Há variados efeitos extrapulmonares que podem contribuir para aumentar a gravidade da doença em diversos indivíduos (1).

O maior fator de risco para o desenvolvimento de DPOC é a exposição à fumaça de cigarro. No entanto, outros fatores de risco, como poeira ocupacional e agentes químicos, podem estar associados ao desenvolvimento da doença. A poluição no interior das casas, causada por queima de biomassa (madeira, restos de árvores ou fezes), parece também estar relacionada ao desenvolvimento desta doença (2,3,4). Os casos de DPOC associados a esta poluição domiciliar aparentam ter evolução similar àqueles induzidos pela exposição à fumaça de cigarro (5).

A DPOC pode ter diferentes apresentações clínicas e muitos pacientes são diagnosticados como portadores de enfisema pulmonar ou bronquite crônica. Enfisema pulmonar refere-se à destruição das superfícies alveolares dos pulmões. É um diagnóstico anatomopatológico, embora seja usado muitas vezes na prática clínica. Bronquite crônica é definida como a presença de tosse com expectoração por pelo menos 3 meses, por 2 anos consecutivos. No entanto, muitos pacientes apresentam graus variados das duas alterações patológicas: tosse produtiva e destruição do parênquima pulmonar. Assim, a definição proposta atualmente não utiliza os termos

enfisema e bronquite crônica, mas caracteriza a doença por sua manifestação principal, a limitação do fluxo aéreo.

1.2 Epidemiologia

A prevalência mundial de DPOC, em adultos com mais de 40 anos, é cerca de 9-10%, quando definida pela limitação do fluxo aéreo (6). No entanto, há grande variação regional desta medida, quer por diferenças na exposição das populações aos fatores de risco, quer por diferenças nas definições de DPOC usadas nos muitos estudos epidemiológicos.

Em São Paulo, um estudo iniciado em 2002 mostrou que a prevalência de DPOC, definida com espirometria, foi 15,8% em indivíduos acima de 40 anos (7). Embora maior que a prevalência descrita na meta-análise global discutida acima, este valor é compatível com uma medida anterior, feita em Pelotas, que identificou uma prevalência de 15,2% (8).

A prevalência da doença aumenta progressivamente com a idade, acompanhando a perda funcional pulmonar que ocorre em todos os indivíduos. No estudo realizado em São Paulo, a prevalência de DPOC foi 8,4% nos indivíduos entre 40 e 49 anos; 16,2% na faixa entre 50 e 59 anos; e 25,7% nos indivíduos com 60 anos ou mais.

Dados do DATASUS* mostram que bronquite crônica e enfisema pulmonar foram responsáveis por cerca de 170.000 internações em 2007 no

* FONTE: Ministério da Saúde, Brasil.

sistema público de saúde em todo o Brasil, representando 1,5% do total de internações em hospitais públicos.

O cigarro constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença. A incidência cumulativa pode dobrar ou triplicar com a exposição a este agente (9). Dados do DATASUS* mostraram que a prevalência de tabagismo na cidade de São Paulo foi 19,9% em 2002. No mesmo ano, a prevalência de DPOC na população tabagista da capital paulista foi 21,8%. Os ex-fumantes tinham uma prevalência de DPOC de 15,6%. Nos não fumantes, esta prevalência foi 12,5% (7). A exposição ao cigarro também está associada a uma maior queda da função pulmonar ao longo do tempo. A abstinência ao cigarro, por sua vez, reduz esta velocidade de declínio (10,11).

A poluição ambiental é considerada, por alguns autores, como tendo um papel ainda não claro no desenvolvimento da DPOC (1). No entanto, há dados mostrando o aumento da prevalência desta enfermidade associada à poluição ambiental (12,13) bem como aumento no risco de hospitalizações por exacerbações da doença (14,15) em ambientes mais poluídos.

A prevalência de DPOC no médio prazo deve aumentar. Ainda que haja um programa eficiente que consiga reduzir a exposição à fumaça de cigarro, projeta-se que o envelhecimento populacional suplantará o efeito da redução deste fator de risco (16). Portanto, esta é uma doença que continuará a afetar grande parcela da população por vários anos.

1.3 Fisiopatologia

1.3.1 Alteração mecânica pulmonar

A principal manifestação da DPOC é a redução do fluxo aéreo. Há vários mecanismos que podem produzir esta alteração e podemos dividi-los em fatores que aumentam a resistência de vias aéreas e fatores que diminuem a força elástica pulmonar.

Na via aérea, pode haver espessamento epitelial, formação de folículos linfóides e deposição de colágeno, o que reduz seu diâmetro interno e sua capacidade de distensão (17). Estes fatores podem aumentar a resistência de vias aéreas, produzindo a redução de fluxo observada nos pacientes. O aumento da secreção de muco também pode contribuir para esta redução do fluxo aéreo e, em fases avançadas da doença, correlaciona-se com a mortalidade dos pacientes (18,19). Ainda, a destruição da arquitetura pulmonar pode alterar a disposição normal das vias aéreas, contribuindo para o aumento da resistência destas (17).

Por outro lado, o pulmão com destruição de parênquima e fibras elásticas apresenta redução da sua elastância, produzindo um menor fluxo expiratório para uma mesma condutância. No entanto, é improvável que esta destruição do parênquima explique isoladamente a redução do fluxo aéreo do paciente, mesmo quando intensa. As alterações anatômicas em vias aéreas, aumentando a resistência desta, parecem ser predominantes na limitação ao fluxo aéreo.

* FONTE: Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Câncer (INCA), Brasil.

1.3.2 Desequilíbrio protease antiprotease

Muitos dos mecanismos que conduzem a estas alterações já foram parcialmente elucidados, mas existem diversos aspectos a serem mais bem entendidos. A teoria fisiopatológica dominante explica a destruição pulmonar a partir de um desequilíbrio nos sistemas de protease e antiprotease.

Segundo este modelo, há um predomínio da ação das proteases com um antagonismo insuficiente das antiproteases. Os pacientes com deficiência de α 1-antitripsina, um inibidor da protease neutrofílica, podem evoluir com grande destruição do parênquima pulmonar. Esta observação contribuiu para o desenvolvimento desta teoria. Diversos modelos experimentais produziram evidências compatíveis com esta idéia, mostrando que é possível induzir enfisema em animais administrando-se proteases elastolíticas, mas não outras proteases (20).

Várias enzimas presentes na matriz extracelular ou produzidas por células inflamatórias são capazes de fazer proteólise: MMP12, MMP9, elastase neutrofílica, catepsina K, L, S, proteinase 3 (17). Se houver um aumento na produção destas enzimas, suplantando o efeito das antiproteases, haverá destruição das fibras elásticas pulmonares e aumento dos espaços aéreos.

Por outro lado, um maior efeito das antiproteases pode prevenir o desenvolvimento do enfisema pulmonar. A administração intraperitoneal de α 1-antitripsina pode impedir a quebra de tecido conectivo que se segue à exposição aguda ao cigarro (21). Outras enzimas com papel de antiproteases, como SLPI (Inibidor das leucoproteases) e TIMPs (inibidores

da MMP), podem reduzir a quebra de fibras elásticas e impedir a destruição do parênquima pulmonar (17).

1.3.3 Inflamação pulmonar

O desequilíbrio protease antiprotease pode ser produzido por uma resposta inflamatória ao agente agressor inalado. Várias células inflamatórias são encontradas na via aérea, no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar dos pacientes, em diferentes fases da doença. Porém, os tempos de surgimento de cada uma destas células, seu papel no desenvolvimento da doença e suas inter-relações não são suficientemente conhecidos.

Os neutrófilos estão presentes em pacientes com DPOC em fases mais avançadas e podem estar relacionados à produção de muco, que é potencialmente estimulada por muitas das proteases neutrofílicas (proteinase 3, catepsina G e elastase neutrofílica). Estas proteases, bem como a MMP8 e MMP9, também produzidas por neutrófilos, podem destruir o parênquima pulmonar e as fibras elásticas.

Detecta-se a presença de vários fatores quimiotáticos para neutrófilos nos pulmões de indivíduos expostos ao cigarro: LTB₄, IL8, GRO α , ENA78. O aumento do número de neutrófilos no sangue periférico correlaciona-se com a queda de FEV1 (22) e o número destas células na biópsia brônquica e escarro induzido está associado à gravidade da doença (23). Muitos autores mostraram aumento no número de neutrófilos em pacientes portadores de DPOC (24,25,26). Estudos em animais mostraram que a presença do

neutrófilo e da elastase neutrofílica parece ser importante para o desenvolvimento do enfisema (27,28).

No entanto, alguns pesquisadores não conseguiram encontrar aumento de neutrófilos nos pulmões dos pacientes com DPOC quando comparados a fumantes assintomáticos (29,30,31,32). Ainda, pode haver uma associação negativa entre o número de neutrófilos no pulmão e a destruição do parênquima (33). Portanto, com alguns dados conflitantes, o papel do neutrófilo no desenvolvimento do enfisema é ainda obscuro.

Os macrófagos são encontrados mais frequentemente em estudos de pacientes com DPOC, o que sugere que podem ser uma célula central no desenvolvimento da doença. Induzidos por substâncias do cigarro, podem secretar IL8, TNF α , MCP1 (peptídeo quimiotático para monócitos), LTB4 e espécies reativas de oxigênio. Ainda podem secretar MMP2, MMP9, MMP12, elastase neutrofílica e catepsina K, L e S. Assim, podem ser mediadores do processo lesivo iniciado pelas toxinas do cigarro, bem como efetores da lesão pulmonar, produzindo destruição do parênquima (17).

Há aumento do número de macrófagos no parênquima, glândulas submucosas e lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC (25,29,32,34). Ainda, a presença de elastase macrofágica parece ser necessária para o desenvolvimento do enfisema em modelo experimental (35).

Há evidências de cooperação entre macrófago e neutrófilo na geração do processo lesivo pulmonar. Aparentemente, as duas células são

necessárias, em um modelo agudo, para produzir a quebra do tecido conectivo (28).

No entanto, alguns autores não conseguiram mostrar aumento de macrófagos em fumantes sintomáticos quando comparados a fumantes assintomáticos (31,34). Embora esta diferença possa ocorrer por variação amostral, isto dificulta a interpretação dos resultados e a criação de um modelo inflamatório que explique adequadamente o desenvolvimento da doença.

Por sua vez, os linfócitos T CD4 e CD8 são amplamente encontrados nos pulmões dos pacientes com DPOC (23,24,29,30,31,32,36). Aparentemente há predomínio dos clones Th1, produtores de INF γ . Algumas análises feitas em infiltrados de linfócitos B mostram que esta população de células é predominantemente mono ou oligoclonal.

O papel dos linfócitos nesta doença não é bem esclarecido. Podem estar presentes como resposta a agentes microbiológicos, que colonizam ou infectam freqüentemente as vias aéreas inferiores destes pacientes. Podem ser estimulados, também, por alguns dos antígenos presentes na fumaça do cigarro. E, ainda, é possível que o processo de lesão pulmonar exponha alguns auto-antígenos, desencadeando uma resposta linfocitária local contra estes (37).

Eosinófilos são mais raramente encontrados em paciente com DPOC e sua presença pode marcar a coexistência de asma (38). Podem estar presentes nas exacerbações da doença. No entanto, é possível que sua presença tenha sido mascarada por um erro metodológico, uma vez que

podem degranular ao serem estimulados pela elastase neutrofílica e, assim, serem confundidos com neutrófilos (39).

1.3.4 Mecanismos não inflamatórios

Embora o processo inflamatório e o desequilíbrio protease antiprotease representem a teoria fisiopatológica dominante, existem outros mecanismos que podem produzir a doença ou participar do seu processo de desenvolvimento.

As células epiteliais podem desempenhar um papel importante. Podem ser ativadas pela fumaça do cigarro e produzir $TNF\alpha$, $IL1\beta$, GM-CSF, $IL8$, $TGF\beta$ (17,40,41). São as primeiras células pulmonares que entrarão em contato com as partículas inaladas. Portanto, podem exercer um papel tanto sinalizador para outras células de defesa pulmonar, como protetor, secretando muco, antiproteases e antioxidantes. O epitélio de pacientes com DPOC freqüentemente mostra metaplasia escamosa, que pode ser induzida pela produção de EGF (fator de crescimento epitelial).

O estresse oxidativo também pode ter uma importante participação no desenvolvimento desta doença. O fumo, diretamente ou por meio das células inflamatórias, pode aumentar a concentração de oxidantes. Pode também levar a uma redução da capacidade antioxidante pulmonar. Há associação entre dieta pobre em antioxidantes e o risco para o desenvolvimento de enfisema e detecta-se aumento de Isoprostano 8, um produto do estresse oxidativo, no ar exalado e na urina de pacientes com DPOC (17,42).

O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no pulmão pode contribuir para amplificar a inflamação pulmonar e reduzir a atividade das antiproteases, como a α 1-antitripsina. Pode também contribuir para produzir resistência à ação dos corticosteróides e induzir apoptose, mediada pelo NF- κ B.

Portanto, há sinais de estresse oxidativo em pacientes com DPOC e esta pode ser uma via alternativa para o desenvolvimento da doença. No entanto, o exato papel desta via de lesão e sua relação com os mecanismos inflamatórios na fisiopatologia da DPOC ainda precisam ser mais bem esclarecidos.

Vários fatores de crescimento produzem alterações que fazem parte da instalação da DPOC. Como já descrito anteriormente, o TGF β pode ser produzido no epitélio (40,41), estimulado pelo contato deste com as toxinas inaladas. Esta citocina pode induzir a deposição de fibras colágenas na via aérea, contribuindo para sua obstrução e redução ao fluxo aéreo. O TGF β pode induzir a proliferação das células epiteliais, o que é muitas vezes observado nos pacientes com DPOC.

O VEGF (fator de crescimento endotelial) também pode participar do desenvolvimento da DPOC. O bloqueio do seu receptor (VEGFR) pode desencadear uma lesão pulmonar com alargamento dos espaços aéreos. Acredita-se que, na ausência deste fator, ocorra apoptose dos vasos pulmonares com conseqüente destruição do parênquima pulmonar (43,44).

A apoptose de células pulmonares, induzida pelo bloqueio do VEGFR ou desencadeada pelo processo inflamatório ou estresse oxidativo, pode ser

um dos grandes mecanismos pelos quais a doença pulmonar se instala. Mas é também possível que a apoptose seja diretamente induzida por outras vias ainda não conhecidas. Alguns autores entendem o pulmão como um órgão em constante reparo. Segundo este modelo, deve haver um balanço entre a taxa normal de apoptose das células pulmonares e sua renovação. O cigarro poderia afetar a renovação celular, impedindo o reparo adequado, o que produziria a redução da área de parênquima pulmonar observada nos pacientes (45,46,47).

Portanto, apesar de haver vários dados que confirmem a hipótese inflamatória e o desequilíbrio protease antiprotease, há vários outros mecanismos que podem levar à DPOC. A maneira pela qual eles interagem é ainda pouco clara. É possível que alguns não participem da fisiopatologia da DPOC no homem, mas estejam apenas presentes em um modelo animal. No entanto, os futuros avanços no entendimento desta enfermidade talvez nos levem a concluir que algumas destas vias sejam de fato participantes e, possivelmente, mais importantes para o desenvolvimento da doença do que os mecanismos hoje conhecidos.

1.4 Histopatologia

A evolução da definição de DPOC acompanhou a evolução das descrições histológicas da doença. Na primeira metade do século XX predominava o conceito da destruição da arquitetura pulmonar observada pelos patologistas. Com o tempo, a definição da doença foi progressivamente incorporando as alterações em vias aéreas.

A definição atual envolve alterações histológicas tanto em grandes como em pequenas vias aéreas e espaços alveolares. Nas grandes vias aéreas, encontramos hiperplasia de células caliciformes e aumento de glândulas mucosas. Estas alterações são compatíveis com o quadro clínico de tosse e produção de muco, mas não se correlacionam com a piora da função pulmonar. Podemos observar a infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, principalmente em fases mais avançadas da doença (20).

Nas vias aéreas menores, também há infiltrado inflamatório, predominando macrófagos nas fases iniciais da doença e neutrófilos em fases mais avançadas. Pode haver metaplasia das células caliciformes e substituição das células de Clara, produtoras de surfactante, por células secretoras de muco e células inflamatórias. Pode haver ainda deposição de colágeno na parede celular e hipertrofia da musculatura lisa. Estes fatores contribuem para a obstrução da via aérea, juntamente com o edema, a produção de muco e o infiltrado inflamatório. A destruição de fibras elásticas que acompanha o desenvolvimento do enfisema também pode contribuir para intensificar a obstrução da via aérea. As fibras elásticas ancoradas aos bronquíolos exercem uma tração radial, aumentando seu diâmetro. Perdida esta tração pela quebra das fibras elásticas, a obstrução ao fluxo aéreo fica ainda mais proeminente (20).

No parênquima pulmonar observa-se a destruição heterogênea de diversas áreas, com infiltrado inflamatório de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os macrófagos parecem estar presentes nas fases mais iniciais da doença (48), enquanto os neutrófilos aparecem mais tardiamente. A

destruição de pequenas vias aéreas pode também contribuir para aumentar a resistência respiratória por reduzir o diâmetro transversal total do sistema condutor de ar.

1.5 Modelos animais

1.5.1 Modelos de DPOC

Com o objetivo de melhor compreender a evolução da doença e encontrar medidas terapêuticas, diversos modelos animais de DPOC foram desenvolvidos em diferentes espécies.

A instilação pulmonar de enzimas elastolíticas, como elastase neutrofílica, elastase pancreática porcina, papaína ou proteinase 3 é capaz de induzir enfisema em diversos modelos animais. O alargamento dos espaços aéreos que se segue à instilação de elastase surge em cerca de 1 mês, estabilizando-se a seguir. Há recrutamento agudo de neutrófilos e subagudo de macrófagos (49). A instilação de papaína também leva ao desenvolvimento de enfisema em cerca de 1 mês, com concomitante formação de novas fibras elásticas em parênquima pulmonar.

Camundongos geneticamente modificados também podem desenvolver enfisema, embora isto algumas vezes ocorra por uma incompetência do desenvolvimento pulmonar e não por uma destruição do pulmão maduro. Camundongos “Tight Skin” e “Pallid Mice” podem desenvolver alargamento dos espaços aéreos por apresentarem dificuldade na formação de fibras elásticas ou produzirem α 1-antitripsina em menor quantidade (50,51).

Diversos animais defectivos para determinadas proteínas, como PDGFA (fator de crescimento derivado de plaquetas A), FGFR (receptor do fator de crescimento de fibroblastos), fibulina, elastina e outras, podem sofrer deficiência do processo de alveolização, com alargamento dos espaços aéreos no pulmão ainda não maduro. Em outros modelos, usando animais deficientes em TIMP3 (inibidor tecidual das metaloproteinases) ou proteína surfactante D, o desenvolvimento do alargamento dos espaços aéreos ocorre após o nascimento do animal. Modelos de superexpressão de determinadas proteínas, como IL13, INF γ e MMP1 (Colagenase humana intersticial), também podem produzir enfisema (52).

Por outro lado, algumas deficiências protéicas podem proteger o animal do desenvolvimento do enfisema induzido por algum agressor. Isto ocorre nas deficiências de MMP12 (metaloproteinase 12), receptor tipo 1 da IL1 β e receptores tipo 1 e 2 do TNF α (52).

Diversos modelos de DPOC induzido por cigarro já foram criados, usando cães, cobaias, coelhos e ratos e camundongos (49). Os modelos com camundongos parecem ser particularmente úteis, pois permitem estudos dos mecanismos de desenvolvimentos das doenças. Há disponibilidade de marcadores de citocinas, bem como é possível usarmos linhagens geneticamente modificadas para avaliarmos o desenvolvimento da doença em condições biológicas distintas.

No entanto, a transposição dos resultados obtidos em camundongos para a doença humana requer cuidado, já que há grandes diferenças entre as espécies. Os camundongos respiram obrigatoriamente pelo nariz e a

maioria de suas células epiteliais nasais são olfatórias, com poucos cílios. Assim, podem ter menor eficiência na capacidade de filtrar partículas inaladas. Têm poucas glândulas submucosas, localizadas principalmente na traquéia. Não têm verdadeiras células caliciformes, mas apresentam células de Clara e células epiteliais ciliadas presentes em toda a via aérea. O sistema brônquico do camundongo tem um menor número de ramificações que o humano (49).

Os modelos de exposição ao cigarro mostram que os camundongos suportam bem a exposição à fumaça por cerca de um ano, tolerando níveis de carboxihemoglobina de 10-14% (35). Em 2 meses podem desenvolver alterações epiteliais com infiltrado inflamatório. Em 6 meses de exposição, podem apresentar alargamento de espaços aéreos e uma histologia semelhante à do enfisema humano (49).

1.5.2 Modelos usando poluição

A poluição e seus efeitos pulmonares também foram estudados em muitos modelos animais. A exposição de camundongos a SO₂ produz lesão em via aérea, mas não enfisema. Alguns autores tentaram combinar este modelo com instilação de elastase, para mimetizar os dois componentes encontrados na doença humana: enfisema e bronquite (53). Há também modelos que expõem animais à poluição ambiental e comparam-nos a animais mantidos em ambientes com ar filtrado (54). Alguns modelos expuseram animais a material particulado, O₃ e NO₂ (53). Os modelos de

exposição à poluição mostraram haver uma piora da lesão pulmonar induzida por outro agente (55).

No estudo dos efeitos da poluição, alguns autores passaram a usar uma suspensão de resíduos da queima de óleo (ROFA – “Residual Oil Fly Ash”). Este material pode ser facilmente manipulado e administrado aos animais por instilação nasal ou traqueal. A ROFA contém uma mistura de resíduos do combustível queimado, compostos de carbono e nitrogênio, sulfatos, silicatos e metais, como ferro, vanádio e níquel. Seus efeitos pulmonares parecem ser mediados por estresse oxidativo, estimulando a resposta inflamatória via NF- κ B, IL6, IL8, TNF α (56).

A ROFA pode ser um instrumento bastante prático para estudarmos lesões pulmonares induzidas por componentes dos poluentes atmosféricos. Sendo uma suspensão que pode ser armazenada, podemos desenvolver protocolos de exposição sem depender das variações climáticas e dos níveis de poluição que inevitavelmente ocorrem no ambiente.

1.6 Medidas de enfisema e bronquite

A definição de bronquite é clínica, como já explicitado anteriormente. Seu correspondente histopatológico caracteriza-se pelo aumento de muco, espessamento da parede de vias aéreas, deposição de fibras colágenas na parede da via aérea, aumento de glândulas submucosas, metaplasia epitelial e infiltrado inflamatório nas glândulas submucosas e no espaço peribroncovascular.

Há, portanto, várias medidas morfométricas que podemos fazer para identificar e quantificar a bronquite. No entanto, não sabemos bem qual a relação de cada uma destas medidas com o quadro clínico do paciente, ou com sua evolução.

Medir a quantidade de fibras elásticas e colágenas presentes na via aérea, o espessamento da parede brônquica, a área de glândulas mucosas ou infiltrado inflamatório contribui para o entendimento do processo fisiopatológico. Estas medidas podem também permitir que encontremos alternativas terapêuticas para a doença. Mas é importante lembrar que podem não corresponder exatamente à “bronquite”, uma vez que a definição desta é clínica.

Por sua vez, a definição de enfisema é anatomopatológica. Isto poderia permitir-nos encontrar medidas que caracterizem bem esta lesão, de modo a quantificar a evolução da doença. No entanto, as medidas de enfisema têm muitos problemas (57).

O Lm (Intercepto Linear Médio) é um marcador do grau de distensão alveolar presente no pulmão e pode ser calculado por técnicas morfométricas. Embora seja amplamente usado nos estudos experimentais, ele parece ser pouco sensível para a caracterização do enfisema. O Lm fornece um valor médio e, no enfisema, a distensão de espaços aéreos pode acompanhar-se de uma redução do diâmetro dos espaços aéreos vizinhos. Isto pode influenciar o valor médio da distensão alveolar, comprometendo a medida do Lm (58).

O índice de destruição é uma medida que procura analisar o número de alvéolos que tiveram interrupções nas suas paredes, classificando-os em três subgrupos. No entanto, a definição destas classificações não é muito clara. Embora tenha sido usada por alguns autores, esta medida fica sujeita a erro de preparo e coloração da lâmina, fazendo com que uma parede alveolar menos visível seja identificada como uma parede rompida.

Podemos caracterizar a distensão alveolar medindo a proporção da área de parênquima sobre área de espaços aéreos. No entanto, também esta medida fornece um valor médio da distensão alveolar e pode ficar prejudicada por uma eventual compressão de espaços aéreos vizinhos à área de destruição.

Estas medidas não fornecem uma análise compartimentalizada da lesão pulmonar. Em situações onde a destruição do parênquima concentra-se em determinada região do pulmão, uma medida que avalie a média de toda a área de parênquima tende a perder sensibilidade.

As medidas estereológicas podem nos permitir calcular a superfície alveolar total, considerada menos sujeita a erros do que as medidas de Lm. No entanto, são um pouco mais trabalhosas e também refletem uma média de todo o pulmão, não permitindo uma análise regional.

Portanto, apesar de podermos medir a evolução da histopatologia da DPOC com diferentes estratégias, encontramos vários problemas nestas mesmas medidas. Isto pode dificultar muito nossa interpretação sobre a fisiopatologia da doença.

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de lesão pulmonar em camundongos induzido pela exposição à fumaça de cigarro e à ROFA (“Residual Oil Fly Ash”), uma suspensão resultante da queima de material orgânico.

Tivemos como objetivo também estudar o tipo de alteração pulmonar produzida e explorar a possível interação entre os dois fatores agressores usados.

Por fim, exploramos alguns dos mecanismos pelos quais esta lesão pulmonar pode ocorrer.

3. Métodos

3.1 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram manejados de acordo com as orientações para cuidados com animais de laboratório, publicadas pelo NIH (59).

Utilizamos 48 camundongos fêmeas C57/Bl6, obtidos do biotério central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais tinham idades entre 6 a 8 semanas de vida ao saírem do biotério central e passaram por um período de ambientação no biotério do laboratório por 2 semanas.

Após este período, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o protocolo de exposição a que seriam submetidos:

- Salina 13 animais;
- Cigarro 12 animais;
- ROFA 10 animais;
- Cigarro/ROFA 13 animais.

As exposições, ao cigarro e/ou à ROFA ou à salina (NaCl 0,9%), duraram 2 meses, após o que os animais foram anestesiados e mortos para a obtenção dos dados de mecânica pulmonar e histologia.

Durante o período de exposição, os animais eram mantidos no biotério do laboratório em gaiolas próprias. Eram levados ao laboratório 5 dias por semana para a realização das exposições. No biotério, os animais recebiam água e ração apropriada sem restrições.

Por conveniência da medida ou problemas técnicos durante as análises, nem todos os animais foram usados em todas as medidas realizadas. O número de animais em cada medida será explicitado ao se descrever o método de cada uma das análises realizadas.

3.2 Exposição à suspensão de poluente (ROFA)

Para modelar a exposição ao poluente atmosférico, escolhemos administrar, por via nasal, uma suspensão de poluentes obtidos de uma caldeira. O precipitado da queima do combustível da caldeira do Hospital Universitário da USP (HU) foi recuperado, triturado e suspenso em solução fisiológica a uma concentração de 5 mg/ml, produzindo a ROFA (“Residual Oil Fly Ash”). Como discutido anteriormente, a ROFA já foi utilizada em estudos que objetivavam avaliar os efeitos da poluição ambiental (56).

A composição desta ROFA foi analisada por outro laboratório e é apresentada a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição da ROFA HU analisada pelo método de ativação de nêutrons

Elementos	Concentração na ROFA HU (µg/g)
AS	9,3 ± 1,0
Br	8,7 ± 0,6
Ca	5900 ± 40
Co	122,9 ± 3,1
Cr	32,4 ± 0,4
Cs	0,58 ± 0,04
Fe	3,28 ± 0,07
Hf	1,64 ± 0,03
Rb	11,4 ± 1,1
Sb	39,8 ± 0,7
Sc	1,111 ± 0,007
Se	20,5 ± 0,2
Th	3,07 ± 0,03
U	Não detectado
Zn	115,7 ± 1,5
La	972 ± 12
Ce	51,1 ± 0,4
Nd	33,1 ± 2,9
Sm	2,69 ± 0,08

A via de administração nasal foi escolhida por permitir um modelo de exposição crônica ao poluente com pouca manipulação do animal. O uso da ROFA permite ainda que, conhecida a composição do poluente, o protocolo seja mais reprodutível do que um modelo com exposição ambiental.

Os animais alocados para receber ROFA (grupos ROFA e Cigarro/ROFA) recebiam a administração de 10 µl da suspensão do poluente, intranasal, com a periodicidade de 5 dias por semana, durante os 2 meses de exposição. A suspensão de ROFA era armazenada em um congelador a -20° C, em pequenas alíquotas. Para a administração, o

material era descongelado, misturado e aspirado com uma pipeta automática. Após a administração, o material não usado era conservado em geladeira (-4° C). Como as alíquotas eram pequenas, o concentrado de poluente era mantido em geladeira por no máximo 3 dias. Após este período, nova amostra era descongelada.

Os animais alocados para não receber ROFA (grupos Salina e Cigarro), recebiam 10 µl de salina via intranasal com a mesma frequência dos animais que recebiam ROFA – 5 dias por semana, durante 2 meses.

3.3 Exposição à fumaça de cigarro

O protocolo de exposição à fumaça de cigarro foi realizado 5 dias por semana, durante 2 meses. Os animais alocados para receber exposição à fumaça de cigarro (grupos Cigarro e Cigarro/ROFA) eram mantidos na caixa de exposição durante 2 horas, nos dias de exposição. Os animais restantes (grupos Salina e ROFA) permaneciam em suas gaiolas.

As exposições eram realizadas em uma caixa de plástico de 28 l (Figura 1) (aproximadamente 40 x 27 cm na base, com altura de 26 cm), dentro de uma capela. O interior da caixa foi dividido ao meio com uma tela de metal para mantermos 2 grupos de camundongos separados. Na parte superior, colocamos um pequeno ventilador para homogeneizar o ar no interior da caixa. Havia 1 saída de ar e 2 entradas: uma para ar sintético e outra para fumaça de cigarro.

O fluxo na entrada de ar sintético era controlado por um fluxômetro conectado a um torpedo de ar comprimido e era mantido em 1,5 a 2 l/min. A

segunda entrada da caixa recebia uma mistura de ar sintético e fumaça de cigarro, que era aspirada por um sistema de Venturi conectado a um cigarro aceso. O fluxo laminar de ar sintético, passando por uma região de menor diâmetro, era acelerado, com conseqüente redução da pressão neste ponto (efeito Venturi), permitindo a aspiração da fumaça do cigarro. A redução na pressão que ocorre no ponto de redução do diâmetro do tubo é dependente do fluxo de ar mantido. Assim, controlando o fluxo de ar sintético na segunda entrada, controlávamos também a quantidade de fumaça de cigarro que era aspirada para a tubulação e enviada para o interior da caixa. Isto nos permitia regular a concentração de monóxido de carbono (CO) mantida na caixa, o que era medido por um sensor de CO (Toxi/Oxy Pro, Biosystems, Connecticut, EUA).

Figura 1 – Esquema ilustrativo da caixa de exposição. Os animais do grupo Cigarro e Cigarro/ROFA foram mantidos nesta caixa por 2 horas ao dia, 5 dias por semana, por 2 meses. A cada dia, invertíamos os grupos de lado para que a exposição fosse homogênea.

Após alguns testes iniciais, escolhemos manter o fluxo fixo de ar sintético na segunda entrada aproximadamente em 2,5 l/min. Isto produzia concentrações de CO variando entre 250 e 350 ppm, na maioria das medidas. Não podíamos manter o sensor de CO constantemente no interior da caixa, pois este aparelho perdia sua precisão com o tempo, por não ter sido desenvolvido para suportar longos períodos de uso.

Os cigarros utilizados eram da marca Derby vermelho (Souza Cruz) cuja composição é aqui apresentada (Tabela 2). Eram colocados em uma tubulação ligada a parte lateral do Venturi, para que sua fumaça fosse aspirada, e eram trocados antes que seu filtro começasse a queimar. Em cada dia de exposição, cerca de 40 cigarros eram consumidos, para mantermos a concentração de CO desejada no interior da caixa por 2 h.

Tabela 2 – Composição do cigarro marca Derby Vermelho, Souza Cruz

	Concentração
Alcatrão	10 mg/cigarro
Nicotina	0,8 mg/cigarro
Monóxido de carbono	10 mg/cigarro

Os níveis de carboxi-hemoglobina não foram monitorados nos animais do experimento, já que para tanto era preciso coletar grande parte de seu sangue. Dosamos a carboxi-hemoglobina em animais separados, submetidos ao mesmo protocolo: 2 h de exposição na caixa mantendo-se concentrações de CO entre 250 e 350 ppm. Nestes animais, os níveis de carboxi-hemoglobina foram aproximadamente de 23%. No entanto, todos os camundongos toleraram as exposições a estes níveis de CO por 2 meses

sem sinais de desconforto respiratório e sem manifestações aparentes de doença.

3.4 Avaliação da mecânica pulmonar

Após os 2 meses de exposição, os animais foram anestesiados com Thiopental (250 mg/kg intraperitoneal) e traqueostomizados. Inserimos uma cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil) pelo orifício da traqueostomia, que foi fixada com fio de algodão ao redor da traquéia. Os animais foram, então, conectados a um aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Quebec, Canadá) e ventilados com volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 2 Hz e curva de fluxo inspiratório senoidal. Para abolir seu esforço respiratório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg intraperitoneal). Quando não havia mais movimentação do animal, os dados para o cálculo da mecânica oscilatória foram obtidos. Para tanto, utilizamos um sinal que produzia oscilações do fluxo aéreo com diferentes frequências primas (0,25 a 19,625) por 16 segundos, mantendo-se a válvula expiratória fechada. Os valores de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) foi calculada como função das diferentes frequências produzidas.

Usando uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos, 3 blocos de 8 segundos foram usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória (60), segundo a equação:

$$Z(f) = \mathbf{Raw} + i(2\pi f)l_{aw} + \frac{[\mathbf{Gtis} - i\mathbf{Htis}]}{(2\pi f)^\alpha}$$

Neste modelo, $Z(f)$ é a impedância de via aérea em função da frequência, i é a unidade imaginária ($-1^{1/2}$), f é frequência, l_{aw} é a inertância de vias aéreas e $\alpha = (2/\pi) \cdot \arctan(\mathbf{Htis}/\mathbf{Gtis})$. Os parâmetros que buscamos para descrever o modelo pulmonar são **Raw** (resistência de vias aéreas maiores), **Gtis** (resistência de vias aéreas menores ou tecidos) e **Htis** (elastância de tecidos pulmonares).

Nesta análise, utilizamos os dados de 47 animais, pois em 1 caso não conseguimos que ocorresse completa paralisação muscular, o que impediu a regressão dos dados para o modelo matemático.

3.5 Histologia pulmonar – preparação

Depois de obtidos os dados para o cálculo da mecânica oscilatória, os animais foram mortos por secção da aorta abdominal. Os pulmões foram retirados e fixados com formalina 10%, infundida pela traquéia a uma pressão de 20 cmH₂O, que era mantida por 24 h, para homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar. Os pulmões eram, então, guardados em formalina 10% por até 7 dias, quando eram cortados e embebidos em parafina para a confecção de lâminas.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina, Resorcina-fucsina (para análise de fibras elásticas), Picrossírius (para a análise de fibras

colágenas) e também foram preparadas sem corantes para a realização posterior de imuno-histoquímica.

3.6 Imuno-histoquímica

Para a imuno-histoquímica, o material foi retirado da parafina e hidratado. A peroxidase endógena foi bloqueada e os antígenos foram recuperados com tripsina (para o Isoprostano 8) ou tampão de citrato (pH 6,0) a altas temperaturas (para os demais anticorpos). Utilizamos os seguintes anticorpos para as marcações específicas:

- Macrófagos: anticorpo IgG2a monoclonal de rato anti-macrófagos de camundongos, Mac2 (diluição 1:25000, Clone M3/M38, Código CL8942AP, Cedarlane Lab, Ontário, Canadá). Como anticorpo secundário foi usado o Vectastain Abc kit (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) para IgG de ratos, código PK 6104.
- Neutrófilos: anticorpo IgG2a monoclonal de rato anti-neutrófilos de camundongos (diluição 1:400, Código MCA771G, AbD serotec, Kidlington, Reino Unido). Como anticorpo secundário foi usado o Vectastain Abc kit (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) para IgG de ratos, código PK 6104.
- MMP12: anticorpo IgG policlonal de cabras anti-MMP12 (M-19) de camundongos (diluição 1:200, Código SC 8839, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). Como anticorpo secundário foi

usado o Vectastain Abc kit (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) para IgG de cabras, código PK 6105.

- Isoprostano 8: anticorpo policlonal de cabras anti-8-epi-PGF2a (diluição 1:1200, Código IS20, Oxford Biomedical Research, Oxford, Reino Unido). Como anticorpo secundário foi usado o Vectastain Abc kit (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) para IgG de cabras, código PK 6105.

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. Para o controle negativo da reação de imuno-histoquímica usamos albumina bovina no lugar dos anticorpos primários.

3.7 Morfometria

Medimos o Lm (intercepto linear médio), uma medida do grau de distensão alveolar, usando um microscópio óptico com uma grade de 50 retas acoplada à ocular do aparelho. Nas lâminas de pulmão coradas com hematoxilina-eosina, em um aumento de 200 vezes, contamos o número de intersecções entre o parênquima pulmonar e as retas desenhadas na ocular, em 10 diferentes campos por animal. No aumento de 200 vezes o comprimento somado das 50 retas usadas para a medida do Lm é 2500 μm . Portanto, o Lm para cada animal foi calculado dividindo-se 2500 pela média do número de intersecções dos 10 campos observados. Para esta medida, usamos as lâminas dos primeiros 23 animais expostos aos protocolos.

Fizemos ainda uma segunda medida da distensão alveolar, que denominamos Lm radial. Para tanto, usamos as lâminas de pulmão de todos os 48 animais, coradas com hematoxilina-eosina, observadas em um microscópio óptico acoplado a uma câmara JVC ligada a uma TV. O sistema microscópio-câmara-TV produzia um aumento de 390 vezes da imagem. Acoplamos uma grade radial desenhada em um papel transparente em frente à TV (Figura 2). Esta grade era composta de 5 semicírculos de mesmo centro e com raios que correspondem, no aumento de 390 vezes, a 50, 100, 150, 200 e 250 μm . O centro dos semicírculos era colocado no meio da borda distal da via aérea. Contávamos, então, o número de intersecções de cada semicírculo com o parênquima pulmonar, produzindo 5 valores de Lm para cada região analisada. Cada um destes valores refletia a distensão alveolar observada a 5 progressivas distâncias da via aérea observada. Medimos o Lm em 10 regiões diferentes para cada animal. Calculamos o Lm radial para cada distância dividindo o comprimento de cada uma das 5 linhas testes pela média do número de intersecções observadas naquele animal para cada uma das 5 distâncias. Isto nos permitiu analisar o grau de distensão alveolar produzido em diferentes regiões do parênquima pulmonar, classificadas de acordo com a distância da via aérea.

Figura 2 – Esquema usado para a medição do Lm radial. A grade com 5 semicírculos de mesmo centro e raios correspondentes a 50-250 μm foi usada. Colocávamos o centro dos semicírculos no meio da borda distal da via aérea e contávamos as intersecções das linhas com o parênquima pulmonar. O Lm era calculado dividindo-se o comprimento de cada linha pelo número médio de intersecções da linha correspondente com o parênquima pulmonar em 10 regiões diferentes, por lâmina. Isto produzia 5 valores de Lm por lâmina, permitindo avaliar a distensão alveolar a diferentes distâncias da via aérea.

3.8 Análise das células inflamatórias

Analizamos as células inflamatórias em 2 regiões diferentes do pulmão: o parênquima pulmonar; e o espaço peribroncovascular, uma região entre vaso e brônquio, formada por tecido conjuntivo frouxo, onde pode haver concentração de células inflamatórias recrutadas do espaço vascular migrando para a via aérea (Figura 3).

Figura 3 – Exemplo de foto com espaço peribroncovascular. As células foram contadas na TV, para uma melhor definição, e a imagem foi gravada em arquivo, para análise posterior. Isolamos a região do espaço peribroncovascular e calculamos sua área por contagem eletrônica de pixels, corrigido pelo aumento que o sistema microscópio-TV-computador produzia por meio de uma régua Zeiss.

Para a análise dos macrófagos e células MMP12 positivas no parênquima pulmonar, utilizamos o mesmo sistema microscópio-câmara JVC-TV que foi usado para o cálculo do Lm radial, com aumento total de 390 vezes. Contamos as células marcadas para macrófago (com anti-Mac2) e para MMP12 (com anti-MMP12) em 10 diferentes campos por animal. Utilizamos 45 animais para a análise de macrófagos e 39 para a análise de MMP12. O preparo das demais lâminas não ficou adequado. As imagens de cada campo eram gravadas em computador para análise posterior. Estas imagens foram analisadas usando o software ImageJ (NIH, Maryland, EUA) para determinarmos a área de parênquima presente em cada um dos 10 campos em que as células foram contadas. Para tanto, as imagens receberam uma correção do seu fundo e foram transformadas em binárias, usando um limiar de cor predeterminado que diferenciava adequadamente o parênquima pulmonar de espaços aéreos. Assim, determinamos a área de parênquima pulmonar presente naquela imagem, multiplicando a proporção

de parênquima pela área da lâmina analisada. Dividimos os números de células (macrófagos ou MMP12 positivas) contados na TV pela área de parênquima correspondente a cada campo contado, para obtermos o número de células marcadas corrigido por área de parênquima.

Para a contagem de neutrófilos utilizamos um microscópio óptico acoplado a uma grade de 100 pontos, com um aumento de 400 vezes. Utilizamos as lâminas de 44 animais. O preparo das demais lâminas não ficou adequado. O número de células marcadas (anti-neutrófilos) foi contado em 10 campos diferentes, bem como o número de pontos da grade que se sobrepunha a uma região de parênquima pulmonar. A contagem de pontos foi usada para estimar a área de parênquima observada em cada campo (61), multiplicando-se a proporção de pontos em parênquima (número de pontos em parênquima/100) pela área observada do campo. Assim, obtivemos o número de neutrófilos marcados corrigido pela área de parênquima, em 10 campos por animal.

Para a análise das células na região peribroncovascular, utilizamos o mesmo sistema de microscópio-câmara JVC-TV anteriormente descrito. Observamos 10 campos desta região por animal e contamos o número de macrófagos marcados (anti-Mac2) e neutrófilos marcados (anti-neutrófilos) em cada campo. Utilizamos as lâminas de 37 animais para a análise de macrófagos e de 39 animais para a análise de neutrófilos. O preparo histológico das demais lâminas não ficou adequado. As imagens usadas para a contagem manual foram gravadas em computador e posteriormente analisadas usando o software ImageJ (NIH, Maryland, EUA). Nesta análise,

delimitamos manualmente o espaço peribroncovascular e calculamos sua área. Assim, calculamos o número de células marcadas (neutrófilos ou macrófagos) corrigido pela área do espaço peribroncovascular em que foram observados.

3.9 Análise de fibras e estresse oxidativo

A análise das fibras colágenas e elásticas foi feita em um microscópio acoplado a uma câmara Nikon, ligada a um computador, com aumento de 200 vezes. Utilizamos lâminas de 39 animais para a análise de fibras colágenas e de 38 animais para a análise de fibras elásticas. O preparo histológico das demais lâminas não ficou adequado. Fotografamos 10 campos de parênquima e 5 campos de vias aéreas das lâminas coradas para fibras elásticas (Resorcina-fucsina) e fibras colágenas (Picrossírius).

As imagens foram analisadas usando o software ImageJ (NIH, Maryland, EUA). Para o cálculo das fibras em parênquima pulmonar, estabelecemos dois limiares de cores para transformar as imagens gravadas em binárias: um para as fibras (colágenas ou elásticas, de acordo com a coloração fotografada); e um para o parênquima pulmonar. Deste modo, calculamos a área, em cada imagem gravada, das fibras e do parênquima pulmonar. Obtivemos assim, a medida da proporção de fibras (colágenas ou elásticas) por área de parênquima pulmonar (Figura 4).

Figura 4 – Esquema da análise eletrônica das fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar. As imagens receberam uma correção de fundo e foram transformadas em binárias usando dois diferentes limiares (para as fibras e para o parênquima), em cada uma das colorações (para fibras elásticas ou colágenas). A região de cada limiar foi medida, obtendo-se a proporção de fibras por parênquima pulmonar.

Para a análise das fibras nas vias aéreas, determinamos o comprimento de cada via aérea fotografada traçando uma linha imaginária paralela à membrana basal. O comprimento desta linha foi usado como indicador do comprimento da via aérea. Posteriormente, usando uma grade de pontos sobreposta à imagem gravada da via aérea, contamos o número de pontos que se sobrepunham às fibras analisadas (elásticas ou colágenas, dependendo da coloração da lâmina fotografada) para obter a área de fibras

presentes no campo (61). Deste modo, obtivemos a área de fibras corrigida pelo comprimento da via aérea (Figura 5).

Figura 5 – Esquema da análise eletrônica das fibras colágenas e elásticas em via aérea. As imagens receberam correção de fundo e as vias aéreas foram isoladas. Calculamos o comprimento da via aérea traçando uma linha imaginária paralela à membrana basal. Calculamos a área de fibras (elásticas ou colágenas) usando uma grade de pontos sobreposta à imagem da via aérea e contando o número de pontos sobre as fibras. Deste modo, obtivemos a área de cada fibra (colágena ou elástica) corrigida pelo comprimento da via aérea.

A análise do estresse oxidativo foi feita em um microscópio acoplado a uma câmara Nikon e a um computador. Fotografamos pelo menos 5 vias aéreas por animal. Utilizamos as lâminas de 45 animais. As demais lâminas ficaram com preparação histológica insatisfatória.

As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (NIH, Maryland, EUA). Estabelecemos 2 limiares para transformar a imagem em binária: um limiar para a região marcada com anti-Isoprostano 8; e um segundo limiar, que marcava toda a via aérea do animal. Calculando a área destas duas imagens, obtivemos a área de área marcada com Isoprostano 8 corrigida pela área de via aérea.

3.10 Parede da via aérea e células epiteliais

Usando as fotografias de via aérea de lâminas de 39 animais previamente obtidas, calculamos um índice da espessura média da via aérea usando o software ImageJ (NIH, Maryland, EUA). As imagens foram transformadas em binárias com um limiar preestabelecido e as vias aéreas foram isoladas do parênquima pulmonar. A área de cada via aérea foi então calculada e corrigida pelo seu comprimento, determinado por uma linha imaginária desenhada paralelamente à membrana basal da via aérea.

Usando um microscópio óptico acoplado a uma grade de 100 pontos na ocular, com aumento de 1.000 vezes, analisamos as células epiteliais presentes nas vias aéreas em lâminas coradas com PAS/AB (Ácido Periódico de Schiff e Azul Alciano). Esta seqüência cora os componentes ácidos do muco em azul e os componentes neutros em vermelho (62). Utilizamos as lâminas de 40 animais aleatoriamente selecionados. Contamos os pontos sobrepostos às células epiteliais divididas em três tipos: ciliadas, produtoras de muco e não-ciliadas não-produtoras de muco. Assim, determinamos a área proporcional de cada um destes três tipos de células.

3.11 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software Minitab (Pennsylvania, EUA). Para a comparação dos 4 grupos, usamos o teste ANOVA 2 fatores, quando os dados eram paramétricos. Para a comparação dos dados não paramétricos usamos o teste Kruskal-Wallis. Consideramos as diferenças entre os grupos como estatisticamente significantes quando o valor de p para o erro alfa era menor que 0,05.

4. Resultados

4.1 Mecânica pulmonar

Resistência de vias aéreas (Raw), resistência de tecidos (Gtis) e elastância (Htis) foram medidas de acordo com o modelo de fase constante. Os dados foram transformados em potências da base 10 para reduzir sua dispersão (transformação logarítmica), permitindo que fossem tratados por uma análise paramétrica. Os pontos (Figura 6) representam os valores obtidos para cada animal e a linha representa a média dos valores do grupo.

Houve um aumento da resistência de vias aéreas nos animais submetidos à exposição ao cigarro (ANOVA 2 fatores: $p=0,01$ para o fator cigarro). Para os animais submetidos à exposição à ROFA, no entanto, a resistência de vias aéreas não apresentou alterações significativas.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para as medidas de resistência de tecidos e elastância do sistema respiratório. Ainda que pareça haver uma tendência à queda na elastância dos animais submetidos conjuntamente à exposição à ROFA e ao cigarro, esta diferença pode ter ocorrido ao acaso.

Figura 6 – Mecânica pulmonar nos 4 grupos de exposição. Os gráficos mostram resistência de vias aéreas (Raw), resistência de tecidos (Gtis) e elastância (Htis). Os pontos representam os valores individuais e os traços a média do grupo. Houve aumento de Raw nos animais expostos ao cigarro ($p=0,01$ para ANOVA 2 fatores). Não houve diferença significativa entre os grupos em Gtis e Htis.

4.2 Histologia – medidas de enfisema pulmonar

Para analisar o desenvolvimento de enfisema pulmonar, usamos duas medidas de distensão alveolar: o intercepto linear médio (Lm); e uma medida que denominamos Lm radial, onde verificamos a distensão alveolar a diferentes distâncias da via aérea (ver métodos).

Apresentamos exemplos de fotografias das lâminas coradas em hematoxilina-eosina de animais dos 4 grupos para exemplificar os resultados. As fotografias foram feitas na região periférica do parênquima pulmonar e na região central, próxima a uma via aérea, onde realizamos as medidas do Lm radial (Figura 7).

Figura 7 – Fotografias das regiões central e periférica pulmonar de animais representando os 4 grupos analisados. A medida do Lm foi feita em microscópio óptico acoplado-se, ao aparelho, uma ocular com uma grade de retas. A medida do Lm radial foi feita usando um microscópio acoplado à TV com uma grade de semicírculos concêntricos e com raios progressivos, posicionados no final da via aérea.

Não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação do Lm tradicional entre os 4 grupos (Figura 8). No entanto, utilizando o Lm radial, notamos um aumento da distensão alveolar a 100 μm da via aérea para os animais expostos ao cigarro (ANOVA 2 fatores: $p=0,034$). Os animais expostos ao cigarro e à ROFA parecem ter sido aqueles com maior distensão alveolar neste compartimento. A 150 μm da via aérea, houve aumento da distensão alveolar nos animais expostos à ROFA (ANOVA 2 fatores: $p=0,006$). Não houve diferenças estatisticamente significantes a outras distâncias (50, 200 e 250 μm) da via aérea (Figura 9).

Figura 8 – Histologia – Lm tradicional. Utilizamos uma grade de retas acoplada ao microscópio óptico. Os pontos representam os valores individuais e os traços a média do grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os quatro grupos.

Figura 9 – Histologia – Lm radial. Utilizamos uma grade com semicírculos concêntricos. O Lm foi medido, nos 4 grupos, a 5 distâncias progressivas da via aérea (50, 100, 150, 200 e 250 μm). Os pontos representam os valores individuais e o traço, a média do grupo. Notou-se aumento do Lm a 100 μm associado ao fator cigarro (ANOVA 2 fatores, $p=0,034$) e a 150 μm para o fator ROFA ($p=0,006$).

4.3 Histologia – células inflamatória em parênquima

Nas análises de células inflamatórias, comparamos o número de neutrófilos, macrófagos e macrófagos expressando MMP12 marcados por imuno-histoquímica em parênquima pulmonar. Os dados são apresentados em número de células por área de parênquima. Os neutrófilos e macrófagos também foram quantificados no espaço peribroncovascular. Neste caso, os dados são apresentados em número de células por área deste espaço.

Não houve diferenças na quantidade de macrófagos (Figura 10) ou neutrófilos (Figura 11) presentes no parênquima pulmonar ou no espaço peribroncovascular.

Figura 10 – Macrófagos marcados com Mac-2 em parênquima pulmonar e no espaço peribroncovascular. Os pontos representam os valores individuais e o traço, a média do grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas duas regiões analisadas.

Figura 11 – Neutrófilos marcados com anticorpos anti-neutrófilos de camundongos em parênquima pulmonar e no espaço peribroncovascular. Os pontos representam os valores individuais e o traço, a média do grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas duas regiões analisadas.

Não houve também diferença estatisticamente significativa no número de macrófagos marcados com anti-MMP12 no parênquima pulmonar (Figura 12).

Figura 12 – Macrófagos expressando MMP12 no parênquima pulmonar. Os pontos representam os valores individuais e o traço, a média do grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.4 Histologia – análise das fibras elásticas e colágenas

Analizamos a presença de fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar e na via aérea com colorações específicas. As fibras no parênquima pulmonar foram comparadas a partir de um índice obtido através da divisão da área da fibra (colágena ou elástica) pela área de parênquima pulmonar (Figura 13). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

As fibras na via aérea foram analisadas usando-se um índice obtido pela divisão da área da fibra (colágena ou elástica) pelo comprimento da via aérea (Figura 14). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Figura 13 – Fibras elásticas e colágenas em parênquima pulmonar. A análise feita foi automatizada, estabelecendo-se 2 limiares (para as fibras e para o parênquima pulmonar) nas fotografias das lâminas coradas para fibras elásticas ou colágenas. Os pontos representam os valores individuais e o traço, a média do grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para fibras elásticas ou colágenas no parênquima pulmonar.

Figura 14 – Fibras elásticas e colágenas na via aérea. A análise foi automatizada, com limiares para cada fibra nas fotografias das lâminas coradas. Estabelecemos também um limiar, na fotografia, para a via aérea e usamos um algoritmo para estimar o comprimento da via aérea usando uma linha imaginária, traçada paralelamente à membrana basal. Os pontos representam valores individuais e o traço, a média do grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para as fibras colágenas ou elásticas.

Exemplos de fotografias do parênquima pulmonar e via aérea coradas para fibras elásticas e colágenas são apresentados a seguir (Figura 15).

Figura 15 – Exemplos de fotografias das regiões de via aérea e parênquima pulmonar. Estas lâminas foram coradas para fibras elásticas (Resorcina-fucsina) e colágenas (Picrosirius).

4.5 Histologia – parede de via aérea e células epiteliais

A análise da espessura da parede foi feita estabelecendo-se um limiar para a parede de vias aéreas e corrigindo-se a área calculada desta parede pelo comprimento da via aérea (Figura 16). Houve aumento na espessura da parede da via aérea, medida por este índice, nos animais expostos ao cigarro (ANOVA 2 fatores: $p=0,006$). Não houve aumento da espessura de via aérea associada à exposição do fator ROFA. Apresentamos imagens de vias aéreas de cada grupo obtidas das lâminas coradas com Picrosirius para exemplificar os resultados observados (Figura 17).

Figura 16 – Espessura da parede de via aérea medida de maneira automatizada. Estabelecemos um limiar para a parede de via aérea, calculando a área da parede e corrigindo-a por seu comprimento, medido por meio de uma linha imaginária, traçada acompanhando a membrana basal. Os pontos representam os valores individuais e o traço, a média do grupo. Houve aumento da espessura da parede das vias aéreas nos animais expostos ao cigarro (ANOVA 2 fatores: $p=0,006$).

Figura 17 – Exemplos de vias aéreas fotografadas nas lâminas coradas com Picrossíus. Estes exemplos mostram o aparente espessamento da parede de via aérea nos grupos expostos ao cigarro. Este aumento parece ter ocorrido principalmente pelo espessamento das células epiteliais.

A análise das células epiteliais mostrou que ocorre uma significativa mudança no padrão celular da parede da via aérea (Figura 18). Houve um aumento da área de células epiteliais nos animais expostos ao cigarro ou à ROFA (Kruskal-Wallis: $p < 0,001$). Houve ainda uma redução da área de células ciliadas principalmente nos animais expostos somente ao cigarro (Kruskal-Wallis: $p = 0,003$). Os animais expostos apenas à ROFA parecem não ter tido esta redução na área de células ciliadas. Os animais expostos ao cigarro e à ROFA parecem ter tido uma redução menor desta área do que aqueles expostos somente ao cigarro. Notamos ainda um aumento da área

de células não-ciliadas não-secretoras principalmente nos animais expostos ao cigarro (Kruskal-Wallis: $p=0,003$).

Figura 18 – Análise das células epiteliais em microscópio óptico por contagem de pontos. Os pontos representam os valores individuais e o traço, a mediana do grupo. Houve aumento da área de células epiteliais nos animais expostos à ROFA e ao cigarro (Kruskal-Wallis: $p<0,001$). Houve redução da área de células ciliadas nos animais expostos somente ao cigarro, o que parece ter sido atenuado pela exposição conjunta à ROFA (Kruskal-Wallis: $p=0,003$). Houve também um aumento na área de células não ciliadas não secretoras principalmente nos animais expostos ao cigarro (Kruskal-Wallis: $p=0,003$).

4.6 Histologia – Análise do estresse oxidativo

Analizamos a presença do estresse oxidativo em lâminas coradas com anti-Isoprostano 8 comparando a área corada com o marcador corrigida pela área de via aérea. Não houve diferenças entre os grupos (Figura 19).

Figura 19 – Análise do estresse oxidativo usando anti-Isoprostano 8. Os pontos representam os valores individuais e o traço a mediana do grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

5. Discussão

Este trabalho demonstrou a lesão pulmonar inicialmente produzida pela exposição de cigarro e ROFA em camundongos. Encontramos aumento de resistência de vias aéreas (Raw) nos animais que receberam exposição ao cigarro, que também apresentaram espessamento da parede de vias aéreas.

Na análise do epitélio, observamos que o espessamento da parede de vias aéreas ocorria principalmente por mudanças na camada celular. Notamos um aumento na área total de células nos animais que receberam exposição a qualquer um dos fatores, ROFA ou cigarro. Este aumento parecia maior nos animais expostos aos dois fatores simultaneamente.

Houve redução da área ocupada por células ciliadas nos animais expostos ao cigarro, com aumento da área ocupada por células não-ciliadas, não-secretoras. Os animais expostos somente à ROFA, porém, não apresentaram alteração da área de células ciliadas, mas tiveram um discreto aumento na área de células não-ciliadas, não-secretoras. Não encontramos células secretoras de muco nestes animais (dado não mostrado) ou a presença de muco em via aérea.

Houve um aumento da distensão alveolar associada à exposição ao cigarro que parecia estar apenas presente a 100 μm da via aérea. Por outro lado, houve um aumento da distensão alveolar associada à exposição à ROFA presente apenas a 150 μm da via aérea. Na medida de Lm tradicional, que marca a distensão média em todo o parênquima pulmonar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Interessantemente, não conseguimos detectar a presença de infiltrado de neutrófilos, macrófagos ou macrófagos expressando MMP12 no

parênquima pulmonar dos animais expostos à ROFA ou ao cigarro. Não houve também aumento do infiltrado de macrófagos ou neutrófilos na região peribroncovascular, onde esperávamos que houvesse migração leucocitária dos vasos para as vias aéreas.

Não detectamos a presença de remodelamento, medida pela deposição de fibras elásticas e colágenas, no parênquima ou na via aérea destes animais. Também não detectamos aumento do estresse oxidativo, marcado pelo Isoprostano 8, na via aérea dos grupos que receberam ROFA ou cigarro.

5.1 Desenvolvimento do enfisema

Estes dados mostram a evolução da lesão pulmonar em uma fase precoce da instalação da DPOC. Na maioria das vezes, a doença manifesta-se apenas após longos períodos de exposição ao agente agressor.

Em modelos animais, o desenvolvimento do enfisema pulmonar medido pelo Lm, requer vários meses de exposição. A maioria dos protocolos de DPOC induzido por exposição de camundongos à fumaça de cigarro utiliza períodos de exposição entre 6 e 12 meses (28,35,63,64,65,66). Portanto, é necessária uma exposição durante grande parte da vida do animal para que haja a instalação da doença.

Há poucos modelos que mostraram enfisema com tempos de exposição menores. Bartalesi mostrou um discreto aumento no Lm com 3 meses de exposição (67) para animais C57/Bl6 e DBA/2, que têm um menor poder antioxidante. Takubo mostrou o aumento de Lm em 4 meses de

exposição ao cigarro em camundongos “Pallid mice” , que têm menor concentração de α 1-antitripsina. Por sua vez, os animais C57/Bl6 apenas desenvolviam aumento do Lm com 6 meses de exposição (66). Kasagi conseguiu demonstrar um aumento de Lm com 2 meses de exposição ao cigarro, usando um camundongo com uma taxa de envelhecimento acelerada (68).

Portanto, os dados encontrados neste trabalho são compatíveis com o desenvolvimento do enfisema em camundongos publicados em outros estudos. O tempo de exposição que usamos, 2 meses, não é suficientemente longo para produzir uma lesão detectável pelas medidas tradicionais (Lm). No entanto, foi possível observar alargamento dos espaços aéreos em determinados compartimentos pulmonares, definidos pela distância em relação à via aérea.

Isto sugere que a lesão que se desenvolve no pulmão é heterogênea, concentrando-se principalmente nas regiões próximas às vias aéreas. Para os animais expostos à fumaça de cigarro, a distensão aérea ocorreu predominantemente a 100 μ m da via aérea. Para os animais que receberam ROFA, a distensão localizou-se principalmente a 150 μ m do mesmo ponto de referência (Figura 9).

Neste aspecto, este modelo aproxima-se do enfisema humano induzido por cigarro, no qual a lesão em parênquima pulmonar mais freqüente é denominada centroacinar, próxima à via aérea terminal.

A exposição à ROFA provocou alargamento dos espaços aéreos em uma região ligeiramente mais distal que a exposição ao cigarro. Embora esta

diferença possa ter ocorrido por variação amostral, é possível que indique que o local de acometimento dos diferentes estímulos seja distinto e talvez mediado por diferentes mecanismos. A co-exposição da ROFA e cigarro parece ter aumentado o grau de distensão alveolar encontrado a 100 μ m da via aérea distal, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa (Figura 9).

O uso do Lm radial permitiu que identificássemos regiões de maior distensão alveolar no parênquima pulmonar e que observássemos diferenças na distensão produzida por cada um dos agentes agressores, como discutido acima. Isto não foi possível usando o Lm tradicional. O Lm radial permitiu, ainda, que identificássemos uma lesão pulmonar em um grau ainda não detectável pelo Lm tradicional. A diferença entre os resultados encontrados pelos 2 métodos pode ser explicada pela heterogeneidade da lesão pulmonar provocada. O Lm tradicional, medido a partir de uma média de toda a região do parênquima, pode perder sensibilidade para detectar enfisema quando o alargamento de espaços aéreos concentrar-se em uma determinada região do pulmão.

5.2 Células inflamatórias

Apesar de observarmos discreto alargamento dos espaços aéreos, espessamento da parede de via aérea com aumento de resistência e alterações no epitélio de via aérea, não observamos recrutamento de células inflamatórias.

Não houve diferenças estatisticamente significantes no número de macrófagos, neutrófilos ou macrófagos marcados com anti-MMP12 no parênquima pulmonar. Não houve, também, diferenças no número de macrófagos ou neutrófilos encontrados no espaço peribroncovascular.

De certa forma, este resultado é surpreendente, pois esperávamos encontrar recrutamento celular nas fases iniciais da doença. Se as células inflamatórias são as mediadoras e sinalizadoras dos mecanismos efetores que realizam a destruição alveolar, deveriam estar presentes no início do processo fisiopatológico.

No entanto, como já discutido anteriormente, enquanto alguns estudos mostram aumento de macrófagos, linfócitos ou neutrófilos no parênquima de pacientes com DPOC (23,24,25,26,28,29,30,31,32,34,36), esta observação não foi universal para todas estas células. Alguns autores não encontraram a presença de macrófagos no parênquima de fumantes com DPOC inicial (31,34) enquanto outros não encontraram a presença de neutrófilos (29,30,31,32) ou de linfócitos (34) nestes pacientes. Embora a maioria destes estudos tenha identificado pelo menos um tipo de célula inflamatória nos pacientes com DPOC, o tipo celular predominante não é o mesmo em todos os casos. Estas diferenças podem ocorrer por variações amostrais.

Porém, ainda que as células inflamatórias pareçam essenciais para o desenvolvimento do enfisema, seus tempos de aparecimento e sua exata contribuição não estão totalmente esclarecidos.

Os modelos animais de exposição crônica também mostram discordâncias. Alguns autores mostram aumento de macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar com 6 meses de exposição (28). Outros pesquisadores, analisando as células inflamatórias no parênquima pulmonar de diferentes linhagens de camundongos, mostraram pequena resposta inflamatória, em apenas algumas linhagens, após 6 meses de exposição ao cigarro (63).

Em uma revisão sobre os mecanismos celulares para o desenvolvimento do enfisema, Di Stefano ilustra em tabelas estas incongruências na identificação das células inflamatórias em pacientes com DPOC e propõe um modelo temporal. As células inicialmente recrutadas seriam os macrófagos e linfócitos, predominantemente encontrados em pacientes com DPOC leve. Em fases mais avançadas da doença, neutrófilos e macrófagos seriam recrutados, enquanto linfócitos seriam menos encontrados (69). Muitos outros autores concordam com esta interpretação temporal da resposta inflamatória na DPOC, atribuindo um papel central aos macrófagos, que estariam inicialmente presentes e sinalizariam para os demais mecanismos de lesão (17,20). Os neutrófilos poderiam aparecer apenas em uma fase mais tardia da evolução da doença.

Entretanto, modelos animais de exposição aguda ao cigarro mostram recrutamento tanto de neutrófilos como de macrófagos para a via aérea, detectados pelo lavado broncoalveolar (27,70).

Não sabemos ao certo como ocorre a evolução desta inflamação aguda observada nos estudos experimentais para o processo inflamatório crônico. É possível que o recrutamento celular encontrado nesta fase desapareça e o processo inflamatório secundário à exposição crônica reapareça mais tardiamente, com um papel fisiopatológico diferente.

O modelo animal do presente trabalho utiliza uma exposição ao cigarro e/ou à ROFA por 2 meses. É um modelo de exposição crônica no qual podemos observar as alterações fisiopatológicas iniciais do processo de lesão. A ausência de infiltrado inflamatório que encontramos é compatível com alguns outros modelos animais crônicos, que também analisaram inflamação no parênquima pulmonar (63). No entanto, não parece compatível com os modelos agudos e com modelos crônicos que analisaram infiltrado inflamatório no lavado broncoalveolar (27,28,70).

Não analisamos o lavado broncoalveolar neste estudo. Embora seja possível haver infiltrado inflamatório na luz da via aérea sem que este esteja presente no parênquima pulmonar ou no eixo peribroncovascular, parece improvável que estas células inflamatórias tenham desencadeado as lesões observadas neste estudo. É possível que outros mecanismos tenham produzido a distensão de espaços aéreos observada e talvez mesmo as alterações em vias aéreas.

Neste cenário, a resposta inflamatória poderia participar de uma fase posterior da fisiopatologia da doença, como resposta a infecções, reparo celular e apoptose.

5.3 Mecânica pulmonar e alterações epiteliais

Contrariamente ao que esperávamos, não houve uma redução na elastância pulmonar. Embora notemos uma tendência à queda no Htis (Elastância de tecidos) nos animais expostos à Cigarro/ROFA, esta diferença não é estatisticamente significativa.

É possível que isto represente uma alteração inicial da mecânica pulmonar e tempos maiores de exposição poderiam produzir um sinal mais claro nesta medida da função pulmonar. Como o alargamento de espaços aéreos que detectamos é pequeno, não perceptível com medidas histológicas tradicionais, é possível que a elastância pulmonar, que também é um valor médio para todo o parênquima pulmonar, ainda não tenha se modificado.

Por outro lado, houve aumento da resistência de vias aérea (Raw) nos grupos expostos à ROFA e ao cigarro. Esta alteração é compatível com o espessamento da parede de via aérea encontrado na análise histológica, principalmente nos animais expostos ao cigarro.

Esta combinação sugere que, na lesão inicial provocada pela exposição ao cigarro, o fator responsável pela redução do fluxo aéreo seja o aumento da resistência de vias aéreas, possivelmente causado pelo espessamento da parede destas. Provavelmente, a destruição de fibras elásticas e o

alargamento dos espaços aéreos contribuem muito pouco para a limitação do fluxo aéreo nesta fase da doença.

O espessamento da parede da via aérea nestes animais ocorreu principalmente por alterações nas células epiteliais. Observamos redução da área de células ciliadas, mas aumento da área de células totais presentes no epitélio. No entanto, não encontramos células produtoras de muco. O aumento da área de células totais ocorreu pela expansão da área de células não-ciliadas, não-secretoras.

As células epiteliais estão entre as primeiras barreiras que o pulmão oferece aos agressores externos. Não têm apenas funções de revestimento ou produtoras de muco, mas podem ter importante papel de interação com outras células. Podem ser ativadas pelo fumo e produzir TGF β , TNF α , GM-CSF, IL8, IL1 β . Deste modo podem ser os sinalizadores iniciais de que o processo de agressão ao sistema respiratório continua, atraindo as células inflamatórias, controlando os fatores de crescimento (epitelial e endotelial), regulando o estresse oxidativo e o reparo pulmonar.

Em nosso estudo, que permite analisar uma fase inicial do processo de lesão pulmonar crônica, parecem ter sido as primeiras células a sofrer alterações. Podemos especular que estas células sejam centrais no desenvolvimento da DPOC. Há evidências de que participam do mecanismo de resposta imune inato, secretando inibidores de proteases, fatores opsonizantes, enzimas, peptídeos permeabilizantes, entre outras. Podem ainda, cooperar com as células dendríticas e linfócitos para estimular a resposta imune adaptativa (71).

Portanto, podemos imaginar que as células epiteliais estariam comandando a resposta ao agressor externo. Podem ser também responsáveis por estimular o recrutamento de células inflamatórias em uma fase seguinte da lesão pulmonar.

As células epiteliais podem, ainda, sofrer apoptose. A instilação de caspase 3 intratraqueal é capaz de induzir este fenômeno nas células epiteliais e alterações compatíveis com enfisema em camundongos. A remoção das células que evoluíram com apoptose é importante para limitar o estímulo ao processo inflamatório. Deste modo, é possível que o cigarro estimule a apoptose das células epiteliais e dificulte os fenômenos de remoção das células mortas. Isto poderia estimular o processo inflamatório, talvez em uma fase mais avançada, e contribuir para o processo fisiopatológico (72).

Por fim, a produção de VEGF parece ser importante para a adequada manutenção da estrutura do parênquima pulmonar. Pacientes com DPOC têm menor quantidade de VEGF e o bloqueio deste sinalizador é capaz de induzir enfisema em camundongos. Este processo também pode explicar, em parte, o desenvolvimento do enfisema sem a associação com o processo inflamatório. Neste sentido, o cigarro poderia contribuir para inibir a produção normal de VEGF e, desta forma, contribuir para gerar alargamento nos espaços aéreos (43).

5.4 Remodelamento, estresse oxidativo e muco

Não encontramos sinais de remodelamento no parênquima ou na via aérea dos animais expostos ao cigarro ou à ROFA. A destruição de fibras colágenas e elásticas pode iniciar-se em uma fase bem precoce da exposição ao cigarro (27). No entanto, a deposição de novas fibras colágenas e elásticas parece ser um processo mais lento.

Neste modelo, representando fases iniciais da lesão pulmonar crônica, o remodelamento de fibras aparentemente ainda não se iniciou.

Não encontramos também evidências de estresse oxidativo, medido a partir do Isoprostano 8. É possível que este mecanismo também não faça parte da lesão inicial produzida por agressores ao pulmão e o espessamento da parede de via aérea e o alargamento dos espaços aéreos sejam mediados por outros mecanismos.

Não medimos outros marcadores do estresse oxidativo, como óxido nítrico. No entanto, as evidências de estresse oxidativo no paciente com DPOC sugerem haver produção de Isoprostano 8 (17), o que nos sugere que este mecanismo fisiopatológico não se iniciou nesta fase da doença.

Por fim, não encontramos muco na via aérea destes animais ou mesmo aumento de células secretoras. Este achado também pode sugerir que esta seja uma alteração mais tardia no desenvolvimento da doença. No entanto, é importante considerar que os camundongos, diferentemente do homem, não têm células caliciformes verdadeiras (49) e que a lavagem das lâminas durante o preparo também pode ter contribuído para eliminar o muco das vias aéreas. Deste modo, não podemos concluir se a ausência de muco

ocorreu por este não estar presente nesta fase da doença ou por limitações das técnicas utilizadas.

5.5 Limitações do estudo

Neste estudo, há algumas limitações que devemos apontar.

O uso de modelos animais pode trazer uma série de vantagens para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos de determinadas doenças. Mas ainda que grande parte das respostas biológicas sejam altamente conservadas entre as diferentes espécies, há características próprias de cada tipo de animal que podem não se aplicar ao homem. Várias das diferenças anatômicas pulmonares entre camundongos e homens foram explicitadas na introdução deste trabalho. Porém, é possível que existam muitas outras diferenças entre as duas espécies, no tocante a resposta inflamatória, sinalização intercelular, entre outras. Deste modo, é possível que os mecanismos de lesão presentes em um modelo animal não sejam os mesmos encontrados no modelo humano.

A análise estatística usada foi ANOVA, aceitando-se um erro tipo I de 0,05. No entanto, quando aceitamos a igualdade entre diversas condições medidas – quantidade de células inflamatórias, presença de remodelamento ou estresse oxidativo – toleramos o erro tipo II, menos controlado e de maior monta. Assim, é possível que existam diferenças entre algumas destas variáveis que não foram detectadas pela presença de grande variabilidade biológica.

A análise das células inflamatórias foi uma análise quantitativa. Estas células, porém, são capazes de secretar uma série de proteínas que podem destruir a matriz extracelular ou enviar sinais para outras células. Com exceção da MMP12, não avaliamos outros mediadores produzidos pelas células inflamatórias. É possível que o efeito produzido por elas não requeira o aumento de seu número e ainda assim seja fundamental nesta fase da doença. Ainda é possível que exerçam um efeito multiplicador ao enviarem sinais para outras células. Deste modo, seu número pode estar muito pouco aumentado – de maneira que não consigamos verificar este aumento –, mas seu efeito, por se multiplicar nas demais células, pode ser essencial para o processo fisiopatológico.

Por fim, gostaríamos de destacar a possível presença de um viés de seleção dos parâmetros a serem analisados. Em um modelo experimental como este, onde várias análises são feitas (mecânica pulmonar, medidas de enfisema, análise do epitélio e outras) é possível que algum parâmetro, por variação biológica, apresente-se estatisticamente diferente entre os grupos, sem o estar na real população teórica que pretendemos representar. Ao avaliar muitos parâmetros, destacaremos aquele em que notarmos esta diferença.

Embora isto possa ter ocorrido neste estudo, o espessamento da parede de via aérea foi reproduzido em diferentes medidas e é compatível com o aumento da resistência de vias aéreas e a alteração epitelial. A manutenção da coerência entre estes parâmetros, em que observamos diferenças entre os grupos, minimiza a possibilidade deste viés. No entanto,

a reprodução destes dados em outro experimento garantiria um menor risco deste erro.

5.6 Considerações finais

Este trabalho demonstrou algumas alterações em parênquima e via aérea, induzidas pela exposição à fumaça de cigarro e à ROFA, que não foram acompanhadas por recrutamento de macrófagos, neutrófilos ou aumento de Isoprostano 8.

Estes dados sugerem que a lesão inicial do processo de doença crônica não parece ser desencadeada por inflamação pulmonar ou estresse oxidativo. É possível que a célula epitelial desempenhe um papel fundamental neste cenário, sinalizando para as demais células a agressão que o sistema respiratório está sofrendo.

Este modelo pode ser bastante útil para estudarmos os mecanismos iniciais do desenvolvimento da DPOC. Conhecendo-os melhor, poderemos encontrar diferentes vias terapêuticas que nos permitam reduzir o impacto de morbi-mortalidade imposto por esta doença.

Nosso grupo continuará a explorar este modelo, analisando outros marcadores que podem indicar diferentes mecanismos fisiopatológicos. Pretendemos verificar a presença de linfócitos, TGF β , EGF e VEGF, que podem participar do desenvolvimento da DPOC e poderiam estar presentes em fases iniciais da doença.

6. Conclusões

Neste estudo, estabelecemos um modelo de lesão pulmonar induzida por cigarro e ROFA em uma fase ainda inicial da DPOC. Pudemos observar indícios de um enfisema inicial, presente próximo à via aérea; um aumento de resistência de vias aéreas; e espessamento da parede de via aérea, acompanhado por modificações nas células epiteliais. Estas alterações não foram acompanhadas de inflamação em parênquima ou via aérea, remodelamento ou estresse oxidativo.

7. Bibliografia

¹ GOLD 2006 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Executive Summary: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Available in <http://www.goldcopd.com>

² Akhtar T, Ullah Z, Khan MH, Nazli R. Chronic Bronchitis in women using solid biomass fuel in rural Peshawar, Pakistan. *Chest* 2007;132:1472-1475.

³ Smith KR. National burden of disease in India from indoor air pollution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13286-13293.

⁴ Liu S, Zhou Y, Wang X, Wang D, Lu J, Zheng J, Zhong N, Ran P. Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. *Thorax* 2007;62:889-897.

⁵ Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Pérez-Padilla R, Regalado J, Velázquez A, Sánchez C, Mayar ME. Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:393-397.

⁶ Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Resp J* 2006;28:523-532.

⁷ Menezes AMB, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Oca MM, Talamo C, Hallal PC, Victoria CG. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005;366:1875-1881.

⁸ Menezes A, Macedo SC, Gigante DP, da Costa JD, Olinto MT, Fiss E, Chatkin M, Hallal PC, Victora CG. Prevalence and risk factors for chronic obstructive pulmonary disease according to symptoms and spirometry. *COPD* 2004;1:173-179.

⁹ Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 2007;30:993-1013.

¹⁰ Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:196-205.

¹¹ Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:675-679.

¹² Schikowski T, Suigiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Krämer U. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res* 2005;6:152-161.

¹³ Viegi G, Maio S, Pistelli F, Baldacci S, Carrozzi L. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: Health effects of air pollution. *Respirology* 2006;11:523-532.

¹⁴ Anderson HR, Spix C, Medina S, Schouten JP, Castellsague J, Rossi G, Zmirou D, Touloumi G, Wojtyniak B, Ponka A, Bacharova L, Schwartz J, Katsouyanni K. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project. *Eur Respir J* 1997;10:1064-1071.

¹⁵ Yang Q, Chen Y, Krewski D, Burnett R, Shi Y, McGrail M. Effect of short-term exposure to low levels of gaseous pollutants on chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *Environ Res* 2005;99:99-105.

¹⁶ Feenstra TL, van Genugten MLL, Hoogenveen RT, Wouters EF, Rutten-van Mölken MPMH. The impact of Aging and Smoking on the Future Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A model analysis in the Netherlands. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:590-596.

¹⁷ Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672-688.

-
- ¹⁸ Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen F, Schnohr P. Relation of ventilatory impairment and of chronic mucus hypersecretion to mortality from obstructive lung disease and from all causes. *Thorax* 1990;45:579-585.
- ¹⁹ Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur Respir J* 1995;8:1333-1338.
- ²⁰ Shapiro SD, Ingênito EP. The Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Advances in the Past 100 Years. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:367-372.
- ²¹ Dhami R, Gilks B, Xie C, Zay K, Wright JL, Churg A. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by α 1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:244-252.
- ²² Sparrow D, Glynn RJ, Cohen M, Weiss ST. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest* 1984;86:383-386.
- ²³ Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1277-1285.

-
- ²⁴ Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:911-917.
- ²⁵ Kuschener WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Resp J* 1996;9:1989-1994.
- ²⁶ Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, Ghafouri MA, Oehlerking M, Rennard SI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1527-1537.
- ²⁷ Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:368-374.
- ²⁸ Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol* 2003;163:2329-2335.
- ²⁹ O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis inverse relationship of

CD8 T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:852-857.

³⁰ Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, Boschetto P, Fabbri LM, Saetta M. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:629-632.

³¹ Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8t lymphocytes in peripheral airways of smokers with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:822-826.

³² Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo A, Potena A, Caccia A, Fabbri Lm. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:301-106.

³³ Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1666-1672.

³⁴ Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the

bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1633-1639.

³⁵ Hautamaki RD, Kobayashi DK, Sênior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277:2002-2004.

³⁶ Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliot WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-2653.

³⁷ Van der Strate BWA, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van den Berg A, Timens W, Kerstjens HAM. Cigarette smoke-induced emphysema. A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:751-758.

³⁸ Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, Pavord ID. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Lancet* 2000;356:1480-1485.

-
- ³⁹ Keatings VM, Barnes PJ. Granyocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:449-453.
- ⁴⁰ Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, van Krieken HJM. Transforming growth factor β 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1951-1957.
- ⁴¹ Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Nakahara K, Umeda A. Increased expression of transforming growth factor- β 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1476-1483.
- ⁴² MacNee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S58-S65.
- ⁴³ Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel N. Inhibition of VEGF receptors cause lung cell apoptosis an emphysema. *J Clin Invest* 2000;106:1311-1319.

-
- ⁴⁴ Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini S, Voelkel NF, Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:88-97.
- ⁴⁵ Rennard SI, Togo S, Holz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair. A mechanism for the development of emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:703-708.
- ⁴⁶ Henson PM, Vandivier W, Douglas IS. Cell death, remodeling and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:713-717.
- ⁴⁷ Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006;7:53-62.
- ⁴⁸ Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974;291:755-758.
- ⁴⁹ Shapiro SD. Animal models of COPD. *Chest* 2000;117:223s-227s.

-
- ⁵⁰ Kielty CM, Raghunath M, Siracusa LD, Sherrat MJ, Peters R, Shuttleworth CA, Jimenez SA. The tight skin mouse: demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. *J Cell Biol* 1998;140:1159-1166.
- ⁵¹ Martorana PA, Brand T, Gardi C, van Even P, de Santi MM, Calzoni P, Marcolongo P, Lungarella G. The pallid mouse. A model of genetic α 1-antitrypsin deficiency. *Lab Invest* 1993;68:233-241.
- ⁵² Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease • 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002;57:908-914.
- ⁵³ Costa DL, Kodavanti UP. Toxic responses of the lung to inhaled pollutants: Benefits and limitations of lung-disease models. *Toxicol Lett* 2003;140-141:195-203.
- ⁵⁴ Pires-Neto RC, Lichtenfels AJ, Soares SR, Macchione M, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res* 2006;101:356-361.
- ⁵⁵ Gilmour MI, Daniels M, McCrillis RC, Winsett D, Selgrade MJK. Air pollutant-enhanced respiratory disease in experimental animals. *Environ Health Perspect* 2001;109:619-622.

-
- ⁵⁶ Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect* 2002;110:89-94.
- ⁵⁷ Thurlbeck WM, Müller N. Emphysema: Definition, Imaging and Quantification. *Am J Roentgenol* 1994;163:1017-1025.
- ⁵⁸ Harikrishnan P, Majumdar A, Ito S, Alencar AM, Suki B. Quantitative characterization of airspace enlargement in emphysema. *J Appl Physiol* 2006;100:1419-1421.
- ⁵⁹ Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Science, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Washington DC: National Academy Press; 1996.
- ⁶⁰ Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* 1992;72:168-178.
- ⁶¹ Weibel ER, Cruz-Orive LM. Morphometric Methods. Chapter 22 In: *The Lung* 1997, RG Crystal, Lippincott.
- ⁶² Jones R, Reid I. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br Med Bull* 1973;34:9-16.

-
- ⁶³ Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR, Cosio MG. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;974-980.
- ⁶⁴ Cavarra E, Bartalesi B, Lucattelli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, Ortiz LA, Martorana A, Lungarella G. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of α 1-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:886-890.
- ⁶⁵ Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, Okada Y, D'Armiento JM. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:623-631.
- ⁶⁶ Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JHT, Hoidal JR, Cosio MG. α 1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1596-1603.
- ⁶⁷ Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucattelli M, Lunghi B, Martorana PA, Lungarella G. Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J* 2005;25:15-22.

⁶⁸ Kasagi S, Seyama K, Mori H, Souma S, Sato T, Akiyoshi T, Suganuma H, Fukuchi Y. Tomato juice prevents senescence-accelerated mouse P1 strain from developing emphysema induced by chronic exposure to tobacco smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L396-L404.

⁶⁹ Di Stefano A, Garamori G, Ricciardolo FLM, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1156-1167.

⁷⁰ Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:849-854.

⁷¹ Kato A, Schleimer RP. *Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity.* *Curr Opin Immunol* 2007;19:711-720.

⁷² Kuwano K. Epithelial Cell Apoptosis and Lung Remodeling. *Cell Mol Immunol* 2007;4:419-429.