**FERNANDA DEGOBBI TENORIO QUIRINO DOS
SANTOS LOPES**

**O efeito da exposição a níveis ambientais de
material particulado no desenvolvimento do
enfisema pulmonar em camundongos**

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

Área de Concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

SÃO PAULO
2007

**FERNANDA DEGOBBI TENORIO QUIRINO DOS
SANTOS LOPES**

**O efeito da exposição a níveis ambientais de
material particulado no desenvolvimento do
enfisema pulmonar em camundongos**

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

Área de Concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

SÃO PAULO
2007

*Aos meus queridos Eduardo,
Pedro e Bruna,
razões da minha vida.*

Agradecimentos

Ao Professor Milton de Arruda Martins, chefe do laboratório e meu orientador, a quem devo agradecer toda a atenção e paciência. Com certeza, não poderia ter escolhido uma pessoa melhor para me orientar! Ao mesmo tempo que o Professor nos deixa caminhar por “nossas próprias pernas”, ele sabe exatamente em que momento interferir não nos deixando perder o foco do estudo.

À Professora Thaís Mauad, uma pessoa única e verdadeira que se envolveu totalmente neste projeto, acreditando e estando o tempo todo ao meu lado.

Ao Prof. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva, o nosso “professor pop”, quem nos permitiu trabalhar conjuntamente com a equipe do LIM-05 e quem com suas idéias brilhantes tornou este projeto exequível.

À minha querida pupila Tatiana da Silva Pinto, com quem aprendi a ser um pouco mais organizada! Sua dedicação e interesse por este estudo me fizeram acreditar ainda mais nele.

À Fernanda Magalhães Arantes-Costa, com quem compartilho minhas alegrias e meus anseios; seja fora ou dentro do laboratório, minha melhor amiga, uma pessoa que jamais esquecerei!

Ao nosso “Jovem Einstein”, Dr. Paolo Biselli, fonte inesgotável de novas idéias....

Ao “nosso” politécnico, Henrique Takachi Moriya, que com sua sensibilidade e inteligência se tornou uma pessoa muito querida.

A Ângela B. Santos pessoa maravilhosa e extremamente competente, quem me apresentou ao mundo da imunohistoquímica

Ao Dr. Luiz Fernando da Silva Ferraz, pelo auxílio indispensável na análise do estresse oxidativo.

Ao Davi Francisco Ferreira, funcionário do nosso biotério, quem foi todas as vezes buscar meus animais lá em Campinas. Valeu Davi!!!!

Aos meus queridos amigos do LIM-20, com quem convivo todos os dias, especialmente:

Alessandra Choqueta de Toledo, “figura” do laboratório;

Débora Hizume: Pequena notável!

Márcia Mabel, “eita mulhé arretada!”, companheira nos estudos de Enfisema;

Adriana Anciães, nossa mais nova aluna do grupo enfisema;

Adenir Perini, por todos os conselhos que sempre vieram em boa hora;

Edna Leick-Maldonado, nossa querida sub-chefe, ainda estou para conhecer uma pessoa mais caprichosa e detalhista;

Rosana Aparecida, nossa secretária, quem sempre dá um jeitinho para tudo;

Carla Máximo Prado, minha companheira dos congressos e uma pessoa que adoro ter por perto;

Dra Iolanda Calvo Tibério, sempre tão solícita e gentil;

Prof. Celso Carvalho e seus alunos com os quais tenho uma prazerosa convivência;

À Cláudia Fló, amiga de todos os momentos, com quem aprendi muito;

Beatriz e Francine, dispostas a colaborar com tudo o que estivesse ao alcance.

Ao LIM-05, Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental em especial à Regiane e Ana Júlia, responsáveis pelas medidas diárias feitas nas Câmaras e à Dolores Helena que muito me ajudou no início deste projeto.

Aos meus sogros Carlos e Edina por todo amor e carinho.

Aos meus pais Wilson e Sônia Maria, exemplos de caráter e determinação, a vocês ofereço este Título de Doutora em Ciências, por tudo que sempre fizeram por mim.

Aos meus queridos filhos Pedro e Bruna, dos quais me orgulho mais e mais a cada dia!

Ao meu marido Carlos Eduardo, por tudo o que é e me faz ser!

*Não há um momento em que eu não sinta a presença de uma testemunha de cujo olhar nada
escapa e com quem luto para me manter em sintonia.*

Gandhi

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Resumo

Abstract

INTRODUÇÃO	1
Considerações Gerais	1
Fisiopatologia da DPOC	4
Mecanismos Envolvidos no Desenvolvimento da DPOC	7
Modelos Experimentais de DPOC	11
Modelos de Degradação Tecidual	12
Modelos Inalatórios: Fumaça de Cigarro	13
Modelos Inalatórios: SO ₂	15
Modelos Inalatórios: NO ₂	16
Modelos Inalatórios: Material Particulado e Gases Oxidantes	17
Modelos Com Animais Manipulados Geneticamente	19
DPOC X Poluição	21
Mecanismos de Defesa Pulmonar na Presença do PM ₁₀	22
Toxicidade e Mecanismos de Ação do Material Particulado	24
OBJETIVOS	29
MÉTODOS	30
Indução do Enfisema Pulmonar	30

Exposição aos Poluentes Atmosféricos	31
Caracterização da Exposição	33
Protocolo de Exposição	34
Grupos Experimentais	34
Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório	35
Análise Histológica	38
Imunohistoquímica	39
Avaliação Morfométrica	40
Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm)	40
Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elastina	42
Contagem de Macrófagos, Células Positivas para MMP12 e Células Positivas para Caspase-3	42
Expressão de Isoprostano-8	43
Análise Estatística	44
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema das câmaras utilizadas para a exposição dos animais ao material particulado	32
Figura 2	Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados da mecânica respiratória.....	36
Figura 3	Foto do retículo, utilizado para as medidas morfométricas, sobre uma lâmina.....	41
Figura 4	Valores de PM (média $\pm$ erro padrão) medidos diariamente ao longo do período em que os animais permaneceram nas câmaras.....	46
Figura 5	Valores de NO ₂ (média $\pm$ erro padrão) medidos diariamente ao longo do período em que os animais permaneceram nas câmaras.....	47
Figura 6	Gráfico dos valores de Raw (média $\pm$ erro padrão) dos quatro grupos de animais.....	48
Figura 7	Gráfico dos valores de Gtis (média $\pm$ erro padrão) dos quatro grupos de animais.....	49
Figura 8	Gráfico dos valores de Htis (média $\pm$ erro padrão) dos quatro grupos de animais.....	50
Figura 9 A e B	Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos que receberam instilação intranasal de solução de papaína (A) ou de solução salina (NaCl 0.9%) (B).....	53
Figura 9 C	Valores de Lm (média $\pm$ erro padrão) nos quatro grupos experimentais.....	54
Figura 10	Valores da proporção de fibras de colágeno (média $\pm$ erro padrão) no parênquima remanescente dos quatro grupos experimentais	55
Figura 11	Valores da proporção de fibras de colágeno (média $\pm$ erro padrão) no parênquima remanescente dos quatro grupos experimentais	56

Figura 12	Número de células positivas para MAC-2 (média $\pm$ erro padrão) no parênquima dos quatro grupos experimentais	57
Figura 13	Número de células marcadas para MMP-12 (média $\pm$ erro padrão) no parênquima pulmonar nos quatro grupos experimentais.....	58
Figura 14	Fotomicrografia do parênquima pulmonar com as células positivas para MAC-2.....	59
Figura 15 A	Valores das células positivas para caspase-3 (média $\pm$ erro padrão) no parênquima dos quatro grupos experimentais	61
Figura 15 B	Fotomicrografia do parênquima pulmonar com as células marcadas para caspase-3.....	62
Figura 16 A	“Box plots” dos valores referentes à intensidade de expressão do isoprostano-8.....	63
Figura 16 B	Fotomicrografias dos pulmões corados para isoprostano-8 seguindo uma sequência dependente da intensidade da cor do marrom.....	64

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>CEMIB</i>	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas
<i>CETESB</i>	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
<i>CO</i>	Monóxido de Carbono
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucléico
<i>DPOC</i>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
<i>EP</i>	Erro Padrão
<i>FEV1</i>	Volume Expiratório Forçado no 1º Segundo ,do inglês Forced Expiratory Volume in 1 Second
<i>Filtro HEPA</i>	Filtro de alta Eficiência para Filtragem de Material Particulado do inglês “High Efficiency Particulated Air”
<i>HPLC</i>	Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”
<i>IgG</i>	Imunoglobulina G
<i>IL</i>	Interleucina
<i>Lm</i>	Intercepto Linear Médio
<i>MMP</i>	Metaloproteinase de Matriz

<i>NADPH</i>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
<i>NaCl</i>	Cloreto de Sódio
<i>NF</i>	Fator Nuclear
<i>NIH</i>	“National Institutes of Health”
<i>NO₂</i>	Dióxido de Nitrogênio
<i>PAA</i>	Grupo Instilado com Solução de Papaína e Permaneceu na Câmara com Ar Ambiente
<i>PAF</i>	Grupo Instilado com Solução de Papaína e Permaneceu na Câmara com Ar Filtrado
<i>PEEP</i>	Pressão Positiva de Final de Expiração, do inglês “Positive End Expiratory Pressure”
<i>PGF</i>	Sintase de Prostaglandina F, do inglês “Prostaglandin F Synthase”
<i>PM</i>	Material Particulado
<i>ppm</i>	Parte por Milhão
<i>ROFA</i>	Resíduo da Queima de Óleo, do inglês “Residual Oil Fly Ash”
<i>ROS</i>	Espécies Reativas de Oxigênio

<i>SAA</i>	Grupo Instilado com Solução Salina e Permaneceu na Câmara com Ar Ambiente
<i>SAF</i>	Grupo Instilado com Solução Salina e Permaneceu na Câmara com Ar Filtrado
<i>SO₂</i>	Dióxido de Enxofre
<i>TNF</i>	Fator de Necrose Tumoral
α 1-AT	Alfa 1 Antitripsina

Lista de Símbolos

cmH_2O	Centímetros de Água
f	Função
G_{tis}	Resistência de Tecido
H_{tis}	Elastância de Tecido
i	Unidade Imaginária
I_{aw}	Inertância de vias Aéreas
kg	Kilograma
mg	Miligramas
mL	Mililitros
P_{cyl}	Pressão dentro do Cilindro do flexiVent
P_{ao}	Pressão na saída das Vias Aéreas
R_{aw}	Resistência de Vias Aéreas
UI	Unidade Internacional
V'	Fluxo
V	Volume

V_{cyl}	Posicionamento do Pistão do flexiVent, Medida Indireta do Volume Fornecido
$Z(f)$	Impedância em função da Frequência
Z_{rs}	Impedância do Sistema Respiratório
α	$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$
μL	Microlitros
π	Pi

Lopes, FDTQS. O efeito da exposição a níveis ambientais de material particulado no desenvolvimento do enfisema pulmonar em camundongos. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

A inalação de material particulado (PM) exerce um papel importante na exacerbação de doenças respiratórias, incluindo DPOC e asma, no entanto os efeitos específicos do PM no desenvolvimento do enfisema pulmonar são ainda pouco descritos na literatura. Neste estudo investigamos os efeitos da exposição crônica a níveis ambientais de PM no desenvolvimento do enfisema e do remodelamento pulmonar em camundongos. Os animais receberam instilação intranasal de solução de papaína ou de solução salina e permaneceram em câmaras situadas em uma área de tráfego intenso de veículos: uma recebia ar ambiente e a outra possuía filtros para PM na entrada de ar. Fizemos medidas morfométricas, de densidade de fibras de colágeno e elástica, análise quantitativa de macrófagos, expressão de MMP-12 (metaloproteinase de matriz), de isoprostano-8 e de caspase-3 no tecido pulmonar. Os animais que receberam papaína e que foram mantidos na câmara sem filtros apresentaram os maiores valores de intercepto linear médio (Lm) comparados aos que receberam a solução desta mesma substância, mas que permaneceram na câmara com os filtros ($47,11 \pm 1,49$ e $39,33 \pm 1,93$ μm , respectivamente, $p=0.002$). Também observamos um aumento na densidade de fibras de colágeno e na expressão de isoprostano-8 nos pulmões dos animais que receberam papaína e que permaneceram na câmara sem filtros comparado ao grupo que recebeu a mesma substância mas foi mantido na câmara com filtros ($p<0,05$ e $p=0,002$, respectivamente). Não houve diferença entre estes dois grupos ao avaliarmos a quantidade de células que expressaram MAC-2, MMP-12 e caspase-3. Não observamos diferença em nenhum dos parâmetros estudados entre os grupos que receberam solução salina, mas foram mantidos em câmaras diferentes. Concluimos que a exposição a níveis ambientais de PM piorou o enfisema induzido pela papaína e resultou em aumento do remodelamento pulmonar. O estresse oxidativo parece ser um dos mecanismos responsáveis por esta resposta.

Descritores: Enfisema Pulmonar/Fisiopatologia; Poluição ambiental/Efeitos Adversos; Estresse Oxidativo; Camundongos Endogênicos Balb C.

Lopes, FDTQS. Effects of exposure to ambient level of particulate matter on the development of pulmonary emphysema. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

Inhalation of particulate matter (PM) exacerbates a variety of pulmonary disorders, including COPD and asthma, but the specific effects of PM on the developing of emphysema are largely unknown. We investigated the effects of chronic exposure to ambient levels of PM on the development of emphysema and pulmonary remodeling in mice. Mice received either papain or normal saline and were kept for two months in two chambers in an area of high traffic density: one received ambient air and the other had filters for PM. We performed lung morphometry, measured the density of elastic and collagen fibers and studied the expression of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12), macrophage MAC-2, 8-isoprostane and caspase 3. Lungs from papain-treated mice exposed to ambient air presented greater values of mean linear intercept than papain-treated mice kept in the chamber with filtered air (47.11 ± 1.49 and 39.33 ± 1.93 μm , respectively, $p=0.002$). There was an increase in the density of collagen fibers and in the expression of 8-isoprostane in pulmonary tissue of papain-treated mice that remained in the chamber with ambient air ($p<0.05$ and $p=0.002$, respectively). There were no significant differences between these two groups in the amount of cells expressing MAC-2, MMP-12 and caspase-3. There were no significant differences in any of the parameters studied between saline-treated mice kept in the two chambers. We conclude that exposure to urban levels of PM worsens protease-induced emphysema and increases pulmonary remodeling. We suggest that an increase in oxidative stress induced by PM exposure influences this response.

Descriptors: Pulmonary Emphysema/Physiopathology; Environmental Pollution/Adverse Effects; Oxidative Stress; Inbred BALB C Mice.

Introdução

Considerações gerais

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença caracterizada por uma limitação ao fluxo aéreo não totalmente reversível, geralmente progressiva, associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos e com manifestações extra-pulmonares (1).

Pode ser descrita como um conjunto de alterações patológicas, desde inflamação crônica até a degradação do tecido pulmonar por ação de proteases e não há, até o momento, medicamentos específicos para o tratamento desta doença (2).

As manifestações mais comuns de DPOC são a bronquite crônica e o enfisema pulmonar e estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em adultos e idosos (3,4).

A bronquite crônica é clinicamente definida como tosse produtiva com expectoração mucosa ou mucopurulenta por no mínimo três meses em dois anos consecutivos na ausência de outras causas (5).

No enfisema pulmonar ocorre um aumento anormal dos ácinos pulmonares devido à destruição das paredes alveolares com conseqüente perda da capacidade do recolhimento elástico dos pulmões (6,7,8).

O tabagismo é considerado a principal causa dessas doenças pulmonares, sendo responsável por 75% dos casos, e a deficiência da enzima α_1 antitripsina é outro fator determinante da doença, embora represente apenas 2% dos casos.

A doença pulmonar obstrutiva crônica é considerada uma das principais causas de mortalidade no mundo, acarretando repercussões econômicas e sociais. A morbidade e mortalidade variam entre os diferentes países e entre os diferentes grupos de pessoas em um mesmo país e geralmente estão associadas diretamente à prevalência de fumantes na população; embora em muitos países a poluição atmosférica resultante da queima de madeira ou de combustíveis fósseis tem sido considerada, também, um fator de risco importante. Acredita-se que a exposição contínua aos fatores de risco e o aumento de indivíduos que alcançam idades mais avançadas aumentem ainda mais a prevalência e impacto desta doença (1).

No Brasil, a DPOC está em primeiro lugar nas estatísticas de mortalidade por doenças respiratórias, sendo responsável por um quarto do total da população adulta hospitalizada com problemas respiratórios (9). Desta forma, é um importante problema de saúde pública, não somente devido aos

altos índices de mortalidade e morbidade, mas também por ser uma doença que pode ser prevenida em muitos casos (10). É progressiva e irreversível e em estágios mais avançados o tratamento só é eficaz para alívio dos sintomas. O abandono do hábito de fumar é a forma principal de limitar o avanço da doença e em alguns casos é a única medida que se pode tomar para aumentar o tempo de vida do paciente (9).

Em contraste com a grande quantidade de estudos experimentais na área de asma alérgica e do conhecimento detalhado que se tem obtido a respeito dos mediadores inflamatórios nas vias aéreas (11,12), menos atenção tem sido dada à DPOC (13).

Atualmente o grande desafio nos estudos das doenças obstrutivas crônicas é identificar os papéis dos vários mediadores e os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia desta doença, o que muito provavelmente favoreceria o achado de novos tratamentos.

O estudo em seres humanos é restrito ao uso de observações morfológicas e moleculares em fragmentos de tecido de pulmões retirados de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos; ou estudos *in vitro* limitados a um único tempo (14). Há uma grande expectativa do uso de modelos animais para o estudo da patogênese, das mudanças funcionais e dos efeitos de possíveis novos tratamentos, sendo que estes estudos podem ser feitos *in vivo*. Entretanto, existem limitações para o uso de modelos experimentais

em animais, uma vez que são modelos não espontâneos da doença e não mimetizam por inteiro o fenótipo da doença (15).

Uma das mais importantes limitações da utilização dos modelos animais para o estudo de DPOC é a dificuldade em reproduzir as alterações de pequenas vias aéreas, particularmente em pequenos animais, como camundongos e ratos, que apresentam menor número subdivisões brônquicas. Parte dos problemas dos modelos em animais de laboratório é a falta de sofisticação nas medidas de função pulmonar, apesar do crescente desenvolvimento na metodologia para a coleta destas medidas (16).

Além das alterações na função pulmonar, também são observados em pacientes com DPOC, perda de peso, anormalidades nutricionais e disfunção músculo esquelética (17).

Fisiopatologia da DPOC

O processo de inflamação crônica das vias aéreas é uma característica importante na DPOC (18). Os neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD8+ e eosinófilos, estes últimos, encontrados somente em estágios bem avançados da doença, são os tipos de células inflamatórias encontradas nesta doença (18,19,20).

Os neutrófilos são liberadores de mediadores e enzimas elastolíticas como as elastases responsáveis por coordenar a destruição tecidual e a inflamação crônica (21,22). Em amostras de lavado broncoalveolar de fumantes observa-se um aumento de neutrófilos e macrófagos (23). O aumento da concentração de neutrófilos em amostras de escarro induzido de pacientes que apresentam limitação de fluxo em vias aéreas está relacionado com o rápido decréscimo de FEV₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo após inspiração forçada (24).

O segundo maior tipo de células envolvidas são os macrófagos (25). Este tipo celular libera numerosas enzimas que degradam tecido como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (15). Em modelos animais de degradação tecidual através do uso de cigarros, não só os neutrófilos liberam enzimas elastolíticas, mas também os macrófagos promovem liberação de enzimas como a MMP12 (25). Neutrófilos e macrófagos exercem influência sobre outras células, como as células da camada muscular de vias aéreas, células endoteliais ou neurônios sensoriais e na liberação de mediadores inflamatórios que induzem broncoconstrição (26) e remodelamento de vias aéreas (27).

Kuhn et al. (28) demonstraram que, no período de 48 até 72 horas após a instilação de elastase, em ratos, ocorre uma resposta inflamatória aguda moderada com a presença de neutrófilos e macrófagos, que se mantém até um mês após a instilação (29).

Embora os neutrófilos sejam considerados os primeiros liberadores de elastase, experimentos em camundongos apresentaram evidências de que elastase produzida por macrófagos, somente, já é suficiente para o desenvolvimento de enfisema, utilizando modelo de exposição à fumaça de cigarro (30).

Os linfócitos também estão envolvidos nos mecanismos celulares da DPOC (31,32). O aumento do número de linfócitos CD8 positivos e linfócitos T encontrados nas vias aéreas de pacientes com DPOC (33,34) apresentam relação direta com a obstrução de fluxo aéreo observada nestes indivíduos (35).

Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC

1) Desequilíbrio entre Proteases e Antiproteases

Esta teoria provém de observações clínicas em pacientes deficientes da enzima α 1-antitripsina (α 1-AT) e que desenvolveram enfisema grave. O desequilíbrio entre proteases e antiproteases tem sido apontado como uma das explicações para a patogênese do enfisema desde a década de 60 (36,15), embora seja raro o aparecimento de enfisema somente devido à ausência da α 1-AT (37,38).

A α 1-AT (presente em macrófagos, no soro e em fluidos de tecidos) é a maior inibidora da ação das proteases. Pacientes homozigotos para a deficiência genética, que impede a produção de α 1-AT, apresentam uma tendência maior para o desenvolvimento de enfisema pulmonar. O fenótipo normal, PiMM (Pi, inibidor de proteína sérica) está presente em 90% da população. Dos vários fenótipos associados à deficiência de α 1-AT, o PiZZ é o mais comum e estes pacientes desenvolvem enfisema sintomático em idades jovens, atingindo alto grau de gravidade em fumantes (39).

A principal célula em pacientes deficientes em α 1-AT envolvida na atividade elastolítica é o neutrófilo. A elastase proveniente do neutrófilos causa destruição do tecido pulmonar e esta destruição é inibida pela ação da α 1-AT. Os neutrófilos também liberam radicais livres de oxigênio que, por sua vez inibem a ação da α 1-AT. Assim, se há baixos níveis séricos de α 1-AT, o processo de destruição do tecido pulmonar leva a enfisema pulmonar. Portanto, o enfisema é o resultado do efeito destrutivo da atividade de proteases devido à ineficiência da atividade das antiproteases.

A exposição crônica ao cigarro comanda a invasão das células inflamatórias nos espaços aéreos alveolares e a conseqüente liberação de grandes quantidades de elastases, o que em pacientes deficientes em α 1-AT se torna mais crítico (40). Nestes indivíduos, tanto os neutrófilos, como os macrófagos são os responsáveis pela liberação das elastases (39).

Camundongos modificados geneticamente, deficientes em elastase neutrofílica não desenvolveram enfisema após submissão a um modelo crônico de exposição à fumaça de cigarro (41). A depleção do gene para produção de elastase macrófagica resultou na proteção contra o desenvolvimento de enfisema, também em modelo que utiliza cigarro em camundongos (42). Estudos referem que animais que não apresentam o gene relacionado com a produção de elastase, em modelos de inalação de fumaça de cigarro, apresentam muito menos atividade de elastase produzida por macrófagos devido à redução do influxo de macrófagos (41,42).

Estas evidências experimentais encontradas em modelos animais chamam a atenção para a importância do papel das proteases para esta patologia, fator este também observado em pacientes que apresentam disfunção de proteases e desenvolvimento de enfisema (15).

2) Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo decorrente da inalação de gases tóxicos como fumaça de cigarro ou dióxido de nitrogênio é considerado uma outra causa importante para o desenvolvimento da inflamação e destruição do tecido na DPOC. Dados clínicos revelam um aumento dos níveis de indicadores de estresse oxidativo em condensado de ar exalado em pacientes DPOC (43,44,45).

Enzimas geradoras de oxidantes presentes em seres humanos incluem NADPH oxidase, mieloperoxidase, peroxidase eosinofílica e sintases do óxido nítrico, sendo que todas estas tem efeito pró-inflamatório (46).

Em processos inflamatórios encontrados na asma e na doença obstrutiva crônica (DPOC), bem como em outras doenças que acometem o parênquima pulmonar, têm sido demonstrados sérios distúrbios no balanço oxidante/antioxidante nos pulmões, com conseqüente lesão mediada por células inflamatórias (46).

As espécies reativas de oxigênio são responsáveis pela reação de oxidação tanto de lipídios quanto de proteínas contidos no surfactante pulmonar, tornando este último menos efetivo (47,48). A síntese de surfactante pode ser inibida pelo processo do estresse oxidativo (49).

Em recém-nascidos, o aumento da expressão da collagenase tipo IV conseqüente ao estresse oxidativo resultou em ruptura da membrana basal alveolar, levando ao aparecimento de edema devido ao aumento da permeabilidade dos capilares e a remodelamento de vias aéreas semelhante ao observado em estágios iniciais de doença obstrutiva crônica (50).

3) Apoptose

A apoptose é um mecanismo de regulação de morte celular. Esta morte celular programada permite a eliminação de células infectadas ou danificadas que precisam ser removidas do organismo; no entanto se estas células não forem devidamente eliminadas e permanecerem no tecido ocorrerá o rompimento do citoplasma com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios no tecido em questão, com progressão de doenças (51).

A apoptose de células estruturais nos pulmões é considerada um mecanismo importante para o desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Existe um aumento da apoptose de células endoteliais e epiteliais em pacientes com DPOC.

A instilação intratraqueal de caspase-3, uma enzima efetora da apoptose, acarretou a apoptose em células epiteliais de pulmões de ratos, com conseqüente desenvolvimento de enfisema (52).

Modelos Experimentais de DPOC

Os modelos experimentais desenvolvidos em animais existem para nos auxiliar a entender mais detalhadamente os mecanismos envolvidos na doença. Atualmente os modelos mais utilizados para indução de enfisema em animais são:

- 1) instilação de proteases;
- 2) inalação de gases tóxicos (ex. fumaça de cigarro e dióxido de nitrogênio);
- 3) animais modificados geneticamente.

Estes diferentes modelos propostos apresentam tanto méritos quanto limitações para sua utilização e requerem diferentes interpretações. Talvez a combinação de diferentes modelos possa elucidar, ainda mais, o mecanismo da doença em questão (53).

Considerando que a definição de enfisema baseia-se fundamentalmente em medidas de função pulmonar (limitação de fluxo de ar nas vias aéreas) é muito importante obter medidas de função pulmonar em modelos em animais de laboratório (54). Os métodos invasivos são tidos como o “padrão ouro” e a correlação destas medidas com marcadores inflamatórios e

remodelamento são fatores que devem acrescentar ainda mais nos estudos desta doença (15).

Modelos de Degradação Tecidual

Nestes modelos são utilizadas enzimas elastolíticas, capazes de degradar o tecido pulmonar levando a um quadro de enfisema pulmonar; proteinases como elastase neutrofílica de humanos, elastase pancreática de suínos ou papaína induzem um enfisema panacinar após uma única instilação intratraqueal (55,56).

Apesar de estes modelos não elucidarem como ocorre o desenvolvimento inicial da doença em humanos, já que desde o início existe uma destruição do parênquima pulmonar; os modelos que utilizam elastases propiciam o estudo do mecanismo da fase mais adiantada da doença, onde já existe uma dramática destruição tecidual, possibilitando inclusive estudar os mecanismos de reparo. São modelos nos quais podemos observar anormalidades da função pulmonar, hipoxemia e metaplasia de células secretoras que são características encontradas em pacientes com DPOC (15).

O mecanismo do enfisema induzido pela administração intratraqueal de elastase, já inicialmente, leva a uma perda de fibras de colágeno e elastina.

Mais tardiamente os níveis de elastina e de glicosaminoglicanos tendem a apresentar valores normais, mas observa-se um aumento de fibras de colágeno. A matriz extracelular apresenta-se reduzida e com uma estrutura modificada resultando em uma estrutura anormal das vias aéreas (57). O alargamento dos espaços aéreos aparece após a indução do enfisema com substâncias elastolíticas e juntamente a isto ocorre um processo inflamatório que transforma estes alargamentos dos espaços alveolares em lesões similares às aquelas encontradas em enfisematosos. Esta progressão da doença deve-se, em muito, aos efeitos destrutivos exercidos pelas proteinases inflamatórias (15).

Modelos Inalatórios: Fumaça de Cigarro

O primeiro modelo animal de enfisema pulmonar com a utilização de fumaça de cigarro foi apresentado em 1990 por Wright et al. (58). Neste estudo, cobaias foram expostas a 10 cigarros por dia, 5 dias por semana, por períodos de 1, 3, 6 e 12 meses e os dados sugeriram ocorrer um enfisema progressivo e alterações de função pulmonar similares às observadas em pacientes fumantes que desenvolvem DPOC. Mesmo depois do término da exposição dos animais à agressão da fumaça de cigarro, não houve reversão do alargamento dos espaços aéreos. Os animais que ficaram expostos por mais tempo apresentaram intensa neutrofilia, acúmulo de macrófagos e de células CD4+ (59,60).

Depois das cobaias, também foram utilizados coelhos, cachorros, ratos e camundongos. No entanto, os ratos parecem ser mais resistentes que as cobaias ao desenvolvimento de enfisema (15). Em relação aos camundongos, há grande dependência da linhagem escolhida; existem linhagens de camundongos mais susceptíveis ao desenvolvimento de enfisema pulmonar, como por exemplo o C57BL/6 (61).

Os camundongos têm sido os animais preferidos para estes estudos devido à oportunidade de manipulação da expressão dos genes nestes animais (15,61). Entretanto, além de serem mais resistentes ao desenvolvimento do enfisema, estes animais apresentam muitas diferenças em relação ao seres humanos, quando se compara a anatomia do aparelho respiratório. São animais que respiram, obrigatoriamente, pelo nariz, apresentam um epitélio respiratório menos ciliado, menos células de Clara e restrição de glândulas submucosas na traquéia. Não apresentam reflexo de tosse, e muitos dos mediadores como histamina ou taquicininas têm diferentes ações farmacológicas nestes animais (15).

Em camundongos expostos à fumaça de cigarro observa-se inicialmente um recrutamento de neutrófilos após o primeiro cigarro, seguido por um aumento gradual de macrófagos e um aumento de substâncias provenientes da degradação de colágeno e elastina. Neste período inicial já se observa neutrofilia em lavado broncoalveolar e em tecido, o que não acontece

quando estes animais são tratados com anticorpos para neutrófilos ou para α_1 -antitripsina (62).

O modelo que utiliza fumaça de cigarro para indução de enfisema pulmonar é bastante utilizado e apresenta resultados consistentes quanto ao aparecimento de enfisema, de remodelamento em vias aéreas e inflamação crônica, muito embora, existam diferenças em relação ao enfisema encontrado em seres humanos e muitos dos mediadores apresentam diferentes efeitos, principalmente no trato respiratório de murinos. É preciso considerar as variações de espécie para espécie e linhagem para linhagem, para que se possam fazer avaliações que mais se aproximem do mecanismo desta doença em seres humanos. Descobertas obtidas a partir destes modelos certamente trarão avanços significativos no entendimento dos mecanismos da DPOC.

Modelos Inalatórios: SO₂

Existem modelos com exposições diárias ao SO₂ em altas concentrações, e observou-se em ratos e cobaias lesão crônica e reparação de células epiteliais. As exposições a altos níveis deste gás variando de 200 a 700 ppm pelo período de 4 a 8 semanas promoveu uma inflamação neutrofílica, alterações morfológicas de produção de muco, metaplasia de células produtoras de muco e descamação de células epiteliais em ratos (63,64).

Após uma semana do término do tratamento houve uma reversão na produção de muco e a inflamação neutrofílica desapareceu totalmente (64).

A inflamação de vias aéreas e o infiltrado inflamatório são importantes características da DPOC, e a exposição ao SO₂, logo após um dia, em ratos, aumentou o número de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares em vias aéreas. No entanto, este influxo de células se restringiu, somente, às grandes vias aéreas e não nas pequenas vias aéreas, como é comum nos pacientes com DPOC (63)

Os modelos que utilizam SO₂ como indutor de DPOC também induzem a um aumento da resistência pulmonar e da hiperresponsividade, muito provavelmente decorrente da elevada produção de muco (63).

Modelos Inalatórios: NO₂

Exposições curtas ao NO₂ levam a uma resposta bifásica, com uma lesão inicial seguida por uma segunda fase de reparação. Tanto a proliferação celular quanto a atividade enzimática ocorrem durante a fase de reparo (65).

As cobaias apresentam alterações na morfologia pulmonar em concentrações inferiores às aquelas que os ratos e camundongos precisam ser expostos para apresentar as mesmas lesões. Mais uma vez há uma

variação de resposta a um modelo entre as diferentes espécies de camundongos (66).

Modelos Inalatórios: Material Particulado e Gases Oxidantes

A administração de oxidantes como ozônio também leva à lesão pulmonar com características similares às alterações inflamatórias observadas em pacientes com DPOC (67), causando efeitos nas células das vias aéreas (68,69,70,71,72). Sendo o ozônio um gás poluente, a exposição a este gás promove uma série de sintomas respiratórios, incluindo piora da função pulmonar e aumento da hiperreatividade de vias aéreas. Em pacientes com DPOC ou asmáticos a exposição ao ozônio leva à exacerbação dos sintomas. O ozônio é um gás altamente reativo, e a sua reação com outros substratos nas vias aéreas produz substâncias tóxicas que servem como sinalizadores tóxicos para o epitélio das vias aéreas. Estes sinais incluem liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão liderando um influxo de células inflamatórias e aumento da permeabilidade pulmonar resultando em edema pulmonar (67).

Os dados obtidos em modelos animais expostos ao ozônio indicam que as alterações dependem preferencialmente da infiltração neutrofílica (73,74).

Alguns modelos animais utilizam partículas ultrafinas, sílica e poeira de carvão como agentes agressores (75,76). As partículas ultrafinas são comuns em locais que apresentam poluição do ar e são compostos primários provenientes da combustão o que causa níveis significativos de estresse oxidativo nas células de vias aéreas (77,78). Em modelos animais observa-se principalmente um enfisema focal e acredita-se que tanto o enfisema provocado por inalação de poeiras contendo partículas nocivas quanto o enfisema provocado pela fumaça de cigarro apresentam mecanismos similares de desenvolvimento (79).

Exposição a partículas derivadas do diesel acarreta inflamação crônica de vias aéreas em animais de laboratório e piora da DPOC, asma e infecções do trato respiratório (80).

Tanto o componente gasoso como o particulado da poluição atmosférica causam uma significativa lesão pulmonar e em especial o material particulado induz descamação do epitélio alveolar, altera os níveis de tiol nos macrófagos alveolares e linfócitos e induz a produção de espécies reativas a oxigênio e citocinas pró-inflamatórias. Exposição prolongada a partículas incluindo as partículas derivadas da queima do diesel, leva à produção de inflamação e respostas tumorigênicas (81).

Modelos Com Animais Manipulados Geneticamente

A predisposição genética de determinadas linhagens para o desenvolvimento da doença está sendo estudado exaustivamente (82,83,84). Alterações genéticas monogênicas e poligênicas para mimetizar a DPOC têm apresentado amplo desenvolvimento nos últimos anos, utilizando técnicas modernas de biologia molecular (85,86).

Um grande número de linhagens de camundongos modificados geneticamente tem sido utilizada em estudos de DPOC. Camundongos que não produzem elastina estão sendo utilizados para estudar os mecanismos de enfisema envolvendo a destruição das fibras alveolares. Estes animais apresentam alterações do desenvolvimento dos ramos de vias aéreas terminais, acompanhadas por poucos sacos distais que apresentam uma atenuação da quantidade de tecido nos septos. Através da utilização destes animais pode-se avaliar a importância da elastina para a função pulmonar em pulmões já maduros (87).

Animais geneticamente modificados são expostos a estímulos exógenos tóxicos como fumaça de cigarro, permitindo identificar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DPOC. Estudos com camundongos geneticamente modificados que não apresentam metaloelastase 12 produzida pelos macrófagos mostraram que eles se

mantem normais mesmo após longo tempo de exposição a cigarros (15). Estes animais também não apresentaram acúmulo de macrófagos em resposta ao estímulo do cigarro, um efeito possivelmente promovido pela MMP-12, que gera fragmentos de elastina que são quimiotáticos para monócitos (88,89).

A combinação da utilização de animais modificados geneticamente com protocolos de inalação de agentes tóxicos pode ajudar na identificação de mediadores protetores ou pró-inflamatórios da doença em questão (15). Talvez nos facilite responder questões fundamentais. Como a inflamação pulmonar é causada pelo hábito de fumar? Porque somente uma minoria de fumantes desenvolve enfisema? Como ocorre o reparo do tecido alveolar normal? As respostas para estas questões serão extremamente úteis para encontrarmos possíveis formas de tratamento para esta doença (53).

É importante ressaltar que, de todos os modelos que foram brevemente citados, os que mais se aproximam do modelo de DPOC em humanos são os que utilizam a exposição dos animais a gases, especialmente o modelos de tabagismo, os quais mimetizam as exposições repetidas ao agente agressor, gerando inflamação e posteriormente a lesão do tecido, no entanto são modelos que levam mais tempo para se obter resultados, enquanto que os modelos com substâncias elastolíticas fornecem resultados mais rápidos e facilitam estudar os mecanismos dos processos da fase mais tardia da doença, onde já existe uma destruição tecidual. No entanto, todos estes

modelos são feitos utilizando animais, portanto os resultados obtidos precisam ser analisados com cautela.

DPOC X Poluição

A exposição a poluentes atmosféricos, em especial o material particulado, está associada a doenças pulmonares, cardiovasculares e câncer (90,91,92,93). Mesmo em níveis considerados aceitáveis podem ser observados efeitos deletérios dos poluentes (90,91,94), acarretando inflamação cardiopulmonar, com aumento dos mediadores pró-inflamatórios como as IL-6, IL-8 e TNF- α (95,96). O material particulado, um dos componentes da poluição atmosférica urbana, está associado à exacerbação de doenças respiratórias, incluindo a doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e infecções no trato respiratório inferior, especialmente em crianças e em pessoa idosas (97). No entanto, os efeitos específicos do material particulado nas pessoas com enfisema ainda é pouco conhecido.

O material particulado proveniente da queima do diesel é constituído por partículas ultrafinas, que são partículas com diâmetro igual ou menor que 100 μm , são altamente insolúveis devido à presença de um núcleo de carbono e tendem a formar agregados com sulfetos, metais e hidrocarbonetos (98).

Evidências epidemiológicas (99,100) indicam uma relação direta entre os níveis de PM_{10} (material particulado com partículas de até 10 nm de diâmetro) e aumento da morbidade das doenças respiratórias incluindo aumento de sintomas, redução na função pulmonar (101) e aumento de internações de pacientes com DPOC (99). Também existe uma associação entre níveis de PM_{10} e mortes, não somente por causas respiratórias, mas por causas vasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (102).

Mecanismos de Defesa Pulmonar na Presença do PM_{10}

A habilidade dos mecanismos de defesa pulmonar na remoção de partículas inaladas e a susceptibilidade do indivíduo aos efeitos destas partículas determinam quais serão os efeitos adversos a este material particulado presente nos pulmões.

Um mecanismo de defesa importante para remoção das partículas inaladas, nas vias aéreas, é o aparelho muco-ciliar. O muco tem papel fundamental na proteção das vias aéreas, sendo rico em substâncias antioxidantes (103). Nas vias aéreas proximais, células caliciformes produzem muco, no qual ficam retidas as partículas inaladas. Este muco posteriormente será eliminado ou por expectoração ou por deglutição (104).

Embora o muco tenha um papel protetor, a indução do aumento da produção de muco, devido à presença de poluentes nos pulmões como dióxido de enxofre e PM₁₀ contribui de maneira direta para a exacerbação da DPOC, devido ao aumento da resistência de vias aéreas e pela formação de rolhas de muco em pequenas vias aéreas (105). Em pacientes com DPOC e em fumantes existe um dano ciliar, o que juntamente com o excesso de produção de muco e a não remoção efetiva deste muco não permitem a remoção adequada das partículas inaladas. As células epiteliais das vias aéreas têm a função de limitar a passagem de poluentes inalados e são responsáveis por liberar mediadores inflamatórios como IL-8 e quimiocinas, quando estes poluentes estão presentes e ocorre o influxo de células inflamatórias (106,107). Os macrófagos presentes nas paredes e superfícies das vias aéreas são os principais responsáveis pela fagocitose das partículas inaladas, mas como resultado liberam mediadores inflamatórios como IL-8 E TNF. Em pacientes com DPOC o número de macrófagos está aumentado (103,108), conseqüentemente encontra-se um aumento de mediadores inflamatórios liberados por macrófagos em escarro colhido destes pacientes. A inalação de partículas é responsável por agravar a inflamação nestes casos, levando à exacerbação da doença (109).

Grande parte das partículas inaladas se deposita nas porções mais distais das vias aéreas, próximas aos alvéolos (110). As partículas que conseguem atravessar a camada epitelial dos espaços aéreos distais e entrar no

interstício pulmonar não são eliminadas de forma eficaz e permanecem nestas regiões subepiteliais, próximas a grupos de células como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais.

Toxicidade e Mecanismos de Ação do Material Particulado

Os efeitos agudos secundários à exposição ao material particulado são encontrados principalmente em subgrupos susceptíveis e não em populações saudáveis, exceto quando a concentração deste material esteja muito alta (111).

A inflamação é considerada o efeito adverso mais importante, ocasionando exacerbação de doenças de vias respiratórias (112) e de doenças cardiovasculares (113).

Ghio et al. (114) encontraram uma inflamação pulmonar em voluntários saudáveis após exposição à inalação de material particulado. Li et al. (115) utilizaram ratos expostos a PM_{10} e também observaram um efeito inflamatório nos pulmões destes animais, após exposição. Jimenez et al. (116) descreveram a ativação de genes pró-inflamatórios em células expostas ao PM_{10} (114,115,116).

A toxicidade do PM₁₀ é atribuída às partículas ultra-finas, constituintes deste material particulado, que por apresentarem um tamanho tão reduzido conseguem se dispersar facilmente pelos pulmões, atingindo as regiões mais distais. Em pacientes com DPOC a eficiência da deposição destas partículas é maior do que em indivíduos normais, provavelmente devido à redução do fluxo expiratório observado nestes pacientes (117).

Os mecanismos de ação destas partículas nos pulmões têm sido uma área de intenso estudo para os toxologistas e acredita-se que os principais mecanismos são:

1) Número de partículas:

Os macrófagos são as principais células responsáveis pelo mecanismo de fagocitose das partículas ultrafinas que atingem o sistema respiratório, estimulando a liberação de mediadores inflamatórios como TNF. A inabilidade dos macrófagos fagocitarem uma grande quantidade de partículas resulta em uma estimulação contínua das células epiteliais, com aumento da produção de quimiocinas como IL-8, que contribuem para o processo inflamatório (118).

Morrow et al. (119) observaram que, quando o volume de partículas fagocitadas por macrófago atinge 60% do volume interno desta célula, a atividade de remoção de partículas por esta célula é completamente inibida.

2) Área de Superfície de Contato:

As partículas ultra-finas podem se apresentar como partículas isoladas ou formar agregados. Em forma de agregados apresentam um diâmetro aerodinâmico muito maior (109).

A área de superfície destes agregados parece ser mais importante para a toxicidade destas partículas, do que a massa, ou o volume ou o número destas partículas, considerando que a interação entre as partículas e o sistema biológico ocorre via superfície de contato e não com a massa interna destas partículas (111).

A grande área de superfície formada pelas partículas ultra-finas, constituintes do PM_{10} , permite uma grande absorção de substâncias que estão no ambiente, ou no epitélio pulmonar, o que aumenta a reatividade destas partículas (115).

3) Passagem das Partículas para o Interstício Pulmonar:

A transferência das partículas para o interstício pulmonar é uma consequência da ineficiência no processo de defesa pulmonar. A não remoção efetiva das partículas inaladas permite um aumento da interação entre estas partículas e o epitélio, favorecendo a passagem para o interstício

pulmonar. Estudos em ratos mostraram um aumento da permeabilidade do epitélio na presença de partículas ultrafinas e PM₁₀, resultando na progressão destas partículas para as áreas de interstício (120).

4) Estresse Oxidativo

A produção de radicais livres no tecido pulmonar é a resposta deste tecido à diferentes partículas patogênicas (121,122). Acredita-se que o estresse oxidativo inicia-se nas partículas por si só (através da liberação de altas concentrações de metais de transição presentes nestas partículas) e subseqüentemente pela liberação de espécies reativas de oxigênio dos leucócitos que migraram para as vias aéreas como resultado da primeira reação das células dos pulmões à presença de partículas inaladas. Quando ocorre estresse oxidativo são estimulados genes pró-inflamatórios para citocinas, enzimas antioxidantes, receptores e moléculas de adesão. As partículas ultra-finas, componentes do PM₁₀, com sua grande área de superfície de contato, geram radicais livres que estimulam o processo de transcrição destes genes pró-inflamatórios (123).

Existem evidências de que as partículas encontradas no meio ambiente como a ROFA (124) e PM₁₀ podem comprometer a estrutura do epitélio causando destruição ou estresse oxidativo. Em pacientes com DPOC, devido à pré-existência de uma inflamação das vias aéreas, se torna mais

fácil a ocorrência de estresse oxidativo secundário à deposição de partículas inaladas (111).

Objetivos

Tivemos como objetivo neste estudo avaliar os efeitos da exposição crônica a níveis ambientais de material particulado sobre o desenvolvimento de enfisema pulmonar em camundongos.

Métodos

Foram utilizados camundongos Balb/c, machos, provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, da Universidade Estadual de Campinas).

Os animais receberam os cuidados necessários de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” (NIH publication 85-23, revisado em 1985). Nosso projeto recebeu a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Indução do Enfisema Pulmonar

A indução do enfisema pulmonar foi realizada utilizando papaína em pó (6000 UI/mg- Valdequímica Produtos Químicos - Brasil) diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9%) com uma concentração de 20 mg/mL. Cada animal recebeu 50 µL desta solução através de instilação nasal.

Nos grupos nos quais não foi induzido enfisema, os animais receberam instilação nasal de solução fisiológica (0,9% NaCl), veículo da papaína.

Exposição aos Poluentes Atmosféricos

Os animais foram alojados em câmaras de exposição, localizadas no estacionamento da Faculdade de Medicina da USP, exatamente no cruzamento da Rua Teodoro Sampaio com a Av. Dr. Arnaldo, local com fluxo intenso de automóveis e ônibus.

Neste estudo experimental foram empregadas duas câmaras de exposição, montadas uma ao lado da outra, sendo que uma recebia o ar ambiente, íntegro e a outra recebia ar filtrado. Estas câmaras apresentam estrutura cilíndrica, medindo 1,5 metro de diâmetro por 2,5 metros de altura e são revestidas com plásticos que apresentam proteção contra os raios ultravioleta. O ar entra na câmara através da base do cilindro e é distribuído de forma uniforme através de furos, com um fluxo de 50 litros por segundo e eliminado pela parte superior da câmara através de uma grande abertura. Cada câmara é um sistema normobárico de pressão positiva em relação à atmosfera, onde a pressão dentro desta não ultrapassa 3 cmH₂O. Um diagrama esquemático das câmaras é apresentado na Figura 1.

A câmara com ar filtrado contém um sistema de filtragem quatro filtros em série. O primeiro filtro, que recebe o ar ambiente, elimina as partículas grandes (Purafil, São Paulo, modelo TB). O segundo retém as partículas finas (Purafil, São Paulo, modelo JFL-90), seguido pelo terceiro filtro que

adsorve substâncias químicas através da associação de leitos químicos constituídos por carvão ativado mais permanganato de potássio. O quarto filtro constituído por um filtro do tipo HEPA retém partículas com diâmetros aerodinâmicos abaixo de $0,3\ \mu\text{m}$. No período em que foi feito o protocolo deste estudo, o terceiro filtro estava inativo.

Assim, só houve filtragem de material particulado no ar da câmara que possuía filtros.

Pires-Neto et al. 2006

Figura 1: Esquema das Câmaras de Exposição.

Caracterização da Exposição:

Foram feitas medidas diárias das concentrações de determinados componentes no ambiente interno das câmaras:

1. Concentrações de NO₂ através do método colorimétrico do Arsenito de Sódio (126),
2. Partículas com diâmetro inferior de 10 µm foram determinadas gravimetricamente através da coleta de polycarbonato, utilizando-se filtros do tipo Harvard.

Há uma estação de monitoramento da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) muito próxima ao local onde ficam as câmaras (aproximadamente a uns 100 metros). Esta estação registra continuamente os níveis de NO₂, PM₁₀, CO e SO₂. Foram feitas comparações entre as concentrações de NO₂ e PM_{2,5} medidas pela CETESB e dentro das câmaras.

Foram feitos registros diários da temperatura e umidade relativa obtidos dos ambientes internos das câmaras.

Todas as medições foram feitas pela equipe do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP.

Protocolo de Exposição

Foram expostos dois lotes de animais, um primeiro lote de animais foi exposto à poluição de junho de 2004 a agosto de 2004, e o segundo lote foi exposto de julho de 2004 a setembro deste mesmo ano, totalizando, assim, dois meses de exposição para cada lote.

Ambos os lotes foram subdivididos em quatro grupos experimentais.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1: Animais que receberam instilação intranasal de 50 μ L de solução de papaína (20 mg/mL) e alocados na câmara que recebia em seu interior, ar ambiente, sem ser filtrado, simulando um ambiente semelhante à poluição urbana da cidade de São Paulo. Este grupo recebeu a denominação de Grupo Papaína - Ar Ambiente (PAA), n=11.

Grupo 2: Igualmente ao Grupo 1, estes animais receberam instilação de 50 μ L de solução de papaína intranasal (20 mg/mL), mas foram alocados na

câmara que recebia ar ambiente filtrado. O Grupo 2 recebeu a denominação de Grupo Papaína - Ar Filtrado (PAF), n=10.

Grupo 3: Este grupo recebeu instilação intranasal de 50 µL de solução salina (NaCl 0,9%, veículo da papaína) e foi mantido na câmara que recebia ar ambiente, portanto recebeu a denominação de Grupo Salina - Ar Ambiente (SAA), n=11.

Grupo 4: Os animais receberam instilação intranasal de 50 µL de solução salina (NaCl 0,9%, veículo da papaína) e foram mantidos na câmara que recebia ar filtrado, recebendo o nome de Grupo Salina - Ar Filtrado (SAF), n=10.

Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório

Após os dois meses de exposição nas câmaras, os animais de cada grupo foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados com um cateter intravascular 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canada). Um diagrama esquemático do respirador mecânico utilizado é apresentado na Figura 2.

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Utilizamos um PEEP de 5

cmH₂O conectado à válvula expiratória do ventilador. Posteriormente foi induzida uma paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de Brometo de Pancurônio (1 mg/kg).

Foi calculada a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) dos animais de cada grupo, para tanto foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações. Após a perturbação, os dados foram coletados.

Figura 2: Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória.

Foram coletados: a posição do pistão (V_{cyl}) e a pressão interna do cilindro (P_{cyl}) durante os 16 segundos de perturbação.

A perturbação de 16 segundos é composta por uma soma de senóides com frequências primas que vão de 0,25 a 19,625 Hz, evitando, assim, distorção

harmônica (127). As amplitudes das senóides decrescem hiperbolicamente com a frequência.

Para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (128). V_{cyl} foi corrigido para obtermos o volume que efetivamente chega ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido, nos dando o valor de P_{ao} , pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de V , obtivemos o fluxo (V').

Para análise das impedâncias obtidas, utilizamos o modelo de fase constante, descrito por Hantos (127):

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

O R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância das vias aéreas, G caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$$

Diferentemente do modelo que utiliza a equação do movimento para a obtenção dos dados de resistência e da elastância do sistema respiratório,

no tempo, este modelo de fase-constante considera o sistema pulmonar de forma multicompartimentar, permitindo a obtenção de parâmetros de diferentes compartimentos dos pulmões; o parâmetro Raw (resistência de vias aéreas), nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro Gtis avalia a resistência tecidual, enquanto que o parâmetro Htis seria a elastância do tecido pulmonar.

Análise Histológica

Logo após a avaliação de mecânica do sistema respiratório os animais foram exsanguinados e foram retirados os pulmões e coração em monobloco, sendo que a cânula traqueal foi mantida conectada à traquéia.

Os pulmões foram fixados em formaldeído (4%) sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas. Após a fixação foram feitos cortes destes pulmões para análises morfométrica e de imunohistoquímica. Para análise morfométrica foram feitas colorações com Hematoxilina-Eosina, Picrossírius (para as fibras de colágeno) e Resorcina-Fucsina (para fibras elásticas) (129).

Imunohistoquímica

Para imunohistoquímica, cortes dos pulmões foram desparafinizados e hidratados. Após bloqueio com peroxidase endógena foi feita recuperação do antígeno ou com tampão citrato (pH=6) em temperatura alta ou em tripsina.

A imunohistoquímica para quantificação MMP12 foi feita utilizando-se um anticorpo policlonal produzido em cabras, anti-camundongo, na diluição de 1:1000 (SC-8839 Goat Polyclonal ; Sta. Cruz Biotechnology, Ca, USA).

A imunohistoquímica para macrófagos foi feita com um anticorpo monoclonal de rato IgG2a anti MAC-2 de camundongo, na diluição de 1:10000 (Clone M3/38; Cedarlane Laboratories, Ontário, Canadá).

Para a avaliação da expressão de isoprostano 8 utilizamos o anticorpo policlonal produzido em cabra 8-epi-PGF2 α com diluição de 1:1200 (Oxford Biomedical Research, Oxford, Inglaterra). Como anticorpo secundário utilizamos Vectastin Abc Kit, Vector Laboratories (Sta. Cruz Biotechnology, CA, EUA).

Para MMP-12, MAC-2 e isoprostano-8, utilizamos o Vectastin Abc Kit, Vector Laboratories (Sta. Cruz Biotechnology, CA, EUA) para revelação.

Para imunohistoquímica para Caspase-3 utilizamos um anticorpo policlonal produzido em cabras com diluição de 1:300 da Promega Corporation. Para revelação, o anticorpo secundário foi Envisionision + Dual Link System Peroxidase (DakoCytomation, CA, EUA).

Avaliação Morfométrica

Para a análise morfométrica, foi feita uma leitura cega (o pesquisador não sabia a que grupo experimental as lâminas pertenciam), utilizando morfometria convencional, através da utilização de um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular de um microscópio óptico convencional. Uma foto do retículo sobre uma lâmina é apresentada na Figura 3.

Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm)

O intercepto linear médio é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais.

Foram contados 15 campos por lâmina com aumento de 200X.

Utilizando o retículo sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas do parênquima, foram contados o número de vezes que os interceptos cruzavam as paredes dos alvéolos (130).

Foi feita uma média dos quinze campos para cada lâmina e calculado o Lm através da seguinte equação:

$Lm = 2500 \mu m / \text{média do número de vezes que os inteceptos cruzaram as paredes dos alvéolos.}$

O valor de 2500 μm foi obtido através da aferição do retículo utilizado, por meio de uma régua da fabricante Zeiss. O tamanho de cada segmento de reta foi medido utilizando-se a régua em um microscópio com o retículo em um aumento de 200X. A somatória de todos os segmentos do retículo resultou no valor 2500 μm .

Figura 3: Fotomicrografia do retículo sobre uma lâmina, aumento de 200X.

Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elastina

Para obtenção das medidas de fibras de colágeno e de elastina foram contados o número de pontos que incidiam sobre as fibras de colágeno e de elastina e também os pontos que incidiam no parênquima remanescente (131). Para o cálculo, utilizou-se a seguinte equação:

Proporção de Fibras de Colágeno e Elastina no Parênquima Remanescente
= número de pontos que incidiam nas fibras de colágeno (ou elastina) /
número de pontos que incidiam no parênquima

Foram contados 15 campos por lâmina com um aumento de 400X.

Contagem de Macrófagos, Células Positivas para MMP-12 e Células Positivas para Caspase-3

O número de macrófagos e o número de células que expressam MMP-12 e caspase 3 no parênquima alveolar foram obtidos através da contagem do número de pontos. Utilizando o mesmo retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida ($62.500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400X) foi contado o número de pontos que caíam no parênquima para cada campo escolhido. A área de tecido alveolar para cada campo foi calculada de acordo com o número de pontos que interceptavam os septos alveolares. Depois foi

contado o número de células positivas que estavam no tecido do parênquima. A densidade de células foi determinada pela seguinte equação:

Densidade de células positivas = número de células positivas / número de pontos que incidiam no parênquima

O resultado está expresso como células/ μm^2 (132).

Foram contados 15 campos por lâmina com um aumento de 400X.

Expressão de Isoprostano-8

Os resultados de imunohistoquímica para isoprostano-8 foram avaliados de maneira semiquantitativa, em aumento de 400X. Dois observadores fizeram as medidas independentemente. Baseada na intensidade da coloração foi feita uma escala de 0 a 4 (0 = sem coloração; 1 = coloração marrom muito fraca; 2 = coloração marrom fraca; 3 = coloração marrom moderada; 4 = coloração marrom intensa). Foi atribuída, dependendo da intensidade de coloração do parênquima, para cada lâmina, dentro da escala pré-determinada (133).

Análise Estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média $\pm$ EP (erro padrão) e os dados não-paramétricos foram expressos por medianas e percentis. A análise estatística foi feita através da utilização do software Sigma Stat (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para avaliação dos níveis de NO₂ e PM₁₀ foi utilizado teste t de Student. Para os valores de Lm, proporção de fibras de colágeno e elastina e células positivas para Caspase-3, MAC-2 e MMP-12 utilizamos a análise de variância para dois fatores seguida pelo teste de Tukey. Para os dados da escala utilizada para análise dos dados de expressão do isoprostano-8 utilizamos análise de variância para dados não-paramétricos seguida pelo teste de Dunn. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

As médias dos valores das concentrações de material particulado (PM₁₀) e NO₂ estão representadas nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Os níveis de PM₁₀ medidos na câmara que recebeu ar filtrado apresentaram uma redução estatisticamente significativa quando comparados aos níveis deste material na câmara que recebia ar ambiente ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os níveis de NO₂ (Figura 5), temperatura e umidade entre as duas câmaras. As concentrações de NO₂ e PM₁₀ na câmara que recebia ar ambiente foram similares às medidas destes poluentes no ambiente externo às câmaras.

A resistência de vias aéreas (Raw) está representada na Figura 6. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos analisados. Também não houve diferença entre os grupos, quando analisados os dados da resistência tecidual (Gtis, Figura 7). Na Figura 8 estão representados os dados da elastância do tecido pulmonar e, embora os valores de Htis tenham sido mais baixos no grupo que recebeu papaína e foi mantido na câmara que recebia ar filtrado, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Figura 4: Média $\pm$ erro padrão (EP) dos valores de PM_{10} medidos diariamente, ao longo do período em que os animais permaneceram nas câmaras. * $p < 0,001$, comparado à Câmara que recebia ar filtrado.

Figura 5: Média $\pm$ EP dos valores de NO₂ medidos diariamente, ao longo do período em que os animais permaneceram nas câmaras. * $p < 0,001$, comparado à câmara que possui filtros em sua entrada de ar.

Figura 6: Resistência de vias aéreas (Raw) dos quatro grupos de animais . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores são a média $\pm$ EP, $p > 0,05$; $n = 11$ (papaína-ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 7: Resistência do tecido pulmonar (Gtis) dos quatro grupos de animais. Os valores são a média $\pm$ EP. Embora se observe os valores mais baixos nos dois grupos que ficaram expostos à poluição, independente de ter recebido solução salina ou solução de papaína, não foi constatada diferença estatisticamente entre os diferentes grupos, $p > 0,05$; $n = 11$ (papaína-ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 8: Elastância do tecido pulmonar (Htis) dos quatro grupos de animais. Os valores são a média $\pm$ EP. Apesar de o grupo papaína + ar ambiente apresentar os valores mais baixos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, $p > 0,05$. ; $n = 11$ (papaína-ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

A Figura 9 mostra fotomicrografias de cortes histológicos de pulmões de camundongos que receberam instilação intranasal de NaCl 0,9% (A) ou solução de papaína (B). A instilação de papaína acarretou uma significativa destruição dos septos alveolares, resultando em alargamento dos espaços aéreos distais. Na Figura 9 C estão representados os valores de Lm medidos nos quatro grupos experimentais. Os dois grupos que receberam instilação de solução de papaína apresentaram aumento estatisticamente significativo de Lm ($p < 0,001$) comparados aos grupos que receberam instilação somente de solução fisiológica. A média dos valores de Lm medidos nos camundongos que receberam instilação de solução de papaína e foram alocados na câmara que recebia ar ambiente foram significativamente maiores que as médias dos animais que receberam instilação de papaína e foram mantidos na câmara que recebia ar ambiente filtrado ($p = 0,002$).

A proporção do volume de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar estão representadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Foi observado um aumento estatisticamente significativo da proporção de fibras de colágeno nos pulmões dos animais que receberam instilação de solução de papaína ($p < 0,001$). Os animais que receberam solução de papaína e que foram mantidos na câmara que recebeu ar ambiente apresentaram maior proporção de fibras de colágeno quando comparados aos animais que receberam instilação de papaína e foram mantidos na câmara que recebeu

ar ambiente filtrado ($p < 0,05$). Camundongos que receberam instilação de papaína apresentaram um aumento estatisticamente significativo de fibras elásticas no parênquima pulmonar comparados aos animais que receberam somente solução fisiológica ($p < 0,001$). Os animais instilados com solução de papaína e que foram mantidos na câmara que não apresentava filtros apresentaram menor proporção de elástica no parênquima quando comparados aos que receberam papaína e foram mantidos na câmara com filtros ($p = 0,02$).

Observamos um aumento estatisticamente significativo nos animais que receberam instilação de solução de papaína ($p = 0,02$), comparados aos animais que receberam somente solução fisiológica tanto para a contagem de macrófagos, quanto para a contagem de células positivas para MMP12 (Figuras 12 e 13, respectivamente). No entanto, não houve diferença entre os dois grupos que receberam papaína e que foram mantidos em câmaras diferentes. A Figura 14 é uma fotomicrografia do parênquima pulmonar com células marcadas para MAC-2, as células apresentam um tom de marrom, sendo que esta mesma tonalidade é observada para as lâminas em que utilizamos marcador para MMP-12.

A

B

Figura 9 A e 9 B: Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos que receberam instilação intranasal solução de papaína (A) ou de solução salina (NaCl 0.9%) (B) (aumento de 400x, coloração utilizada: Hematoxilina-Eosina). Na figura A, observa-se destruição das paredes alveolares e alargamento dos espaços alveolares , enquanto que na figura B, observamos que a integridade das paredes alveolares foi mantida .

Figura 9 C: Valores do intercepto linear médio medidos nos quatro grupos experimentais. Os valores estão expressos como média $\pm$ EP. * $p < 0,001$ comparados aos grupos que receberam somente instilação de solução salina; ** $p = 0,002$ comparado ao grupo que recebeu instilação de solução de papaína e foi mantido na câmara que recebia ar filtrado ; $n = 11$ (papaína-ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 10: Proporção de fibras de colágeno no parênquima remanescente dos quatro grupos experimentais. Os valores estão representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,001$ comparado aos grupos que receberam instilação de solução salina; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo que foi mantido na câmara que recebia ar filtrado ; $n = 11$ (papaína- ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 11: Proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar remanescente dos quatro grupos experimentais. Os valores estão representados como média $\pm$ EP, * $p < 0,001$, comparados aos grupos instilados com solução salina; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo que permaneceu na câmara que recebia ar filtrado ; $n = 11$ (papaína- ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 12: Número de macrófagos (células positivas para MAC-2) no parênquima pulmonar nos quatro grupos experimentais. Os valores estão representados como média $\pm$ EP, * $p = 0,02$ comparados aos grupos que receberam instilação de solução salina ; $n = 11$ (papaína- ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 13: Número de células marcadas para MMP-12 no parênquima pulmonar nos quatro grupos experimentais. Os valores estão representados como média $\pm$ EP, * $p = 0,04$ comparados aos grupos que receberam instilação de solução salina; $n = 11$ (papaína- ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 14: Fotomicrografia do parênquima pulmonar, em um aumento de 400x, com as células positivas para MAC-2, que assumem uma coloração marrom. Ao analisarmos as lâminas de pulmões com marcação para MMP-12 observamos o mesmo tipo de coloração, células positivas para este marcador são aquelas que assumiram a tonalidade marrom.

Na Figura 15 A estão representados os dados referentes às células positivas para caspase-3, no parênquima pulmonar. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados. A Figura 15 B é uma fotomicrografia do parênquima pulmonar com células positivas para caspase-3.

Observamos um aumento de expressão de isoprostano-8 no tecido pulmonar dos camundongos que receberam instilação de papaína e que permaneceram na câmara que não possuía filtros na entrada de ar, comparada aos outros três grupos (Figura 16 A, $p = 0,002$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que recebeu papaína e foi mantido na câmara com filtros em relação aos grupos que receberam instilação de solução fisiológica. Na figura 16 B (painéis 1 a 5) apresentamos fotomicrografias de cortes de pulmões corados para isoprostano-8.

Figura 15 A: Número de células positivas para caspase-3 no parênquima pulmonar dos quatro grupos experimentais. Os valores estão expressos como média $\pm$ EP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais ; n =11 (papaína-ar ambiente), n = 10 (papaína- ar filtrado), n = 11 (salina- ar ambiente), n = 10 (salina- ar filtrado).

Figura 15 B: Fotomicrografia do parênquima pulmonar, em um aumento de 400x, com as células marcadas para caspase-3.

Figura 16 A: “Box plots” dos valores referentes à intensidade de expressão do isoprostan-8. A linha central corresponde à mediana; os limites dos retângulos correspondem aos percentis 25 e 75% e as barras aos percentis 10 e 90%. Houve um aumento estatisticamente significativo da expressão de isoprostan-8 no grupo que recebeu instilação de solução de papaína e que foi mantido na câmara sem filtros durante os dois meses de exposição, $p = 0,002$; $n = 11$ (papaína- ar ambiente), $n = 10$ (papaína- ar filtrado), $n = 11$ (salina- ar ambiente), $n = 10$ (salina- ar filtrado).

Figura 16 B: Fotomicrografias dos pulmões corados para isoprostano-8, em aumento de 400x. Foram atribuídas notas de 1 a 5 dependendo da intensidade de cor marrom do parênquima pulmonar. Quanto mais marrom o parênquima, maior a nota atribuída à lâmina analisada.

Discussão

A poluição atmosférica é reconhecida como um dos fatores responsáveis pela exacerbação de doenças cardiovasculares e respiratórias, entre elas, o enfisema pulmonar. É muito comum a associação entre o aumento dos níveis de poluentes atmosféricos e o aumento de internações de pacientes que apresentam doença pulmonar obstrutiva crônica (134).

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que a exposição crônica de animais a níveis ambientais de poluentes piora o enfisema induzido por instilação intranasal de papaína. Os animais que receberam instilação de solução de papaína e que foram mantidos na câmara sem filtros apresentaram maior destruição do parênquima pulmonar e maior remodelamento de fibras de colágeno.

A quantificação do enfisema pulmonar foi feita através da medida do intercepto linear médio (Lm). É um achado característico de pulmões enfisematosos o aumento dos espaços aéreos (135,136), sendo esta medida utilizada como um indicador da gravidade do enfisema desenvolvido.

O aumento do Lm observado nos animais que receberam instilação intratraqueal de papaína, quando comparados aos que receberam somente solução salina, confirmou o desenvolvimento de enfisema pulmonar nestes

animais. Além do aumento do Lm, observamos perda de integridade de septos alveolares.

Em trabalho anterior, em nosso laboratório, Fusco et al. (136) induziram enfisema em ratos Wistar, através de instilação intratraqueal de solução de papaína, com a mesma concentração que foi utilizada neste estudo atual, 20 mg/mL e encontraram, também, valores maiores de intercepto linear médio nos animais que receberam solução de papaína em relação ao grupo que recebeu solução salina.

A instilação de substâncias elastolíticas por via traqueal ou inalatória é muito utilizada em modelos animais para indução de enfisema pulmonar, reproduzindo efeitos fisiopatológicos que se assemelham em muito a esta doença em seres humanos (55,73,137).

Dependendo da dose e do tempo de avaliação após a instilação desta substância elastolítica, consegue-se reproduzir enfisema em porções diferentes dos pulmões, podendo-se obter destruição do parênquima pulmonar mais próxima aos brônquios, enfisema centroacinar, que se aproxima mais ao enfisema que ocorre em seres humanos ocasionado pelo tabagismo, ou um enfisema em porções mais distais dos pulmões, de distribuição panacinar, mais semelhante ao observado em pessoas que apresentam deficiência em $\alpha 1$ -antitripsina (138,139,140,141).

Utilizamos instilação intranasal de papaína em camundongos, em um volume de 50 μ L de solução em concentração de 20 mg/mL para cada animal. A administração de substâncias, por via nasal, em camundongos, é uma técnica não invasiva e muito utilizada em imunoterapia (142,143,144) e para a administração de alérgenos (145,146,147), drogas (146,148) e patógenos (149,150,151), atingindo tanto as porções superiores como as inferiores do trato respiratório.

Existe, porém uma preocupação entre os pesquisadores que utilizam esta forma de instilação, não somente quanto à maneira como se distribui a solução instilada através do pulmão, mas também, quanto à proporção que será deglutida pelo animal. Tsuyuki e col. (152) instilaram 50 μ L de solução de Azul de Evans em camundongos, observando que 75% do total instilado encontrava-se nas vias aéreas, sendo que não foi detectada a presença deste corante, nem no esôfago, nem no estômago destes animais. Eyles et al. (143) instilaram, também, um volume de 50 μ L de microesferas de material radioativo (Sc-labeled styrene-divinyl benzene) e 48% deste material encontrava-se no pulmão, já 15 minutos após a administração. Já Takafuji et al. (153) encontraram somente 19% do total de 25 μ L de ovalbumina marcada com material radioativo, após 15 minutos da instilação. Southam et al. (154) instilaram diferentes volumes (5, 10, 15, 20, 25, 50 e 75 μ L) de solução de sulfeto coloidal marcado com ^{99m}Tc , por via nasal em camundongos e observaram que o volume mínimo necessário para que a

substância atingisse porções mais distais dos pulmões seria um volume de 35 μL .

Em nosso estudo acreditamos que o volume que foi instilado em nossos animais conseguiu atingir porções distais dos pulmões, já que o enfisema obtido estava distribuído nas porções próximas à pleura.

Um dos achados mais interessantes do nosso estudo foi a piora do enfisema encontrado no grupo que recebeu papaína e foi exposto à poluição ambiental, sendo que este grupo apresentou valores de L_m significativamente maiores que os valores encontrados nos grupos salina e no grupo papaína que foi mantido na câmara com filtros (Figura 9 C) É importante ressaltar que os camundongos começaram a ser expostos à poluição imediatamente após a instilação da solução de papaína.

Nas últimas décadas houve um grande aumento da frota de veículos, principalmente nas grandes cidades acarretando a liberação de novos poluentes, como ozônio e material particulado fino com diâmetro igual ou menor que 10 μm . A principal fonte emissora de material particulado para a atmosfera, em São Paulo, é predominantemente automotiva, derivada da queima de óleo diesel.

Os filtros utilizados na câmara impediram a passagem de material particulado para o interior desta, no entanto não foram suficientes para

impedir a passagem de poluentes gasosos. Desta forma as duas câmaras não apresentaram diferenças nas medidas dos gases poluentes em seus interiores. Já as partículas com diâmetro igual ou inferior a 10 μm (PM_{10}) ficaram retidas nos filtros da câmara que recebeu ar filtrado e somente os animais mantidos na câmara sem filtros estiveram expostos às concentrações ambientais de material particulado, constituinte dos poluentes (Figura 4).

O material particulado é uma mistura de diferentes tipos de partículas, muitas das quais não promovem efeitos adversos à saúde. Na literatura são vários os estudos que descrevem que os efeitos adversos do PM_{10} são mais importantes em populações que já possuem algum tipo de doença (mais susceptíveis) e não em um grupo de indivíduos saudáveis, exceto em altas concentrações.

Em nossos dados não observamos nenhuma diferença entre os animais que receberam instilação somente de solução salina e que foram mantidos em câmaras distintas, sugerindo que nos níveis ambientais de PM presentes durante o estudo e na duração da exposição, a concentração dos poluentes não acarretou efeitos pulmonares em camundongos saudáveis. No entanto, em estudo anterior desenvolvido por Mohallen et al. utilizando as mesmas câmaras de exposição que utilizamos em nosso trabalho, houve uma diminuição estatisticamente significativa da fertilidade de camundongos-fêmea que foram mantidas por 19 dias, durante o período de gestação, na

câmara que recebia o ar ambiente de São Paulo, comparado às que foram mantidas na câmara que recebia o ar filtrado. Foi observada uma diminuição de 50% de PM_{10} e de 77,5% de NO_2 na câmara que recebia ar filtrado comparada à câmara que recebia ar ambiente. Pires-Neto et al. (125), utilizando também estas mesmas câmaras de exposição, concluíram que a exposição prolongada (5 meses) a níveis ambientais de poluentes em camundongos Swiss com apenas 6 dias de vida levou a alterações no epitélio da cavidade nasal destes animais com consequente aumento da produção de muco ácido. Neste mesmo estudo, houve uma diminuição de 37,85% de NO_2 e de 54,77% de $PM_{2,5}$ na câmara limpa em relação à câmara suja.

Não observamos um efeito significativo da instilação intranasal de papaína sobre os parâmetros obtidos da mecânica respiratória, dois meses após a instilação, embora as análises morfométricas tenham demonstrado ter havido desenvolvimento de enfisema pulmonar, com consequente aumento de Lm. Ao observarmos a Figura 8, podemos notar uma tendência de queda dos valores de Htis (elastância do sistema respiratório) nos grupos que receberam instilação de solução de papaína, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa.

Ito et al. (155) instilaram em camundongos C57BL/6 elastase pancreática de porco, por via intratraqueal, e após três semanas observaram uma diminuição estatisticamente significativa do Htis e do Gtis (resistência do

tecido) no grupo que recebeu a elastase em relação ao que recebeu somente solução salina. Não houve diferença entre os dois grupos quando foi analisada Raw (resistência de vias aéreas). Resultados semelhantes foram obtidos por Brewer et al. (156), que instilando elastase pancreática de porco em ratos, por via traqueal, observaram diminuição de Htis e Gtis, quatro semanas após a instilação, nos animais que receberam elastase quando comparados aos que receberam somente solução salina. Tanto o estudo de Ito et al. (155), quanto o de Brewer et al. (156) foram feitos utilizando-se o respirador Flexivent-Scireq, como em nosso trabalho. No entanto, em ambos os estudos citados acima, o tempo de espera para a coleta dos dados de mecânica respiratória após a instilação foi menor que em nosso estudo. Só fizemos a avaliação da mecânica respiratória dois meses após a instilação da solução de papaína. Optamos pela utilização deste equipamento, por ser um respirador para pequenos roedores, capaz de realizar perturbações em volume nos pulmões do animal em diferentes frequências, o que possibilita analisar o sistema respiratório em diferentes compartimentos, separando tecido de vias aéreas.

Visto que a poluição atmosférica, mais especificamente no nosso estudo, o material particulado, exerceu um efeito importante para a piora do enfisema, resolvemos avançar nos estudos dos mecanismos que poderiam explicar o efeito da poluição sobre o desenvolvimento do enfisema.

Já está demonstrado em modelos de indução de enfisema com utilização de proteases que há migração de macrófagos para regiões que sofrem lesão e que os fragmentos de elastina exercem uma atividade quimiotática para os monócitos (157). Em pacientes enfisematosos, estas células encontram-se em paredes alveolares destruídas.

Em nosso estudo foram feitas medidas da densidade de macrófagos utilizando imunohistoquímica para MAC-2, uma proteína específica para macrófagos. Observamos um aumento estatisticamente significativo na densidade de macrófagos nos pulmões dos camundongos que desenvolveram enfisema pulmonar. Entretanto, não observamos aumento do número de macrófagos induzido somente pela exposição ao material particulado.

Também foram feitas medidas das células que expressavam MMP-12, uma metaloproteinase (MMP), responsável pela degradação de matriz extracelular. A MMP-12 é produzida, principalmente, por macrófagos e está envolvida em doenças pulmonares crônicas inflamatórias associadas a remodelamento das vias aéreas, e parece exercer um papel importante na patogênese destas doenças, em particular, no enfisema pulmonar (158).

Já está previamente descrito que o número de macrófagos expressando MMP-12 é maior em amostras de lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC comparados aos indivíduos saudáveis (159). Camundongos

manipulados geneticamente, deficientes em MMP-12, quando expostos a um protocolo de exposição à fumaça de cigarro, não apresentam aumento do número de macrófagos e também não desenvolvem enfisema após o período de exposição (160).

Neste estudo observamos um aumento de células positivas para MMP-12 nos pulmões dos animais que receberam instilação intranasal de papaína. No entanto, também não houve diferença significativa desta medida quando comparamos o grupo de animais que foi mantido na câmara que recebia ar ambiente em relação ao que foi mantido na câmara que recebia o ar ambiente filtrado, o que sugere que a piora do enfisema observado nos animais da câmara sem os filtros não apresenta relação com o aumento da atividade da MMP-12.

No enfisema não ocorre somente destruição mas também remodelamento dos septos alveolares. Vlahovic et al. (161) observaram aumento da proporção de fibras elásticas e de colágeno em pedaços de pulmões de pacientes enfisematosos submetidos à lobectomia. Este aumento da síntese de fibras elásticas e de fibras de colágeno nas áreas enfisematosas sugere a ocorrência de um processo de reparo tecidual mas não necessariamente indica uma melhoria na função destas porções do pulmão.

Rubio et al. (162) observaram aumento da proporção de fibras de colágeno em pulmões de ratos no oitavo dia após a instilação intratraqueal de

elastase. Kononov et al. (163) também observaram em ratos um aumento da espessura das fibras de colágeno e elásticas nas paredes alveolares quatro semanas após o tratamento com elastase. Obtivemos resultados similares a estes (Figura 10 e 11); os animais que receberam papaína apresentaram aumento da proporção tanto de fibras de colágeno quanto de fibras elásticas nos septos alveolares.

Juntamente a estes dados, a exposição ao material particulado acarretou um aumento estatisticamente significativo da proporção das fibras de colágeno. Pinkerton et al. (35) observaram em fragmentos de pulmões de pacientes fumantes que apresentavam bronquite crônica uma correlação significativa entre o acúmulo de resíduos de poeira de origem mineral e de carbonáceos em bronquíolos respiratórios e um aumento de deposição de tecido conectivo (fibras de colágeno e fibras elásticas) sugerindo que o remodelamento é dependente da deposição de material particulado.

Embora tenha ocorrido aumento da densidade de fibras elásticas em ambos os grupos que receberam papaína, o grupo que foi mantido na câmara que recebia ar ambiente apresentou valores inferiores aos observados no grupo da câmara com filtros.

De uma maneira geral, os estudos que abordam remodelamento em paciente enfisematosos ou em modelos experimentais de enfisema (35,161,163), consideram o remodelamento do tecido conectivo como um

todo, não havendo a preocupação de estudar a participação relativa de fibras elásticas e colágenas. Em nosso estudo não fizemos uma análise temporal, ao longo dos dois meses de exposição, só temos resultados dos pulmões ao término dos dois meses, assim, não acompanhamos pormenorizadamente o processo de destruição seguido pelo remodelamento. No entanto, o resultado que obtivemos para as fibras elásticas nos faz supor que a exposição ao material particulado pode ter induzido uma maior destruição destas fibras inicialmente, o que acarretaria um valor mais baixo da proporção destas fibras após os dois meses comparado aos valores daqueles animais que não receberam o material particulado, apesar da ocorrência do remodelamento.

Talvez este remodelamento das fibras do tecido conectivo observado em nosso estudo tenha tido uma importância significativa nos resultados negativos que obtivemos para os dados de mecânica respiratória, especialmente para o dado de elastância do tecido (Htis). Dois meses após a instilação da solução de papaína obtivemos aumento de Lm, com aumento da proporção de fibras de colágeno e de fibras elásticas; esta fibrose que encontramos pode ter tido um efeito oposto ao da lesão dos septos alveolares. No trabalho de Ito et al. (155), em que foi encontrada diferença na elastância do tecido entre os animais instilados com elastase pancreática de porco e os que foram instilados somente com solução salina, foi observado também um aumento da proporção de fibras de colágeno, três

semanas após a instilação. No entanto não foi observado aumento significativo das fibras elásticas entre os grupos.

O papel da apoptose na patogênese da DPOC tem sido foco de estudo em muitos grupos, que vêm utilizando fragmentos de pulmões de pacientes DPOC. Segura-Valdez et al. (164) encontraram um aumento da apoptose de células endoteliais em pulmões de pacientes com DPOC. Immai et al. (65) também observaram aumento de células apoptóticas (células epiteliais e endoteliais) em pulmões de pacientes enfisematosos, juntamente com aumento da atividade de caspase-3. Yokohori et al. (166) encontraram aumento de apoptose de células epiteliais em pacientes com enfisema fumantes comparados aos enfisematosos que não fumavam. Em modelo experimental, Aoshiba et al. (37) fizeram administração intratraqueal de caspase-3 em camundongos e observaram apoptose de células das paredes alveolares, predominantemente de células epiteliais com posterior destruição destas paredes e alargamento dos espaços aéreos distais.

A exposição ao material particulado, incluindo partículas derivadas da queima do diesel, leva à exacerbação de doenças respiratórias, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica e tem sido considerada fator importante para promover a supressão da atividade fagocítica dos macrófagos (167). A apoptose de macrófagos pode ser um dos mecanismos que explicaria a piora da inflamação pulmonar devido à exposição a poluentes (168). No entanto, Kafoury et al. (38) demonstraram, em cultura de

células, que a exposição a partículas derivadas do diesel aumenta a atividade inibitória do NF-Kappa B-DNA, protegendo contra a apoptose. Para avaliarmos o número de células que entraram em apoptose nos pulmões dos nossos animais, medimos o número de células que expressaram caspase-3. Não obtivemos diferenças significativas entre os quatro grupos, sugerindo que em nosso estudo não podemos correlacionar a piora do enfisema ao mecanismo da apoptose (Figura 15 A)

Segundo estudo de MacNee e Donaldson (169), o principal mecanismo que explica a ação do material particulado no sistema respiratório é o estresse oxidativo e que as populações mais suscetíveis são aquelas em que já existe um mecanismo de estresse oxidativo pré-existente, o que já está demonstrado em pacientes com doença de vias aéreas.

As partículas ultra-finas são nocivas ao sistema respiratório, conseguindo atingir porções distais dos pulmões, devido ao tamanho reduzido. Estas partículas ficam depositadas em diferentes regiões dos pulmões, formando agregados, com uma grande área de superfície de contato, facilitando interações com outras partículas (170).

Instilação intratraqueal de partículas ultra-finas levou a aumento do estresse oxidativo e dos efeitos pró-inflamatórios em ratos (171).

Rhoden et al (172) observaram que a administração de N-acetil-cisteína, em dose suficiente para inibir o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reduzir a oxidação de proteínas preveniu a inflamação em pulmões de ratos inalados com concentrado de partículas do ambiente.

Para estudarmos a importância do estresse oxidativo em nosso protocolo experimental medimos a expressão do isoprostano-8 nos tecidos pulmonares dos camundongos dos quatro grupos. Os isoprostanos são compostos resultantes da peroxidação do ácido aracdônico das membranas celulares, sendo bastante utilizados como marcadores de estresse oxidativo em doenças pulmonares. Estes compostos encontram-se aumentados em indivíduos que possuem doença pulmonar obstrutiva crônica (173), fibrose cística (174) e hipertensão pulmonar (175). O isoprostano-8 é considerado um bom marcador de estresse oxidativo tanto em seres humanos quanto em animais (176) .

Tipos diferentes de isoprostanos são produzidos através da lipoperoxidação da membrana promovida pelas espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, mas os mais comuns são aqueles em que a peroxidação ocorre no carbono 9 e 11 do ácido aracdônico originando o i8-iso-PGF2 α . São compostos que conseguem ser detectados em concentrações mínimas (nanomolares) através da utilização de técnicas analíticas como HPLC, são estáveis em amostras de fluidos, como por exemplo em amostras de lavado broncoalveolar e as concentrações destes compostos são estáveis (177).

Em nosso estudo, o grupo de camundongos que recebeu instilação intranasal de papaína e permaneceu exposto ao ar ambiente por dois meses apresentou maior expressão de isoprostano-8 comparado aos outros três grupos (Figura 16 A).

Donaldson et al. (178) utilizando cultura de macrófagos (cell line J774.2) expostos a partículas finas e ultra-finas, observaram que a presença destas partículas interferiu de forma negativa na atividade fagocítica dos macrófagos. O decréscimo da atividade fagocítica permitiu um aumento da interação entre estas partículas e o epitélio respiratório, o que acarretou o aumento do estresse oxidativo e a produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas pelo epitélio respiratório.

A presença do material particulado na câmara sem filtros foi fundamental para o aumento do estresse oxidativo, levando a uma piora do enfisema e indução de remodelamento nos animais que receberam papaína.

Visto que, dos mecanismos de piora do enfisema estudados, encontramos diferença entre os dois grupos que receberam instilação de solução de papaína e que foram mantidos em câmaras diferentes apenas na expressão de isoprostano-8, podemos levantar a hipótese de que, em nosso estudo, a presença do material particulado foi fundamental para o aumento do

estresse oxidativo, acarretando uma piora do enfisema e indução de remodelamento nos animais que receberam papaína.

Conclusões

Neste estudo, concluímos que:

- a exposição a níveis ambientais de material particulado acarretou piora do enfisema pulmonar e do remodelamento pulmonar em camundongos submetidos à instilação intranasal de papaína;
- o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos responsáveis por esta resposta;
- os efeitos da exposição ao material particulado não foram observados nos animais que não receberam instilação intratraqueal de solução de papaína.

Referências

- 1) GOLD 2006 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Executive Summary: global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Disponível em <http://www.goldcopd.com>
- 2) Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary diseases. *Respiratory Research* 2004; 5:18.
- 3) Watson PB, Town GI, Holbrook N, Dwan C, Toop LJ, Drennan CJ. Evaluation of a self-management plan for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Resp J* 1997; 10(6): 1267-71.
- 4) Pawels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Gold Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLB/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5): 1256-76.
- 5) Mannino DA. COPD: Epidemiology, Prevalence, Morbidity, Mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 2002;121;121-6.
- 6) Cosio M, Ghezzo H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, Macklem PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med* 1978; 298(23): 1277-81.
- 7) Penman RW, O'Neill RP, Begley L. The progress of chronic airway obstruction in relation to measurements of airway resistance and lung elastic recoil. *Am Rev Respir Dis* 1970; 101(4): 536-44.

- 8) Colebatch HJ, Finucane KE, Smith MM. Pulmonary conductance and elastic recoil relationships in asthma and emphysema. *J Appl Physiol* 1973;34(2):143-53.
- 9) Menezes AMB, Jardim JR, Prez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO study in São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 2005; 21(5):1565-73.
- 10) Celli BR, Halbert RJ, Iqbal A, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. *Eur Resp J* 2003; 22: 268-73.
- 11) Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54 (9): 825-57.
- 12) Springer J, Geppeti P, Fischer A, Groneberg DA. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16(3): 121-30.
- 13) Chung F, Barnes N, Allen M, Angus R, Corris P, Knox A, Morice A, O'Reilly J, Richardson M. Assessing the burden of respiratory disease in the UK. *Respir Med* 2002; 96 (12), 963-75.
- 14) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliot WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sclurba FC, Coxson HO. The nature of small-Airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-53.
- 15) Groneberg DA, Chung FK. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research* 2004; 5:18.

- 16) Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lotvall J, Pauwels RA, Plopper CG. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003; 22(2): 374-82.
- 17) Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21(2): 347-60.
- 18) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157 (3): 822-6.
- 19) Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferrarresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(2): 301-6.
- 20) Saetta M, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallero G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P. CD8⁺ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160 (2):711-7
- 21) Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 50s-9s.
- 22) Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121 (5 Suppl): 151S-5S.
- 23) Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128(5): 833-8.

- 24) Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(5): 29s-32.
- 25) 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(3): 368-74.
- 26) O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest* 2003; 123:411S-6S.
- 27) Vignola AM, La Grutta S, Chiappara G, Benkeder A, Bellia V, Bonsignore G. Cellular network in airways inflammation and remodelling. *Paediatr Respir Rev* 2002; 3:41-6.
- 28) Kuhn C, Yu S-Y, Chraplyvy MS, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase II. Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976; 34(4):372–80.
- 29) Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1985; 133:149–69.
- 30) Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277:2002–4.
- 31) Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17: 946-53.

- 32) Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:469-7
- 33) Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:301-6.
- 34) Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallero G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711-7.
- 35) 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; 155:852-7.
- 36) Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl* 2003; 44: 30s-32s.
- 37) Parfrey H, Mahadeva R, Lomas DA. Alpha(1)-antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:1009-14.
- 38) Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: Pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002, 110:1585-90.

- 39) Maitra A, Kumar V. The lung and the upper respiratory tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia Saunders- Elsevier Science; 2002
- 40) Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 555-62
- 41) Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AMG, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *Am J Pathol* 2003; 163:2329-35.
- 42) Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277:2002-4.
- 43) Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:S31-7.
- 44) Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7:1-32.
- 45) Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Oxidative Stress in Expired Breath Condensate of Patients With COPD. *Chest* 2003; 124:1373-80.
- 46) Kinnula VL. Production and degradation of oxygen. Metabolites during inflammatory states in human lung. *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy* 2005; 4(4): 465-70.
- 47) Bracci R. Free oxygen radicals and surfactant. *Biol Neonate* 1997; 71 (suppl1):23-7

- 48) Haddad IY, Ischiropoulos H, Holm BA, Beckman JS, Baker JR, Matalon S Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to lung surfactants. *Am J Physiol* 1993; 265:L555-L564
- 49) Holm BA, Matalon S, Finkelstein JN, Notter RH . Type II pneumocyte changes during hyperoxic lung injury and recovery. *J Appl Physiol* 1988;65:2672-78.
- 50) Schock BC, Sweet DG, Ennis M, Warner JA, Young IS, Halliday HL. Oxidative stress and increased type-IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies. *Pediatr Res* 2001; 50: 29-33.
- 51) Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research* 2006; 7:53-9.
- 52) Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 555-62
- 53) Mahadeva R, Shapiro, SD. Chronic obstructive pulmonary disease 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002; 57: 908-14.
- 54) Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lotvall J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 374-82.

- 55) Snider GL. Emphysema: The first two centuries-and beyond: A historical overview, with suggestions for future research:Part 2. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1615-22.
- 56) Snider GL, Lucey EC, Stone PJ: Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:149-69.
- 57) Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Lab Invest* 1976; 34:372-80.
- 58) Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1422–8.
- 59) Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, et al. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:52–7.
- 60) Wright JL. The importance of ultramicroscopic emphysema in cigarette smoke-induced lung disease. *Lung* 2001; 179:71–81.
- 61) 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; 170: 974–80.
- 62) Dhami R, Gilks B, Xie C, et al. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 244–52.

- 63) Shore S, Kobzik L, Long NC, Skornik W, Van Staden CJ, Boulet L, Rodger IW, Pon DJ. Increased airway responsiveness to inhaled methacholine in a rat model of chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1931-38.
- 64) Kodavanti UP, Jackson MC, Ledbetter AD, Starcher BC, Evansky PA, Harewood A, Winseta DW, Costa DL. The combination of elastase and sulfur dioxide exposure causes COPD-like lesions in the rat. *Chest* 2000; 117: 299S-302S.
- 65) Barth PJ, Muller B. Effects of nitrogen dioxide exposure on Clara cell proliferation and morphology. *Pathol Res Pract* 1999; 195:487-93.
- 66) Azoulay-Dupuis E, Torres M, Soler P, Moreau J: Pulmonary NO₂ toxicity in neonate and adult guinea pigs and rats. *Environ Res* 1983; 30: 322-39.
- 67) Mudway IS, Kelly FJ. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Mol Aspects Med* 2000; 21:1-48.
- 68) Haddad EB, Salmon M, Sun J, Liu S, Das A, Adcock I, Barnes PJ, Chung KF. Dexamethasone inhibits ozone-induced gene expression of macrophage inflammatory protein-2 in rat lung. *FEBS Lett* 1995; 363: 285-8.
- 69) Sun J, Chung KF. Airway inflammation despite loss of bronchial hyper-responsiveness after multiple ozone exposures. *Respir Med* 1997; 91:47-55.

- 70) Haddad EB, Liu SF, Salmon M, Robichaud A, Barnes PJ, Chung KF. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in Brown Norway rats exposed to ozone: effect of dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 1995; 293:287-90.
- 71) Tsukagoshi H, Haddad EB, Sun J, Barnes PJ, Chung KF. Ozone induced airway hyperresponsiveness: role of superoxide anions, NEP, and BK receptors. *J Appl Physiol* 1995; 78:1015-22.
- 72) Haddad EB, Salmon M, Koto H, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kappa b in rat lung: inhibition by corticosteroids. *FEBS Lett* 1996; 379:265-8.
- 73) Snider GL. Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury. *Eur J Respir Dis Suppl* 1986; 146:17-35.
- 74) Harkema JR, Wagner JG. Non-allergic models of mucous cell metaplasia and mucus hypersecretion in rat nasal and pulmonary airways. *Novartis Found Symp* 2002; 248:181-97; discussion 197-200, 277-82.
- 75) Albrecht C, Adolf B, Weishaupt C, Hohr D, Zeittrager I, Friemann J, Borm PJ. Clara-cell hyperplasia after quartz and coal-dust instillation in rat lung. *Inhal Toxicol* 2001; 13:191-205.

- 76) Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Gorlitz BD, Hecht M, Kairies U, Muhle H, Muller M, Heinrich U, Pott F. Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO). *Exp Toxicol Pathol* 2002; 54:109-26.
- 77) Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 2002; 15:213-20.
- 78) Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1369-82.
- 79) Churg A, Zay K, Li K. Mechanisms of mineral dust-induced emphysema. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 5:1215-18.
- 80) Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlen SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* 2001; 17:733-46.
- 81) Ma JY, Ma JK. The dual effect of the particulate and organic components of diesel exhaust particles on the alteration of pulmonary immune/inflammatory responses and metabolic enzymes. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2002; 20:117-47.
- 82) Martorana PA, van Even P, Gardi C, Lungarella G. A 16-month study of the development of genetic emphysema in tightskin mice. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:226-32.

- 83) Ranga V, Grahn D, Journey TM. Morphologic and phenotypic analysis of an outcross line of blotchy mouse. *Exp Lung Res* 1983; 4:269-79.
- 84) 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 alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lab Invest* 1993; 68:233-41.
- 85) Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and marlboro mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:4-7.
- 86) Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest* 2000; 117:223S-7S.
- 87) Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY. Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:320-6.
- 88) Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* 1980; 66:859-62.
- 89) Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science* 1981; 212:925-7.
- 90) Abbey DE, Burchette RJ, Knutsen SF, McDonnell WF, Lebowitz MD, Enright PL. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 289-98.
- 91) Donaldson K, Stone V, Clouter A, Reinwich L, MacNee W. Ultrafine Particles. *Occup Environ Med* 2001; 58: 211-6.

- 92) Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287: 1132-41.
- 93) Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002; 360: 1233-42.
- 94) Lin CA, Martins MA, Farhat SCL, Conceição GMS, Anastacio VM, Hamaue WR, Bohm GM, Saldiva PH. Air Pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Peadritr Perinat Epidemiol* 1999; 13: 475-88.
- 95) Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, Vacek P, Mossman BT. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappa-B-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation *in vitro*. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2000; 23: 182-7.
- 96) Hetland RB, Casse FR, Refsnes M, Schwarze PE, Lag M, Boere AJF, Dybing E. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicology in Vitro* 2004; 18:203-12.
- 97) Pinkerton KE, Green FHY, Saiki C, Vallyathan V, Plopper CG, Gopal V, Hung D, Bahne EB, Lin SS, Menache MG, Schenker MB. Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108:1063-9.
- 98) Cardoso W, Sekhon H, Hyde DM, Thurlbeck WM. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1993; 137:975-81.

- 99) Thurlbeck WM, Ryder RC, Sternby N. A comparative study of the severity of emphysema in necropsy populations in three different countries. *Am Rev Resp Dis* 1974; 109(2):239–48.
- 100) Adesina AM, Vallyathan V, McQuillen EN, Weaver SO, Craighead JE. Bronchiolar inflammation and fibrosis associated with smoking. A morphologic cross-sectional population analysis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143(1):144–9.
- 101) Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974; 291(15):755–8.
- 102) Wright JL, Cagle P, Churg A, Colby TV, Myers J. State of the art. diseases of the small airways. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:240–62.
- 103) Alexis A, Gaffney P, Garcia C, Nystrom M, Rood R. The 1999 California Almanac of Emissions and Air Quality. Sacramento, CA:California Environmental Protection Agency/Air Resources Board 1999; 271.
- 104) Harkema J, Plopper C, Hyde D, St. George J, Wilson D, Dungworth D. Response of macaque bronchiolar epithelium to ambient concentrations of ozone. *Am J Pathol* 1993; 143:857–66.
- 105) Sherwin RP, Barman ML, Abraham JL. Silicate pneumoconiosis of farm workers. *Lab Invest* 1979; 40:576–82.
- 106) Churg A, Brauer M, Vedal S, Stevens B. Ambient mineral particles in small airways of the normal human lung. *J Environ Med* 1999; 1:39–45.

- 107) Churg A, Brauer M. Human lung parenchyma retains PM2.5. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:2109–11.
- 108) Plopper CG, Ten Have-Opbroek A. Anatomical and histological classification of the bronchioles. In: Diseases of Bronchioles (Epler G, ed). New York:Raven Press, Ltd. 1994;15–25.
- 109) Pinkerton KE, Green FHY, Saiki C, Vallyathan V, Plopper CG, Gopal V, Hung D, Bahne EB, Lin SS, Menache MG, Schenker MB. Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108:1063-9.
- 110) Federspiel WJ, Fredberg JJ. Axial dispersion in respiratory bronchioles and alveolar ducts. *J Appl Physiol* 1988; 64(6): 2614–21.
- 111) Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine Particles. *Occup Environ Med* 2001;58;211-6.
- 112) MacNee W, Donaldson K. Particulate air pollution: injurious and protective mechanisms in the lungs. In: Holgate ST, Samet JM, Koren HS, Maynard RL (Ed.). *Air pollution and health*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 653-72.
- 113) MacNee W, Donaldson K. Exacerbations of COPD: Environmental Mechanisms. *Chest* 2000; 117 (5 Suppl 2): 390S-7S.
- 114) Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:981-8.

- 115) Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) *in vivo* and *in vitro*. *Thorax* 1996; 51: 1216-22.
- 116) Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, Drost EM, Hay RT, Donaldson K, MacNee W. Activation of NF-kappaB by PM10 occurs *via* an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 101-10.
- 117) Anderson PJ, Wilson DJ, Hirsch A. Respiratory tract deposition of ultrafine particles in subjects with obstructive or restrictive lung disease. *Chest* 1990; 97:1115–20.
- 118) Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, et al. Pulmonary inflammatory, chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136:372–80
- 119) Morrow PE. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam Appl Toxicol* 1988; 10:369–84
- 120) Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, et al. Free-radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air-pollution (PM10) *in-vivo* and *in-vitro*. *Thorax* 1996; 51:1216–22
- 121) Kennedy TP, Dodson R, Rao NV, et al. Dusts causing pneumoconiosis generate. OH and produce hemolysis by acting as Fenton catalysts. *Arch Biochem Biophys* 1989; 269:359–64.
- 122) Donaldson K, Beswick PH, Gilmour PS. Free-radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity. *Toxicol Lett* 1996; 88:293–8

- 123) Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998; 53:601–12.
- 124) Dye JA, Adler KB, Richards JH, Dreher KL.. Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: role of reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 12: 625–33.
- 125) Pires-Neto RC, Lichtenfels AJ, Soares SR, Macchione M, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environmental Res.* 2006; 101 (3): 356-61.
- 126) Lodge Jr JP, Methods of Air Sampling and Analysis, third ed. Intersociety Comité, Lewis Publishers, Inc 1989.
- 127) Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, and Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J. Appl. Physiol* 1992; 72(1): 168-78.
- 128) Bates JHT, Abe T, Romero PV, and Sato J. Measurements of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. *J. Appl. Physiol* 1989; 67: 488-92.
- 129) Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1750–7.
- 130) Margraf LR, Tomashefski JF, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 391-400.

- 131) Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100(5): 1610-6.
- 132) Kluijver J, Schrumpf JA, Evertse CE, Sont JK, Roughley PJ, Rabe KF, Hiemstra PS, Mauad T, Sterk PJ. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35 (10): 1361-9
- 133) Fregonese L, Swan FJ, van Schadewijk A, Dolhnikoff M, Santos MA, Dahan MR, Stolk J, Tschernig T, Sterk PJ, Hiemstra PS, Rabe KF, Mauad T. Expression of the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is increased in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(6): 1148-54.
- 134) March TH, Green FHY, Fletcher FH, Kinula KJ. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease. *Inhalation Toxicology* 2000; 12(4): 155-87.
- 135) Johanson Jr WG, Pierce AK. Effects of elastase, collagenase, and papain on structure and function of rat lungs in vitro. *J Clin Invest* 1972; 51: 288-93.
- 136) Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol* 2002; 28(1): 1-7.
- 137) Karlinsky JB, Snider GL. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:1109-13.

- 138) Gross P, Tolker EA, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health* 1965; 11:50-8.
- 139) Damon EG, Mauderly JL, Jones RK. Early effects of intratracheal instillation of elastase on mortality, respiratory function, and pulmonary morphometry of F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 64: 467-75.
- 140) Heemskerk-Gerritsen BAM, Dijkman JH, Ten Have-Opbroek AAW. Stereological methods: A new approach in the assessment of pulmonary emphysema. *Microsc Res Tech* 1996; 34: 556-62.
- 141) Wright JL, Harrison N, Wiggs B, Chrug A. quartz but not iron oxide causes airflow obstruction, emphysema, and small airways lesions in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:129-35.
- 142) Barackman JD, Ott G, and O'Hagan DT. Intranasal immunization of mice with influenza vaccine in combination with the adjuvant LT-R72 induces potent mucosal and serum immunity which is stronger than that with traditional intramuscular immunization. *Infect Immun* 1999; 67: 4276-9.
- 143) Eyles JE, Williamson ED, and Alpar HO. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume. *Int J Pharmaceut* 2000; 189: 75-9.
- 144) Fukushima A, Yoo YC, Yoshimatsu K, Matsuzawa K, Tamura M, Tono-Oku S, Taniguchi K, Urasawa S, Arikawa J, and Azuma I. Effect of MDP-Lys (L18) as a mucosal immunoadjuvant on protection of mucosal infections by Sendai virus and rotavirus. *Vaccine* 1996; 14: 485-91.

- 145) Charpoval S, Nabozny G, Marietta EV, Raymond EL, Krco CJ, and Andrivet P. Short ragweed allergen induces eosinophilic lung disease in HLA-DQ transgenic mice. *J Clin Invest* 1999; 103: 1707–17.
- 146) Chun S, Daheshia M, Lee S, Eo SK, and Touse BT. Distribution fate and mechanism of immune modulation following mucosal delivery of plasmid DNA encoding IL-10. *J Immunol* 1999; 163: 2393–402.
- 147) Zhang Y, Lamm WJE, Albert RK, Chi EY, Henderson WR, Lewis DB. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 661–9.
- 148) Stampfli MR, Cwiartka M, Gajewska BU, Alvarez D, Ritz S, Inman MD, Xing Z, and Jordana M. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization to mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 586–96.
- 149) Hvalbye BKR, Aaberge IS, Lovik M, and Haneberg B. Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection. *Infect Immun* 1999; 67: 4320–5.
- 150) Martin M, Metzger DJ, Michalek SM, Connell TD, Russell MW. Comparative analysis of the mucosal adjuvanticity of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb. *Infect Immun* 2000; 68: 281–7.
- 151) Ng WH, Lutsar I, Wubbel L, Ghaffar F, Jofri H, McCracken GH, and Friedland IR. Pharmacodynamics of trovafloxacin in a mouse model of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 811–6.

- 152) Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, and Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (Th2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med* 1997; 185: 1671-9.
- 153) Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, and Muranka M. Diesel exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 639-45.
- 154) Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillation in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L833-L839.
- 155) Ito S, Ingenito EP, Brewer KK, Lauren DB, Harikrishnan P, Lutchen KR, Suki B. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodelling. *J Appl Physiol* 2005; 98: 503-11.
- 156) Brewer KK, Sakai Hiroaki, Alencar AM, Majundar A, Arold SP, Lutchen KR, Ingenito EP, Subi B. Lung and alveolar wall elastic and hysteric behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1926-36.
- 157) Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, Mecham RP, Senior RM, Shapiro SD. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest* 2006; 116:753-9.

- 158) Nénan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem Int Oswaldo Cruz* 2005; 100 (Suppl I): 167-72.
- 159) Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2002; 283: L867-L873.
- 160) Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S29-S32.
- 161) Vlahovic G, Russel ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2086-92.
- 162) Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba German, Gonzáles-Mangado N. Oral N-Acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004; 125: 1500-6.
- 163) Kononov S, Brewer K, Sakai H, Cavalcante FSA, Sabayanagam CR, Ingenito EP, Subi B. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1920-6.
- 164) Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117:684-94.
- 165) Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25:250-8.

- 166) Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004, 125: 626-32.
- 167) Jakab GJ, Risby TH, SehnertSS, Hmieleski RR, Farrington JE. Suppression of alveolar macrophage membrane receptor-mediated phagocytosis by model and actual particle-adsorbate complexes; initial contact with the alveolar macrophage membrane. *Environ. Health Perspect.* 1990, 86: 337- 44.
- 168) Holian A, Hamilton Jr. RF, Morandi MT, Brown SD, Li L. Urban particule-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* 1998; 106: 127-32.
- 169) Donaldson K, Stone V. Current hypothesis on the mechanism of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanità* 2003; 39 (3): 405-10.
- 171) Brown DM, Stone V, Findlay P, MacNee W, Donaldson K. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med* 2000; 57: 685-91.
- 172) Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, Gonzáles-Flecha B. N-Acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol Sciences* 2004; 79: 296-303.

- 173) Pratico DB, Vieiro MCC, FitzGerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2-alpha-III, as index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 170:8-17.
- 174) Montuschi PKSA, Ciabtoni GCM, van Rensen L, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55: 205-9.
- 175) Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G, Pepin JL, Bessard JSC, Stanke-Labesque FPC. Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1038-42.
- 176) Morrow JD and Roberts LJ. The isoprostanes. Their roles as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(12 Pt 2): S25-30.
- 177) Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *The journal of Biol Chemistry* 1999; 274(35): 2441-4.
- 178) Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafines particles. *Occup Environ Med* 2001; 58: 211-6.