ADRIANA MARTINS ANCIÃES

**Análise temporal da mecânica respiratória e
morfometria pulmonar em camundongos após
instilação nasal de papaína**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Fernanda Degobbi Tenorio Quirino
dos Santos Lopes

SÃO PAULO
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Anciães, Adriana Martins

Análise temporal da mecânica respiratória e morfometria pulmonar em camundongos após instilação nasal de papaína / Adriana Martins Anciaes. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Enfisema pulmonar 2.Modelos animais 3.Modelos experimentais 4.Camundongos 5.Mecânica respiratória 6.Remodelamento do parênquima pulmonar

USP/FM/DBD-069/11

*“Deus me dê Serenidade para aceitar as coisas
que não posso mudar, Coragem para mudar
aquilo de que sou capaz e Sabedoria para ver a
diferença.”*

Autor desconhecido

Agradecimentos

À minha mãe, Adozinda pelo apoio incondicional e ao meu marido Alessandro Tavares, por suportar meus momentos de estresse, pela contribuição com sugestões na elaboração deste trabalho e por estar sempre ao meu lado. AMO VOCÊS!!!!!!

Ao Professor Milton de Arruda Martins, chefe do laboratório, que eu admiro muito, que sempre com muito carinho, cordialidade e confiança, me deu a oportunidade de frequentar o laboratório (LIM 20), para que eu pudesse realizar este trabalho. Sou IMENSAMENTE grata pelo apoio e consideração.

À Fernanda Degobi Tenório Quirino dos Santos Lopes, por ter assumido a orientação desta tese e que me acolheu com tanto carinho e se tornou minha orientadora e amiga ...e que sem ela não teria finalizado este trabalho.....MUITO OBRIGADA!!!!

À Clarice Olivo por estar sempre ao meu lado me ajudando a resolver todos os problemas que apareciam.

À Fernanda Magalhães Arantes, por estar sempre disposta a me ajudar com qualquer dúvida ou problema no início deste trabalho

Ao Henrique Takachi Morya com toda sua inteligência e paciência , agradeço todo apoio e disponibilidade que me proporcionou ao longo desta tese.

À Carla que gentilmente cedeu os equipamentos necessários para a concretização desta tese e por estar sempre disposta a ajudar.

À minha amiga Keila. Iniciamos juntas este trabalho e enfrentamos tantos obstáculos!!!. Saibas que és parte dele.....Obrigada!!!!.... pela amizade e companherismo em todos os momentos da minha vida.

Às minhas queridas amigas, Lília Yuri Yamauchi, Claudia Kano, Carolina Fu, Ana Carolina Cavalcanti, Simone B.N.Miguel, Ana Nery, Alessandra Mahieux, Fabiana Leão, Raquel Pires, que sempre estarão em meu coração, Obrigada!!!.. por me apoiarem sempre.....

Ao meu cunhado e amigo Guilherme Tavares, que com sua inteligência, paciência está sempre disposto a me ajudar a qualquer momento.

A Rosana Aparecida secretária do Professor Milton, sempre disposta a ajudar. Obrigada!!

À toda equipe do LIM 20, que sem exceção, são extremamente amigáveis e sempre me apoiaram e me auxiliaram na realização deste trabalho. O meu reconhecido e carinhoso MUITO OBRIGADA!!!!!!...

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

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

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

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

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Abstract

1.INTRODUÇÃO	1
1.1Definição	2
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Fisiopatologia da DPOC	4
1.4 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC	8
1.5 Modelos Experimentais de DPOC	11
1.5.1 Instilação de protease	11
1.5.2 Inalação de gases tóxicos	13
1.5.3 Modelos Experimentais com Animais Manipulados Geneticamente	15
1.6 Técnicas utilizadas para avaliação do enfisema em modelos experimentais	16
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	22

2.2 Objetivos Específicos.....	22
3.MÉTODOS.....	23
3.1 Indução do Enfisema Pulmonar.....	24
3.2 Grupos Experimentais.....	24
3.3 Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório	25
3.4 Análise Histológica	28
3.5 Imunohistoquímica.....	28
3.6 Avaliação Morfométrica	29
3.7 Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm)	30
3.8 Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elastina	32
3.9 Contagem de Macrófagos e Células Positivas para MMP-12	32
3.10 Expressão do Isoprostano 8 no Parênquima.....	33
3.11 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Avaliação da Mecânica Respiratória	36
4.2 Avaliação Morfométrica	36
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS	56

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema dos Mecanismos inflamatórios na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	7
Figura 2	Esquema da Interação entre os mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.....	11
Figura 3	Esquema dos grupos papaína e salina divididos de acordo com o dia do sacrifício.....	24
Figura 4	Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória.....	26
Figura 5	Foto do retículo,utilizado para as medidas morfométricas, sobre uma lâmina.....	31
Figura 6	Gráficos dos Valores de Htis, Gtis e Raw (médias $\pm$ desvio padrão) dos parâmetros obtidos pela avaliação da mecânica respiratória nos diferentes tempos estudados.....	39

Figura 7	Gráficos dos Valores de Lm, da proporção de fibras de colágeno e elástica dos grupos salina e papaína nos diferentes tempos estudados.....	40
Figura 8	Fotomicrografias de parênquima pulmonar nos dias 15, 28 e 40 após a instilação de papaína (Grupo P) ou solução salina (Grupo S).....	41
Figura 9	Representação gráfica de números de células positivas para MAC-2, de células marcadas para MMP12 e expressão de isoprostano-8 no parênquima pulmonar.(média $\pm$ desvio padrão).....	42
Figura 10	Fotomicrografia do parênquima pulmonar, com as células positivas para MAC-2.....	43
Figura 11	Fotomicrografia dos pulmões (A) grupo salina (B) grupo papaína corado para isoprostano-8.....	44

Lista de Siglas e Abreviaturas

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
OMS	Organização Mundial de Saúde
DP	Desvio Padrão
BAL	Lavado broncoalveolar
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
Gtis	Resistência do tecido
Htis	Elastância do tecido
Lm	Intercepto Linear Médio
Raw	Resistência de Via Aérea
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NIH	“National Institutes of Health”
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
TGFβ	Fator de crescimento tumoral
PEEP	Pressão Positiva Final de Expiração, do inglês “Positive End Expiratory Pressure”
ppm	Parte por Milhão
α1-AT	Alfa 1 Antitripsina
cmH ₂ O	Centímetros de Água
kg	Kilograma

mg	Miligramas
mL	Mililitros
μm	Micrômetro
F	Frequencia
Hz	Hertz
P	Pressão
R	Resistência do Sistema Respiratório
R_{aw}	Resistência de vias aéreas
V'	Fluxo
V	Volume
i	Unidade Imaginária
V_{cyl}	Posicionamento do Pistão do flexiVent, Medida Indireta do Volume Fornecido
P_{cyl}	Pressão dentro do Cilindro do Flexi Vent
P_{ao}	Pressão de abertura de Vias Aéreas
Z_{rs}	Impedância do Sistema Respiratório

RESUMO

Anciães, AM. Análise temporal da mecânica respiratória e morfometria pulmonar em camundongos após instilação nasal de papaína. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

Objetivos: Verificar alterações na mecânica e parâmetros de morfometria pulmonar em um estudo temporal sobre enfisema em um modelo animal. **Métodos:** Setenta camundongos Balb / c receberam instilação nasal de solução de papaína ou salina e foram estudados no 1º, 3º, 15º, 28º e 40º dias após a instilação. Resistência das vias aéreas (Raw), Resistência do tecido (Gtis) e elastância tecidual (Htis), foram analisados. Intercepto Linear Médio (Lm), a proporção do volume de fibras elásticas e colágenas, macrófagos (MAC), o número de células que expressam MMP12 e a expressão de -isoprostano 8 no parênquima pulmonar, foram medidos. **Resultados:** Comparando os grupos papaína e solução salina ao longo do tempo, foi observado um aumento de Lm após o dia 28, associado a uma diminuição no Htis e Gtis. Houve um aumento na proporção do volume das fibras colágenas a partir do dia 15 até o dia 40, enquanto a proporção do volume de fibras elásticas foi aumentada somente no dia 40. Analisando o número de macrófagos, houve um aumento no dia 1 e manteve-se crescente até o dia 40. A expressão de MMP12 aumentou a partir do dia 3 até o dia 40. No entanto, a expressão de isoprostano 8 foi maior apenas nos dias 1 e 3. **Conclusão:** Um aumento significativo no intercepto linear médio (Lm) após o dia 28 de instilação de papaína foi associado a uma piora na função pulmonar caracterizando assim o enfisema pulmonar. No entanto, no dia 40, as diferenças na morfometria foram mantidos, mas não houve diferenças na mecânica respiratória. O remodelamento da matriz extracelular observada no parênquima pulmonar no dia 40 poderia explicar estes resultados.

Descritores: Enfisema Pulmonar, Modelos Animais, Mecânica Respiratória, Remodelamento do Parênquima Pulmonar.

ABSTRACT

Anciães, AM. Temporal analysis of respiratory mechanics and lung morphometry in mice after nasal instillation of papain. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

Objectives: To verify how mechanical and morphometry parameters change in a temporal study of emphysema in an animal model. **Methods:** Balb/c mice received either a nasal drop of papain solution (Papa) or saline (Sal) and were studied on the 1st, 3rd, 15th, 28th and 40th days after instillation. We evaluated airway resistance (Raw), tissue damping (Gtis) and tissue elastance (Htis). Using morphometry, we measured mean linear intercept (Lm), volume proportion of elastic and collagen fibers, number of macrophages (MAC), number of cells expressing MMP12 and the expression of 8-isoprostane in parenchyma. **Results:** Comparing Papain and Saline groups in each time window, we observed an increase in Lm after the 28th day associated to a decrease in Htis and Gtis. The volume proportion of collagen fibers increased from the 15th to the 40th day, while the volume proportion of elastic fibers increased only on the 40th day. Analyzing the macrophages number, there was an increase on the 1st day, and it continued increasing until the 40th day. The expression of MMP12 increased from the 3rd until 40th day. However, the expression of 8-isoprostane increased only on the 1st and the 3rd day. **Conclusions:** A significant increase in mean linear intercept (Lm) after the 28th day of papain instillation was associated to a worsening in lung function. However, on the 40th day, differences in morphometry maintained but there were no differences in respiratory assessment. The extracellular matrix remodeling observed in lung parenchyma on the 40th day could explain these results.

Descriptors: Pulmonary Emphysema, Animal Model, Mechanics Respiratory, parenchyma remodeling.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A DPOC é uma doença tratável e prevenível com alguns efeitos extrapulmonares significativos, que contribuem para a gravidade desta doença. O componente pulmonar é caracterizado por obstrução ao fluxo aéreo não completamente reversível, é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a gases e /ou partículas tóxicas (1).

A bronquite crônica e o enfisema pulmonar são as principais manifestações da DPOC. A bronquite crônica é caracterizada por obstrução das pequenas vias aéreas e presença de tosse com duração superior a três meses por mais de dois anos consecutivos. No enfisema pulmonar, observa-se o alargamento dos espaços aéreos distais com destruição do parênquima pulmonar, perda da elasticidade pulmonar e fechamento de pequenas vias aéreas sem evidência de fibrose (2).

1.2 Epidemiologia

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma das principais causas de mortalidade no mundo e conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), será a quarta causa de mortalidade em 2020 (3).

No Brasil, ocupa o sexto lugar de causa de mortalidade. Estima-se que 4,5 a 6 milhões de brasileiros sejam portadores da DPOC, representando altos custos com seu tratamento e grande impacto sobre a sociedade, sobre os familiares e sobre os planos de saúde (3,4).

O principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC é o tabagismo. Durante muitos anos, considerou-se que apenas 15% dos fumantes desenvolveriam DPOC, no entanto, mais recentemente demonstrou-se que a continuidade do tabagismo determinaria obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas em até 50% em indivíduos com mais de 70 anos (3).

A deficiência em α -1 antitripsina é outro fator de risco importante para o desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (5), principalmente em indivíduos que apresentam o hábito de fumar. Piitulainen et al.(6), em 1999 demonstraram uma piora da função pulmonar em indivíduos que apresentavam deficiência em α -1 antitripsina, no período de 1 ano, comparando os que fumavam, os ex-fumantes e os indivíduos que nunca fumaram (6).

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. Além disso, 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 (7). Há uma grande expectativa do uso de modelos desenvolvidos em animais de laboratório para o estudo da patogênese, das mudanças funcionais e dos efeitos de possíveis fármacos, como novos tratamentos, sendo que estes estudos podem ser feitos *in vivo*. Entretanto, existem limitações para o uso desses modelos, uma vez que são modelos não espontâneos da doença e não mimetizam por inteiro o fenótipo da doença (8,9).

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 de subdivisões brônquicas. Além disto, parte dos problemas dos estudos em 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 (10).

1.3 Fisiopatologia da DPOC

O processo de inflamação crônica das vias aéreas é uma característica importante na DPOC (11). 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 patologia (11,12,13) (Figura 1).

Apesar dos muitos estudos, o papel dos neutrófilos na fisiopatologia da DPOC ainda não está totalmente esclarecido. Os neutrófilos são liberadores de enzimas elastolíticas como as serinoproteases, incluindo a elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase-3 que contribuem para os processos de destruição tecidual e inflamação crônica (14,15). A migração destes tipos celulares para o trato respiratório depende de fatores quimiotáticos como a presença de interleucina-8 (IL-8) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (16). Em estudos desenvolvidos em pacientes com DPOC, o aumento do número de neutrófilos em biópsias e amostras de escarro induzido está relacionado à gravidade da doença (16,17).

O aumento do número de macrófagos em tecidos de vias aéreas e parênquima pulmonar, no lavado broncoalveolar e amostras de escarro também está associado à presença da DPOC (16). São células encontradas na região do parênquima pulmonar que se apresenta destruído pela ação das elastases (14,18) e podem ser ativados pela fumaça de cigarro a liberar mediadores inflamatórios incluindo, fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-8, LTB₄, espécies reativas de oxigênio (19) e as metaloproteinases de matriz (MMPs) (9).

Kuhn et al.(20), em 1976 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. Neutrófilos e macrófagos exercem influência sobre outras células, como as células da camada muscular de vias aéreas, células endoteliais, neurônios sensoriais e na liberação de mediadores inflamatórios que induzem broncoconstrição (22) e remodelamento de vias aéreas (23).

O outro tipo celular envolvido nos mecanismos celulares da DPOC são os linfócitos (24,25). O aumento do número de linfócitos T CD8 + encontrados nas vias aéreas de pacientes com DPOC (26,27) está correlacionada com o grau de destruição do parênquima alveolar e com a gravidade da obstrução ao fluxo aéreo (28).

As células epiteliais presentes nas vias aéreas também liberam mediadores inflamatórios importantes quando ativadas pela fumaça de cigarro, incluindo TNF- α e IL-8. Nas pequenas vias aéreas estes mesmos tipos celulares liberam fator de crescimento (TGF- β) envolvido no processo de remodelamento e fibrose pulmonar (29).

Figura 1: Mecanismos inflamatórios na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. A fumaça do cigarro e outros irritantes exógenos ativam macrófagos e células epiteliais das vias aéreas a liberarem fatores quimiotáticos para neutrófilos (interleucina-8, leucotrieno B₄). Neutrófilos e macrófagos liberam proteases, que podem resultar no desenvolvimento de enfisema pulmonar ou brônquite crônica. Proteases são neutralizadas por inibidores incluindo $\alpha 1$ antitripsina, inibidor de leucoprotease secretória e inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz. Células T citotóxicas (CD8+), também podem estar envolvidas no processo inflamatório. MCP-1 indica a proteína quimiotática para monócitos 1, que é liberado por macrófagos (2).

1.4 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC

O desequilíbrio entre proteases e antiproteases tem sido apontado como o principal mecanismo para explicar a patogênese do enfisema desde a década de 60 (9,30). Esta teoria provém de observações clínicas em pacientes deficientes em α 1-antitripsina (α 1-AT) que desenvolveram enfisema grave, embora seja raro o aparecimento de enfisema somente devido à ausência da α 1-AT (31,32).

Este desequilíbrio se dá principalmente devido ao aumento do número de macrófagos e neutrófilos no trato respiratório e o conseqüente aumento da liberação de proteases. Essas proteases causam destruição do tecido pulmonar que é inibida pela ação da α 1-AT. Assim, se há baixos níveis séricos de α 1-AT, o processo de destruição do tecido pulmonar leva ao enfisema pulmonar. Desta forma, 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 para pacientes deficientes em α 1-AT se torna muito mais crítico (33), juntamente aos processos inflamatórios encontrados na asma e na doença obstrutiva crônica, bem como em outras doenças que

acometem o parênquima pulmonar, têm sido demonstrado sérios distúrbios no balanço oxidante/antioxidante nos pulmões, com conseqüente lesão mediada por células inflamatórias (34, 35, 36, 37).

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 (38,39). Além disto, a síntese de surfactante pode ser inibida pelo processo do estresse oxidativo (40).

Tanto a inflamação quanto o aumento dos agentes oxidantes podem levar ao aumento da apoptose de células estruturais do trato respiratório, outro mecanismo considerado importante no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica e que ocorre em células endoteliais e epiteliais de pacientes DPOC (41).

A apoptose é um processo de regulação de morte celular, permitindo 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 destas células com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios no tecido em questão, aumentando a progressão da doença (41,42).

O grande desafio nos estudos que contemplam o entendimento da fisiopatologia da DPOC é entender até que ponto estes mecanismos ocorrem de forma isolada e como a interação entre eles interfere no desenvolvimento da doença (Figura 2).

Em pacientes fumantes que não desenvolvem DPOC, também existe um processo inflamatório e um desequilíbrio protease/anti- protease mas com menor intensidade (17,43). Sugerindo desta forma, que o aumento do declínio da função pulmonar na DPOC deve ser por uma amplificação da resposta inflamatória anormal dos pulmões devido à presença de fatores exógenos irritantes ou por causa do aumento da produção de enzimas e proteínas inflamatórias ou ainda devido à deficiências endógenas dos mecanismos de defesa pulmonar, que resultam na produção tanto de substâncias anti-inflamatórias como de enzimas que inativam a ação de proteases. Tais diferenças podem ser explicadas por polimorfismos em genes relacionados à produção de citocinas, proteases, proteínas anti-inflamatórias e anti-proteases (44).

Figura 2: Interação entre os mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC, incluindo desequilíbrio protease/antiprotease, apoptose e estresse oxidativo que levam à destruição tecidual resultando em enfisema pulmonar (45).

1.5 Modelos Experimentais de DPOC

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

1.5.1 Instilação de Proteases

Nestes modelos são utilizadas enzimas elastolíticas, capazes de degradar o tecido pulmonar, levando a um quadro de enfisema pulmonar. Proteases como elastase neutrofílica de humanos, elastase pancreática de suínos ou papaína induzem enfisema pulmonar após uma única instilação intratraqueal em

roedores (46,47). São modelos nos quais podemos observar anormalidades da função pulmonar, hipoxemia e metaplasia de células secretoras que são características encontradas em pacientes com DPOC. Além do alargamento dos espaços aéreos, também está presente um processo inflamatório que transforma estes alargamentos dos espaços alveolares em lesões similares às aquelas encontradas em pacientes enfisematosos (9).

Apesar destes modelos não elucidarem como ocorre o desenvolvimento inicial da doença em humanos, já que desde o início existe uma destruição do parênquima pulmonar; eles propiciam o estudo do mecanismo da fase mais adiantada da doença, onde já existe destruição tecidual, possibilitando o estudo dos mecanismos de remodelamento do parênquima pulmonar (48).

Em um estudo desenvolvido por Shapiro et al.(49), em 2003 constatou-se que no lavado broncoalveolar de camundongos que receberam instilação de elastase pancreática de porco e que não eram deficientes em MMP12 (animais MMP12 +/-) havia atividade quimiotática para monócitos e o mesmo não acontecia para camundongos deficientes em MMP12 (animais MMP12 -/-), que receberam o mesmo tratamento. Os autores concluíram que os fragmentos de elastina liberados devido à lesão tecidual exerciam esta atividade quimiotática com conseqüente aumento do número de macrófagos e liberação de MMP12 por estas células, predominantemente.

Com o aumento do número de macrófagos alveolares há um aumento da produção do TGF β (fator de crescimento tumoral) e outras citocinas que promovem o processo de remodelamento das fibras de colágeno (27). A degradação das fibras que constituem o parênquima pulmonar, observada tanto nos modelos experimentais quanto em pacientes com enfisema pulmonar, é acompanhada por um processo de reconstrução destas fibras, no entanto este processo de remodelamento ocorre de uma maneira desorganizada gerando novas fibras que não apresentam estruturas semelhantes às aquelas existentes antes do processo fisiopatológico (48).

1.5.2 *Inalação de Gases Tóxicos*

O primeiro modelo animal de enfisema pulmonar com a utilização de fumaça de cigarro foi apresentado por Wright et al.(50), em 1990. Cobaías foram expostas a 10 cigarros/dia, 5 dias/semana, por períodos de 1, 3, 6 e 12 meses e os dados sugeriram ocorrer um enfisema progressivo com alterações de função pulmonar semelhantes às observadas em pacientes fumantes que desenvolvem DPOC.

Já, Dhimi et al.(51), em 2000 observaram em camundongos, um recrutamento de neutrófilos após o primeiro cigarro, seguido por um aumento gradual de macrófagos e de substâncias provenientes da degradação de colágeno e elastina.

Ofulue et al.(52), em 1998 fizeram uma análise temporal do perfil inflamatório no lavado broncoalveolar (BAL) em ratos expostos diariamente à fumaça de cigarro. Os tempos de exposição foram de 1 a 6 meses. Observou-se presença de lesão tecidual, somente a partir do 2º mês e que se manteve até o 6º mês. Houve aumento de neutrófilos no BAL somente no 1º mês, retornando aos valores basais já no 2º mês. No entanto, o número de macrófagos aumentou somente a partir do 2º mês, mantendo-se em níveis elevados até o final do estudo.

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.

Em um estudo anterior desenvolvido em nosso laboratório Biselli et al.(53), em 2008 utilizaram camundongos C57BL/6 para indução de enfisema pulmonar. Os animais foram expostos à inalação de fumaça de cigarro por um período de 2 meses, 5 vezes/semana durante 2 horas. No entanto, após este período foi observada apenas uma discreta lesão tecidual ao redor dos brônquios, sem evidência da presença de infiltrado inflamatório no parênquima.

Em um outro estudo desenvolvido posteriormente, também em nosso laboratório por Toledo et al.(54), em 2009 a mesma linhagem de camundongo foi exposta sob as mesmas condições à inalação de fumaça de cigarro por um período de 6 meses, somente 30 minutos/dia e foi observado a presença de enfisema pulmonar e infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar .

1.5.3 Modelos experimentais com animais manipulados geneticamente

A predisposição genética de determinadas linhagens para o desenvolvimento da DPOC está sendo estudado exaustivamente (55,56). Alterações genéticas monogênicas e poligênicas para mimetizar a DPOC têm apresentado amplo desenvolvimento nos últimos anos, utilizando técnicas modernas de biologia molecular (57,58).

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 (9). Talvez nos facilite responder questões fundamentais, como: A inflamação pulmonar é causada pelo hábito de fumar? Porque somente uma minoria de fumantes adquire enfisema? Como ocorre o processo de reparo do tecido alveolar, após injúria? As respostas para estas questões serão extremamente úteis para encontrarmos possíveis formas de tratamento para esta doença (59).

Estes diferentes modelos propostos apresentam reconhecimento, mas também limitações para utilização e requerem diferentes interpretações. Talvez a combinação de diferentes modelos possa elucidar, ainda mais, o mecanismo da doença em questão (33).

1.6 Técnicas utilizadas para avaliação do enfisema em modelos experimentais

A destruição do parênquima observada no enfisema pulmonar é acompanhada por alterações na composição e distribuição das fibras elásticas e de colágeno constituintes da matriz extracelular. Estas alterações estruturais interferem nas propriedades viscoelásticas do pulmão avaliadas através de medidas da elastância pulmonar. Muitos estudos utilizam a técnica das oscilações forçadas para os cálculos de elastância tecidual (H_{tis}), resistência tecidual (G_{tis}) e resistência de vias aéreas (R_{aw}). O R_{aw} reflete tanto alterações das vias aéreas quanto da caixa torácica. O G_{tis} e o H_{tis} são parâmetros utilizados para descrever as propriedades viscoelásticas do sistema respiratório (60,61).

Avaliar a função pulmonar em camundongos é essencial para estabelecer a relevância dos modelos murinos nas doenças pulmonares humanas. No entanto, fazer tais medidas representa um desafio particularmente técnico devido ao pequeno tamanho dos animais (62).

Além das medidas funcionais, as avaliações morfométricas são utilizadas para quantificar o grau de destruição das paredes alveolares e ainda são consideradas as medidas mais fidedignas para detectar a presença de enfisema. O aumento do intercepto linear médio (Lm) é diretamente proporcional ao alargamento dos espaços aéreos distais, tanto em pulmões de ratos quanto em camundongos, que apresentam enfisema pulmonar (62,63). Além disto, a maior parte dos estudos descreve também um aumento de deposição de fibras do tecido conectivo (elásticas e colágenas), caracterizando presença de remodelamento do parênquima durante o desenvolvimento da doença em questão (64, 65, 66).

Embora alguns estudos tiveram como objetivo principal correlacionar as alterações funcionais e morfométricas, muitos deles não encontraram correlações positivas entre estes diferentes parâmetros. Takubo et al.(67), em 2002 demonstraram que camundongos C57/BL6 expostos à fumaça de cigarro apresentavam alterações nos parâmetros morfométricos condizentes com a presença de enfisema pulmonar. Além disto, no grupo de animais deficientes em α -1 antitripsina o enfisema se desenvolveu mais rapidamente e com um maior grau de lesão tecidual, levando à alterações também nos parâmetros funcionais, além dos morfométricos, não observados nos animais selvagens, que apresentam níveis normais de α -1 antitripsina .

Em um outro estudo, que foi desenvolvido em nosso laboratório, encontramos um aumento do Lm e de deposição de fibras elásticas e de colágeno 2 meses após a instilação de uma protease em camundongos Balb/C. Entretanto, não observamos alteração significativa para os valores de Htis. A distribuição heterogênea da lesão tecidual associada ao remodelamento das fibras podem explicar tais resultados.

Parameswaran et al.(69), em 2009 induziram enfisema pulmonar em camundongos C57BL/6 através de instilação de elastase pancreática de porco (PPE) e avaliaram, 7 e 14 dias após a instilação, os valores de Htis e de diâmetro médio do parênquima. Após 7 dias encontraram diferenças tanto para Htis quanto para diâmetro médio, comparando o grupo controle e o grupo que recebeu a instilação. No entanto, após 14 dias só encontraram diferença entre os grupos, quando analisaram o diâmetro médio. Foi observado um aumento do diâmetro médio no grupo 14 dias comparado ao grupo 7 dias. Desta forma, neste estudo, a elastância não refletiu, em todos os tempos estudados, as alterações estruturais observadas. Ainda, na tentativa de correlacionar os parâmetros funcionais e morfométricos, Foronjy et al.(70), em 2005 estudaram três linhagens de camundongos expostos à inalação de fumaça de cigarro durante o período de 1 ano, 6 horas/dia, 5 dias/semana. Observaram aumento de Lm em todas as linhagens estudadas, embora tenha havido diferença na

proporção de aumento entre as linhagens, não foi detectado alterações da complacência pulmonar em nenhuma das linhagens estudadas.

Também em outro estudo de susceptibilidade ao desenvolvimento de enfisema em diferentes linhagens de camundongos, Guerassimov et al.(71), em 2004 utilizaram as linhagens NZWLac/J, C57BL6/J, A/J, SJ/L, e AKR/J para exposição à fumaça de cigarro. Após 6 meses de exposição, encontraram aumento de Htis somente na linhagem AKR/J, sendo esta a linhagem que apresentou os valores mais altos de Lm. Para o NZWLac/J não foi observada diferença em nenhum dos parâmetros analisados. Já para as linhagens C57BL6/J, A/J, e SJ/L foi demonstrado um aumento de Lm sem alterações nos valores de Htis. Os autores atribuem estes resultados ao fato de que as alterações na complacência pulmonar resultam não somente da perda de tecido, mas também como resultado de alguma alteração fundamental nas propriedades biológicas e físicas do tecido, principalmente devido ao processo de remodelamento do parênquima pulmonar.

Após extensa revisão da literatura, não encontramos nenhum estudo que tenha avaliado em diferentes tempos após a instilação de solução de papaína intranasal, parâmetros funcionais e histológicos, analisando além dos valores de elastância do tecido e intrercepto linear médio, mas também parâmetros que tornem possível a avaliação do remodelamento de fibras do parênquima

pulmonar e como este remodelamento poderia interferir nos parâmetros citados anteriormente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Neste estudo temos como objetivo principal verificar se em diferentes tempos após a indução do enfisema pulmonar em camundongos, tanto os parâmetros funcionais quanto os parâmetros morfométricos escolhidos, demonstram a presença do enfisema pulmonar.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar nos diferentes tempos:

- Mecânica Respiratória;
- Fibras elásticas e de colágeno no parênquima pulmonar;
- Possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia.

3.Métodos

Foram utilizados 70 camundongos Balb/c, do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. 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).

3.1 Indução do Enfisema Pulmonar

A indução do enfisema pulmonar foi realizada através da utilização de 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.

3.2 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos em 2 grandes grupos: Papaína (no qual os animais receberam solução de papaína) e Salina (no qual os animais receberam apenas solução salina, veículo da Papaína). Estes 2 grandes grupos foram subdivididos em outros 5 subgrupos de acordo com o dia de sacrifício, após a instilação intranasal, representados na Figura 3.

Figura 3: Esquema dos grupos papaína e salina, divididos de acordo com o dia do sacrifício. Papa 1 dia (n=6), Papa 3 dias (n=8), Papa 15 dias (n=7), Papa 28 dias (n=8), Papa 40 dias (n=8) Sal 1 dia (n=7), Sal 3 dias (n=7), Sal 15 dias (n=7), Sal 28 dias (n=6), Sal 40 dias (n=6).

3.3 Avaliação da mecânica do sistema respiratório

Para a avaliação da mecânica respiratória foi utilizado um ventilador para pequenos animais (Flexi Vent, Scireq, Montreal, Canadá), ilustrado na figura abaixo. Os animais foram anestesiados com Thiopental (50 mg/kg), traqueostomizados e ventilados com volume corrente de 10ml/Kg, frequência respiratória de 120 ciclos/min, Peep de 5 cmH₂O conectado a uma válvula expiratória do ventilador.

Figura 4: Esquema do respirador para pequenos animais (Flexi Vent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória.

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. Logo após, os dados foram coletados.

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 (72). 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 (73). 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 (72):

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

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, a elastância do tecido pulmonar.

3.4 Análise Histológica

Logo após a coleta da mecânica respiratória, os animais foram sacrificados através da exsanguinação da veia cava para retirada dos pulmões que foram fixados com formaldeído a 4%, sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas. Após a fixação foram realizadas secções destes pulmões para análise morfométrica e de imunohistoquímica. Para a análise morfométrica foram feitas colorações com Hematoxilina – Eosina, Picrossírius (para análise das fibras de colágeno) e Resorcina – Fucsina (para análise das fibras elásticas) (74).

3.5 Imunohistoquímica

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

A imunohistoquímica para macrófagos foi realizada com um anticorpo monoclonal de rato IgG2a anti MAC-2 de camundongo, na diluição de 1:50000 (Clone M3/38; Cedarlane Laboratories, Ontário, Canadá).

Para MAC-2 foi utilizado Vectastin Abc Kit, Vector Laboratories (Sta. Cruz Biotechnology, CA, EUA) para revelação.

Para a avaliação da expressão de isoprostano 8 utilizamos o anticorpo policlonal produzido em cabra 8-epi-PGF2 α com diluição de 1:500 (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.

3.6 Avaliação Morfométrica

Para a análise morfométrica, foi realizada uma leitura cega (durante a leitura no microscópio, 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 convencional.

3.7 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 (75).

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

Lm = 2500 μ m/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 5: Fotomicrografia do retículo sobre uma lâmina, aumento de 200X

3.8 Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras Elásticas

Para obtenção das medidas das fibras de colágeno e de elastina foram contados o número de pontos que incidiram sobre as fibras de colágeno e de elastina e também os pontos que incidiram no parênquima remanescente (76).

Para o cálculo, utilizamos a seguinte equação:

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

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

3.9 Contagem de Macrófagos e Células Positivas para MMP-12

O número de macrófagos e o número de células que expressam MMP-12 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 sobrepunham 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 estiveram 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 foi expresso como células/ μm^2 (77).

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

3.10 Expressão do Isoprostano 8 no Parênquima

A expressão de isoprostano 8 no parênquima foi avaliado através de análise digital com a utilização do software ImageProPlus (v.4.5 windows, Média Cybernetics, Inc. USA). As imagens do parênquima foram capturadas através do microscópio (Nikon-E200) conectado à uma câmera (Lumera Infinity 2-1 Monochrome CCD Câmera) ligada a um computador.

A área positiva de isoprostano 8 foi expressa como uma relação entre a área do parênquima corada e a área total do tecido no parênquima pulmonar.

3.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através da utilização do software Sigma Stat (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para todos os parâmetros analisados, comparamos os grupos papaína e salina para cada tempo, utilizando o teste t student. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.RESULTADOS

4.1 Avaliação da Mecânica Respiratória

As médias $\pm$ desvio padrão (DP) dos valores de Htis, Gtis e Raw dos diferentes grupos estão apresentadas na Figura 6 A, B e C, respectivamente. Observamos um aumento estatisticamente significativo da elastância do tecido (Htis) nos animais que receberam instilação intranasal de papaína somente no dia 28 ($p=0.0012$). Houve um aumento estatisticamente significativo dos valores de resistência do tecido (Gtis), quando comparamos grupo salina e grupo papaína, apenas no primeiro dia após a instilação ($p=0.009$). Enquanto que no dia 28 houve uma diminuição deste parâmetro no grupo papaína comparado ao grupo salina ($p=0.03$). Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos ao longo do tempo, quando avaliamos os dados de Raw.

4.2 Avaliação Morfométrica

Na Figura 7(A) estão apresentados as médias $\pm$ DP dos valores do diâmetro alveolar médio, (B) proporção de volume das fibras colágenas e (C) das fibras elásticas no parênquima pulmonar. Houve um aumento estatisticamente significativo de Lm, nos animais instilados com papaína, a partir do dia 28 ($p \leq 0,001$) e manteve-se aumentado até o dia 40 ($p=0.008$). Também observamos um aumento estatisticamente significativo, da proporção de fibras de colágeno no parênquima nos dias 15 ($p=0.003$), 28 ($p=0.003$) e 40 ($p=0.012$) nos grupos Papaína quando comparados aos grupos Salina. Já a proporção de volume das

fibras elásticas apresentou um aumento estatisticamente significativo somente no dia 40 ($p= 0.009$) após instilação de papaína.

Na Figura 8 estão representadas fotomicrografias do parênquima pulmonar nos dias 15, 28 e 40, após a instilação dos grupos papaína (Grupo P) e salina (Grupo S). (A) Cortes de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina, houve aumento acentuado dos espaços aéreos distais dos grupos papaína nos dias 28 e 40. (B) Secções do parênquima pulmonar corados com Sirius red, ilustrando um aumento da proporção de fibras colágenas desde o dia 15 nos grupos papaína. (C) Secções do parênquima pulmonar corados com Resorcina Fucsina, mostrando um aumento da proporção de fibras elásticas no dia 40. Aumento original X 200.

Os resultados referentes a quantificação dos macrófagos nos diferentes grupos estão apresentados na Figura 9(A). Houve um aumento do número de macrófagos nos grupos papaína desde o dia 1 ($p=0.007$) e se manteve aumentado em todos os tempos até o dia 40 ($p\leq 0.005$). Na Figura 9B estão expressos os valores das células positivas para MMP12 (Média $\pm$ DP) no parênquima pulmonar que apresentaram aumento estatisticamente significativo nos grupos papaína nos dias 3 ($p=0.034$), 15, 28 e 40 ($p\leq 0.005$ para estes grupos). Para a expressão de isoprostano-8 nos diferentes grupos, representada na figura 9C, observamos um aumento estatisticamente

significativo nos grupos papáina comparados aos seus respectivos controles, somente nos dias 1 e 3 ($p \leq 0.05$ para ambos os grupos), não houve diferença entre os grupos nos tempos subsequentes .

A Figura 10 é uma fotomicrografia do parênquima pulmonar com células marcadas para MAC-2, as células apresentam um tom marrom, sendo que esta mesma tonalidade é observada para as lâminas em que utilizamos marcador para MMP-12.

Na Figura 11 apresentamos fotomicrografias de cortes de pulmões corados para isoprostano-8.

Figura 6: Valores das médias $\pm$ DP dos parâmetros obtidos pela avaliação da mecânica respiratória nos diferentes tempos estudados. (A) Observamos aumento de Htis somente no dia 28 (* $p=0.012$, comparado ao respectivo controle). (B) Observamos aumento de Gtis nos grupos Papaína nos dias 1 (* $p=0.09$, comparado ao respectivo controle) e 28 (* $p=0.03$, comparado ao respectivo controle). (C) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais quando comparamos os valores de Raw.

Figura 7: Média $\pm$ DP dos valores de Lm (A), Proporção de volume de Fibras de Colágeno (B) e Elásticas (C). (A) Houve um aumento do Lm a partir do dia 28 (* $p \leq 0,001$, comparado ao respectivo controle) e que se manteve no grupo 40 dias (* $p = 0,008$, comparado ao respectivo controle). (B) Observamos aumento na proporção de volume das fibras colágenas no parênquima nos dias 15 (* $p = 0,003$, comparado ao respectivo controle), 28 (* $p = 0,003$, comparado ao respectivo controle) e 40 (* $p = 0,012$, comparado ao respectivo controle). (C) O aumento da proporção de volume de fibras elásticas foi observado somente no dia 40 ($p = 0,009$, comparado ao respectivo controle).

Figura 8. Fotomicrografias de parênquima pulmonar nos dias 15, 28 e 40 após a instilação de papaína (Grupo P) ou solução salina (Grupo S). (A) Os cortes de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina onde observamos o aumento dos espaços aéreos distais dos grupos papaína nos dias 28 e 40. (B) Secções do parênquima pulmonar corados com Sirius red, onde as fibras assumem uma coloração vermelha, ilustrando um aumento da proporção de fibras colágenas desde o dia 15 nos grupos papaína. (C) Secções do parênquima pulmonar corados com Resorcina-Fucsina, onde as fibras elásticas assumiram uma coloração arroxeadas, mostrando um aumento da proporção destas fibras somente no dia 40. Aumento original X 200.

Figura 9: (A) Houve aumento do número de macrófagos nos dias 1 (* $p=0,007$, comparado ao respectivo controle), 3, 15, 28 e 40 dias (* $p\leq 0,005$, comparados aos respectivos controles). (B) Observamos aumento do número de células positivas para MMP12 no parênquima pulmonar nos dias 3 (* $p=0,034$, comparado ao respectivo controle) 15, 28 e 40 (* $p\leq 0,005$, comparados aos respectivos controles). (C) A expressão de isoprostano-8 no parênquima apresentou aumento nos dias 1 e 3 ($p\leq 0,05$ comparados aos respectivos controles). Os valores estão expressos como média $\pm$ DP.

Figura 10: 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.

Figura 11: Fotomicrografia dos pulmões corados para isoprostano-8 A.Pulmão de um animal do grupo Salina. B.Pulmão de um animal do grupo Papaína, em aumento de 400x.

5.DISSCUSSÃO

Neste estudo, após 28 dias, a instilação de solução de papaína em camundongos Balb/C acarretou alterações tanto em parâmetros avaliados através das medidas da mecânica respiratória, quanto em parâmetros obtidos através das análises morfométricas, caracterizando a presença de enfisema pulmonar. Foi observado um aumento do intercepto linear médio (Lm), associado a uma diminuição da elastância (Htis) e da resistência tecidual (Gtis). Além disto, os dados obtidos através das análises morfométricas do parênquima pulmonar revelaram um aumento do número de macrófagos, de células positivas para MMP-12 e da proporção de fibras colágenas. Sugerindo que neste modelo experimental, tanto os parâmetros funcionais como os parâmetros morfométricos, no tempo 28 dias, foram condizentes quanto a presença da doença em questão.

No entanto, após 40 dias da instilação, apesar de os valores de Lm permanecerem aumentados demonstrando a presença de destruição tecidual, não encontramos diferença em nenhum dos parâmetros avaliados através da mecânica respiratória quando comparamos o grupo controle com o grupo de animais que recebeu instilação da solução de papaína. As análises morfométricas demonstraram que, houve aumento da proporção de fibras de colágeno a partir do 15º até o 40º dia após a instilação, e um aumento da proporção das fibras elásticas que ocorreu somente 40 dias após a instilação. Observamos que somente no tempo 40 dias houve aumento da deposição,

tanto de fibras de colágeno, quanto de fibras elásticas no parênquima, sugerindo um provável remodelamento pulmonar.

No enfisema não ocorre somente destruição, mas também remodelamento dos septos alveolares. Vlahovic et al.(78), em 1999 observaram aumento da proporção de fibras elásticas e de colágeno em pedaços de pulmões de pacientes enfisematosos submetidos à lobectomia. Entretanto, este aumento da síntese de fibras elásticas e 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.

Em condições normais, as fibras colágenas são as principais responsáveis por manter a estrutura do parênquima mesmo em volumes pulmonares aumentados. São fibras que não sofrem ruptura facilmente e apresentam uma rigidez cerca de 50-100 vezes maior que as elásticas. No entanto, em condições patológicas, como o enfisema pulmonar já está demonstrado que após a destruição, ocorre nova síntese e deposição destas fibras, que são mais frágeis e apresentam menor estabilidade mecânica (79).

Kononov et al.(80), em 2001 observaram a presença de remodelamento tecidual em pulmões de ratos, com aumento de deposição de fibras elásticas e colágenas, quatro semanas após a instilação de elastase pancreática de porco.

No entanto, eles observaram que durante o estiramento de pedaços destes pulmões, as fibras remodeladas apresentavam maior distorção do que as fibras dos tecidos normais, demonstrando, assim, uma redução da estabilidade mecânica destas fibras remodeladas. Desta forma, os autores sugerem que, apesar de haver um aumento da deposição destas fibras, as fibras remodeladas se rompem mais facilmente.

Finlay et al.(48), em 1996 compararam o remodelamento de fibras de colágeno e elástica em pulmões de pacientes que apresentavam câncer de pulmão e de ratos enfisematosos que receberam instilação de elastase pancreática de porco e observaram que, tanto em humanos quanto em ratos, as fibras elásticas e de colágeno apresentavam-se fragmentadas porém com uma espessura maior que a apresentada pelo grupo controle, constatando um aumento de deposição destas fibras. Em nosso estudo, não fizemos a análise de fragmentação destas fibras, mas as observações dos cortes histológicos revelaram um parênquima com estrutura bastante fragmentada.

Pastor et al.(81), em 2006 estudaram a morfogênese do enfisema em ratos que receberam instilação de papaína, com ênfase no estudo das alterações ocorridas nas fibras elásticas nos tempos 12h, 3, 10 e 60 dias após. Doze horas após observou-se uma resposta inflamatória com ruptura de fibras elásticas. Após 3 dias houve aumento de deposição de fibras elásticas. Já após 10 dias, o

edema alveolar desapareceu e as fibras elásticas assumiram uma morfologia normal, muito embora existissem fragmentos destas fibras elásticas dispersos pelo parênquima. E, finalmente após dois meses observou-se um aumento estatisticamente significativo do intercepto linear, juntamente com um aumento da fragmentação das fibras do parênquima e aumento de deposição de fibras elásticas e de colágeno, caracterizando um remodelamento desordenado.

Em outro estudo Lucey et al.(82), em 1998 hamsters foram inalados com elastase pancreática de porco para análise de RNAm para produção de colágeno e elastina em diferentes tempos após a exposição (1, 2, 3, 5, 7 e 30 dias após). Logo após as primeiras 24h, o grupo tratado apresentou aumento do intercepto linear médio, que se manteve aumentado até o trigésimo dia. A expressão dos genes para produção de elastina e colágeno já apresentaram um aumento no 1º dia, atingindo seus valores mais altos por volta do 3º dia e mantendo-se neste padrão até o 5º dia, no entanto no 30º dia, estes valores retornaram aos basais.

Além da destruição alveolar, tanto a quantidade quanto a reorganização das fibras constituintes do parênquima são determinantes para as alterações observadas na função pulmonar durante a progressão do enfisema (78,83,84).

Em nosso estudo, possivelmente o aumento da deposição das fibras de colágeno em conjunto com as fibras elásticas após 40 dias tenha apresentado

um efeito oposto ao da lesão dos septos alveolares e tenha contribuído de forma importante para os resultados negativos de elastância do tecido Htis.

Apesar de haver muitos estudos que descrevam o processo de remodelamento em modelos experimentais de enfisema, até o momento, não encontramos nenhum estudo em que foram avaliados em diferentes tempos após a indução de enfisema os valores de elastância tecidual, intercepto linear médio e remodelamento da matriz extracelular.

Ito et al.(64), em 2005 demonstraram em camundongos C57BL/6, assim como em nosso estudo, que após 21 dias da instilação de elastase pancreática de porco (PPE) houve diminuição da elastância do tecido, com aumento de Lm. Além disto, também observaram o aumento da quantidade de hidroxiprolina, proteína liberada após a quebra de fibras colágenas.

Para verificamos a presença de inflamação nos diferentes tempos estudados, fizemos medidas morfométricas para quantificação de macrófagos e de células marcadas para MMP12 no parênquima.

A fase inicial do enfisema é caracterizada por inflamação, com presença predominantemente de macrófagos. Estas células liberam fatores quimiotáticos

para migração de neutrófilos com conseqüente aumento da liberação de enzimas proteolíticas (85).

Em nosso estudo, observamos desde o primeiro dia um aumento do número de macrófagos nos animais que foram instilados com solução de papaína. Este aumento se manteve em todos os tempos estudados (3, 15 e 40 dias). Também observamos aumento de expressão de MMP-12 nos animais enfisematosos. No entanto este aumento somente foi observado a partir do 3º dia. Sugerindo, que apesar de haver aumento de macrófagos desde o 1º dia, estas células só começaram a expressar MMP-12 no 3º dia.

Acredita-se que a MMP-12 seja predominantemente liberada por macrófagos alveolares (86,87). Entretanto, estudos in vitro demonstraram liberação desta metaloprotease por células epiteliais após exposição à fumaça de cigarro (88,89). Também já foi demonstrado o aumento dos níveis de MMP-12 em amostras de BAL e em fragmentos de tecido obtidos de biópsias de pacientes com DPOC (42,90). Já está demonstrado em modelos animais que o papel da MMP-12 é crucial para o desenvolvimento do enfisema (91). Animais knock out para MMP-12 não desenvolveram enfisema pulmonar após meses de exposição à fumaça de cigarro, enquanto que os animais que não apresentavam deficiência na produção desta enzima desenvolveram o enfisema após o mesmo tempo de exposição (93). Além disto, os animais knock out para

MMP-12 apresentaram uma diminuição do recrutamento de monócitos para os pulmões possivelmente devido à menor destruição do parênquima, na ausência de MMP-12 e consequentemente menor quantidade de fragmentos de fibras (quimiotáticos para monócitos) (42). A ação da MMP-12 no enfisema não se limita, somente, à ação direta desta enzima na quebra de fibras do parênquima, mas está também relacionada à ação indireta desta enzima na inativação da α -1 antitripsina o que implica diretamente no desequilíbrio protease/ anti-protease e no recrutamento de neutrófilos (93, 94).

Em nosso estudo, o aumento do número de macrófagos e de expressão de MMP-12 nos grupos instilados com solução de papaína sugere que o desequilíbrio entre proteases e anti-proteases esteve diretamente relacionado ao processo de lesão tecidual e enfisema. Uma vez que o estresse oxidativo é outro mecanismo importante para explicar o desenvolvimento de enfisema e há evidências de aumento de estresse oxidativo em amostras de tecido pulmonar de pacientes com DPOC, avaliamos a expressão de isoprostano- 8, um marcador para estresse oxidativo (95). Isoprostanos são compostos derivados da peroxidação lípidica de membranas celulares e são considerados marcadores estáveis, tanto em humanos como em animais experimentais(96).

Lopes et al.(68), em 2009 demonstrou uma piora do enfisema juntamente com um aumento na expressão de isoprostano-8 em camundongos submetidos à

instilação de solução de papaína e expostos à poluição do ar, comparados com os animais que receberam somente instilação de solução salina e que também foram expostos a poluentes. Demonstrando que o estresse oxidativo seria um dos mecanismos envolvidos nesta piora do enfisema.

No nosso estudo, observamos um aumento da expressão de isoprostano-8 apenas no primeiro e terceiro dia, após instilação de solução de papaína, sugerindo que nestes tempos o mecanismo de estresse oxidativo estava presente, no entanto após o terceiro dia provavelmente um equilíbrio oxidante-antioxidante explicaria o não aumento do marcador utilizado.

O modelo experimental que mais se aproxima da exposição em humanos é o modelo de tabagismo. No entanto, este modelo experimental requer muitos meses de exposição dos animais, à fumaça de cigarro, e o grau de lesão tecidual obtido caracteriza um enfisema leve (97). Desta forma, para que pudéssemos estudar o remodelamento de fibras neste modelo, pensaríamos em um tempo de exposição ainda maior do que já é utilizado. A utilização da papaína viabilizou estudarmos os estágios iniciais da doença e a observação de lesão tecidual grave com remodelamento de fibras em poucos dias após a instilação.

6.Conclusões

A instilação de solução de papaína em camundongos Balb/c induziu o desenvolvimento de enfisema pulmonar, com aumento de Lm e diminuição de Htis após 28 dias da data da instilação. Após este período, somente os dados de Lm demonstravam a presença de lesão.

O desequilíbrio entre protease e antiproteases é um dos mecanismos que deve estar presente neste modelo, visto o aumento do número de macrófagos no tecido em conjunto com o aumento da expressão de MMP-12, já nos primeiros dias após instilação.

O aumento de isoprostano-8 apenas nos primeiros dias sugere que houve um equilíbrio oxidante/ anti-oxidante logo após o início do processo.

As avaliações histológicas são consideradas “padrão ouro” para avaliação das alterações estruturais causadas pelo enfisema pulmonar, e neste estudo as avaliações histológicas também foram mais sensíveis em relação as avaliações funcionais.

7.Referências

1. GOLD (Global initiative for Chronic Obstructive Lung disease). Executive Summary: Global strategy for the Diagnosis, management prevention of DPOC. Revisado em 2009. Disponível em www.goldcopd.com.
2. Barnes PJ. *N Eng J Med* 2000; v.343 n. 4: p.269 – 280.
3. Pessoa CLC, Pessoa RS. Pulmao RJ. Epidemiologia da DPOC . *Atualizações Tematicas* 2009;1(1):7-12.
4. Campos HS, Lemos ACM. A asma e a DPOC na visão do pneumologista. *J Bras Pneumol* 2009;35(4):301-309.
5. Needham M, Stockley RA. Alpha 1-antitrypsin deficiency. 3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax* 2004; 59 (5):441-5.
6. Piitulainen E, Eriksson S. Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (Pi ZZ). *Eur Respir J* 1999;13:247–51.
7. 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.

- 8.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.
- 9.Groneberg DA, Chung FK. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research* 2004; 5:18.
- 10.Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295:L1-I15.
- 11.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.
- 12.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.
- 13.Saetta M, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (2):711-7

14.Finkelstein R, Fraser RS, Ghezze H, Cosio MG.. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 52:1666–72.

15.Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, G Turato, S Calabro, A Potena, CE Mapp, A Ciaccia, L Covacev and LM Fabbri. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Resp Crit Care Med* 1994;149:803–10.

16.Di Stefano A, Capelli A, Lusuadi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1277–1285.

17. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-® in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1996;153:530–34.

18.Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD, Hayashi S, Hogg JC. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2002; 26:52–57

19. Russell REK, 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 Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:L867–L873.

20. 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.

21. 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.

22. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest* 2003; 123:411S-6S.

23. 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.

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.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.
- 27.Saetta M, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavalllesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160 (2):711-7.
- 28.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.
- 29.Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtosh T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamaswa F, Nakahara K, Umeda A. Increased expression of transforming growth factor α 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with COPD. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 163:1476–83.

- 30.Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl* 2003; 44: 30s-32s.
- 31.Parfrey H, Mahadeva R, Lomas DA. Alpha(1)-antitrypsin deficiency,liver disease and emphysema. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:1009-14.
- 32.Lomas DA, Mahadeva R. Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: Pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest* 2002; 110:1585-90.
- 33.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.
- 34.Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:S31-7.
- 35.Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; (7):1-32.
- 36.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.

- 37.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.
- 38.Bracci R. Free oxygen radicals and surfactant. *Biol Neonate* 1997; 71 (suppl1):23-7.
- 39.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.
- 40.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.
41. Cavalcante AGM, Bruin PFC. *J Bras Pneumol* 2009; 35(12):1227-1237.
- 42.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.

- 43.Culpitt SV, Nightingale JA, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 1999;160:1635–39.
- 44.Barnes PJ. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 245–52.
- 45.Cavalcante AGM, Bruin PFC.O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *J Bras Pneumol* 2009;35(12):1227-1237
- 46.Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1985; 133:149–69.
- 47.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.
- 48.Finlay GA,. O'Donnell MD, O'Connor CM.,. Hayes JP, Gerald MXF, Elastin and Collagen Remodeling in Emphysema A Scanning Electron Microscopy Study. *Am J Pathol* 1996; 149(4): 1405–1415.

49.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.

50.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.

51.Dhami R, Gilks B, Xie C, Zay K, Wright JL, Churg A. Acute cigarette smoke induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 244–52.

52.Ofulue AF, Ko M, Abboud RT. Time course of neutrophil and macrophage elastinolitic activities in cigarette smoke-induced emphysema. *Am J physiol Lung cell mol physiol* 1998; (19),n.6, L1134-L1144.

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

54.Toledo AC.Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a lesão Pulmonar induzida sob a exposição à fumaça de cigarro em camundongos C57Bl6 [tese].São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.

55.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.

56.Ranga V, Grahn D, Journey TM. Morphologic and phenotypic analysis of an outcross line of blotchy mouse. *Exp Lung Res* 1983; 4:269-79.

57.Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klothe and marlboro mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:4-7.

58.Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest* 2000; 117:223S-7S.

59.Mahadeva R, Shapiro, SD. Chronic obstructive pulmonary disease 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002; 57: 908 14.

60.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.

61.Gomes,RFM, Shen X, Ramchandani R, Tepper R. S, Bates JHT. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol* 2000; 89: 908-916.

62.Irvin CG, Bates JHT. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 2003; 4:4.

63.Fló C, Lopes FDTQS, Kasahara DI, Silva ACD, Martins MA, Filho WJ, Jesus RCC, Rivero DHRF, Saldiva PHN. Effects of exercise training on papain induced pulmonary emphysema.in Wistar rats. *J Appl Physiol* 2006; 100:281-285.

64.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.

65.Pastor L.M, Sánchez-Gascón F, Girona J.C, Bernal-Mañas C.M, Morales E, Beltrán-Frutos E, Canteras M. Morphogenesis of rat experimental pulmonary emphysema induced by intratracheally administered papain: changes in elastic fibres. *Histol Histopathol* 2006; 21 (12): 1309-1319.

66.Shifren A, Mecham R.P. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc* 2006;(3).428–433.

67.Takubo Y, Guerassimov A, Ghezze H, Triantafillopoulos A, Bates JHT, Hoidal JR, and Cosio MG. α 1-Antitrypsin Determines the Pattern of Emphysema and Function in Tobacco Smoke–exposed Mice: Parallels with Human Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1596 –1603.

68.Lopes FDTQS, Pinto TS, Costa FMA, Moriya HT, Biselli PJC, Ferraz LFS, Lichtenfels AJ, Saldiva PH, MauadT, Martins MA. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Envir Res* 2009; 109:(5):544-551.

69.Parameswaran H, Bartolák-Suki E, Hamakawa H, Majumdar A, Allen PG., Suki B. Three-dimensional measurement of alveolar airspace volumes in normal and emphysematous lungs using micro-CT. *J Appl Physiol* 2009; 107(2): 583-592.

70.Foronjy RF, Mercer BA, Maxfield MW, Powell CA, D'Armiento J, Okada Y. Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoke model. *Experimental lung research* 2005; 31(6):547-562.

71.Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezze H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR., and Cosio MG. The

Development of Emphysema in Cigarette Smoke-exposed Mice Is Strain Dependent. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:974–980.

72.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.

73.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.

74.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.

75.Margraf LR, Tomashefski JF, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 391 400.

76.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.

77. 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

78. 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

79. Suki B., Lutchen K.R. and Ingenito E.P. On the progressive nature of emphysema roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;. 168:516–521.

80. Kononov S, Brewer K, Sakai H, Cavalcante FSA, Sabayanagam CR, Ingênito 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.

81. Pastor L.M, Sánchez-Gascón F, Girona J.C, Bernal-Mañas C.M, Morales E, Beltrán-Frutos E, Canteras M. Morphogenesis of rat experimental pulmonary emphysema induced by intratracheally administered papain: changes in elastic fibres. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1309-1319.

82.Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters: results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:555–564.

83.Wright J.L, Churg A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am J Physiol* 1995; 268:17–20.

84.Finlay G.A, O'Driscoll L.R, Russell K.J, D'Arcy E.M, Masterson J.B, Fitz Gerald M.X, O'Connor C.M. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:240–247.

85. Barnes PJ. New Concepts in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Med* 2003; 54:113–29.

86.Nénan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. Macrophage elastase (MMP12): a pro inflammatory mediator? *Mem Int Oswaldo Cruz* 2005; 100 (Supl I): 167 – 72.

87.Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE< Ruggieri MP, Roggeri A, Boschetto P, Fabbri LM, Saetta M. Airflow limitation in chronic bronchitis is

associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 629 – 632.

88.Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121 (5 Suppl): 151S-5S.

89.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.

90.Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, Planquois JM, Delaval P, Lagente V. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm. Res* 2005; 54 31–36

91.Churg A; Wright JL. Proteases and emphysema. *Current Opinion in Pulmonary Medicin* 2005;11(2)153-159.

92 Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277:2002-4.

93. Costa CH, Rufino R, Silva JRL. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(3): 347 -54.

94. Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA: Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2005, 5:257-263.

95. Drost EM, Skwarsk KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Augusti A, Mcnee W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005; 60:293-300.

96. 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.

97. Churg A, Wright J. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. *Contrib Microbiol* 2007;14:113–125.