ANTONIO DI PETTA

Influência do diabetes mellitus na evolução do enfisema pulmonar
induzido por elastase em ratos

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Paulina Sannomiya

São Paulo

2008

ANTONIO DI PETTA

Influência do diabetes mellitus na evolução do enfisema pulmonar
induzido por elastase em ratos

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Paulina Sannomiya

São Paulo

2008

Dedicatória

Aos meus pais, Carmine e Antonietta
responsáveis pelo milagre da vida.

À minha irmã, Maria
pelo carinho, amizade e amor.

À minha esposa, Andreia
por todo o seu amor, amizade e paciência.
Te amo ontem, hoje e sempre.

Ao meu filho, meu anjo, Gabriel
pelo carinho e amor em todos os momentos
onde a vitória parecia impossível.

A sempre e eterna Profa. Dra. Paulina
pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, discernimento e sabedoria.

Por estar sempre presente em minha vida,
principalmente nos momentos mais difíceis, em que os
obstáculos pareciam intransponíveis.

Obrigado Senhor.

À Profa. Dra. Paulina Sannomiya pela confiança, ensinamento,
amizade, crítica, orientação e oportunidade dada em realizar este
trabalho em seu laboratório.

Obrigado por me ensinar a fazer ciência.

À Profa. Dra Vera Luiza Capelozzi pelo carinho e dedicação
durante a realização deste trabalho

Aos meus pais, Carmine e Antonietta,
que sempre estiveram ao meu lado.

À minha esposa Andreia e meu filho Gabriel, pela paciência,
carinho, dedicação e amor.

Aos colegas de laboratório Leila, Karin, Fernando e Cristiano pela
amizade e apoio na realização deste trabalho.

Sumário

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enfisema pulmonar.....	1
1.1.1. Considerações preliminares.....	1
1.2. Fisiopatologia do enfisema pulmonar.....	2
1.3. Processo inflamatório.....	7
1.4. Inflamação e diabetes mellitus.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Animais.....	14
3.2. Protocolo experimental.....	14
3.3. Indução do diabetes mellitus.....	15
3.4. Tratamento com insulina.....	15
3.5. Indução do enfisema pulmonar.....	16
3.6. Parâmetros avaliados na fase aguda.....	16
3.7. Parâmetros avaliados na fase crônica.....	17
3.8. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

Resumo

Di Petta A. *Influência do diabetes mellitus na evolução do enfisema pulmonar induzido por elastase em ratos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 66p.

O presente estudo tem como objetivo investigar a ação da insulina no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda e crônica do enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática de porco (EPP).

Ratos machos da raça Wistar (aloxana, 42 mg/kg, i.v., 10 dias) e ratos controle foram instilados com solução salina fisiológica contendo EPP (0.25 UI/0.2 mL, pulmão direito) ou salina (pulmão esquerdo). Foram realizadas as seguintes análises: a) número de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar dos animais, 6 h após a instilação com salina ou elastase (fase aguda); b) diâmetro médio alveolar (μm), quantificação das fibras elásticas e colágenas (%), análise radiográfica do volume pulmonar e número de macrófagos alveolares (mm^2) 50 dias após instilação com salina ou EPP (fase crônica).

Ratos diabéticos apresentaram uma redução de 42% no número de neutrófilos presentes no lavado broncoalveolar, um aumento de 20% do diâmetro médio alveolar, um aumento de 15% do volume pulmonar e uma diminuição de 33% das fibras elásticas nos septos alveolares, sem alteração na quantidade de fibras colágenas. Não houve diferença no número de macrófagos. Tratamento dos ratos diabéticos com 4 UI de insulina NPH, 2 h após a instilação de elastase restaurou completamente o número de neutrófilos do lavado broncoalveolar. O diâmetro médio alveolar, volume pulmonar e a fração de área de fibras elásticas presentes nos septos alveolares foram semelhantes aos valores observados nos ratos controle, após o tratamento com 4 UI de insulina 2 h após a instilação, seguida de 2 UI/dia pelos próximos 50 dias. Além disso, observou-se aumento do número de macrófagos em ratos diabéticos tratados com insulina.

Os resultados sugerem que a insulina modula o desenvolvimento das fases aguda e crônica do enfisema pulmonar induzido por EPP, assegurando uma reparação e remodelamento tecidual dentro dos limites da normalidade.

Descritores: 1.Enfisema pulmonar 2.Diabetes mellitus 3.Insulina 4.Elastase pancreática 5. Rato Wistar

Summary

Di Petta A. *Influence of diabetes mellitus on the course of pulmonary emphysema induced by elastase in rats* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 66p.

The present study was undertaken to investigate the role of insulin in the development of acute and chronic inflammatory responses in porcine pancreatic elastase (PPE)-induced pulmonary emphysema.

Diabetic male Wistar rats (alloxan, 42 mg/kg, i.v., 10 days) and control rats were instilled with physiological saline solution containing PPE (0.25 IU/0.2 mL, right lung) or saline only (left lung). The following analyses were performed: a) number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of the animals, 6 h after saline or PPE instillation (acute phase); b) mean alveolar diameter (μm), quantification of elastic and collagen fibers (%), radiographic analyses of lung volume, and number of alveolar macrophages (mm^2) 50 days after saline or PPE instillation (chronic phase).

Relative to controls, alloxan-induced diabetic rats presented 42% reduction in the number of neutrophils in BAL fluid, 20% increase in mean alveolar diameter, 15% increase in lung volume, 33% decrease of elastic fibers in alveolar septa, without changes in the content of collagen fibers. There were no differences in the number of macrophages. Treatment of diabetic rats with 4 IU neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin, 2 h before elastase instillation restored the number of neutrophils in BAL fluid. Mean alveolar diameter, lung volume, and elastic fibers in alveolar septa matched the values observed in control rats, after treatment with 4 IU NPH insulin 2 h before instillation, followed by 2 IU/day for the next 50 days. Furthermore, increased number of macrophages was observed in insulin-treated diabetic rats.

Data presented suggest that insulin modulates the development of acute and chronic phases of PPE-induced pulmonary emphysema, assuring normal repair and tissue remodeling.

Descriptors: 1.Pulmonary emphysema 2.Diabetes mellitus 3.Insulin
4. Pancreatic elastase 5.Wistar rat

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enfisema pulmonar

1.1.1. Considerações preliminares

Historicamente, Laennec (1834) descreveu o enfisema pulmonar a partir de observações em cortes necroscópicos superficiais de pulmões humanos, atribuindo a lesão à atrofia do tecido pulmonar resultante da hiperinsuflação pulmonar. O enfisema foi, então, redefinido como uma “anormal e permanente dilatação dos espaços aéreos distais do bronquíolo terminal” (Ciba Guest Symposium Report, 1959). Esta definição foi posteriormente modificada incluindo-se “destruição da parede alveolar sem fibrose evidente” (Snider et al., 1985).

Atualmente, o enfisema pulmonar pode ser definido como um processo obstrutivo crônico, resultante de importantes alterações de toda a estrutura distal do bronquíolo terminal, denominado ácino, seja por dilatação dos espaços aéreos ou por destruição da parede alveolar, ocasionando a perda da superfície respiratória e de irrigação sangüínea, diminuição do recolhimento elástico e hiperexpansão pulmonar (Snider et al., 1986; Barnes, 2000). Estas alterações anatômicas podem atingir apenas uma parte do ácino ou toda a estrutura acinar, indicando a etiologia e o comportamento fisiopatológico da apresentação da doença (Fusco et al., 2002).

O enfisema centroacinar apresenta o ácino pulmonar comprometido por um alargamento ou destruição dos bronquíolos respiratórios,

predominantes em zonas apicais, associado à prática tabagista (Kim et al., 1991; Snider, 2000). O enfisema panacinar, encontrado em pacientes portadores de deficiência de alfa-1-antitripsina (Snider, 1986), e associados com enfisema centroacinar em pacientes tabagistas (Kim et al., 1991), resulta de uma simultânea e uniforme destruição das paredes alveolares e alargamento difuso do ácino pulmonar, predominante em zonas basais (Kim et al., 1991; Snider, 2000). Ambos os tipos de enfisema podem ser encontrados em pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), onde aproximadamente metade dos pacientes apresentam ambas as formas de enfisema pulmonar e cerca de 25% apresentam apenas uma das formas de enfisema (Snider, 2000).

O enfisema acinar distal ou parasseptal compromete a região periférica do ácino, dutos e sacos alveolares, envolvendo-os em uma camada aérea longitudinalmente aos septos interlobulares (Tarantino, 1990). O enfisema parasseptal localizado encontra-se associado ao pneumotórax espontâneo, em adultos jovens, e bolhas pulmonares em idosos. Enfisema unilateral ou síndrome de MacLeod ocorre devido a complicações decorrentes de infecções causadas por varíola ou adenovirus na infância (Dunnill, 1982) e o enfisema lobar congênito surge, geralmente, em crianças antes do sexto mês de vida (Tarantino, 1990).

1.2. Fisiopatologia do enfisema pulmonar

Muitos processos parecem estar envolvidos com a patogenia do enfisema pulmonar. Porém, a hipótese do desequilíbrio enzimático

proteinase-antiproteinase tem prevalecido como tema central nos últimos 40 anos (Shapiro, 1995). De acordo com esta hipótese, a destruição da parede alveolar resulta da ação de enzimas proteolíticas ativas que degradam a matriz extracelular (MEC) (Hogg & Senior, 2002) e afetam a integridade de seus componentes, particularmente as fibras colágeno e elástica (Strawbridge, 1960). A formulação deste conceito foi fundamentada com base em duas observações: a) indivíduos com deficiência de alfa-1-antiprotease, considerada um defeito genético transmissível por gene recessivo autossômico (Tarantino, 1990), geralmente desenvolvem enfisema pulmonar grave quando relativamente jovens (Laurell & Eriksson, 1963); b) modelos experimentais de enfisema pulmonar baseiam-se na nebulização ou instilação de enzimas proteolíticas, como papaína (*Carica papaya*) (Gross et al., 1964), elastase pancreática de porco (Kuhn et al., 1976; Snider et al., 1986), e elastase neutrofílica humana (Janoff et al., 1977; Senior et al., 1977). Este processo proteolítico, associado à destruição uniforme da MEC do ácino pulmonar (Hogg & Senior, 2002; Mahadeva & Shapiro, 2002), resulta em alterações morfo-histológicas e fisiológicas dos pulmões equivalentes às alterações encontradas no enfisema em seres humanos (Hayes et al., 1975).

A hipótese do enfisema pulmonar estar correlacionado com a deficiência de alfa-1-antiprotease, a qual possui atividade inibitória sobre a elastase neutrofílica com maior rapidez do que sobre outras proteinases (Rufino & Lapa e Silva, 2006) ou ao aumento da atividade elastolítica resultante do acúmulo e ativação de neutrófilos em fumantes comparado a

não-fumantes, (Hogg & Senior, 2002) sugerem a ação das proteinases neutrofílicas decisivas para o desenvolvimento do enfisema (Mahadeva & Shapiro, 2002). Em uma recente análise das células inflamatórias presentes no parênquima pulmonar e nos espaços aéreos terminais em pulmões cirurgicamente retirados de pacientes não enfisematosos, com enfisema leve ou severo verificou-se um aumento do número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e eosinófilos no tecido enfisematoso. Estas células apresentam um aumento aproximado de 10 vezes nos pulmões com enfisema grave comparado com os pulmões normais (Retamales et al., 2001; Hogg & Senior, 2002). Em estágios avançados da DPOC, associado à extensa obstrução das vias aéreas, particularmente nas vias aéreas periféricas, e ao acelerado declínio das funções pulmonares observa-se aumento do infiltrado neutrofílico (Stanescu et al., 1996; Culpitt et al., 1999; O'Donnell et al., 2004). Stringer et al. (2007) demonstraram que a ação fagocitária dos neutrófilos encontra-se prejudicada quando expostos ao extrato de fumaça de cigarro. Não apenas os neutrófilos, mas também os macrófagos alveolares apresentam disfunções quando expostos aos componentes do cigarro. Macrófagos alveolares são células predominantes nas vias aéreas e desempenham um papel essencial na gênese do enfisema, através da liberação de leucotrienos, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, metaloproteinases (MMP) e espécies reativas de oxigênio (Barnes, 2004). Em análise da submucosa bronquial de pacientes com DPOC, observa-se que o predomínio de macrófagos alveolares (Saetta et al., 1993; O'Shaughnessy et al., 1997, Saetta et al., 1999), relaciona-se à gravidade da

patologia (Hogg et al., 2004). Macrófagos de pacientes fumantes expressam aumento da proteína antiapoptótica *B-cell leukaemia/lymphoma* (Bcl-X_L), sugerindo que o estresse oxidativo, induzido pela fumaça do cigarro, possa contribuir para a cronicidade da inflamação das vias aéreas, associada à redução da apoptose celular (Tomita et al., 2002). Kirkham et al. (2004) observaram, em experimentos conduzidos *in vitro*, que em macrófagos humanos expostos a fumaça do cigarro reduz-se a habilidade destas células em fagocitar neutrófilos apoptóticos. Resumidamente neutrófilos, macrófagos e eosinófilos induzem a degradação da MEC alveolar pela liberação de enzimas proteolíticas, enquanto que os linfócitos T influenciam o recrutamento das células inflamatórias e liberação de suas proteinases (Hogg & Senior, 2002).

Em condições normais, existe um equilíbrio entre a produção de substâncias agressoras e protetoras no ácino pulmonar. Entretanto, a ação prolongada da prática tabagista, associada ao estresse oxidativo induzem ao desequilíbrio destas substâncias. As espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas do estresse oxidativo da fumaça do cigarro promovem a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e proteína ativadora 1 (AP1), que podem potencializar a resposta inflamatória em pulmões de pacientes com DPOC. Além disso, as MAP kinases (MAPK) e fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), são também ativadas pela ROS (Barnes et al., 2005; Kamata et al., 2005; Mossman et al., 2006). Experimentos com pequenos roedores expostos ao ozônio, confirmaram a ativação do NF-κB e p38 MAPK nas células pulmonares (Haddad et al., 1996). Di Stefano et al. (2002) demonstraram

aumento da expressão do fator nuclear NF- κ B nas células bronquiais de pacientes com DPOC. Resultado similar fora observado em pulmões de pacientes com DPOC, onde o aumento da expressão do fator nuclear NF- κ B associa-se à degradação do inibidor do NF- κ B (I- κ B) α (Szulakowski et al., 2006). O estresse oxidativo pode causar, ainda, a fosforilação de I- κ B α e sua subsequente degradação em algumas células típicas (Ginn-Pease & Whisler, 1996; Bowie et al., 1997). Uma importante característica do processo inflamatório em pacientes com DPOC é a redução ou ausência do efeito anti-inflamatório dos glicocorticóides (Culpitt et al., 1999; Culpitt et al., 2003). Em tecido pulmonar de pacientes com quadro grave de DPOC, verificou-se grau reduzido da atividade das histonas desacetilases (HDACs), essenciais para a supressão de muitos genes inflamatórios pelos glicocorticóides (Ito et al., 2006), e aumento da expressão da IL-8. Estas observações sugerem um possível mecanismo envolvido na diminuição da eficácia dos glicocorticóides em pacientes tabagistas. Estudos demonstraram a apoptose de células epiteliais alveolares e endoteliais em tecidos pulmonares enfisematosos (Segura-Valdez et al., 2000; Kasahara et al., 2001; Yokohori et al., 2004; Imai et al., 2005) associada a aumento da subunidade da caspase-3, proteína apoptótica e perda da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Imai et al., 2005).

O fato de apenas uma minoria dos fumantes desenvolverem a patologia sugere a existência de outros fatores de risco além dos já citados na gênese do enfisema pulmonar (Guerassimov et al., 2004). Estudos em familiares de pacientes com enfisema pulmonar demonstraram, claramente,

a importância do fator genético na determinação da suscetibilidade individual para esta patologia (Silverman et al., 1998). Estudos experimentais em camundongos expostos a fumaça de cigarro (Shapiro, 2000; Cavarra et al., 2001; Takubo et al., 2002) ou após alteração genética (Mahadeva & Shapiro, 2002; Morris et al., 2003) indicam a ocorrência de alterações morfofuncionais compatíveis com enfisema pulmonar.

Embora a hipótese do desequilíbrio enzimático proteinase-antiproteinase prevaleça na patogenia do enfisema pulmonar, ainda não está esclarecido se o desenvolvimento do enfisema ocorre pelo excesso de proteases ou deficiência de alfa-1-antiprotease ou ambas (Hoidal & Niewoehner, 1983). Entretanto, deve-se considerar também os fenômenos celulares e moleculares, autoimunes, a apoptose de células alveolares e fatores genéticos os quais, em conjunto ou isoladamente, contribuem para a compreensão da fisiopatologia do enfisema pulmonar.

1.3. Processo inflamatório

O processo inflamatório caracteriza-se pela resposta do tecido conjuntivo vascularizado a estímulos lesivos endógenos ou exógenos (Cotran et al., 2000). Estímulos lesivos de natureza química, física ou biológica, desencadeiam uma série de alterações funcionais e morfológicas de células, tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos, circunscrevendo a lesão provocada pelo estímulo lesivo (Garcia Leme, 1989).

A resposta inflamatória é fundamental para destruir, diluir ou eliminar o agente agressor, evoluindo para a cicatrização e reconstituição do tecido

danificado. O processo inflamatório apresenta dois padrões distintos de manifestação. A inflamação aguda caracteriza-se pela resposta imediata e precoce a um agente nocivo. A inflamação crônica caracteriza-se pela duração prolongada, onde a inflamação ativa, a destruição tecidual e a tentativa de reparo ocorrem simultaneamente (Cotran et al., 2000).

A manifestação da resposta inflamatória aguda envolve alterações do calibre vascular, promovendo o aumento do fluxo sanguíneo, alterações estruturais da microvasculatura, ocasionando o aumento da permeabilidade vascular seguida da formação do exsudato inflamatório, e a emigração dos leucócitos da microcirculação para o foco da lesão (Cotran et al., 2000).

Inicia-se por uma vasoconstrição inconstante e transitória seguida de uma vasodilatação envolvendo primeiramente os microvasos adjacentes e secundariamente a abertura de novos leitos capilares na área lesada, resultando no aumento do fluxo sanguíneo local. A permeabilidade vascular observada no curso da resposta inflamatória decorre da abertura de junções interendoteliais ao nível de vênulas pós-capilares e extravasamento de proteínas para o tecido perivascular (Garcia-Leme, 1989; Cotran et al., 2000). À medida que a velocidade sanguínea diminui, pela vasodilatação, formam-se agregados eritrocíticos que, exibindo massa maior que a dos leucócitos, os deslocam para a periferia dos vasos (Wilhelm, 1977). Os leucócitos passam a aderir momentaneamente ao endotélio, a princípio de maneira transitória (rolagem) e em um segundo momento aderem-se firmemente (aderência firme). Após a aderência firme os leucócitos emitem

pseudópodes pelas junções interendoteliais, para então atingirem a região extravascular (Atherton & Born, 1972).

O aumento da força de adesão depende de alterações estruturais de moléculas responsáveis pela interação da superfície do leucócito com a superfície da célula endotelial. Essas moléculas são chamadas de moléculas de adesão e pertencem, neste caso em particular, a estruturas distintas denominadas selectinas, integrinas e moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas. As selectinas compreendem a P-selectina presente no endotélio e plaquetas, E-selectina confinada ao endotélio e L-selectina expressa por muitos tipos de leucócitos. Os ligantes das selectinas são oligossacarídeos associados a glicoproteínas presentes nas membranas das células adjacentes. As selectinas e seus ligantes são os elementos responsáveis pelo rolamento dos leucócitos sobre o endotélio (Rosen, 2004). As moléculas da superfamília das imunoglobulinas incluem as moléculas ICAM-1(*intercellular adhesion molecule-1*), ICAM-2, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*). Seus ligantes incluem moléculas da família β 2-integrinas (CD11a/CD18, CD11b/CD18) (Mayadas & Cullere, 2005).

Inúmeros mediadores do processo inflamatório, como histamina, trombina, fator de ativação plaquetária (PAF) e citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-1 β , por exemplo, são os elementos responsáveis pela expressão destas moléculas de adesão (Pober & Cotran, 1990).

1.4. Inflamação e diabetes mellitus

Em estudo sistemático da função leucocitária verificou-se que o infiltrado celular inflamatório (neutrófilos) encontra-se reduzido (pleurisia) em ratos tornados diabéticos pela injeção de aloxana. A falha no recrutamento celular encontra-se associada à presença de uma proteína (>12 kDa) presente no plasma com efeito inibitório sobre a quimiotaxia dos neutrófilos (Pereira et al., 1987). Utilizando-se técnica de microscopia intravital verificou-se que proteína análoga associa-se à inibição das interações leucócito-endotélio (Fortes et al., 1991). O tratamento, relativamente prolongado (12 dias), dos animais com insulina resulta na recuperação gradual da quimiotaxia avaliada *in vivo* (pleurisia, microscopia intravital) e *in vitro* (câmara de Boyden). Tratamentos agudos (3 dias) são inefetivos (Pereira et al., 1987; Sannomiya et al., 1990). Associa-se a inibição da quimiotaxia de neutrófilos uma proteína alterada por reação de glicação (Sannomiya et al., 1997), com atividade supressora sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 em células endoteliais de vênulas pós-capilares (Anjos-Valotta et al., 2006). O tratamento dos animais com insulina restaura a expressão de ICAM-1 no endotélio microvascular a valores normais (Anjos-Valotta et al., 2006).

Empregando-se modelo de hipersensibilidade mediada por IgE em ratos, Vianna e Garcia-Leme (1995) demonstraram que a insulina modula o componente inflamatório da reação asmática. Neste estudo verificou-se que animais, tornados diabéticos pela injeção de aloxana, exibem redução do infiltrado inflamatório pulmonar. O defeito no recrutamento não se deve a

alterações no leucograma, síntese de anticorpos, à hiperglicemia ou à citoglicopenia. O tratamento dos animais diabéticos com insulina corrige, completamente, esta situação. Estes dados dão suporte ao papel da insulina na gênese da reação broncoalveolar de hipersensibilidade mediada por IgE. Verificou-se, ainda, que a redução do infiltrado celular inflamatório no diabetes mellitus associa-se à redução da expressão de ICAM-1, a nível de endotélio vascular e epitélio alveolar, restabelecendo-se os valores normais após tratamento dos animais com insulina (Sannomiya et al., 1999). Em estudo recente, empregando-se modelo de hipersensibilidade mediado por IgE em ratos. Cavalher-Machado et al. (2004) verificaram que segmentos de brônquios fonte e intraparenquimatoso, isolados de animais diabéticos, apresentam redução da resposta contrátil à ovalbumina (desafio *in vitro*) decorrente de menor desgranulação mastocitária. O tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina ou a adição *in vitro* do hormônio corrige estas alterações (Cavalher-Machado et al. 2004).

Estudos conduzidos em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* indicam, de modo consistente, a participação da insulina na regulação de variados aspectos desta resposta. Verificou-se que ratos, tornados diabéticos pela injeção de aloxana, exibem redução da geração de íons superóxido por leucócitos presentes no lavado broncoalveolar (Boichot et al., 1999); redução do consumo de ácido araquidônico e liberação de prostaglandina E₂ (Alba-Loureiro et al., 2007); redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10) (Martins et al., 2006), eventos

associados a redução do infiltrado celular inflamatório pulmonar (Alba-Loureiro et al., 2007). O tratamento dos animais com insulina restaura, por completo, estas anormalidades.

Estes estudos contribuíram para se compreender porque pacientes diabéticos descompensados são mais susceptíveis a infecções, as quais se manifestam com maior gravidade e são mais difíceis de serem erradicadas (Garcia-Leme & Farsky, 1993; Alba-Loureiro et al., 2007), e porque, poucos anos após a introdução da insulina em terapêutica, constatou-se que a mortalidade decorrente de processos infecciosos, no paciente diabético, decrescera.

A resposta inflamatória não é meramente um evento de expressão local, mas reação complexa e extensa do organismo como um todo. Existem amplas evidências para o papel regulador de sistemas hormonais no processo inflamatório. Sítios de ligação para muitos hormônios podem ser caracterizados em estruturas vasculares e células hematógenas envolvidas com a resposta inflamatória; disfunções endócrinas afetam etapas fundamentais da resposta à lesão; as concentrações plasmáticas de vários hormônios alteram-se no decorrer do processo inflamatório; ações hormonais podem representar aspectos relevantes na defesa do organismo contra infecções (Garcia-Leme, 1989). Embora alguns modelos tenham sido desenvolvidos para estudar o enfisema pulmonar induzido por elastase (Snider et al., 1986), desconhece-se a influência do diabetes mellitus na evolução do enfisema pulmonar, tanto em sua fase aguda, como em sua fase crônica.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem o objetivo de investigar a ação da insulina no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda e crônica em modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática de porco em ratos diabéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ao alimento. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e aprovados pelo comitê de ética animal do Instituto do Coração (InCor), Universidade de São Paulo, antes da realização dos experimentos.

3.2. Protocolo experimental

3.3. Indução do diabetes mellitus

Para a indução do diabetes mellitus os ratos receberam uma injeção intravenosa de aloxana (42 mg/Kg) dissolvida em solução salina fisiológica. Animais controle receberam volume equivalente de solução salina pela mesma via. A glicemia foi determinada em amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais, utilizando-se um glicosímetro (Boehringer-Mannheim). Foram considerados diabéticos os ratos com glicemia superior a 200 mg/dL.

3.4. Tratamento com insulina

O grupo de ratos diabéticos da fase aguda foram tratados com 4 UI de insulina NPH (Biolab) por via subcutânea, 2 horas antes dos experimentos. Um segundo grupo de ratos diabéticos da fase crônica foram tratados com 4

UI de insulina NPH (Biolab) por via subcutânea, 2 horas antes dos experimentos, seguido de 2 UI/dia de insulina NPH (Biolab) por via subcutânea por 50 dias.

3.5. Indução do enfisema pulmonar

Sob anestesia com hidrato de cloral (400 mg/Kg intraperitoneal), os animais foram entubados com uma cânula de polietileno inserida seletivamente no brônquio fonte direito onde, então, instilou-se em dose única 0.25 UI de elastase pancreática de porco (EPP, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) diluída em solução salina, em volume final de 200 μ L (pulmão enfisematoso). Outra cânula de polietileno foi seletivamente inserida no brônquio fonte esquerdo, onde foram administrados 200 μ L de solução salina (pulmão controle). A instilação foi realizada de forma lenta e durante a inspiração, de modo que a elastase permanecesse, apenas, no lobo inferior direito do animal, caracterizando o enfisema como panacinar.

3.6. Parâmetros avaliados na fase aguda

a) Avaliação da celularidade do lavado broncoalveolar

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, intraperitoneal), a cavidade peritoneal exposta e a artéria aorta seccionada para exsanguinação. O lavado broncoalveolar foi avaliado 6 horas após a instilação intrabronquial de elastase pancreática de porco e salina. Cada pulmão foi lavado individualmente pela introdução seletiva de cateter de polietileno no brônquio fonte direito (pulmão enfisematoso) e esquerdo

(pulmão controle). O lavado broncoalveolar foi realizado com 15 mL (3 X 5 mL) de tampão fosfato salina (PBS), onde cada alíquota foi infundida e recolhida uma única vez. O lavado broncoalveolar, coletado para análise, apresentou volume mínimo de 85% do total infundido. Após centrifugação a 500 g por 10 minutos a 4°C, o botão celular foi ressuspensão em PBS, e o número total de leucócitos determinados em Contador Automático de Células (modelo CC-510 CELM). A contagem diferencial de células foi realizada em esfregaços corados pela técnica de Leishman. Foram contadas 200 células, e classificadas em neutrófilos, eosinófilos e leucócitos mononucleares com base em critérios morfológicos.

3.7. Parâmetros avaliados na fase crônica

- a) Análise histopatológica e morfométrica do parênquima pulmonar e quantificação de macrófagos no espaço alveolar

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e sacrificados 50 dias após a instilação intrabronquial de elastase pancreática de porco e salina. Os pulmões foram retirados por meio de uma esternotomia e preparados para as medidas morfológicas através da fixação em solução de formaldeído a 10% sob uma pressão de 20 cm de H₂O por 12 horas. Após fixação, foram realizados cortes coronais nos pulmões direito (enfisema) e esquerdo (salina) e incluídos em blocos de paraplast. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina. A análise morfométrica do parênquima pulmonar e a quantificação do número de macrófagos no espaço alveolar foram realizados com o auxílio de um retículo acoplado a

ocular do microscópio óptico. Foram analisados 20 campos, com aumento final de 400x. Os resultados são expressos em diâmetro médio alveolar (μm) e número de macrófagos/ mm^2 .

b) Análise quantitativa de fibras elásticas

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e os pulmões retirados e fixados como descrito anteriormente. Após fixação, foram realizados cortes coronais nos pulmões direito (enfisema) e esquerdo (salina), e incluídos em blocos de paraplast. Cortes de 5 μm de espessura foram corados pelo método da resorcina-fucsina (resorcina oxidada). O tecido pulmonar foi submetido à análise e quantificação das fibras elásticas presentes nos septos interalveolares, em 10 campos, selecionados aleatoriamente, com aumento final de 400x. A quantificação das fibras elásticas foi realizada com o auxílio de um sistema de análise digital constituído por um microscópio óptico (Nikon, Eclipse E600), videocamera (Cool SNAD, Pro Media Cybernetic), computador e software Image Pro®Plus (Media Cybernetics L.P., 4.1, USA).

c) Análise quantitativa de fibras colágeno

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e os pulmões retirados e fixados como descrito anteriormente. Após fixação, foram realizados cortes coronais nos pulmões direito (enfisema) e esquerdo (salina), e incluídos em blocos de paraplast. Cortes de 5 μm de espessura foram corados pelo método do picrosirius. O tecido pulmonar foi submetido à

análise e quantificação das fibras colágeno presentes nos septos interalveolares, em 10 campos selecionados aleatoriamente, com aumento final de 400x. A quantificação das fibras colágeno foi feita com o auxílio de um sistema de análise digital constituído por um microscópio óptico (Nikon, Eclipse E600), videocamera (Cool SNAD, Pro Media Cibernetic), computador e software Image Pro®Plus (Media Cybernetics L.P., 4.1, USA).

d) Análise radiográfica do volume pulmonar

O volume pulmonar (V_L) foi mensurado 50 dias após a instilação de elastase pancreática de porco. Os animais foram anestesiados, como descrito anteriormente, e uma radiografia anteroposterior do tórax foi realizada com o auxílio de uma unidade radiográfica (BV Pulsera, Philips). Todas as radiografias foram obtidas com uma técnica padrão de 300 mA, 0,05 s, e 50 kV e uma distância de 0,8 m do objeto de foco (Canals et al., 2005). Sobre a imagem radiográfica dos pulmões traçou-se uma linha reta (RL) entre os dois seios costofrênicos e os seguintes valores foram mensurados: i) a largura de RL (W); ii) a altura entre RL e o ápice do pulmão direito (H_1) e esquerdo (H_2); iii) a largura dos pulmões direito (w_1) e esquerdo (w_2) no ponto médio do diafragma. Ambos w_1 e w_2 foram utilizados para determinar o diâmetro anteroposterior dos pulmões. Estas medidas foram utilizadas para a construção de uma caixa retangular, contendo os pulmões e órgãos mediastinais, expressos em volume (V_{RX}), onde:

$V_{RX} = W \cdot [(H_1+H_2)/2] \cdot [(w_1+w_2)/2]$, e o volume pulmonar calculado pela fórmula $V_L = 0.496 \cdot V_{RX}$ (Canals et al., 2005), conforme foto abaixo.

3.8. Análise estatística

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando-se Teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey-Kramer para múltiplas comparações. Testes não paramétricos Wilcoxon ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para múltiplas comparações foram utilizados quando os dados não apresentaram uma distribuição normal. Considerou-se significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Animais, tornados diabéticos 10 e 60 dias após injeção de aloxana, exibiram redução no ganho de peso corpóreo durante o período experimental e concentrações plasmáticas elevadas de glicose, por comparação com os respectivos controles, características do estado insulinopênico. Os resultados encontram-se resumidos nas Tabelas 1 e 2. Animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com insulina foram avaliados 6 horas após a instilação de EPP (pulmão direito) ou salina (pulmão esquerdo) determinando-se, no lavado broncoalveolar dos animais, o número de leucócitos (Figura 1).

Avaliando-se a composição celular do lavado broncoalveolar, verificou-se nos pulmões instilados com EPP dos animais controle um aumento de 3,3 vezes comparado com os pulmões contralaterais instilados com salina. Este aumento deveu-se à migração de neutrófilos polimorfonucleares, os quais representaram 79% do total, o restante constituído por células mononucleares. Não se observou a presença de eosinófilos. Não houve diferença no número de leucócitos mononucleares. Ao contrário do grupo controle, verificou-se que os animais diabéticos exibiram redução da resposta broncoalveolar decorrente da instilação de EPP. Esta redução foi de 42% nestes animais, refletindo redução do número de neutrófilos. Eosinófilos estão ausentes e o número de células mononucleares não se alterou de forma significativa. O tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (4 UI), 2 horas antes da instilação de EPP restabeleceu,

completamente, a capacidade de resposta à enzima proteolítica. Os valores de celularidade mostraram-se semelhantes aos observados nos animais controles (Figura 1). O tratamento dos animais com insulina, embora tenha reduzido a concentração plasmática de glicose, não foi suficiente para normalizá-la ($551,2 \pm 26,0$ mg/dL antes e $338,3 \pm 37,8$ mg/dL após tratamento com insulina, $n=9$, $P<0,001$).

Em experimentos conduzidos em animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com insulina, 50 dias após a instilação de EPP (pulmão direito) ou salina (pulmão esquerdo), determinaram-se, em preparações histológicas, a quantificação dos macrófagos no espaço alveolar, a análise morfométrica, a quantificação das fibras colágeno e elásticas do parênquima pulmonar e, por meio da análise radiográfica dos pulmões, determinou-se o volume pulmonar.

Comparando-se os valores de macrófagos alveolares obtidos nos pulmões instilados com EPP de animais controles não se observaram diferenças significativas (Figura 2). Resultado semelhante foi observado no grupo de ratos diabéticos (Figura 2). Entretanto, animais diabéticos tratados com insulina (4 UI) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido do tratamento diário do hormônio (2 UI) por 50 dias, apresentaram aumento de 60% no número de macrófagos alveolares comparados com os demais grupos de animais (Figura 2). O número de macrófagos alveolares dos pulmões instilados com salina dos animais controle, diabéticos e diabéticos tratados com insulina não se alterou de forma significativa (Figura 2). O tratamento dos animais com doses diárias de insulina, embora tenha

reduzido a concentração plasmática de glicose, não foi suficiente para normalizá-la (Tabela 2).

A análise morfométrica realizada a partir de cortes histológicos obtidos dos pulmões instilados com EPP demonstraram alterações morfológicas típicas de lesão enfisematosa, com padrão de enfisema panacinar, caracterizados pela rotura dos septos e hiperdistensão alveolar, com formação de estruturas fibrosas nas extremidades destas roturas, denominadas baquetas (Fotomicrografias encontram-se ilustradas na Figura 3 a-d). A instilação de EPP nos pulmões de ratos controle aumentou significativamente o diâmetro médio alveolar, com conseqüente diminuição da superfície alveolar comparados com os pulmões instilados com salina (Tabela 3). Em contraste, valores de diâmetro médio alveolar, observados em pulmões instilados com EPP de animais diabéticos apresentaram 20% de aumento, comparado com pulmões de animais controles instilados com a enzima proteolítica (Tabela 3). O tratamento dos animais diabéticos com 4 UI de insulina NPH 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias, restaurou, completamente, a capacidade de resposta à enzima proteolítica, com valores do diâmetro médio alveolar semelhantes aos observados nos pulmões instilados com EPP dos animais controle (Tabela 3). Não houve diferença nos valores de diâmetro médio alveolar de pulmões instilados com salina dos animais diabéticos, diabéticos tratados com insulina e controles (Tabela 3).

Os resultados do estudo do citoesqueleto elástico demonstraram a disposição da histoarquitetura do arcabouço elástico, evidenciando a perda

de continuidade da lâmina elástica e seu espessamento nos pulmões dos animais instilados com EPP (Figura 3 e-h). Os pulmões instilados com EPP dos animais controle exibiram média da fração de área ocupada pelas fibras elásticas de 10,22%, enquanto os pulmões dos animais controle instilados com salina apresentaram 16,26%, demonstrando uma diminuição significativa de 38% na média da fração da área ocupada pelas fibras elásticas nos pulmões instilados com a enzima proteolítica (Figura 4A). Pulmões de animais diabéticos instilados com EPP exibiram média da fração de área ocupada pelas fibras elásticas de 6,90%, demonstrando diferença significativa de 30% comparado com os pulmões instilados com EPP dos animais controle (Figura 4A). Novamente, o tratamento dos animais diabéticos com 4 UI de insulina NPH 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias, reverteu esta situação, com valores de média da fração de área ocupada pelas fibras elásticas de 10,32% similares, portanto, aos observados nos pulmões instilados com EPP dos animais controle (Figura 4A). Não houve diferença nos valores de média da fração de área ocupada pelas fibras elásticas em pulmões instilados com salina dos animais diabéticos, diabéticos tratados com insulina e controles (Fotomicrografias encontram-se ilustradas na Figura 3 e-h).

Os resultados do estudo da quantificação de fibras colágeno demonstraram o aumento da síntese destas fibras nos pulmões dos animais instilados com EPP (Figura 3 i-l). Os valores de média da fração de área ocupada pelas fibras colágenas são apresentadas na Figura 4B. Pulmões

instilados com EPP dos animais controle exibiram média da fração de área ocupada pelas fibras colágeno de 9,50%, enquanto os pulmões dos animais controle instilados com salina apresentaram 6,93%, demonstrando aumento significativo de 37% na média da fração da área ocupada pelas fibras colágeno nos pulmões dos animais controle instilados com a enzima proteolítica (Figura 4B). Situação idêntica foi observada com os animais diabéticos. Além do mais, o tratamento destes animais com insulina não modificou esta resposta (Figura 4B). Fotomicrografias encontram-se ilustradas na Figura 3 i-l.

A análise radiográfica dos pulmões instilados com EPP dos animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com insulina são apresentadas na Figura 5. Ratos diabéticos avaliados 50 dias após a instilação de EPP exibiram aumento significativo dos valores de V_L , V_{RX} e W comparados com os animais controles. O tratamento dos animais diabéticos com 4 UI de insulina NPH 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias, reverteu esta situação, com valores de V_L , V_{RX} e W similares aos observados nos animais controles. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 1. Características gerais dos animais na fase aguda do enfisema pulmonar

Animais	N	Glicemia (mg/dL)	Peso (g)	
			Inicial	Final
Controles (10 dias)	20	90,5±1,5	222±5	282±5
Diabéticos (10 dias)	23	473,0±26,0 ^a	234±4	212±8 ^a

O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes dos experimentos. Os valores representam a média ± e.p.m.. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. ^a p<0,001 por comparação com os respectivos valores do grupo controle.

Tabela 2. Características gerais dos animais na fase crônica do enfisema pulmonar

Animais	n	Glicemia (mg/dL)		Peso (g)	
		Initial	Final	Initial	Final
Controles (60 dias)	13	86,2±2,4	85,0±2,8	222±6	416±1
Diabéticos (60 dias)	7	509,8±35,8 ^a	513,1±28,9 ^{a, b}	234±5	230±2 ^a
Diabéticos + Insulina (60 dias)	7	475,4±22,4 ^a	348,1±40,5 ^{a, c}	229±6	257±4 ^a

O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes dos experimentos com elastase pancreática de porco (EPP) e salina. Os animais receberam insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias. A glicemia foi determinada antes da administração do hormônio (imediatamente antes da indução do enfisema), e antes do sacrifício para retirada dos pulmões (50 dias após indução do enfisema pulmonar). Os valores representam a média ± e.p.m.. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. ^a p<0,001 por comparação com os respectivos valores do grupo controle. ^b p<0,01 por comparação com os respectivos valores do grupo diabético+insulina. ^c p<0.05 por comparação com os valores obtidos antes do tratamento com insulina.

Figura 1. Celularidade do lavado broncoalveolar. Número de neutrófilos (histograma aberto) e de células mononucleares (histograma hachurado) de ratos controle (n=20); diabético (n=14) e diabético+insulina (n=9). O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes do experimento com elastase pancreática de porco (EPP) ou solução salina (S). Um grupo dos animais diabéticos recebeu insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP. O lavado broncoalveolar foi realizado 6 horas após o procedimento. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. (controle, n=20; diabético n=14 e diabético+insulina n=9). * p<0,001 por comparação com os respectivos valores dos pulmões tratados com salina. ‡ p<0,001 e † p<0,01 por comparação com os respectivos valores do grupo diabético tratado com EPP.

Figura 2. Número de macrófagos no espaço alveolar de ratos controle (n=11); diabético (n=7) e diabético+insulina (n=7). O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes do experimento com elastase pancreática de porco (EPP) ou solução salina (S). Os animais receberam insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias. Os pulmões (50 dias após indução do enfisema pulmonar) foram removidos e os cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ por comparação com os valores dos demais grupos.

Figura 3. Fotomicrografias do parênquima pulmonar 50 dias após instilação de salina ou EPP. Coloração de hematoxilina-eosina (a-d), aumento x100, barra equivalente a 200 μ m. (a) pulmão controle instilado com solução salina apresenta arquitetura lobular e acinar preservada, (b) pulmão controle instilado com EPP, demonstrando hiperdistensão dos ductos alveolares (*) com ruptura dos septos alveolares (setas), (c) pulmão diabético instilado com elastase pancreática de porco (EPP), demonstrando deformidade acentuada da arquitetura acinar devido à hiperdistensão dos ductos alveolares (*) associado à ruptura dos septos (setas) e (d) pulmão diabético+insulina instilado com EPP, demonstrando padrão histológico similar ao pulmão controle instilado com EPP. Coloração pelo método da resorcina-fucsina (e-h), aumento de 400x, barra equivalente a 50 μ m. (e) pulmão controle salina demonstrando integridade dos componentes elásticos da parede alveolar, contrastando com áreas desnudas ao longo dos septos associadas ao adensamento de fibras elásticas na parede alveolar do pulmão instilado com EPP de rato controle (f) e diminuição da concentração de fibras elásticas no pulmão instilado com EPP de ratos diabéticos (g); note a restauração dos padrões dos componentes elásticos no pulmão instilado com EPP de ratos diabéticos tratados com insulina (h). Coloração pelo método do picrossirius (i-l), aumento de 400x, barra equivalente a 50 μ m. (i) note a coloração laranja-verde revelando as fibras colágeno no pulmão salina comparado com (j) pulmão instilado com EPP de rato controle, (k) pulmão instilado com EPP de rato diabético e (l) pulmão instilado com EPP de rato diabético tratado com insulina.

Tabela 3. Diâmetro médio alveolar do parênquima pulmonar

Animais	Tratamento	n	Diâmetro médio alveolar (μm)
Controles (60 dias)	EPP	11	59,65 $\pm$ 1,44 ^a
	Salina	11	51,50 $\pm$ 1,22
Diabéticos (60 dias)	EPP	7	70,99 $\pm$ 2,34 ^{a, c, d}
	Salina	7	54,24 $\pm$ 1,43
Diabéticos+insulina (60 dias)	EPP	7	61,41 $\pm$ 1,05 ^b
	Salina	7	55,48 $\pm$ 1,59

O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes dos experimentos com elastase pancreática de porco (EPP) ou solução salina. Os animais receberam insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias. Os pulmões (50 dias após indução do enfisema pulmonar) foram removidos e os cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$ por comparação com os respectivos valores nos pulmões tratados com salina. ^c $p < 0,001$ por comparação com o grupo controle tratado com EPP. ^d $p < 0,01$ por comparação com o grupo diabético+insulina tratado com EPP.

Figura 4. A: Média da fração de área ocupada pelas fibras elásticas de ratos controles (n=8); diabéticos (n=7) e diabéticos+insulina (n=9). O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes do experimento com elastase pancreática de porco (EPP) ou solução salina. Os animais receberam insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias. Os pulmões (50 dias após indução do enfisema pulmonar) foram removidos e os cortes histológicos corados pelo método da resorcina-fucsina de Weigert. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.. * p<0,01 por comparação com os valores dos pulmões tratados com EPP dos demais grupos. ‡ p<0,001 e † p<0,05 por comparação com os respectivos valores nos pulmões tratados com salina. **B:** Média da fração de área ocupada pelas fibras colágeno de ratos controles (n=8); diabéticos (n=6) e diabéticos+insulina (n=7). O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes do experimento com EPP ou solução salina. Os animais receberam insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias. Os pulmões (50 dias após indução do enfisema pulmonar) foram removidos e os cortes histológicos corados pelo método do picrossirius. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m.. * p<0,01 e † p<0,05 por comparação com os respectivos valores nos pulmões tratados com salina.

Figura 5. Radiografia anteroposterior de tórax. Exame radiológico anteroposterior de tórax 50 dias após instilação de elastase pancreática de porco (EPP, pulmão direito) e salina (pulmão esquerdo). (A) Radiografia anteroposterior de rato controle. (B) Radiografia anteroposterior de rato diabético, apresentando aumento do volume pulmonar estimado e da distância entre os seios costofrênicos direito e esquerdo. (C) Radiografia anteroposterior de rato diabético tratado com insulina, semelhante ao rato controle.

Tabela 4. Medidas radiológicas dos pulmões

Animais	V _L (ml)	V _{RX} (ml)	H ₁ (cm)	W(cm)
Controles (60 dias)	7,28±0,13	14,68±0,27	3,12±0,08	3,32±0,72
Diabéticos (60 dias)	8,39±0,26 ^{b, c}	16,93±0,53 ^{b, c}	3,18±0,08	3,62±0,74 ^{a, c}
Diabéticos+Insulina (60 dias)	6,87±0,39	13,86±0,78	3,02±0,09	3,32±1,21

O diabetes mellitus foi induzido pela injeção de aloxana (42 mg/Kg, i.v.) 10 dias antes do experimento com elastase pancreática de porco (EPP) ou solução salina. Os animais receberam insulina (NPH, 4 UI, s.c.) 2 horas antes da instilação de EPP, seguido de injeções diárias de 2 UI do hormônio durante 50 dias. Os animais foram radiografados para a realização das medidas radiológicas dos pulmões. Volume pulmonar (V_L), volume equivalente a uma caixa retangular contendo os pulmões e os órgãos mediastinais (V_{RX}). Distância do ápice ao seio costofrênico do pulmão direito (H₁). Distância entre os seios costofrênicos direito e esquerdo (W). Os valores representam a média ± e.p.m. de 5 animais para todos os grupos. ^a p<0,01 e ^b p<0,05 por comparação com o grupo controle. ^c p<0,001 por comparação com o grupo diabético+insulina.

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados nos permitem sugerir que a insulina modula o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda e crônica em modelo de enfisema pulmonar induzido por EPP.

A sugestão baseia-se nas seguintes observações: i) o infiltrado neutrofílico no pulmão, que caracteriza a fase aguda do enfisema, reduziu-se significativamente nos ratos tornados diabéticos pela injeção de aloxana; ii) a determinação do diâmetro médio alveolar, a quantificação das fibras elásticas e fibras colágeno e a análise radiográfica do volume pulmonar, alterações características da fase crônica do enfisema, indicam que a magnitude da lesão foi maior nos ratos diabéticos; iii) o tratamento dos animais com insulina restaurou, completamente, a magnitude da lesão inicial, e restringiu a dimensão da lesão enfisematosa. Embora sem diferença estatística, entre ratos controles e diabéticos, quanto ao número de macrófagos alveolares, o tratamento dos animais diabéticos com insulina determinou aumento significativo destas células no pulmão.

Drogas diabetogênicas, como aloxana e a estreptozotocina, se acumulam nas ilhotas pancreáticas causando lesão irreversível das células β . A ação citotóxica de ambos agentes diabetogênicos é mediada por espécies reativas do oxigênio (Rerup, 1970; Gaulton et al., 1985; Szkudelski, 2001). A aloxana é uma droga hidrofílica e instável, sua meia vida é de apenas 90 segundos, tempo, entretanto, suficiente para permitir que a droga destrua as células β , quando administrada por via endovenosa

(Lenzen & Munday, 1991). Ambas as drogas exibem efeitos tóxicos. A aloxana determina, particularmente em altas doses, necrose da célula tubular renal (Lenzen et al., 1996). Por outro lado, a estreptozotocina apresenta toxicidade para células linfóides do baço e do timo (Gaulton et al., 1985). Em vista do exposto, acredita-se que a aloxana seja o agente mais apropriado para o presente estudo.

Modelos experimentais de enfisema pulmonar têm sido obtidos por dose única intrapulmonar de proteinases, como elastase pancreática de porco (Kuhn et al., 1976; Snider et al., 1986), papaina (Gross et al., 1964) e elastase neutrofílica (Janoff et al., 1977; Senior et al., 1977). Dentre os vários modelos experimentais de doença pulmonar obstrutiva crônica verificou-se que a indução do enfisema pulmonar em ratos é obtida pela instilação de elastase intrapulmonar com resultados satisfatórios em 45 dias (Hele, 2001). No presente estudo, o enfisema pulmonar foi obtido 50 dias após a instilação de EPP, em dose única, pelo brônquio principal direito do animal e, pelo brônquio principal esquerdo, instilou-se volume equivalente de solução salina (pulmão controle). A análise histopatológica demonstrou diferenças entre os pulmões instilados com EPP e salina, incluindo o aumento dos espaços alveolares decorrentes da ruptura dos septos interalveolares, satisfazendo os critérios morfológicos característicos do enfisema pulmonar (Fusco et al., 2002; Monteiro et al., 2004).

Na ordem das investigações sobre a influência do diabetes mellitus na gênese do enfisema pulmonar, a resposta inflamatória inicial dos animais instilados com EPP foi avaliada pela determinação do número de células

presentes no lavado brocoalveolar. Os dados apresentados demonstram que a instilação intrapulmonar de EPP em ratos controle resultou no início da resposta inflamatória aguda com aumento do infiltrado celular inflamatório (neutrófilos). Ratos, tornados diabéticos pela injeção de aloxana 10 dias antes da instilação de EPP, exibiram marcada redução do infiltrado neutrofílico. O tratamento destes animais, com insulina, corrigiu completamente esta resposta.

Concentrações adequadas de insulina parecem ser essenciais para a manifestação das alterações funcionais de células endoteliais e de leucócitos na vigência do processo inflamatório. Estudos, conduzidos *in vitro* com neutrófilos de pacientes diabéticos, documentam defeitos de função leucocitária como redução da capacidade de adesão, fagocitose, atividade bactericida e produção de espécies reativas de oxigênio (Marhoffer et al., 1992). O infiltrado celular inflamatório (neutrófilos) encontra-se reduzido (modelo de pleurisia) em ratos tornados diabéticos pela injeção de aloxana (Pereira et al., 1987). O defeito no recrutamento celular se associa à presença, no plasma, de proteína (>12 kDa) com efeito inibitório sobre a quimiotaxia de leucócitos. O tratamento, relativamente prolongado (10-12 dias), dos animais diabéticos com insulina corrige esta situação em experimentos conduzidos *in vivo* (pleurisia) e *in vitro* (Câmara de Boyden). Tratamentos agudos (3 dias) são ineficazes (Pereira et al., 1987; Sannomiya et al., 1990). Utilizando-se técnica microscópica intravital verificou-se que os leucócitos em contato com o endotélio venular (comportamento de rolar) encontram-se marcadamente reduzidos em ratos tornados diabéticos pela

injeção de aloxana, 10, 30 ou 180 dias antes. Sob influência de um estímulo inflamatório, leucócitos migram para o tecido perivascular de animais controle e, este evento, acompanha-se de redução no número de células que rolam sobre o endotélio. Nos animais diabéticos o número de leucócitos que rolam sobre o endotélio não se altera, porém, poucas células migram para o tecido conectivo adjacente. Estas observações não refletem, entretanto, alterações do leucograma. O tratamento relativamente longo (12 dias), dos animais diabéticos com insulina corrige o defeito na interação leucócito endotélio e, conseqüentemente, o infiltrado celular inflamatório (Fortes et al., 1991; Sannomiya et al., 1997; Anjos-Valotta., 2006).

Outros mecanismos de intervenção hormonal parecem regular a reação inflamatória pulmonar em resposta à EPP, uma vez que dose única de insulina foi suficiente para corrigir a resposta alterada. Situação idêntica é observada em modelo de hipersensibilidade mediada por IgE em ratos. O diabetes mellitus determina redução do número de células presentes no lavado broncoalveolar dos animais. O tratamento dos animais diabéticos com dose única de insulina (NPH, 4 UI, s.c.) imediatamente antes do desafio antigênico corrige, completamente, esta resposta (Vianna & Garcia-Leme, 1995). Por outro lado, o jejum de 15 horas normaliza a glicemia, mas não modifica as características do lavado broncoalveolar dos ratos diabéticos sensibilizados e broncoprovocados, indicando que a simples correção da glicemia não é suficiente para restaurar a resposta de hipersensibilidade mediada por IgE (Vianna & Garcia-Leme, 1995).

A administração de insulina em dose única (4 UI), 2 horas antes da instilação intrapulmonar de EPP, corrigiu a resposta alterada sem, entretanto, normalizar a glicemia dos animais. Houve redução dos níveis glicêmicos dos animais 8 horas após a administração do hormônio, coincidindo com o período de efeito máximo da insulina NPH (6 a 12 horas). Além do mais, a concentração sérica de corticosterona, glicocorticoide prevalente no rato, não difere entre ratos controles e diabéticos por aloxana, o que reforça a intervenção direta da insulina no controle da lesão enfisematosa (Martins et al., 2006). Em suma, a redução do infiltrado neutrofílico na vigência da fase aguda do enfisema pulmonar parece refletir mais uma deficiência contínua de insulina, do que a hiperglicemia dos animais diabéticos, ou a prevalência dos glicocorticóides endógenos. A capacidade de resposta do hospedeiro aos agentes patogênicos parece estar associada à integração das funções dos glicocorticoide endógenos e insulina. Quando ocorre uma falha nesta atividade reguladora, o controle e a neutralização do estímulo nocivo são prejudicados e uma reação, a princípio transitória, tende a tornar-se sustentada e, muitas vezes, deletéria (Garcia-Leme, 1989; Garcia-Leme & Farsky, 1993).

Com o objetivo de se investigar a intervenção da insulina na fase crônica do enfisema pulmonar, procedeu-se análise histopatológica e morfométrica do parênquima pulmonar, por meio da mensuração do diâmetro médio alveolar (Lm), quantificação de macrófagos no espaço alveolar, quantificação das fibras colágeno e elástica e análise radiográfica do volume pulmonar.

De acordo com este estudo, constatou-se que 50 dias após a exposição dos animais à EPP verificou-se, nos ratos controles, um aumento expressivo do diâmetro médio alveolar dos pulmões controle instilados com a enzima proteolítica. Entretanto observou-se, nos pulmões instilados com EPP oriundos de animais diabéticos, um aumento significativo do diâmetro médio alveolar comparado aos respectivos pulmões de animais controles. O tratamento dos animais diabéticos com doses diárias de insulina normalizou os valores do diâmetro médio alveolar, assemelhando-se ao grupo de ratos controles.

Além do mais, a ação da EPP sobre a parede alveolar degrada a matriz extracelular (MEC) (Hogg & Senior, 2002) e afeta a integridade de seus componentes, particularmente as fibras colágeno e elástica (Strawbridge, 1960). Estudos demonstraram que a degradação do componente elástico da MEC exerce um papel fundamental na gênese do enfisema pulmonar (Janoff, 1985; Niewoehner, 1988; Stracher & Williams, 1989; Snider, 1992; Cardoso et al., 1993), evidenciado tanto em modelos experimentais (Johanson et al., 1971), como em pacientes humanos enfisematosos (Fukuda et al., 1989; Cardoso et al., 1993;). De acordo com estes estudos, constatou-se que a exposição intrapulmonar unilateral dos animais a EPP determinou redução expressiva da média da fração da área ocupada pelas fibras elásticas, no parênquima pulmonar dos ratos controles. Porém, nos animais diabéticos verificou-se redução, bastante significativa (30%), da média da fração da área ocupada por estas fibras por comparação com o respectivo controle. O tratamento dos animais diabéticos com injeções

diárias de insulina reverteu, por completo, esta situação. A redução da média da fração da área ocupada pelas fibras elásticas dos pulmões instilados com EPP mostraram-se mais evidentes nos animais diabéticos, indicando maior degradação do componente elástico da MEC. Estas observações sugerem, provavelmente, o envolvimento de radicais livres, ativação de células inflamatórias, produção/liberação de citocinas e liberação de proteinases endógenas (Evans & Pryor, 1994), aspectos que devem ser investigados.

Além do componente elástico da MEC, a integridade das fibras colágeno encontra-se também alterada. Estudos demonstraram que a degradação da fibra colágeno tanto em pacientes humanos enfisematosos (Stone et al., 1995) como em modelos experimentais (Wright & Churg, 1995; Selman et al., 1996) são acompanhados pelo remodelamento do colágeno resultando em um processo de reparação anormal que contribui para a patogenia do enfisema pulmonar (Kuhn et al., 1976; Finlay et al., 1996; Lucey et al., 1998; Vlahovic et al., 1999; Kononov et al., 2001). Lang et al., (1994) demonstraram, em seus experimentos, o aumento da quantidade de colágeno em todos os tipos de lesão enfisematosa, incluindo o enfisema panacinar, sugerindo o depósito de colágeno na MEC da parede alveolar. O mesmo foi demonstrado em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase em hamsters (Kuhn et al., 1976), evidenciando uma aceleração na síntese de colágeno pela ação da enzima proteolítica. Estudos conduzidos *in vitro* e *in vivo*, indicam que a liberação de peptídeos, pela ação da elastase sobre os componentes da MEC, poderia estimular a síntese de colágeno. (Pacini et al., 1990; Gardi et al., 1994). De acordo com

estes estudos, constatou-se que a exposição intrapulmonar unilateral a EPP dos animais controles, diabéticos e diabéticos tratados com insulina determinou aumento expressivo da média da fração da área ocupada pelas fibras colágeno, no parênquima pulmonar por comparação com o respectivo salina. Os efeitos do diabetes mellitus na gênese do enfisema pulmonar são desconhecidos e o mecanismo da síntese da MEC e a integridade de seus componentes, particularmente a fibra colágeno não estão completamente definidos e permanecem controversos. Estudos sobre neuropatia periférica demonstraram, em modelos experimentais de diabetes mellitus, aumento dos valores de colágeno Tipo IV em comparação com o grupo não diabético, porém sem diferença significativa (Hill & Williams, 2002). Experimentos *in vitro* utilizando cultura de células do nervo isquiático de ratos, demonstraram o aumento da produção de colágeno tipo IV (Muona et al., 1993) e elevação da expressão de mRNA de colágeno Tipo I em resposta à concentração elevada de glicose (Muona & Peltonen, 1994). Estudos recentes *in vitro* demonstraram, também, aumento da expressão gênica e da síntese protéica do colágeno Tipo I e III em células do ligamento longitudinal posterior de roedores (Li et al., 2008). Entretanto, outros estudos sugerem um discreto aumento da síntese de colágeno Tipo IV e V em lesões renais glomerulares de pacientes diabéticos (Bruneval et al., 1985; Karttunen et al., 1986; Mohan et al., 1990; Nerlich & Schleicher, 1991).

Com o objetivo de se investigar macroscopicamente a evolução do enfisema pulmonar induzido por EPP, procedeu-se o estudo das medidas radiográficas dos pulmões para obtenção do volume pulmonar estimado.

Anormalidades radiográficas em pacientes com enfisema geralmente refletem em aumento do volume pulmonar ou destruição pulmonar, acompanhada de diminuição da vascularização e formações de bolhas, ou em alguns casos, ambos (Sutinen et al., 1965; Thurlbrck & Simon, 1978; Pratt, 1987). Nas formas moderadas e severas do enfisema pulmonar o exame radiográfico confirma com exatidão a lesão. Entretanto em quadros de enfisema pulmonar leve o diagnóstico pode ser impreciso e incerto (Webb, 1997). A presença do aumento do volume pulmonar e hiperinsuflação presentes nos pacientes portadores de DPOC são características marcantes e refletem a presença do enfisema pulmonar (Reich et al., 1985). O presente estudo demonstrou aumento maior do volume pulmonar estimado em pulmões de ratos diabéticos instilados com EPP, comparados aos respectivos ratos controles. O aumento do diâmetro médio alveolar e a diminuição da média da fração da área ocupada pelas fibras elásticas e o aumento da síntese de fibras colágeno associada à diminuição da degradação da MEC, sugerem uma maior destruição das paredes alveolares e alargamento difuso do ácino pulmonar, resultando em hiperinsuflação pulmonar. O tratamento dos animais diabéticos com injeções diárias de insulina reverteu esta situação.

Os resultados, apresentados neste segmento, nos permitem sugerir que a insulina deva regular o metabolismo da matriz extracelular.

A quantificação dos macrófagos alveolares nos revelou um dado interessante. Verificou-se em ratos diabéticos um aumento acima dos valores normais de macrófagos alveolares após o tratamento destes animais

com insulina. Outros experimentos serão necessários para esclarecer este resultado.

Em suma, os resultados sugerem que a insulina modula o desenvolvimento das fases aguda e crônica do enfisema pulmonar induzido por EPP, assegurando uma reparação e um remodelamento tecidual dentro dos limites da normalidade. Estes dados sugerem que uma resposta inicial adequada é essencial para prevenir ou limitar a intensidade de uma lesão futura.

6. CONCLUSÕES

Durante a fase aguda do enfisema pulmonar verificou-se que:

1) os ratos diabéticos apresentaram redução do número de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) no lavado broncoalveolar. O tratamento destes animais com dose única de insulina restaurou sua capacidade de resposta à enzima proteolítica, entretanto, sem normalizar a glicemia.

Durante a fase crônica do enfisema pulmonar verificou-se que:

1) os ratos diabéticos apresentaram aumento do diâmetro médio alveolar com conseqüente diminuição da superfície alveolar, diminuição da porcentagem de fibras elásticas e aumento do volume pulmonar estimado. O tratamento destes animais com insulina durante 50 dias corrigiu estas alterações sem, entretanto, normalizar a glicemia.

2) não houve modificações na porcentagem de fibras colágeno nos ratos diabéticos ou após o tratamento com insulina.

3) O tratamento dos ratos diabéticos com insulina aumentou o número de macrófagos alveolares no parênquima pulmonar.

7. Referências bibliográficas

Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro CA, Scavone C, Curi R, Sannomiya P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:1037-44.

Anjos-Valota EA, Martins JO, Oliveira MA, Casalori DA, Brito LRG, Tostes RC, Fortes ZB, Sannomiya P. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. *Inflamm Res.* 2006;55:16-22.

Atherton A, Born GVR. Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorfonuclear leukocytes to blood vessel walls. *J Physiol.* 1972; 222:447-74.

Barnes PJ. Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol.* 2004;50:OL627-37.

Barnes PJ. Medical progress: chronic obstructive pulmonary disease. *Engl J Med.* 2000;343:149-69.

Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J.* 2005;25:552-63.

Boichot E, Sannomiya P, Escofier N, Germain N, Fortes ZB, Lagente V. Endotoxin-induced acute lung injury in rats. Role of insulin. *Pulm Pharmacol Therap.* 1999;12:285-90.

Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LA. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- κ B by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF- κ B activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272:25941-50.

Bruneval P, Foidart JM, Nochu D, Camilleri JP, Bariety J. Glomerular matrix protein in nodular glomerulosclerosis in association with light chain deposition disease and diabetes mellitus. *Hum Pathol.* 1985;16:477-84.

Canals M, Olivares R, Rosenmann M. A radiographic method to estimate lung volume and its use in small mammals. *Biol Res.* 2005; 38:41-7.

Cardoso WV, Sekhon HS, Hyde DM, Thurlbeck WM. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:975-81.

Cavalher-Machado SC, de Lima WT, Damazo AS, de Frias Carvalho V, Martins MA, Silva PM, et al. Down-regulation of mast cell activation and airway reactivity in diabetic rats: role of insulin. *Eur Respir J.* 2004;24:552-8.

Cavarra E, Bartalesi B, Lucatteli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, Ortiz LA, Martorana PA, Lungarella G. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha-1 proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:886-80.

Ciba Guest Symposium Report. Terminology, definitions and classifications of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax*. 1959;14:286-99.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e funcional. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 44-78.

Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1635-9.

Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:24-31.

Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased expression of nuclear factor-kB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002;20:556-63.

Dunnill MS. Emphysema. In: *Pulmonary pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1982:81-112.

Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking emphysema and damage to α_1 -proteinase inhibitor. *Am J Physiol*. 1994;266:L593-L611.

Finlay GA, O'Donnell MD, O'Connor CM, Hayes JP, FitzGerald MX. Elastin and collagen remodeling in emphysema: a scanning electron microscopy study. *Am J Pathol*. 1996;149:1405-15.

Fortes ZB, Farsky SP, Oliveira MA, Garcia-Leme J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interactions in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1991;40:1267-73.

Fukuda Y, Masuda Y, Ishizaki M, Masugi Y, Ferrans VJ. Morphogenesis of abnormal elastic fibers in lung of patients with panacinar and centroacinar emphysema. *Hum Pathol*. 1989;20:652-9.

Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Ribeiro DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Papain-induced experimental pulmonary emphysema model in rats. *J Pneumol*. 2002;28(1):1-7.

Garcia-Leme J. Hormones and inflammation. Boca Raton: CRC Press: 1989.

Garcia-Leme J, Farsky SP. Hormonal control of inflammatory responses. *Mediat Inflamm*. 1993;2;181-98.

Gardi C, Calzoni P, Marcolong P, Cavarra E, Vanni I, Lungarella G. Collagen breakdown products and lung collagen metabolism: na *in vitro* study on fibroblast culture. *Thorax*. 1994;49:312-8.

Gaulton G, Schwartz JL, Eardley DD. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocina as a model for study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia*. 1985;28:769-75.

Ginn-Pease ME, Whisler RL. Optimal NFkB mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent on intracellular glutathione and costimulatory signals. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226:695–702.

Gross P, Bajak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *J Occup Med*. 1964;6:481-3

Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, Triantafillopoulos, 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.

Haddad E-B, Salmon M, Koto H, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kB in rat lung: inhibition by corticosteroids. *FEBS Lett.* 1996;379:265-8.

Hayes JA, Kothy A, Snider GL. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamsters. *J Pathol.* 1975;117:1-14.

Hele D. First Siena International Conference on animal Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir Res.* 2001;3(1):12.

Hill RE, Williams PE. A quantitative analysis of perineurial cell basement membrane collagen IV, laminin and fibronectin in diabetic and non-diabetic human sural nerve. *J Anat.* 2002;201:185-92.

Hoidal JR, Niewoehner DE. Pathogenesis of emphysema. *Chest.* 1983;83(4):679-85.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2645-53.

Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease c 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002;57:830-4.

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.

Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- κ B suppression. *J Exp Med*. 2006;203:7-13.

Janoff A. Elastase and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:417-33.

Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, Damiano V, Sandhaus RA, Elias J, Kimbel P. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis*. 1977;115:461-78.

Johanson Jr WG, Pierce AK, Reynolds RC. The evolution of papain emphysema in the rat. *J Lab Clin Med.* 1971;78:599-607.

Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell.* 2005; 120: 649-61.

Karttunen OS, Ristele J, Autio-Harminen H, Risteli L. Effect of age and diabetes on type IV collagen and laminin in human kidney cortex. *Kidney Int.* 1986;30:586-91.

Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:737-44.

Kim WD, Eidelman DH, Izquierdo JL, Ghezzi H, Saetta MP, Cosio MG. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. *Am Rev Resp Dis.* 1991;144:1385-90.

Kirkham PA, Spooner G, Rahman I, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318:32–37.

Kononov S, Brewer K, Sakai H, Cavalcante FSA, Sabayanagam C, Ingenito EP, Suki B. Roles of mechanical force and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1920-6.

Kuhn C, Yu S, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. Changes in connective tissue. *Lab Invest*. 1976;34:372-80.

Laennec RTH. A treatise on diseases of the chest and on mediate auscultation. Traduzido por Forbes J. 4th ed. London: Longmans, 1834.

Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewaert JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax*. 1994;49(4):319-26.

Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 1963;15:132-40

Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol*. 1991;42:1385-91.

Lenzen S, Tiedge M, Jorns A, Munday R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. Boston: E Shafrir; 1996.

Li H, Liu D, Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Hight glucose promotes collagen synthesis by cultured cells from rat cervical posterio longitudinal ligament via transforming growth factor beta-1. *Eur Spine J.* 2008;17(6):873-81.

Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase tretment of hamsters: results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:555-64.

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

Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil $\beta 2$ -integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* 2005;26:388-95.

Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polomorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care.* 1992;15:256-60.

Martins JO, Meyer-Pflug AR, Alba-Loureiro TC, Melbostad H, Cruz JWMC, Coimbra R, Curi R, Sannomiya P. Modulation of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation: Role of insulin. *Shock*. 2006;25:260-6.

Mohan PS, Carter WG, Spiro RG. Occurrence of type IV collagen in extracellular matrix of renal glomeruli and its increase in diabetes. *Diabetes*. 1990;39:31-8.

Monteiro R, Jatene FB, Pazetti R, Correia AT, Manoel LA, Bernardo WM, Rivero DHRF, Oliveira SA. Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to the pulmonary emphysema: Experimental study in rats. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2004;19(4):341-7.

Morris DG, Huang X, Kaminski N, Wang Y, Shapiro SD, Dolganov G, Glick A, Sheppard D. Loss of integrin α V β 6-mediated TGF- β activation causes MMP12-dependent emphysema. *Nature*. 2003;422:169-73.

Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34:666-9.

Muona P, Peltonen J. Connective tissue metabolism in diabetic peripheral nerves. *Ann Med*. 1994;26:39-46.

Muona P, Peltonen J, Jaakkola S, Zhang R, Pan T, Pelliniemi L, Risteli L, Chu ML, Uitto J, Peltonen J. Hyperglycaemic glucose concentration up-regulates the expression of type IV collagen in vitro. *Am J Pathol.* 1993;142:1586-97.

Nerlich A, Schleicher E. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Pathol.* 1991;139:889-99.

Niewoehner DE. Cigarette smoking, lung inflammation, and the development of emphysema. *J Lab Clin Med.* 1988;111:15-27.

O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, Djukanovic R. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax.* 2004;59:837-42.

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.

Pacini A, Gardi C, Corradeschi F, Viti A, Belli C, Calzoni P, Lungarella G: In vivo stimulation on lung collagen synthesis by collagen derived peptides. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1990;68:89-101.

Pereira MA, Sannomiya P, Garcia-Leme J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. *Diabetes*. 1987;36:1307-14.

Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990;70:427-51.

Pratt PC. Role of conventional chest radiography in diagnosis and exclusion of emphysema. *Am J Med*. 1987;82:998-1006.

Reich SB, Weinshelbaum A, Yee J. Correlation of radiographic measurements and pulmonary function tests in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Roentgenol*. 1985;144:695-9.

Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;22:485-518.

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(3):339-40

Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:129-56.

Rufino R, Lapa e Silva JR. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2006;32(3):241-8.

Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:711-7.

Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated Tlymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:301-6.

Sannomiya P, Manzolli S, Alves VAF, Martins MA, Vianna EO. Insulin modulates the expression of ICAM-1 (CD54) in allergen-induced airway inflammation. *Med Inflamm.* 1999;8(Suppl1):S92.

Sannomiya P, Oliveira MA, Fortes ZB. Aminoguanidine and the prevention of leukocyte dysfunction in diabetes mellitus: a direct vital microscopic study. *Br J Pharmacol.* 1997;122:894-8.s

Sannomiya P, Pereira MAA, Garcia-Leme J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell response mediated by complement-derived chemoattractants. *Agents and Actions*. 1990;30:369-76.

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.

Selman M, Montano M, Ramos C, Vanda B, Becerril C, Delgado J, Sansores R, Barrios R, Pardo A. Tobacco smoke-induced lung emphysema in guinea pig is associated with increase interstitial collagenase. *Am J Physiol*. 1996;271:L734-43.

Senior RM, Tegner H, Kulm C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema induced with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis*. 1977;116:469-77.

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.

Shapiro SD. The pathogenesis of emphysema: the elastase:antielastase hypothesis 30 years later. *Proc Assoc Am Phys*. 1995;107:346-52.

Silverman EK, Chapman HA, Drazen JM, Weiss ST, Rosner B, Campbell EJ, O'Donnell WJ, Reilly JJ, Ginns L, Mentzer S, Wain J, Speizer FE. Genetic epidemiology of severe, early onset COPD: risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1770-8.

Snider GL. Clinical relevance summary: collagen vs elastin in pathogenesis of emphysema; cellular origin of elastases; bronchiolitis vs emphysema as a cause of airflow obstruction. *Chest.* 2000;117: 244-6.

Snider GL. Emphysema: the first two centuries-and beyond. A historical overview, with suggestion for future research: part 2. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:1615-22.

Snider GL. Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury. *Eur J Resp Dis.* 1986;69(146):17-35.

Snider GL, Kleinerman JL, Thurbeck WM, et al. Definition of emphysema. Report of a national Heart, Lung and Blood institute, Division of Lung Diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1985;133:132-82.

Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1986;133:149-69.

Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 1996; 51: 267-71.

Stone PJ, Gottlier DJ, O'Connor GT, Ciccolella DE, Breuer R, Bryan-Rhadfi J, Shaw HA, Franzblau C, Snider GL. Elastin and collagen degradation products in urine os smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:952-9.

Stracher B, I Williams. The beige mouse: role of neutrophil elastase in the development of pulmonary emphysema. *Exp Lung Res*. 1989;15:785-800.

Strawbridge HTG. Chronic pulmonary emphysema (an experimental study): I. Historical review. *Am J Pathol*. 1960;37:161-74.

Stringer KA, Tobias M, O'Neill HC, Franklin CC. Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:L1572-9.

Sutinen S, Chistoforidis AJ, Klugh GA, Pratt PC. Roentgenologic criteria for the recognition of non-symptomatic pulmonary emphysema: correlation between roentgenologic findings and pulmonary pathology. *Am Rev Respir Dis*. 1965;91:69-76.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50:536-46.

Szulakowski P, Crowther AJ, Jimenez LA, Donaldson K, Mayer R, Leonard TB, MacNee W, Drost EM. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:41-50.

Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JHT, Hoidal JR, Cosio MG. Alpha-1 antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1596-603.

Tarantino AB. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 1990. p. 44-78.

Thurlbrck WM, Simon G. Radiographic appearance of the chest in emphysema. *Am J Roentgenol.* 1978;130:429-40.

Tomita K, Caramori G, Lim S, Ito K, Hanazawa T, Oates T, Chiselita I, Jazrawi E, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased p21CIP1/WAF1 and B cell lymphoma leukemia-xL expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:724-31.

Vianna ESO, Garcia-Leme J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:809-14.

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;160:2086-96.

Webb WR. Radiology of obstructive pulmonary disease. *Am J Roentgenol*. 1997;169:637-47.

Wilhelm DL. Inflammation and Healing, In: Pathology. 7^a ed. St. Louis: W.A.D. Anderson & J.M.Kissane. v.2; 1977. p.25-89.

Wright JL, Churg A. Smoke-induced emphysema in guine pig is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am J Physiol*. 1995;268:L17-L20.

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.