TATIANA DA SILVA PINTO

**Avaliação de diferentes métodos para o estudo
da mecânica respiratória em um modelo murino
de enfisema pulmonar**

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

SÃO PAULO
2008

A minha querida avó
Hermínia, que estará
sempre no meu coração.

Agradecimentos

À Deus por ser a base de tudo o que faço.....

Ao Professor Milton de Arruda Martins, chefe do laboratório e meu orientador, por estar sempre disposto a me ajudar e a me ouvir, por me dar seu voto de confiança e por acreditar que eu realmente conseguiria... Obrigada por tudo Professor!

À Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes.....Fê!!!! Obrigada por ser minha o-orientadora, minha MÃE, amiga, confidente, companheira.... Por sempree acreditar em mim. Me tornei uma bióloga de verdade depois que conheci você!!

Ao Professor Henrique Takachi Moriya por toda a sua inteligência, paciência e companheirismo durante este projeto. Entender mecânica ficou menos difícil com você.

Ao Doutor Paolo Biselli por todas as idéias e por sempre me ajudar quando pedi socorro....

À Adenir Perini por me ensinar a ser uma pesquisadora de verdade.

À Fernanda Magalhães Arantes- Costa por sempre me socorrer quando tive dúvidas...

À Francine Maria de Almeida, por estar sempre disposta a me ajudar e por ter se tornado uma grande amiga.....

À Anna Cecília e Clarice..... Obrigada por estarem sempre ao meu lado.
Vocês são pessoas mais que especiais na minha vida....

À querida Márcia Mabel, por me ajudar sempre...
Mabel.....Desistir???? *NUMA!*

Ao Davi Francisco Ferreira, funcionário do biotério, por Ter ido
tantas vezes buscar meus animais em Campinas.

À Rosana Aparecida, secretária do laboratório, por estar sempree
disposta a ajudar... Obrigada Rô!!

Aos meus queridos amigos do LGM-20: Rafael (meu companheiro de
tese!!), Alessandra Chaqueta, Beatriz Saraiva, Dábora Kizume,
Rodolfo Vieira, Edna Leick-Maldonado

Aos meus pais, *Edgard e Emilia*, por me apoiarem sempre..... Não
seria nada sem vocês!!!

*“Eterno é tudo aquilo que dura uma fração de segundos, mas com
tamanho intensidade que se petrifica e nenhuma força consegue
destruir.”*

C. Drummond de Andrade

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
Considerações Gerais	1
Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC	4
Desequilíbrio entre Protease e Antiprotease	4
Estresse Oxidativo	5
Apoptose	6
Modelos Experimentais de DPOC	6
Modelos de Degradação Tecidual	8
Modelos Inalatórios: Fumaça de Cigarro	10
Modelos Inalatórios: SO ₂	12
Modelos Inalatórios: NO ₂	13
Modelos Inalatórios: Material Particulado e Gases Oxidantes	14
Modelos Experimentais com Animais Manipulados Geneticamente	15
Medidas de Função Pulmonar	17
Análise da Mecânica Respiratória no Domínio da Frequência:	21
Impedância Mecânica (Z)	
Curva Pressão- Volume do Sistema Respiratório	24
Mecânica do Parênquima Pulmonar	26
OBJETIVOS	28
MÉTODOS	29
Indução do Enfisema Pulmonar	29
Grupos Experimentais	30
Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório	30
Análise Histológica	33
Avaliação Morfométrica	34
Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm	34

Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elastina	36
Curva Pressão –Volume (P-V)	36
Medidas da Mecânica do Parênquima Pulmonar	38
Análise Estatística	40
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

Lista de Figuras

Figura 1	Representação mecânicas do modelo linear de um compartimento constituído por tubo (resistência) e balão (elastância).....	18
Figura 2	Representação mecânica do modelo linear de dois compartimentos.....	20
Figura 3	Exemplo de aplicação do modelo de fase constante para modelamento da impedância de entrada do sistema respiratório de um camundongo.....	23
Figura 4	Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados da mecânica respiratória.....	31
Figura 5	Foto do retículo, utilizado para as medidas morfométricas, sobre uma lâmina	35
Figura 6	Esquema do aparato utilizado para a coleta dos dados da Mecânica do Parênquima Pulmonar.....	39
Figura 7	Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos que receberam instilação intranasal de solução salina (NaCl	

	0.9%) (A) ou de solução papaína (B).....	44
Figura 8	Valores de Lm (média $\pm$ desvio padrão) nos grupos salina e papaína.....	45
Figura 9	Valores da proporção de fibras de colágeno (média $\pm$ desvio padrão) no parênquima remanescente dos grupos salina e papaína.....	46
Figura 10	Valores da proporção de fibras de elástica (média $\pm$ desvio padrão) no parênquima remanescente dos grupos salina e papaína.....	47
Figura 11	Gráficos dos valores de Rrs (média $\pm$ desvio padrão dos grupos salina e papaína.....	48
Figura 12	Gráficos dos valores de Ers (média $\pm$ desvio padrão dos grupos salina e papaína.....	49
Figura 13	Gráfico dos valores de Raw (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos salina e papaína.....	50
Figura 14	Gráfico dos valores de Gtis (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos salina e papaína.....	51

Figura 15	Gráfico dos valores de Htis (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos salina e papaína.....	52
Figura 16 A	Curvas representativas de pressão e volume na inspiração e expiração obtidas no grupo salina.....	53
Figura 16 B	Curvas representativas de pressão e volume na inspiração e expiração obtidas no grupo papaína.....	53
Figura 17	Gráficos dos valores da constante exponencial k (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos salina e papaína.....	54
Figura 18	Gráfico dos valores de Resistência (média $\pm$ desvio padrão) obtidos na mecânica do parênquima pulmonar dos grupos salina e papaína.....	55
Figura 19	Gráfico dos valores de Elastância (média $\pm$ desvio padrão) obtidos na mecânica do parênquima pulmonar dos grupos salina e papaína	56

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>CEMIB</i>	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DP</i>	Desvio Padrão
<i>DPOC</i>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
<i>Lm</i>	Intercepto Linear Médio
<i>MMP</i>	Metaloproteinase de Matriz
<i>NIH</i>	“National Institutes of Health”
<i>NO₂</i>	Dióxido de Nitrogênio
PEEP	<i>Pressão Positiva de Final de Expiração, do inglês “Positive End Expiratory Pressure”</i>
<i>ppm</i>	Parte por Milhão
<i>SO₂</i>	Dióxido de Enxofre
α 1-AT	Alfa 1 Antitripsina

Lista de Símbolos

cmH_2O	Centímetros de Água
E	<i>Elastância do Sistema Respiratório</i>
f	Função
G_{tis}	Resistência de Tecido
H_{tis}	Elastância de Tecido
i	Unidade Imaginária
I_{aw}	Inertância de vias Aéreas
kg	Kilograma
mg	Miligramas
mL	Mililitros
P	<i>Pressão</i>
P_{cyl}	Pressão dentro do Cilindro do flexiVent
P_{ao}	Pressão na saída das Vias Aéreas
R	<i>Resistência do Sistema Respiratório</i>

R_{aw}	Resistência de vias aéreas
UI	Unidade Internacional
$\dot{V}$	Fluxo
V	Volume
V_{cyl}	Posicionamento do Pistão do flexiVent, Medida Indireta do Volume Fornecido
$Z(f)$	Impedância em função da Frequência
Z_{rs}	Impedância do Sistema Respiratório
Z_{in}	Impedância de entrada do Sistema Respiratório
α	$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$
μL	Microlitros
π	Pi

Pinto, TS. Avaliação de diferentes métodos para o estudo da Mecânica Respiratória em um modelo murino de enfisema pulmonar [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Camundongos Balb/c receberam instilação intranasal de 50 µl de papaína (20 mg/ml) ou solução salina. A instilação de papaína resultou em uma diminuição significativa de Ers ($p < 0,001$), Gtis ($p = 0,030$) e Htis ($p = 0,012$). Houve um aumento de k, uma constante medida na curva PV. Não observamos diferença estatística nos parâmetros R e E na mecânica do parênquima pulmonar quando comparamos os diferentes grupos. Os camundongos instilados com papaína apresentaram valores aumentados do diâmetro alveolar médio no tecido pulmonar e aumento na proporção de fibras de colágeno, comparados aos que receberam salina ($p < 0,001$ e $p = 0,004$, respectivamente). As medidas *in vivo* detectaram alterações pulmonares em camundongos enfisematosos. Entretanto, as medidas *in vitro*, na mecânica do parênquima pulmonar, não foram capazes de detectar essas alterações.

Descritores: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; Enfisema Pulmonar/induzido quimicamente; Camundongos; Papaína; Mecânica Respiratória

Pinto, TS. Evaluation of different methods for the study of the Respiratory Mechanics in a murine model of pulmonary emphysema [dissertation] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Male Balb/c mice received a nasal drop of 50 µl of papain (20 mg/ml) or normal saline. After 28 days of instillation, lungs from papain-treated mice showed a significant decrease in mean values of Ers ($P<0,001$), Gtis ($P=0.030$) and Htis ($P=0.012$). There was an increase in mean values of k, a constant measured in P-V curve. We did not observe a significant difference between the groups in R and E in lung tissue strips. Papain instillation presented greater values of mean linear intercept and increase in the density of collagen fibers in alveolar septa in pulmonary tissue than saline-treated mice ($P<0.001$ and $P=0.004$, respectively). We conclude that in vivo measurements of pulmonary mechanics detected pulmonary emphysematous changes in mice. In contrast, in vitro measurements in lung strips with oscillatory mechanics did not detect these changes.

Descriptors: Pulmonary Disease/Chronic Obstructive; Pulmonary Emphysema/chemically induced; Mice; Papain; Respiratory Mechanics

Introdução

Considerações gerais

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) caracterizada por uma limitação ao fluxo aéreo não totalmente reversível, geralmente progressiva, associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos e com manifestações extra-pulmonares (GOLD 2006).

A DPOC pode ser descrita como um conjunto de alterações patológicas, desde inflamação crônica até a destruição do tecido pulmonar e não há, até o momento, medicamentos específicos para o tratamento desta doença ou síndrome (Groneberg e Chun, 2004).

Da DPOC fazem parte a bronquite crônica e o enfisema pulmonar, ambos com caráter irreversível. A DPOC está entre as principais causas de morbidade e mortalidade em adultos e idosos em todo o mundo (Watson, et al., 1997; Pauwels et al., 2001).

A bronquite crônica é clinicamente definida como tosse produtiva com expectoração mucosa ou mucopurulenta por no mínimo três meses em dois anos consecutivos na ausência de outras causas (Mannino, 2002).

No enfisema ocorre um aumento anormal dos ácinos pulmonares devido à destruição das paredes alveolares com conseqüente perda da capacidade

do recolhimento elástico dos pulmões (Cosio et al.,1978, Penman et al.,1970, Colebatch et al.,1973).

A inflamação crônica do parênquima pulmonar e das vias aéreas, que são alterações características da DPOC, resultam em uma subsequente reparação cujo resultado será um tecido muito semelhante ao original ou terá sua arquitetura e função alteradas dependendo das interrelações entre os diferentes mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório (Rennard, 1999).

Nos Estados Unidos, a prevalência de DPOC é de 4-6% entre homens adultos e de 1-3% nas mulheres. Se considerarmos pessoas acima de 55 anos, esse índice sobe para 10-15%.

Em um estudo populacional realizado no Rio Grande do Sul em 1995, foi possível demonstrar que a DPOC ocupa o terceiro lugar como causa de mortalidade entre as doenças crônicas, excluídas as neoplasias, sendo superadas apenas pelas doenças isquêmicas coronarianas e cerebrovasculares. No Estado de São Paulo, em abril de 2003, ocorreram 120 óbitos por DPOC, num total de 726 óbitos do Brasil.

A principal causa da DPOC é o tabagismo, sendo responsável isoladamente por cerca de 75% dos casos; o enfisema pode também ser causado por deficiência da enzima α_1 antitripsina (apenas 2% dos casos).

No Brasil, a DPOC está em primeiro lugar nas estatísticas de mortalidade por doenças respiratórias, sendo responsável por um quarto do total de óbitos da população adulta hospitalizada com problemas respiratórios (Menezes et al.,2005). Desta forma, é um importante problema de saúde pública, não somente devido aos altos índices de mortalidade e morbidade, mas também por ser uma doença que pode ser prevenida em muitos casos (Celli et al.,2003). É progressiva e irreversível e em estágios mais avançados o tratamento só é eficaz para alívio dos sintomas. O abandono do hábito de fumar é a forma principal de limitar o avanço da doença e em alguns casos é a única medida que se pode tomar para aumentar o tempo de vida do paciente (Menezes et al.,2005).

Em contraste com a grande quantidade de estudos experimentais na área de asma alérgica e do conhecimento detalhado que se tem obtido a respeito dos mediadores inflamatórios nas vias aéreas (Chung e Barnes,1999; Springer et al.,2003), menos atenção tem sido dada à DPOC (Chung et al.,2002).

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

desenvolvimento na metodologia para a coleta destas medidas (Kips et al.,2003).

Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC

1) Desequilíbrio entre Proteases e Antiproteases

Esse mecanismo foi proposto após a observação de que indivíduos com baixas concentrações séricas da anti-protease α_1 anti-tripsina (α_1 AT), desenvolviam enfisema ainda jovens. A α_1 AT é produzida no fígado e liberada no sangue. Portadores de problemas relacionados a essa enzima têm grande quantidade de α_1 AT anômala nos sáculos do retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos e esse defeito estrutural parece dificultar sua liberação para o sangue.

Pacientes homozigotos para a deficiência genética, que impede a produção de α_1 AT, apresentam uma tendência maior para o desenvolvimento de enfisema pulmonar. O fenótipo normal, PiMM (Pi, inibidor de proteína sérica) está presente em 90% dos da população. Dos vários fenótipos associados à deficiência de α_1 AT, o PiZZ é o mais comum e estes pacientes desenvolvem enfisema sintomático em ainda jovens, atingindo alto grau de gravidade em fumantes (Maitra e Kumar,2002).

A principal célula em pacientes deficientes em α_1 AT envolvida na atividade elastolítica é o neutrófilo. A elastase proveniente do neutrófilos causa destruição do tecido pulmonar e esta destruição é inibida pela ação da α_1 AT. Os neutrófilos também liberam radicais livres de oxigênio que, por sua vez, inibem a ação da α_1 AT. Assim, se há baixos níveis séricos de α_1 AT, o processo de destruição do tecido pulmonar leva a enfisema pulmonar. Portanto, o enfisema é o resultado do efeito destrutivo da atividade de proteases devido à ineficiência da atividade das antiproteases.

2) Estresse Oxidativo

Causado por radicais livres do oxigênio, peróxidos e peroxinitritos que agindo sobre proteínas, lipídios, bases nitrogenadas do DNA, enzimas e componentes extracelulares, causam dano no parênquima e/ou nas vias aéreas.

O estresse oxidativo decorrente da inalação de gases tóxicos como fumaça de cigarro ou dióxido de nitrogênio é considerado uma causa importante para o desenvolvimento da inflamação e destruição do tecido na DPOC. Estudos revelaram um aumento dos níveis de indicadores de estresse oxidativo em condensado de ar exalado em pacientes com DPOC (Paredi et al.,2002; Kharitonov e Barnes,2002; Kostikas et al.,2003).

3) Apoptose

A apoptose é um mecanismo de regulação de morte celular. Esta morte celular programada permite a eliminação de células infectadas ou danificadas que precisam ser removidas do organismo; no entanto se estas células não forem devidamente eliminadas e permanecerem no tecido ocorrerá o rompimento do citoplasma com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios no tecido em questão, com progressão de doenças (Demedts et al.,2006).

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

Modelos Experimentais de DPOC

Os animais têm sido largamente utilizados em modelos experimentais e ainda na observação da evolução de doenças pulmonares como a bronquite crônica e a asma (Slauson, 1980).

Os estudos com o emprego de modelos animais de enfisema pulmonar têm servido como importante ferramenta nas últimas três décadas, pois

permitiram esclarecimentos sobre as respostas celulares, anatômicas e bioquímicas dos pulmões a uma série de injúrias e alterações genéticas. Esses modelos podem servir para vários tipos de experimentos, como aqueles em que se testa a patogenicidade de substâncias que se suponha serem importantes na gênese do enfisema como a exposição ao NO₂, cádmio, vírus, bactérias e tabaco ou aqueles em que se estuda a patogênese do enfisema através de elastases, inibidores de α_1 antitripsina, depleção de proteínas por desnutrição e que causam danos à integridade do tecido conectivo.

Atualmente os modelos mais utilizados para indução de enfisema em animais são:

- 1) Instilação de proteases;
- 2) Inalação de gases tóxicos (ex. fumaça de cigarro e dióxido de nitrogênio);
- 3) Animais modificados geneticamente.

Considerando que para a avaliação do enfisema é importante realizar medidas de função pulmonar, é muito importante obter medidas de função pulmonar em modelos experimentais em animais de laboratório (Kips et al., 2003). Os métodos invasivos são tidos com o “padrão ouro” e a correlação destas medidas com marcadores inflamatórios e remodelamento

são fatores que devem acrescentar ainda mais nos estudos desta doença (Groneberg e Chung, 2004).

Modelos de Degradação Tecidual

Proteinases como elastase neutrofílica de seres humanos, elastase pancreática de suínos ou papaína induzem um enfisema panacinar após um único desafio intrapulmonar (Massaro e Massaro, 1997).

Apesar de estes modelos não elucidarem como ocorre o desenvolvimento inicial da doença em seres humanos, já que desde o início existe uma destruição do parênquima pulmonar; os modelos que utilizam elastase propiciam o estudo do mecanismo da fase mais adiantada da doença, onde já existe uma dramática destruição tecidual, possibilitando estudar os mecanismos de reparo. São modelos nos quais podemos observar anormalidades da função pulmonar, hipoxemia e metaplasia de células secretoras que são características encontradas em pacientes com DPOC (Groneberg e Chung, 2004).

A indução do enfisema pela administração intratraqueal de elastase leva a uma perda de fibras de colágeno e elastina. Os níveis de elastina e de glicosaminoglicanos tendem a apresentar valores normais, mas observa-se um aumento de fibras de colágeno. A matriz extracelular apresenta-se

reduzida e com uma estrutura modificada resultando em uma estrutura anormal das vias aéreas (Kuhn et al, 1976). Após a indução do enfisema com substâncias elastolíticas aparece o alargamento dos espaços aéreos juntamente com um processo inflamatório que transforma estes alargamentos dos espaços alveolares em lesões similares àsquelas encontradas em enfisematosos devido aos efeitos destrutivos exercidos pelas proteinases inflamatórias (Groneberg e Chung,2004).

A papaína foi usada inicialmente como possível tratamento para a fibrose pulmonar, porém, a instilação endotraqueal de papaína produziu destruição do parênquima com conseqüente aumento dos espaços aéreos mostrando que o processo tinha semelhança com o recém descoberto papel da enzima α_1 antitripsina. Esses dois achados mostraram que a proteólise tinha importância na patogênese do enfisema.

As lesões pulmonares produzidas pela papaína instilada por via endotraqueal são morfológicamente semelhantes ao enfisema panaciar. O aumento dos espaços aéreos é seguido de aumento da capacidade pulmonar total, capacidade residual funcional e complacência. Esse dano pode estar associado a lesões das fibras elásticas, que apesar da ressíntese não restabelecem o recolhimento elástico prévio dos pulmões (Cherniack, 1991).

Modelos Inalatórios: Fumaça de Cigarro

A primeira espécie a ser utilizada como modelo de enfisema pulmonar através da utilização de fumaça de cigarro foi a cobaia (Wright e Churg,1990), que desenvolve alargamento de espaços aéreos após exposição por alguns meses a fumaça de cigarro.

Wright et al (1990) realizaram um estudo onde cobaias foram expostas a 10 cigarros por dia, 5 dias por semana, por períodos de 1, 3, 6 e 12 meses e os dados obtidos sugeriram ocorrer um enfisema progressivo e alterações de função pulmonar similares ao observado em pacientes fumantes que desenvolvem DPOC. Mesmo depois do término da exposição dos animais à agressão da fumaça de cigarro, não houve reversão do alargamento dos espaços aéreos. Os animais que ficaram expostos por mais tempo apresentaram intensa neutrofilia, acúmulo de macrófagos e de células CD4+ (Meshi et al.,2002; Wright,2001).

Depois das cobaias, também foram utilizados coelhos, cães, ratos e camundongos. No entanto, os ratos parecem ser mais resistentes que as cobaias ao desenvolvimento de enfisema (Groneberg e Chung,2004).

Os camundongos têm sido os animais preferidos para estes estudos devido à oportunidade de manipulação da expressão dos genes nestes animais (Groneberg e Chung,2004; Guerassimov et al.,2004). Entretanto, além de

serem mais resistentes ao desenvolvimento do enfisema, estes animais apresentam muitas diferenças em relação ao seres humanos, quando se compara a anatomia do aparelho respiratório. São animais que respiram, obrigatoriamente, pelo nariz, apresentam um epitélio respiratório menos ciliado, menos células de Clara e restrição de glândulas submucosas na traquéia. Não apresentam reflexo de tosse, e muitos dos mediadores como histamina ou taquicinininas têm diferentes ações farmacológicas nestes animais (Kips et al.,2003).

Em camundongos expostos à fumaça de cigarro observa-se inicialmente um recrutamento de neutrófilos após o primeiro cigarro, seguido por um aumento gradual de macrófagos e um aumento de substâncias provenientes da degradação de colágeno e elastina. Neste período inicial já se observa neutrofilia no lavado broncoalveolar e em tecido, o que não acontece quando estes animais são tratados com anticorpos para neutrófilos ou para α_1 -antitripsina (Dhami et al.,2000).

O modelo que utiliza fumaça de cigarro para indução de enfisema pulmonar é bastante utilizado e apresenta resultados consistentes quanto ao aparecimento de enfisema, de remodelamento em vias aéreas e inflamação crônica, muito embora, existam diferenças em relação ao enfisema encontrado em seres humanos e muitos dos mediadores apresentam diferentes efeitos, principalmente no trato respiratório de murinos. É preciso considerar as variações de espécie para espécie e linhagem para linhagem,

para que se possam fazer avaliações que mais se aproximem do mecanismo desta doença em seres humanos. Descobertas obtidas a partir destes modelos certamente trarão avanços significativos no entendimento dos mecanismos da DPOC.

Modelos Inalatórios: SO₂

Dióxido de enxofre (SO₂) pode ser usado na indução de DPOC em modelos animais. Exposições diárias ao SO₂ em altas concentrações resultaram em uma lesão crônica e reparação de células epiteliais em ratos e cobaias. As exposições a altos níveis deste gás variando de 200 a 700 ppm pelo período de 4 a 8 semanas promoveu uma inflamação neutrofílica, alterações morfológicas de produção de muco, metaplasia de células produtoras de muco e descamação de células epiteliais em ratos (Shore et al,1995;Kodavanti et al.,2000). Após uma semana do término do tratamento houve uma reversão na produção de muco e a inflamação neutrofílica desapareceu totalmente (Kodavanti et al.,2000).

A inflamação de vias aéreas e o infiltrado inflamatório são importantes características da DPOC, e a exposição ao SO₂, em ratos, em apenas um dia aumentou o número de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares em vias aéreas. No entanto, este influxo de células se restringiu, somente, às grandes vias aéreas e não nas pequenas vias aéreas, como é comum nos pacientes com DPOC (Shore et al,1995)

Os modelos que utilizam SO₂ como indutor de DPOC também induzem a um aumento da resistência pulmonar e da hiperresponsividade, muito provavelmente decorrente da elevada produção de muco (Shore et al,1995).

Modelos Inalatórios: NO₂

Dióxido de Nitrogênio (NO₂) é outro gás que pode levar a uma lesão característica da DPOC dependendo da concentração, duração da exposição e susceptibilidade genética da espécie (Holroyd et al.,1997).

Exposições curtas ao NO₂ levam a uma resposta bifásica, com uma lesão inicial seguida por uma segunda fase de reparação (Barth e Muller, 1999).

As cobaias apresentam alterações na morfologia pulmonar em concentrações inferiores às aquelas que os ratos e camundongos precisam ser expostos para apresentar as mesmas lesões. Há uma variação de resposta pulmonar a um determinado modelo entre as diferentes espécies de camundongos (Azoulay-Dupuis et al.,1983).

Modelos Inalatórios: Material Particulado e Gases Oxidantes

A administração de oxidantes como ozônio também leva a uma lesão pulmonar com características similares às alterações inflamatórias observadas em pacientes com DPOC (Mudway e Kelly, 2000), causando efeitos nas células das vias aéreas (Sun e Chung, 1997; Haddad et al., 1995). Sendo o ozônio um gás poluente, a exposição a este gás promove uma série de sintomas respiratórios, incluindo piora da função pulmonar e aumento da hiperreatividade de vias aéreas.

A exposição ao ozônio, em pacientes com DPOC ou asmáticos, leva à exacerbação dos sintomas. O ozônio é um gás altamente reativo, e a sua reação com outros substratos nas vias aéreas produz substâncias tóxicas que servem como sinalizadores tóxicos para o epitélio das vias aéreas. Estes sinais incluem liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão, resultando em um influxo de células inflamatórias e aumento da permeabilidade pulmonar com consequente desenvolvimento de edema pulmonar (Mudway e Kelly, 2000).

Alguns modelos animais utilizam partículas ultrafinas, sílica e poeira de carvão como agentes agressores (Albrecht et al., 2001; Donaldson et al., 2002). As partículas ultrafinas são comuns em locais que apresentam poluição atmosférica e são compostos primários provenientes da combustão o que causa níveis significativos de estresse oxidativo nas células de vias

aéreas (Donaldson et al.,2002; Donaldson et al.,2003). Em modelos animais observa-se principalmente um enfisema focal e acredita-se que tanto o enfisema provocado por inalação de poeiras contendo partículas nocivas quanto o enfisema provocado pela fumaça de cigarro apresentam mecanismos similares de desenvolvimento (Churg et al.,1997).

Exposição a partículas derivadas do diesel acarreta inflamação crônica de vias aéreas em animais de laboratório e piora da DPOC, asma e infecções do trato respiratório (Sydbom et al.,2001).

Tanto o componente gasoso como o particulado da poluição atmosférica causam uma significativa lesão pulmonar e em especial o material particulado induz descamação do epitélio alveolar, altera os níveis de tiois nos macrófagos alveolares e linfócitos e induz a produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias. Exposição prolongada a partículas, incluindo as partículas derivadas da queima do diesel, leva à produção de inflamação e respostas tumorigênicas (Ma e Ma,2002).

Modelos Experimentais com Animais Manipulados Geneticamente

A predisposição genética de determinadas linhagens para o desenvolvimento de enfisema pulmonar está sendo estudada exaustivamente (Martorana et al.,1989; Ranga et al.,1983). Alterações genéticas monogênicas e poligênicas para mimetizar a DPOC têm

apresentado amplo desenvolvimento nos últimos anos, utilizando técnicas modernas de biologia molecular (Shapiro,2000; Shapiro, 2003).

Um grande número de linhagens de camundongos modificados geneticamente tem sido utilizada em estudos de DPOC. Camundongos que não produzem elastina estão sendo utilizados para estudar os mecanismos de enfisema envolvendo a destruição das fibras alveolares. Estes animais apresentam alterações do desenvolvimento dos ramos de vias aéreas terminais, acompanhadas por poucos sacos distais que apresentam uma atenuação da quantidade de tecido nos septos. Através da utilização destes animais pode-se avaliar a importância da elastina para a função pulmonar em pulmões já maduros (Wendel et al.,2000).

Animais geneticamente modificados são expostos a estímulos exógenos tóxicos como fumaça de cigarro, permitindo identificar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DPOC. Estudos com camundongos geneticamente modificados que não apresentam metaloelastase 12 (MMP-12) produzida pelos macrófagos mostraram que eles se mantêm normais mesmo após longo tempo de exposição a cigarros (Groneberg and Chung,2004). Estes animais também não apresentaram acúmulo de macrófagos em resposta ao estímulo do cigarro, um efeito possivelmente promovido pela MMP-12, que gera fragmentos de elastina que são quimiotáticos para monócitos (Senior et al.,1980; Hunninghake et al.,1981).

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 DPOC (Groneberg e Chung, 2004).

Medidas de Função Pulmonar

Os testes de função pulmonar são uma ferramenta essencial para fornecer uma ligação entre as mudanças funcionais e estruturais que ocorrem no enfisema. A resistência pulmonar total e a elastância pulmonar (o inverso matemático da complacência) têm sido por muito tempo as variáveis tradicionais, nos modelos animais, para avaliar a função pulmonar, apesar de haver uma compreensão limitada de suas fundações estruturais (Mitzner, 2007).

Medir 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 do animal, e à utilização de pequenos fluxos respiratórios (Bates e Irvin, 2003).

A mecânica do sistema respiratório, na versão clássica, é expressa em um modelo linear de compartimento simples, consistindo de um canal fluxo-

resistente (com resistência R) servindo um compartimento único elástico (com elastância E) Figura 1.

Figura 1. Representação mecânicas do modelo linear de um compartimento constituído por tubo (resistência) e balão (elastância).

A equação do movimento que descreve este modelo é:

$$P(t) = RV(t) + EV(t) + P_o$$

Onde $P(t)$ é a pressão na entrada do modelo, $V(t)$ é o fluxo de gás dentro do modelo, $V(t)$ é o volume de gás no compartimento elástico, P_o é a pressão restante aplicada e t é o tempo.

Os valores de R e E obtidos deste modo variam acentuadamente com a frequência pelo qual o sistema respiratório é oscilado. Essa frequência pode ser particularmente marcada acima dos valores das frequências respiratórias normais e é causado pela viscoelasticidade dos tecidos respiratórios junto com algumas heterogeneidades da função mecânica que podem estar presentes por todo o pulmão (Similowski e Bates, 1991).

A aproximação do sistema respiratório por um único compartimento uniformemente ventilado é considerada adequada desde que o sinal de excitação esteja confinado a uma única frequência. Se o fluxo fornecido ao sistema apresentar diversas frequências, o sistema respiratório passa a responder como sendo composto por diversos componentes distintos, cujas contribuições relativas para o comportamento do sistema respiratório variam com a frequência. Desta forma, podemos inferir que o ar não irá se distribuir da mesma forma, nem ao mesmo tempo para todas as unidades constituintes (Figura 2)

Figura 2. Representação mecânica do modelo linear de dois compartimentos.

Os ventiladores mecânicos convencionais geralmente não são capazes de prover um sinal de excitação com um conteúdo espectral suficientemente rico para possibilitar a identificação do caráter multicompartimental do sistema respiratório (Lutchen et al, 1993^a).

Segundo Moriya et al., (2003), a técnica das oscilações forçadas descrita originalmente por Du Bois et al. em 1956 permite gerar oscilações de pressão que são aplicadas ao sistema respiratório por um dispositivo externo e as oscilações resultantes de fluxo, relacionadas com as oscilações de pressão correspondentes, permitem a estimativa de impedância do sistema respiratório.

Análise da Mecânica Respiratória no Domínio da Frequência: Impedância Mecânica (Z)

Mais informações são obtidas se as medidas de R e E forem sobre uma escala de frequências. Tais caracterizações são expressas através da impedância de entrada do sistema respiratório (Z_{in}) (Peslin e Fredberg, 1986).

A maneira usual de determinação da Z_{in} consiste na perturbação do sistema respiratório com uma ampla marca de V (t) em forma de onda que contém, simultaneamente, muitas frequências diferentes. Z_{in} é portanto determinada para cada uma das frequências envolvidas, usando a transformação de Fourier para converter os sinais de P e V no domínio do tempo para suas representações equivalentes no domínio da frequência. Z_{in} é uma complexa função da frequência (f), com uma parte real, R(f) e uma parte imaginária, X(f), deste modo:

$$Z_{in}(f) = R(f) + i X(f)$$

Onde i é a raiz quadrada positiva de -1 , $R(f)$ é a resistência, X é reatância, que é constituída por uma contribuição negativa de estruturas elásticas no sistema respiratório e contribuições positivas de estruturas com massa.

Para análise das impedâncias obtidas, utilizamos o modelo de fase constante (Figura 3), descrito por Hantos (Hantos et al., 1992):

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

Onde R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância, 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

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

Figura 3. Exemplo de aplicação do modelo de fase constante para modelamento da impedância de entrada do sistema respiratório de um camundongo.

A utilização da técnica de oscilações forçadas fornece uma maior quantidade de informações fisiológicas do que a análise convencional de modelos compartimentais no domínio do tempo. Em contrapartida, a técnica de oscilações forçadas requer uma maior complexidade instrumental e computacional (Bates, 1998).

Pode-se geralmente modelar o sistema respiratório como sendo um sistema linear, mas diversos tipos de fenômenos não-lineares podem ser observados no comportamento mecânico das vias aéreas e dos tecidos respiratórios.

principalmente durante patologias. O que muitas vezes implica em uma diminuição na sensibilidade do sistema para captar possíveis alterações funcionais secundárias à indução de doenças através de modelos experimentais.

De acordo com Suki et al (1991), enquanto vários resultados referentes ao fato da resistência das vias aéreas ser dependente do fluxo estarem em satisfatório acordo, a extensão da contribuição da não-linearidade dos tecidos pulmonares para as propriedades mecânicas do sistema respiratório ainda permanece um assunto bastante controverso.

Curva Pressão- Volume do Sistema Respiratório

A análise dos dados obtidos através da utilização da curva P-V nos permite avaliar o grau de heterogeneidade pulmonar através da histerese.

A relação pressão-volume é um dos aspectos do comportamento mecânico bastante utilizados para se obter informações de alterações dos tecidos em modelos experimentais de doenças pulmonares.

A curva pressão-volume (P-V) do sistema respiratório descreve o comportamento mecânico dos tecidos e da caixa torácica durante a inspiração e expiração. Para eliminar os efeitos resistivos, as medidas de

volume e pressão são realizadas durante períodos curtos de apnéia ou durante um fluxo muito pequeno (Harris, 2005).

São muitos os trabalhos que utilizam a curva P-V para estudos em pacientes com DPOC, considerando a curva P-V uma boa medida para diagnosticar e estabelecer a gravidade do enfisema (Harris, 2005).

A função exponencial originalmente aplicada à curva PV por Salazar e Knowles (1964) foi amplamente empregada em pesquisas (Eidelman et al., 1990) e, em um grau menor, na área clínica (Harris et al., 2000). Esta função é usualmente expressa na forma:

$$V = A - B.e^{-k.P_{tp}}$$

onde V é o volume pulmonar e P_{tp} é a pressão transpulmonar.

De acordo com esta equação, V inicial em um valor igual a (A-B) quando P é zero e tende para o valor de A quando P tende a infinito. A forma da curva é governada principalmente por K, que tem sido considerado um representante das propriedades mecânicas estáticas dos pulmões e um índice da elasticidade pulmonar independente do volume (Pare et al., 1982).

Gibson et al (1979) observaram que o fator k estava aumentado em indivíduos com DPOC. Esta relação foi comprovada por Greaves e Colebatch (1980) que estudaram pulmões normais e enfisematosos.

Mecânica do Parênquima Pulmonar

Para descrever melhor a mecânica periférica do pulmão, costuma-se medir a impedância e curva pressão - volume in vivo, e a impedância e curva estresse - tensão em fatias do tecido pulmonar in vitro. Nas condições experimentais in vitro, o líquido intersticial é removido e então as medidas da relação estresse-tensão refletem as propriedades intrínsecas do tecido. Entretanto, as medidas feitas in vitro aplicam uma extensão uniaxial, diferentemente da distensão tridimensional das medidas in vivo (Fust et al., 2004).

Têm sido utilizadas fatias do parênquima pulmonar para investigar propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão (Goldie et al., 1984). Como os músculos, o tecido pulmonar muda suas propriedades mecânicas quando células contráteis são estimuladas.

As tiras do parênquima consistem principalmente de tecido alveolar com uma pequena proporção de vias aéreas e veias (Salerno et al., 1995) e tem sido estudadas em várias espécies, incluindo camundongos (Faffe et al., 2002).

O tecido pulmonar exibe comportamentos notáveis de histerese durante oscilação dinâmica em todo pulmão (Ludwig et al., 1992) e em preparações com fatias do parênquima (Fredberg et al., 1993).

Muitos estudos in vitro têm mostrado que mudanças na estrutura do tecido ou na composição da matriz podem alterar a mecânica do tecido, principalmente a elastância dinâmica do tecido (Dolhnikoff et al., 1999; Rocco et al, 2001). Em todo o pulmão, tanto mudanças na estrutura do parênquima pulmonar e na sua composição podem resultar em uma heterogeneidade nas propriedades dinâmicas do tecido. De fato, o tecido pulmonar se torna extremamente heterogêneo no enfisema (Russi et al., 1999).

Objetivos

Neste estudo tivemos como objetivo principal utilizar diferentes metodologias para avaliação da mecânica respiratória em um modelo de enfisema pulmonar em camundongos:

- mecânica clássica (domínio do tempo);
- mecânica utilizando a técnica das oscilações forçadas (domínio da frequência);
- curva Pressão- Volume (P-V);
- mecânica do parênquima pulmonar.

Métodos

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

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

Indução do Enfisema Pulmonar

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

No grupo no qual não foi induzido enfisema, os animais receberam instilação nasal de solução fisiológica (0,9% NaCl), veículo da papaína.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo salina: Igualmente ao Grupo 1, estes animais receberam instilação intranasal de 50 μ L de solução salina .

Grupo papaína: Animais que receberam instilação intranasal de 50 μ L de solução de papaína (20 mg/mL);

Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório

Após 28 dias da instilação, os animais de cada grupo foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados e um cateter intravascular 20G foi introduzido na traquéia. Os camundongos foram, então, conectados a um respirador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canada). Um diagrama esquemático do respirador mecânico utilizado é apresentado na Figura 1.

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Posteriormente foi induzida uma paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de Brometo de Pancurônio (1 mg/kg).

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

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

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

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

harmônica (Hantos et al.,1992). 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 (Bates et al., 1989). 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 (Hantos et al.,1992):

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

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

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

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

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

Análise Histológica

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

Os pulmões foram fixados em formaldeído (4%) sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas. Após a fixação, os pulmões foram incluídos em parafina e foram feitos cortes destes pulmões para análises morfométrica e de imunohistoquímica. Para análise morfométrica foram feitas colorações com Hematoxilina-Eosina, Picrossírius (para as fibras de colágeno) e Resorcina-Fucsina (para fibras elásticas)(Dolhnikoff et al.,1999).

Avaliação Morfométrica

Para a análise morfométrica, foi feita uma leitura cega (o pesquisador não sabia a que grupo experimental as lâminas pertenciam), utilizando morfometria convencional, através da utilização de um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular de um microscópio óptico convencional. Uma foto do retículo sobre uma lâmina é apresentada na Figura 2.

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, foi contado o número de vezes que os interceptos cruzavam as paredes dos alvéolos (Margraf et al.,1991).

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

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

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.

Medida das Fibras de Colágeno e das Fibras de Elastina

Para obtenção das medidas de fibras de colágeno e de elastina foram contados o número de pontos que incidiam sobre as fibras de colágeno e de elastina e também os pontos que incidiam no parênquima remanescente (Lanças et al.,2006). Para o cálculo, utilizou-se a seguinte equação:

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

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

Curva Pressão –Volume (P-V)

Para a realização da Curva P-V nós estudamos 34 camundongos que receberam instilação intranasal de papaína (n =17) ou salina (n =16).

Pressão (P) e Volume (V) foram gerados através da aplicação de uma perturbação de onda de volume (SW) com uma amplitude de 0.2 mL e uma frequência de 2.5Hz (Martin et al., 1988). V foi determinado através da correção do deslocamento do volume no pistão do ventilador pela compressão de gás no cilindro do ventilador (Hirai et al.,1999). P foi obtido

através da subtração da pressão resistiva através do cano do flexiVent pela pressão no cilindro do flexiVent. V' foi determinado pelas diferenciações numéricas do volume. Após 5 minutos de ventilação mecânica regular, a perturbação de SW foi aplicada três vezes e a média foi tirada para gerar uma medida de base.

O padrão linear da equação do movimento é estendido de duas maneiras:

- Pela adição de um termo E não linear:

$$P = E_1V + E_2V^2 + RV' + P_0$$

- Pela adição de um termo R não linear:

$$P = EV + R_1V' + R_2V' |V'| + P_0$$

Para a análise estatística da curva PV, o flexiVent foi programado para gerar sete medidas de volume inspiratório para um volume total de 0,8 mL seguidos de sete medidas expiratórias, realizando uma pausa entre cada medida de pelo menos 1 segundo. O platô de P em cada medida foi gravado e relacionado com o volume total liberado.

Medidas da Mecânica do Parênquima Pulmonar

Após 28 dias da instilação intranasal de papaína (n = 9) ou salina (n =5), os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados e após a abertura do toras e do abdome, exsanguinados.

Obtenção e Preparação do tecido

Fatias de tecido pulmonar periférico foram obtidas da região subpleural, medindo aproximadamente 10x2x2 mm e foram mantidas em solução de Krebs (mM: NaCl 118, KCl 4,5, NaHCO₃ 25,5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂SO₄, glucose 10) a 4° C, borbulhada continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (Carbogênio) em um pH de 7,40. As fatias foram pesadas e seu comprimento de repouso (L⁰) medido.

Aparato Experimental

As fatias pulmonares subpleurais foram suspensas em um aparato constituído de um banho contendo solução de Krebs (37° C, pH= 7,4). Através de “clips” de metal colados com cianocrilato a cada ponta da fatia pulmonar, esta foi de um lado ligada a um transdutor de força e do outro a um braço oscilatório de controle de alterações de comprimento (L). O tecido foi submetido a uma força de 2 g por três vezes retornando para uma força de 1 g em seguida. Esse procedimento foi realizado para que ocorra um

melhor arranjo entre as fibras do tecido. Após sessenta minutos de estabilização a uma força (T) de 0.7 g (com duas trocas de Krebs durante esse tempo), foram obtidas medidas de força e comprimento basais. Oscilações mecânicas sinusoidais foram realizadas a uma frequência de 1 hz e a uma amplitude de 2,5% L_0 .

Esquema do equipamento

Correção: L_r/A_0 onde $A_0 = W_0/(\rho \cdot L_r)$, portanto $\alpha = L_r^2 \cdot \rho / W_0$

$\eta = (R/E) 2\pi f$ onde η é a Histeresividade

Figura 6. Esquema do aparato utilizado para a coleta dos dados da Mecânica do Parênquima Pulmonar.

Análise Estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão) e os dados não-paramétricos foram expressos por medianas e percentis. A análise estatística foi feita através da utilização do software Sigma Stat (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para os dados da mecânica respiratória, valores de Lm e proporção de fibras de colágeno e elastina, utilizamos o teste de Student não pareado. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A Figura 7 mostra fotomicrografias de cortes histológicos de pulmões de camundongos que receberam instilação intranasal de NaCl 0,9% (A) ou solução de papaína (B). A instilação de papaína acarretou uma significativa destruição dos septos alveolares, resultando em alargamento dos espaços aéreos distais. Na Figura 8 estão representados os valores de Lm medidos nos dois grupos experimentais. O grupo que recebeu instilação de solução de papaína apresentou aumento estatisticamente significativo de Lm ($p < 0,001$) comparado ao grupo que recebeu instilação somente de solução fisiológica.

As proporções do volume de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar estão representadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Foi observado um aumento estatisticamente significativo da proporção de fibras de colágeno nos pulmões dos animais que receberam instilação de solução de papaína ($p = 0,004$) (Figura 9). No entanto, não houve diferença na proporção de fibras elásticas quando os dois grupos experimentais foram comparados (Figura 10).

Mecânica do Sistema Respiratório

Nas figuras 11 e 12 estão representados os valores dos parâmetros de Rrs (resistência do sistema respiratório) e Ers (elastância do sistema

respiratório) dos grupos salina e papaína. As medidas foram realizadas vinte e oito dias após a instilação. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de Rrs quando comparamos os grupos salina e papaína. Houve uma diminuição estatisticamente significativa da Ers nos animais que receberam instilação de papaína quando comparados aos animais que receberam instilação somente de salina ($p = <0,001$).

Impedância do Sistema Respiratório

Na Figura 13 estão representados os valores do parâmetro da Raw (resistência de vias aéreas) dos grupos salina e papaína. As medidas foram realizadas vinte e oito dias após a instilação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,187$).

Os valores de Gtis (resistência do tecido) estão representados na Figura 14. Observamos uma diferença estatisticamente significativa quando analisamos a resistência do tecido (Gtis) nos animais dos grupos salina e papaína ($p = 0,030$).

Na Figura 15 estão representados os valores do parâmetro Htis (elastância do tecido). Houve uma diminuição estatisticamente significativa do Htis nos animais que receberam instilação de papaína quando comparados aos animais que receberam instilação somente de salina ($p = 0,012$).

Curva Pressão- Volume

Curvas representativas de pressão e volume na inspiração e expiração, obtidas em camundongos que receberam instilação intranasal de salina ou papaína são mostradas nas Figuras 16A e 16B. A instilação de papaína resultou em um aumento significativo na média dos valores da constante exponencial k ($p = 0,032$, Figura 17).

Mecânica do Parênquima Pulmonar

Na Figura 18 estão representados os valores da resistência (R) dos dois grupos experimentais. As medidas foram realizadas vinte e oito dias após a instilação de solução de salina ou papaína. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,551$).

A Figura 19 mostra os valores de elastância (E) dos grupos experimentais. O gráfico mostra que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo que recebeu solução de papaína com o que recebeu salina ($p = 0,800$).

Figura 7 A e 7 B: Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos que receberam instilação intranasal de solução salina (NaCl 0,9%) (A) ou de solução de papaína (B) (aumento de 100x, coloração utilizada: Hematoxilina-Eosina). Na Figura A observa-se a integridade das paredes alveolares, enquanto que na Figura B, observa-se destruição das paredes alveolares e alargamento dos espaços alveolares.

Figura 8: Valores do intercepto linear médio medidos nos dois grupos experimentais. Os valores estão expressos como média $\pm$ DP; * $p < 0,001$ comparado ao grupo que recebeu somente instilação de solução salina; $n = 6$ (Salina) e $n = 8$ (Papaína).

Figura 9: Valores da proporção de fibras de colágeno dos grupos instilados com papaína ou salina. Os valores estão representados como a média $\pm$ DP; $n = 6$ (Salina) e $n = 8$ (Papaína). O grupo Papaína mostrou aumento significativo na proporção de fibras de colágeno quando comparado ao grupo Salina ($p = 0,004$).

Figura 10: Valores da proporção de fibras de elastina dos grupos instilados com papaína ou salina. Os valores são a média $\pm$ DP; $n=6$ (Salina) e $n=8$ (Papaína). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,427$).

Figura 11: Resistência do sistema respiratório (R) dos animais após 28 dias da instilação de salina ou papaína. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Os valores são a média $\pm$ DP; n=6 (Salina) e n= 8 (Papaína) (p = 0,520).

Figura 12: Elastância do sistema respiratório (E) dos animais após 28 dias da instilação de salina ou papaína. Os valores são a média $\pm$ DP; n= 6 (Salina) e n= 8 (Papaína). O grupo Papaína mostrou uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado com o grupo Salina ($p = <0,001$).

Figura 13: Resistência de vias aéreas (Raw) dos animais submetidos às medidas de mecânica oscilatória do sistema respiratório após vinte e oito dias da instilação de papaína ou salina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores são a média $\pm$ DP; n=6 (Salina) e n= 8 (Papaína) (p= 0,187).

Figura 14: Resistência do tecido (Gtis) dos animais submetidos à medidas de mecânica oscilatória do sistema respiratório após vinte e oito dias da instilação de papaína ou salina. Os valores são a média $\pm$ DP; n= 6 (Salina) e n= 8 (Papaína). O grupo Papaína mostrou uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado com o grupo Salina (p = 0,030).

Figura 15: Elastância do tecido (Gtis) dos animais submetidos às medidas de mecânica oscilatória do sistema respiratório após vinte e oito dias da instilação de papaína ou salina. Os valores são a média $\pm$ DP; n=6 (Salina) e n= 8 (Papaína). O grupo Papaína mostrou uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado com o grupo Salina ($p = 0,012$).

Figura 17 - Média ($\pm$ DP) dos valores da constante exponencial k nos grupos que receberam instilação intranasal de salina ou papaína. O grupo papaína apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparamos com o grupo salina ($p = 0,032$).

Figura 18: Resistência (R) dos animais submetidos às medidas de mecânica do parênquima pulmonar após vinte e oito dias da instilação intranasal de papaína ou salina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores são a média $\pm$ DP; n= 6 (Salina) e n= 10 (Papaína) (p = 0,551).

Figura 19: Elastância (E) dos animais obtidos submetidos às medidas de mecânica do parênquima pulmonar após vinte e oito dias da instilação de papaína ou salina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os valores são a média $\pm$ DP ; n= 6 (Salina) e n= 10 (Papaína) (p = 0,800).

Discussão

Neste estudo a instilação de solução de papaína por via nasal acarretou uma diminuição significativa tanto da elastância do sistema respiratório (Ers) quanto da elastância e resistência do tecido pulmonar (Htis e Gtis, respectivamente), bem como um aumento significativo da constante exponencial medida pela curva P-V (k). As análises histológicas apresentaram aumento significativo do intercepto linear médio (Lm), uma característica histopatológica utilizada para determinar a gravidade da destruição tecidual (Johanson e Pierce, 1972; Fusco et al., 2002) e da proporção de fibras de colágeno no parênquima remanescente somente no grupo Papaína. No entanto, a avaliação da mecânica do parênquima pulmonar não mostrou alterações significativas nos tecidos de animais instilados com solução de protease.

Modelos em animais são ferramentas importantes para o estudo de doenças como a DPOC, auxiliando na compreensão dos mecanismos moleculares e celulares presentes na patogenia desta doença (Brusselle et al., 2006). Atualmente os modelos mais utilizados para a indução de enfisema em animais são: 1) modelos que utilizam proteases (papaína, elastase pancreática de porco ou elastase neutrofílica); 2) inalação de gases tóxicos, como fumaça de cigarro, dióxido de nitrogênio ou dióxido de enxofre; 3) utilização de animais modificados geneticamente e que desenvolvem espontaneamente a doença (Mahadeva e Shapiro, 2002).

A instilação de substâncias proteolíticas por via traqueal ou inalatória é muito utilizada em modelos animais para indução de enfisema pulmonar, produzindo efeitos fisiopatológicos que se assemelham em muito a esta doença em seres humanos (Snider,1986; Snider,1992; Karlinski e Snider,1978).

A instilação de papaína para indução de enfisema por via traqueal ou via inalatória é uma técnica muita utilizada (Buduhan et al., 2006). Assim, optamos pela utilização de papaína. Já utilizamos, em nosso laboratório, instilação de papaína para indução de enfisema (Fló et al.,2006; Lopes et al., 2007), tendo sido administrada solução de papaína por via traqueal em ratos. No entanto, devido à dificuldade na execução da técnica de entubação em camundongos optamos pela administração intranasal, uma técnica simples, rápida e que não requer anestesia dos animais. A administração de substâncias por via intranasal em camundongos é uma técnica eficaz e não invasiva utilizada para distribuição de alérgenos (Zhang et al., 1997), drogas (Chun et al., 1999), imunoterapia (Eyles et al.,2000) e patógenos.

Southam et al (2002) realizaram um trabalho estudando a distribuição de solução administrada por instilação intranasal em camundongos, através da utilização de sulfeto coloidal marcado com Tc^{99} , em tecidos como pulmão, esôfago e estômago. Foi possível observar uma maior distribuição relativa nos pulmões quando utilizado um volume acima de 35 μ L. Tsuyuki et al. (1997) instilaram 50 μ L de solução de Azul de Evans em camundongos,

observando que 75% do total instilado encontrava-se nas vias aéreas, sendo que não foi detectada a presença deste corante, nem no esôfago, nem no estômago destes animais. Eyles et al. (2000) instilaram, também, um volume de 50 μ L de microesferas de material radioativo (Sc-labeled styrene-divinyl benzene) e 48% deste material encontrava-se no pulmão, já 15 minutos após a administração. Já Takafuji et al. (1987) encontraram somente 19% do total de 25 μ L de ovalbumina marcada com material radioativo, após 15 minutos da instilação.

No modelo que utilizamos neste trabalho, uma única instilação de solução de papaína (20 mg/mL), com um volume de 50 μ L foi suficiente para acarretar alterações fisiológicas e estruturais nos pulmões dos animais.

Fló et al (2006), em trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório induziram enfisema pulmonar em ratos Wistar, através da administração de papaína por via traqueal. Após 2 meses da instilação, observou-se aumento estatisticamente significativo do Lm nos animais tratados com papaína. O Lm é uma medida morfométrica que nos permite verificar a intensidade da lesão apresentada no tecido (Snider,1986). Foram feitas medidas de mecânica respiratória. Para o cálculo da elastância total do sistema respiratório (Ers) e da resistência do sistema respiratório (Rrs), neste estudo, utilizou-se a equação do movimento do sistema respiratório, considerando o sistema respiratório como um sistema unicompartimental. No entanto, não conseguiu-se constatar diferenças nos resultados obtidos da mecânica

respiratória tanto em elastância quanto em resistência do sistema respiratório.

A utilização do conceito de modelo unicompartimental não permite o estudo separado das regiões mais centrais e das regiões mais periféricas dos pulmões. Esta limitação se torna muito importante ao estudarmos doenças que acometem tanto as vias aéreas o parênquima pulmonar, gerando assim, diferenças regionais na estrutura e na função pulmonar. Desta forma, é muito mais razoável imaginar o sistema respiratório como um sistema multicompartimental, nos permitindo entender de maneira mais clara o comportamento das diferentes regiões pulmonares (Bela Suki e Bates, 2008).

Os parâmetros do modelo de fase-constante (R_{aw} , G_{tis} e H_{tis}), têm sido utilizados em numerosos estudos para caracterização da impedância do sistema respiratório tanto em humanos quanto em animais, permitindo separar os componentes centrais de vias aéreas (R_{aw}) e componentes de tecido periférico (G_{tis} , H_{tis}).

Para podermos avaliar o sistema respiratório como um sistema multicompartimental, utilizamos um outro sistema de mecânica para coleta dos dados. A multicompartimentabilidade deste modelo considera que este sistema respiratório irá funcionar em diferentes constantes de tempo. Para tanto se torna necessária a utilização da técnica das oscilações forçadas

para o cálculo da impedância do sistema respiratório. Para coleta dos nossos dados, utilizamos a impedância de entrada, onde o fluxo é aplicado diretamente na abertura das vias aéreas e a pressão é medida também, na abertura das vias aéreas.

O enfisema é uma doença que acomete predominantemente o parênquima pulmonar, assim acreditamos que com a utilização deste modelo conseguiríamos uma maior precisão nas medidas permitindo encontrar diferenças nos dados da mecânica, principalmente na elastância, o que não foi encontrado no trabalho anterior de Fló et al (2006).

Neste estudo, após 28 dias da instilação de papaína, observamos uma diminuição na Ers (elastância do sistema respiratório) dos camundongos que receberam instilação de papaína quando comparados aos camundongos que receberam instilação de solução salina, no entanto não encontramos diferenças ao avaliarmos os valores de Rrs (resistência do sistema respiratório). Na avaliação da mecânica utilizando modelo multicompartimental, observamos uma diminuição em Gtis (resistência do tecido) e em Htis (elastância do tecido) do grupo papaína, quando comparamos ao grupo salina e também não encontramos diferença entre os grupos ao analisarmos os valores de Raw (resistência de vias aéreas). Esta diminuição significativa da elastância indica que houve um aumento da complacência pulmonar, característico dos dados encontrados em estudos em pacientes enfisematosos. Nossos dados corroboram com outros dados

da literatura; Takubo et al (2002) testaram a hipótese de que variações na expressão de $\alpha 1$ -antitripsina são capazes de modular o tipo de enfisema e suas conseqüências funcionais em camundongos expostos a fumaça do cigarro. Através da análise da mecânica respiratória, eles observaram que camundongos com deficiência de $\alpha 1$ -antitripsina apresentaram uma diminuição de Htis (elastância do tecido) quando comparados aos camundongos C57BL/6J normais. Ito et al. (2005) instilaram em camundongos C57BL/6 elastase pancreática de porco, por via intratraqueal, e após três semanas observaram uma diminuição estatisticamente significativa do Htis e do Gtis (resistência do tecido) no grupo que recebeu a elastase em relação ao que recebeu somente solução salina. Não houve diferença entre os dois grupos quando foi analisada Raw (resistência de vias aéreas). Resultados semelhantes foram obtidos por Brewer et al. (2003), que instilando elastase pancreática de porco em ratos, por via traqueal, observaram diminuição de Htis e Gtis, quatro semanas após a instilação, nos animais que receberam elastase quando comparados aos que receberam somente solução salina.

Em nosso estudo, os animais do grupo papaína apresentaram um aumento significativo de Lm quando comparamos com os animais do grupo salina, confirmando o desenvolvimento de enfisema pulmonar nestes animais. Ito et al (2005) utilizando um modelo de enfisema, com instilação de elastase em camundongos C57BL/6, também encontraram um aumento significativo dos

espaços aéreos no pulmão de camundongos tratados com elastase quando comparados com camundongos controle.

Estudos recentes têm mostrado um remodelamento significativo na matriz extracelular, incluindo colágeno, elastina e proteoglicanos, durante o desenvolvimento de enfisema em seres humanos (Vlahovic et al., 1999) e em modelos experimentais de enfisema em roedores (Kononov et al., 2001).

Vlahovic et al (1999), estudando septos alveolares de tecido pulmonar de seres humanos com enfisema pulmonar, observaram um aumento tanto de fibras elásticas quanto colágenas. Rubio et al (2004) observaram que após a administração traqueal de elastase em ratos houve um aumento de colágeno no 8º dia. Kononov et al (2001) estudaram amostras de pulmão de ratos que receberam instilação intratraqueal de elastase e observaram remodelamento tecidual significativo com espessamento das fibras de colágeno e elastina, após quatro semanas da instilação. Em nosso estudo, após 28 dias da instilação da papaína observamos um aumento significativo na proporção de fibras de colágeno no parênquima pulmonar dos animais. No entanto, não observamos diferença na proporção de fibras de elastina nos dois grupos estudados.

O grau de remodelamento apresentado pelo parênquima pulmonar após a indução de enfisema com a utilização da papaína tem influência direta nas medidas de mecânica respiratória. Neste estudo, após 28 dias de instilação

conseguimos encontrar diferenças tanto com a utilização do modelo unicompartmental quanto com o modelo multicompartimental, o que não ocorreu no estudo de Fló et al (2006) onde a análise dos dados ocorreu somente 2 meses após a administração intratraqueal de papaína. Em trabalho recente de Lopes et al (2007) foi utilizada a mesma forma de administração intranasal de papaína, no entanto a coleta de dados de mecânica só foi feita também 2 meses após, não apresentando diferença em nenhum dos parâmetros de mecânica avaliados (R_{aw} , G_{tis} e H_{tis}). É importante, no entanto observar que o padrão do remodelamento apresentado pelo tecido é diferente do encontrado em nosso trabalho. No estudo de Lopes et al (2007) ocorreu um remodelamento tanto de fibras elásticas, quanto de fibras de colágeno, enquanto que em nosso estudo, após 28 dias encontramos somente remodelamento de fibras de colágeno. A sensibilidade deste método se encontra diretamente relacionada não somente ao grau de destruição do tecido pulmonar, representado pelo L_m , mas também ao aumento de deposição tanto de fibras elásticas quanto de fibras de colágeno, aumentando a rigidez deste tecido.

Análises exponenciais da curva P-V têm sido utilizadas para diagnosticar a gravidade do enfisema, tanto em pacientes quanto em modelos experimentais. A curva P-V do sistema respiratório é uma técnica utilizada com fins diagnósticos para descrever o comportamento mecânico dos pulmões e da caixa torácica durante a inspiração e expiração (Harris, 2005).

O deslocamento do sistema respiratório durante a ventilação necessita se opor a forças resistivas, a forças de inércia e a forças elásticas do referido sistema. Essas forças são exercidas sobre a parede torácica e sobre os pulmões (Vieira, 1999).

Em indivíduos normais, em posição supina, a curva pressão-volume mostra duas inflexões: uma inferior, devido à mecânica da parede torácica quando em baixos volumes pulmonares, e uma superior, devido à hiperdistensão pulmonar em volumes próximos da capacidade pulmonar total (Servillo et al., 1997).

As doenças alveolares ou parenquimatosas pulmonares causam essencialmente alterações do componente elástico do sistema respiratório, razão pela qual as curvas pressão-volume são normalmente realizadas em condições estáticas (Vieira, 1999).

Colebatch et al (1979) sugerem que a intensidade do enfisema pode ser estimada através da medida da constante exponencial K presente na equação de Salazar e Knowles (1964). Eles mostraram que o K estava elevado em pacientes que foram classificados como tendo enfisema através de parâmetros clínicos e radiológicos. Greaves e Colebatch (1980) estudaram pulmões humanos normais e enfisematosos. Eles observaram que quando o enfisema estava presente, K estava aumentado em relação à média de valores predeterminados para a idade. Eles encontraram uma

correlação direta entre k e o diâmetro alveolar médio. Nós obtivemos resultados similares: camundongos tratados com papaína apresentaram um aumento no diâmetro alveolar médio e um aumento na constante exponencial K quando comparados com camundongos tratados com salina.

A mecânica do parênquima pulmonar permite o estudo de fatias deste tecido para avaliação da mecânica periférica do pulmão e seu comportamento farmacológico em resposta a agonistas e antagonistas contráteis (Salerno et al., 1995). Esta técnica têm sido utilizada como ferramenta para estudo do parênquima em modelos animais de asma, nesses estudos observa-se um aumento de Resistência e Elastância (Lanças et al, 2006). No entanto, poucos trabalhos têm estudado as propriedades de fatias do parênquima em camundongos. Por estarmos estudando um modelo de uma doença, no qual instilamos uma protease que irá agir diretamente causando lesão do tecido, imaginamos que o estudo de fatias do parênquima seria uma medida bastante viável para a avaliação das diferenças entre os animais que receberam tratamentos diferentes.

Faffe et al (2002) desenvolveram um estudo para comparação das propriedades mecânicas do tecido pulmonar de ratos e camundongos. As fatias do parênquima foram pré-condicionadas durante 30 minutos, com uma frequência de 1 Hz. Após este período, as fatias pulmonares foram osciladas em frequências de 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 e 3 Hz. Nas duas espécies, R teve uma

dependência negativa e E teve uma dependência positiva em relação à frequência.

Em nosso equipamento, utilizando uma única frequência de oscilação (2 Hz), não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina e papaína quando avaliamos a R e E nas fatias do parênquima pulmonar. Provavelmente não encontramos diferenças em nossos grupos por que em nossa metodologia analisamos apenas uma fatia de pulmão, visto que na lesão obtida com o modelo utilizado neste estudo, se trata de uma lesão que se distribui de forma heterogênea. Talvez o estudo em mais de uma fatia por animal se fizesse necessário. No entanto os pulmões de camundongos têm um tamanho muito reduzido, o que representa dificuldade em estudar muitas fatias em um único animal.

Tendo em vista que a definição de enfisema está fortemente correlacionada às medidas de função pulmonar, se torna indispensável fazer estas medidas em modelos experimentais (Mitzner, 2007). No entanto, o método considerado padrão ouro para definir se houve ou não o desenvolvimento da doença é o estudo morfométrico do tecido. Com base nos dados apresentados neste estudo, as medidas de função pulmonar, com exceção da técnica de medidas de mecânica em fatias do parênquima pulmonar, se mostraram adequadas, correlacionando-se de forma direta com as análises histológicas do tecido e apesar do tamanho reduzido dos animais, tais

técnicas foram facilmente aplicadas, não recorrendo em perdas significativas de animais durante todo o estudo.

Conclusões

Neste estudo, concluímos que:

- Medidas de mecânica pulmonar em camundongos enfisematosos, através de mecânica clássica, de mecânicas oscilatórias e de curva pressão-volume, foram capazes de detectar alterações fisiológicas, posteriormente confirmadas pela morfometria.
- A mecânica do parênquima utilizando apenas uma fatia de pulmão não conseguiu detectar essas alterações.

Referências

Albrecht C, Adolf B, Weishaupt C, Hohr D, Zeittrager I, Friemann J, Borm PJ. Clara-cell hyperplasia after quartz and coal-dust instillation in rat lung. *Inhal Toxicol* 2001; 13:191-205.

Azoulay-Dupuis E, Torres M, Soler P, Moreau J: Pulmonary NO₂ toxicity in neonate and adult guinea pigs and rats. *Environ Res* 1983; 30: 322-39.

Barth PJ, Muller B. Effects of nitrogen dioxide exposure on Clara cell proliferation and morphology. *Pathol Res Pract* 1999; 195:487-93.

Bates SHT, Irvin CG. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainly principle. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1297-1306.

Béla S, Bates JHT. Extracellular matrix mechanis in lung parenchymal diseases. *Resip Physiolo Neurobiol* 2008; doi:10.1016/j.resp.2008.03.015.

Brewer KK, Sakai Hiroaki, Alencar AM, Majundar A, Arold SP, Lutchen KR, Ingenito EP, Subi B. Lung and alveolar wall elastic and hysteric behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1926-36.

Brusselle GG, Bracke KR, Maes T, D'hulst AI, Moerloose KB, Joos GF, Pauwels RA. Murine models of COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2006; 19: 155-165.

Buduhan G, Tan L, Kasian K, Mink SN. Volume reduction surgery impairs immediate postoperative pulmonary function in canine emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec 15;174(12):1310-8. Epub 2006 Oct 5.

Celli BR, Halbert RJ, Iqbal A, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. *Eur Resp J* 2003; 22: 268-73.

Chong BTY, Agrawal DK, Romero FA and Townley RG. Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmography: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998; 39: 163-168.

Chun S, Daheshia M, Lee S, Eo SK and Touse BT. Distribution fate and mechanism of immune modulation following mucosal delivery of plasmid DNA encoding IL-10. *J Immunol* 1999; 163: 2393-2402.

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54 (9): 825-57.

Churg A, Zay K, Li K. Mechanisms of mineral dust-induced emphysema. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 5:1215-18.

Colebatch HJ, Finucane KE, Smith MM. Pulmonary conductance and elastic recoil relationships in asthma and emphysema. *J Appl Physiol* 1973;34(2):143-53.

Colebatch HJ, Ng CK, Nikov N. Use of an exponential function for elastic recoil. *J Appl Physiol* Feb;46(2):387-93,1979.

Cosio M, Ghezzi H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, Macklem PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med* 1978; 298(23): 1277-81.

Dawkins PA , Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001; 56:972-7.

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.

Dolhnikoff M, Mauad T and Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1750-1757.

Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 2002; 15:213-20.

Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W. Oxidative stress

and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1369-82.

Eidelman DH, Ghezzi H, Bates JHI. Exponential fitting of pressure-volume curves: confidence limits and sensitivity to noise. *J Appl Physiol*, 1990; v.69, n.4 1538-1541.

Eyles JE, Williamson ED and Alpar HO. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume. *Int J Pharmaceut* 2000; 189:75-79.

Faffe DS, Rocco PR, Negri EM, Zin WA. Comparison of rat and mouse pulmonary tissue mechanical properties and histology. *J Appl Physiol* 2002; 92: 230-234.

Fan T, Yang M, Halayko A, Mohapatra SS and Stephens NL. Airway responsiveness in two inbred strains of mouse disparate in IgE and IL-4 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:156-163.

Fredberg JJ, Bunk JD, Ingenito E and Shore SA. Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma. *J Appl Physiol* 1993; 74:1387- 1397.

Fló C, Lopes FDTQS, Kasahara DI, Silva ACD, Jesus RCC, Rivero DHRF, Saldiva PHN, Martins MA and Jacob-Filho W. Effects of exercise training on

papain-induced pulmonary emphysema in Wistar Rats. *J Appl Physiol* 2006; 100:281-285.

Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol* 2002; 28(1):1-7.

Fust A, Bates JHT, Ludwig MS. Mechanical properties of mouse distal lung: in vivo versus in vitro comparison. *Res Physiol & Neurobiol* 2004; 143: 77-86.

Gibson GJ, Pride NB, Davis J, Schroter RC. Exponential description of the static pressure-volume curve of normal and diseased lungs. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120(4): 799-811.

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

Goldie RG, Bertram JF, Papadimitriou JM and Paterson JW. 1984. Current techniques: the lung parenchyma strip. *Trends Pharmacol Sci* 5: 7-9.

Greaves IA and Colebatch HJ. Elastic behavior and structure of normal and emphysematous lungs post mortem. *Am Rev Respir Dis* 121 (1): 127-136.

Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary diseases. *Respiratory Research* 2004; 5:18.

Haddad EB, Liu SF, Salmon M, Robichaud A, Barnes PJ, Chung KF. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in Brown Norway rats exposed to ozone: effect of dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 1995; 293:287-90.

Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* 1992; v.72, n.1, 168-178.

Harris RS, Hess DR, Venegas JG. An objective analysis of the pressure-volume curve in the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respir and Critical Care Med* 2000; v.161, n.2 432-439.

Harris RS. Pressure- Volume Curves of the Respiratory System. *Respir Care* 2005; 50(1): 78-98.

Hirai T, McKeown KA, Gomes RF and Bates JH. Effects of lung volume on lung and chest wall mechanics in rats. *J Appl Physiol* 1999; 86:16-21.

Hodgkin J, Petty T. Chronic obstructive pulmonary disease current concepts. *Philadelphia: W.B. Saunders Company* 1987.

Holroyd KL, Eleff SM, Zhang LY, Jakab GJ, Kleeberger SR. Genetic modeling of susceptibility to nitrogen dioxide-induced lung injury in mice. *Am J Physiol* 1997, 273:L595-602.

Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science* 1981; 212:925-7.

Ito S, Ingenito EP, Brewe KK, Black LD, Parameswaran H, Lutchen KR and Suki B. Mechanics, nonlinearity and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. *J Appl Physiol* 2005; 98:503-511.

Johanson Jr WG, Pierce AK. Effects of elastase, collagenase, and papain on structure and function of rat lungs in vitro. *J Clin Invest* 1972; 51: 288-93.

Kononov S, Brewer K, Sakai H, Cavalcante FSA, Sabayanagam C, Ingenito EP and Suki B. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1976; 164:1920-1926.

Karlinsky JB, Snider GL. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:1109-13.

Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7:1-32.

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lotvall J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 374-82.

Kodavanti UP, Jackson MC, Ledbetter AD, Starcher BC, Evansky PA, Harewood A, Winseta DW, Costa DL. The combination of elastase and sulfur dioxide exposure causes COPD-like lesions in the rat. *Chest* 2000; 117: 299S-302S.

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

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.

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.

Lauzon AM and Bates HT. Estimation of time-varying respiratory mechanical parameters by recursive least squares. *J Appl Physiol* 1991; 71:1159-1165.

Ludwig MS, Robatto FM, Simard S, Stamenovic D and Fredberg JJ. Lung tissue resistance during contractile stimulation: structural damping decomposition. *J Appl Physiol* 1992; 72: 1332-1337.

Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002; 57:908-914.]

Maitra A, Kumar V. The lung and the upper respiratory tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. 7th ed. Philadelphia Saunders- Elsevier Science; 2002

Mannino DA. COPD: Epidemiology, Prevalence, Morbidity, Mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 2002;121;121-6.

Martin TR, Gerard NP, Galli SJ and Drazen JM Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J Appl Physiol* 1988; 64: 2318-2323.

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.

Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nat Med* 1997, 3:675-677

Menezes AMB, Jardim JR, Prez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO study in São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 2005; 21(5):1565-73.

Mitzner W. Counterpoint: Lung Impedance Measurements are not more useful than simpler measurements of lung function in animal models of pulmonary diseases. *J Appl Physiol* 2007; 103(5): 1901-3.

Moriya HT, Moraes JC, Bates JH. Nonlinear and frequency-dependent mechanical behavior of the mouse respiratory system. *Ann Biomed Eng.* 2003 Mar;31(3):318-26.

Mudway IS, Kelly FJ. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Mol Aspects Med* 2000; 21:1-48.

Oostveen E and Zwart A. Effects of pentobarbital and halothane anaesthesia on the respiratory transfer impedance of rats. *Eur Respir Rev* 1994; 4: 172-177.

Pare PD, Brooks LA, Bates J, Lawson LM, Nelems JMB, Wright JL, Hogg JC. Exponential analysis of the lung pressure-volume curve as a predictor of pulmonary emphysema. *American Review of Respiratory Diseases*, 1982; v.126, 54-61.

Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:S31-7.

Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Gold Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary . *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-1276.

Penman RW, O'Neill RP, Begley L. The progress of chronic airway obstruction in relation to measurements of airway resistance and lung elastic recoil. *Am Rev Respir Dis* 1970; 101(4): 536-44.

Peslin R and Fredberg JJ. Oscillation mechanics of the respiratory system. In: Handbook of Physiology. The Respiratory System. Bethesda, MD: *Am. Physiol. Soc* 1986; vol III, pt.1, chapt.11, p.145-178.

Petak F, Habre W, Donati YR, Hantos Z. and Barazzzone-Argiroffo C. Hyperoxia-induced changes in mouse lung mechanics: forced oscillations vs. barometric pletysmography. *J Appl Physiol* 2001; 90: 2221-2230.

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

Rennard S. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:S12-S16.

Rocco PRM, Negri EM, Kurtz PM, Vasconcellos FP, Silva GH, Capelozzi VL, Romero PV and Zin WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1067-1071.

Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba German, Gonzáles-Mangado N. Oral N-Acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004; 125: 1500-6.

Russi EW, Bloch KE and Weder W. Functional and morphological heterogeneity of emphysema and its implication for selection of patients for lung volume reduction surgery. *Eur Respir J* 1999; 14:230-236.

Salazar E, Knowles JH. An analysis of pressure-volume characteristics of the lung. *J Appl Physiol* 1964 ; 19 :97-104.

Salerno FG, Dallaire M, Ludwig MS. Does the anatomic makeup of parenchymal lung strips affect oscillatory mechanics during induced constriction? *J Appl Physiol* 1995 ; 79, 66-72.

Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin- derived peptides. *J Clin Invest* 1980; 66:859-62.

Servillo G, Svantesson C, Beydon L, Roupie E, Brochard L, Lemaire F, Jonson B. Pressure-volume curves in Acute Respiratory Failure. Automated low flow inflation versus occlusion. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155:1629-1636.

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

Shore S, Kobzik L, Long NC, Skornik W, Van Staden CJ, Boulet L, Rodger IW, Pon DJ. Increased airway responsiveness to inhaled methacholine in a rat model of chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1931-38.

Similowski T and Bates JHT. Two-compartment modelling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? *Eur Respir J* 1991; 4: 353-358.

Slauson DO, Hahn EF. Criteria for development of animal models of diseases of respiratory system: The comparative approach in respiratory disease model development. *Am J Pathol* 1980; 101 (3suppl):S103-22.

Sneider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bengali Z. The definition of emphysema: Report of a national heart, lung and blood institute. Division of lung diseases, workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:182-185.

Sneider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133(1):149-69.

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.

Southam DS, Dolovich PM, O' Byrne and Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282:833-839.

Springer J, Geppeti P, Fischer A, Groneberg DA. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16(3): 121-30.

Sun J, Chung KF. Airway inflammation despite loss of bronchial hyper-responsiveness after multiple ozone exposures. *Respir Med* 1997; 91:47-55.

Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlen SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* 2001; 17:733-46.

Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, and Muranka M. Diesel exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 639-45

Takubo, Y., Guerassimov, A., Ghezzi, H., Triantafillopoulos, A., Bates, J.H., Hoidal, J.R., Cosio, M.G., 2002. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *Am J Respir Crit Care Med*. Dec 15;166(12 Pt 1):1596-603.

Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, and Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (Th2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med* 1997; 185: 1671-9.

Tu YP, Larsen GL and Irvin CG. Utility of murine systems to study asthma pathogenesis. *Eur Respir Rev* 1995; 29:224-230.

Vieira SRR. Curvas de complacência ou curvas pressão-volume na insuficiência respiratória aguda. *J Pneumol* 25 (6)-nov-dez de 1999.

Vlahovic G, Russel ML, Mercer RR and Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:2086-2092.

Watson PB, Town GI, Holbrook N, Dwan C, Toop L.J, Drennan CJ. Evaluation of a self-management plan for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Resp J* 1997; 10(6): 1267-1271.

Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY. Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:320-6.

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.

Wright JL. The importance of ultramicroscopic emphysema in cigarette smoke-induced lung disease. *Lung* 2001; 179:71–81.

Zhang Y, Lamm WJE, Albert RK, Chi EY, Henderson, W.R. and Lewis, D.B. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 661-669.

Zwart A and Hessel E M. Oscillatory mechanics of the mouse respiratory system. *Eur Respir Rev* 1994; 4: 182-186.