FRANCINE MARIA DE ALMEIDA

**Estudo do crescimento pulmonar compensatório
após bilobectomia em ratos com enfisema
induzido por elastase**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador Dr. Rogerio Pazetti

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Francine Maria de

Estudo do crescimento pulmonar compensatório após bilobectomia em ratos com enfisema induzido por elastase / Francine Maria de Almeida. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Rogerio Pazetti.

Descritores: 1.Enfisema pulmonar 2.Elastase pancreática 3.Bilobectomia pulmonar 4.Pulmão/cirurgia 5.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-375/12

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Waldemar Quirino de Almeida e Maria Sonia Silva de Almeida por todo incentivo, confiança e amor que transmitem todos os dias da minha vida.

Aos meus irmãos, Joyce Carolina de Almeida e Julius Alberto Quirino de Almeida pelo carinho e apoio constante.

Aos meus avós, Waldemir Silva Santos e Umbelina Soares Santos por toda demonstração de garra e amor ao longo da vida.

E aos meus grandes e inesquecíveis amigos....

Agradecimentos

A Deus, que nos momentos de desespero sempre me conforta e me indica um novo caminho.

Ao meu pai Waldemar que sempre acreditou no meu potencial e nunca deixou que faltasse nada de essencial para a conquista de meus sonhos.

A minha mãe Sonia grande incentivadora dos meus sonhos e pessoa mais importante da minha vida.

Aos meus irmãos Joyce e Julius que não perdem a oportunidade de me encher o saco todos os dias, obrigada por todos os momentos de descontração, amo vocês malas!!!

A todos os meus tios e primos que sempre estiveram presentes em todos os momentos felizes e tristes da minha vida.

A todos os meus amigos de infância, pelo companheirismo e por me proporcionar uma infância tranquila, saudável e cheia de recordações inesquecíveis.

Aos amigos irmãos que fiz ao longo da vida... Roberta Leonardi, Mario Augusto, José Luiz, Maria José, Jade Galdino, Adriana Pires, Beatriz Romanholo, Sirlene Traves, Elisangela Pessotti, Dilma Duarte, Jane Pereira, Paulo Castro, Sergio Dalonso, Marcelo Barduco, Jussara Tavares, Ana Lúcia Torres... sem o apoio de vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos grandes companheiros de pós-graduação que sempre estiveram ao meu lado para apoiar, incentivar e ouvir todas as minhas lamentações, que não foram poucas, nestes 3 longos anos do mestrado... Finalmente o meu dia chegou galera!!! Muuuito obrigada: Ronaldo Silva, Petra Mello, Alessandra Choqueta, Renato Mosquela, Clarice Olivo, Marcia Mabel, Felipe Mendes, Nathaila Gobatto, Claudia Pontes, Nathalia Pinheiro, Fernanda Roncon, Cinthia Gonçalves, Sônia Soto, Andrezza França, Rafael Reis, Fernando Annes, Jôse Mara Brito, Kelly Yoshio, Igor Polonio, Maristela Prado, Marcus Abreu, Marcia Zotti, Thiago Silva, Fabio Gava, Rosana Bonzato, Luciana Aristóteles, Flavia Ribas, Viviane Barnabé, Gustavo Buzon, Angelica

Ferreira, Ana Laura Nicoletti, Luciana Duzolina, Luciano Belloti, e Mac Guyver Castro.

Às alunas de IC mais lindas, prestativas e "malas" da FMUSP: Ligia Fornaziero, Larissa Benittes, Isabella Campaner, Juliana Dias, Luana Neves e ao inesquecível Luis Felix.

Aos amigos funcionários da FMUSP, HC e INCOR que estão sempre prontos a me ajudar no que for necessário e independente de qualquer hierarquia: Edna Leick, Fernanda Lopes, Rosana Paz, Davi Francisco, Elaine Manoel, Rosimeire Polidoro, Dalva Santana, Marcia Bento, Luis Afonso, Luis Pereira, Tania Souza, Ludovina Barros, Sandra Fernezlian, Maria Cristina, Angela Santos e Nilsa Damaceno, Heloisa Bueno, Rosa Pozo, Debora Lobo, Eliane Tigre, Marcia Hage, Nildo Santos, Reginaldo Silva, Ana Luiza, Inês Anselmo, Elisabeth, Anásia, Carmem, Célia, Ivandir, Carlos, Gilberto, Denise Otsuki, Maria Luisa...

Às queridas Petra Mello e Fernanda Arantes por me socorrer nos momentos finais antes da entrega dos volumes na qualificação e defesa, sem vocês não haveriam figuras, rrsrsss...

Aos orientadores Prof. Milton de Arruda Martins, Profa. Thais Mauad, Profa. Marisa Dolhnikoff, Prof. Rogério Souza, Profa. Iolanda Calvo, Prof. Celso Carvalho, Profa. Carla Prado, Prof. Paulo Cardoso, Prof. Henrique Moriya, ... por toda a confiança na seriedade do meu trabalho durante estes anos.

Ao meu orientador 2 "Golden boy" Dr. Rodolfo de Paula Vieira por todo incentivo e por me fazer acreditar que as coisas são possíveis com trabalho duro, honesto e feito com amor. Valeu ser iluminado!!!

E ao meu querido orientador Dr. Rogerio Pazetti, um dos meus exemplos de luta e perseverança na pesquisa. Obrigado por acreditar no meu potencial, e por sempre me encorajar ao dizer que sou capaz, sem falar na sua companhia, que fez com que o trabalho ficasse muito mais prazeroso. Muuuuito obrigada por suportar o meu mau humor todos os dias, te adoro Blue!

A CAPES pelo apoio financeiro.

Epígrafe

Sonhos

Sem sonhos, a vida não tem brilho.

Sem metas, os sonhos não têm alicerces.

Sem prioridades os sonhos não se tornam reais

Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e ...

Corra riscos para executar seus sonhos.

Melhor é errar por tentar do que errar por omitir.

"Augusto Cury"

Normalização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses, e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Bibliotec e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1.	Introdução.....	1
1.1.	Doença pulmonar obstrutiva crônica – DPOC	2
1.1.2.	Enfisema pulmonar.....	4
1.1.3.	Modelos de enfisema pulmonar.....	6
1.2.	Cirurgia redutora de volume pulmonar (CRVP).....	8
1.2.1.	Crescimento compensatório.....	10
1.2.2.	Modelos experimentais de lobectomia (LBX).....	12
2.	Objetivos	16
3.	Material e métodos.....	17
3.1.	Animais.....	18
3.2.	Desenho experimental.....	18
3.3.	Indução do enfisema pulmonar.....	19
3.4.	Procedimento cirúrgico.....	20
3.5.	Avaliação da mecânica pulmonar.....	21
3.6.	Gasometria arterial.....	21
3.7.	Eutanásia.....	22

3.8. Índice de hipertensão pulmonar.....	22
3.9. Peso e volume pulmonar.....	22
3.10. Coleta e análise do LBA.....	22
3.11. Histologia.....	23
3.12. Análise de imagem.....	25
3.13. Western blotting.....	26
3.14. Análise estatística.....	26
4. Resultados.....	27
4.1. Número de animais.....	28
4.2. Peso.....	28
4.3. Resistência e elastância do sistema respiratório.....	29
4.4. Gasometria arterial.....	31
4.5. Medida das câmaras cardíacas.....	32
4.6. Peso e volume pulmonar.....	33
4.7. Lavado broncoalveolar (LBA).....	35
4.8. Morfometria e análise de imagem.....	37
4.8.1. Lm.....	37
4.8.2. Fibras elásticas.....	38
4.8.3. Fibras colágenas.....	39
4.8.4. Índice de edema.....	41
4.8.5. Número de células mononucleares (MN).....	41

4.8.6. Número de células polimorfonucleares (PMN).....	41
4.8.7. Densidade de superfície alveolar (Sv).....	43
4.8.8. Volume total da região respiratória (TVvr).....	43
4.8.9. Volume total do espaço aéreo respiratório (TVra).....	43
4.8.10. Volume de tecido respiratório (TVrt).....	43
4.9. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	45
5. Discussão.....	46
6. Conclusões.....	56
7. Referências.....	58

Lista de abreviaturas

ATT	Alfa 1 antitripsina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
CAPPesq	Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
cmH ₂ O	Centímetros de água
CPC	Crescimento pulmonar compensatório
CRVP	Cirurgia redutora de volume pulmonar
CV	Capacidade vital
d	Comprimento da linha do retículo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Ep	Edema perivascular
ES	Grupo com instilação de elastase pancreática suína e bilobectomia <i>sham</i>
Esr	Elastância do sistema respiratório
EX	Grupo com instilação de elastase pancreática suína e bilobectomia
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Gramas
GLUT1	Transporte de glicose tipo 1
Hct _c	Concentração de hematócrito
HE	Coloração de hematoxilina e eosina
HNE	Elastase neutrofílica humana
Hz	Hertz
Is	Número de linhas que interceptam o espaço aéreo
kg	Kilograma
Lac	Lactato
LBA	Lavado broncoalveolar
LBX	Lobectomia

LBX2	Ressecção dos lobos direito superior e médio
LBX3	Ressecção dos lobos direito superior, médio e inferior
LIMs	Labaratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
Lm	Intercepto linear médio
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MMP12	Metaloproteinase de matriz 12
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MN	Células mononucleares
NETT	Grupo de pesquisa e tratamento de enfisema nacional
OMS	Organização Mundial de Saúde
paCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
paO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PBS	Solução tampão fosfato
PEEP	Pressão positiva expiratória final
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Células polimorfonucleares
PNX	Pneumonectomia
Po	Valor da pressão positiva expiratória final
Pp	Número total de pontos no parênquima
PPE	Elastase pancreática suína
Pr	Pontos no espaço aéreo intra-acinar e seus tecidos associados
Pra	Pontos que sobrepõem o espaço aéreo respiratório
Prt	Pontos que caem no tecido respiratório
Ptr(t)	Pressão traqueal em função do tempo
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
Rsr	Resistência do sistema respiratório
sO ₂	Saturação de oxigênio
SS	Grupo com instilação de solução salina e bilobectomy sham
SUS	Sistema Único de Saúde

Sv	Densidade de superfície alveolar
SX	Grupo com instilação de solução salina e bilobectomia
T 0	Procedimento cirúrgico (bilobectomia)
T -6	Administração de salina ou elastase
T16	Dezesseis semanas após lobectomia
T2	Duas semanas após bilobectomia
T4	Quatro semanas após bilobectomia
TBS tween	Salina tamponada com tris
TGFβ1	Fator de crescimento tumoral beta 1
TNFκβ	Fator de transcrição nuclear kappa beta
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TVra	Volume total de espaço aéreo respiratório
TVvr	Volume total da região respiratória
UI	Unidades Internacionais
V(t)	Volume em função do tempo
V'(t)	Fluxo em função do tempo
VD	Ventrículo direito
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VI	Volume total do pulmão
VO _{2max}	Volume máximo de oxigênio
Vra	Densidade de volume do espaço aéreo respiratório
Vrt	Densidade de volume de tecido respiratório
Vvr	Densidade de volume da região respiratória
x10 ⁴	10.000
μL	Microlitros
μm ²	Micrômetros quadrados

Lista de Figuras

Figura 01.	Desenho Experimental	18
Figura 02.	Foto do ventilador flexiVent®	19
Figura 03.	A. Anatomia do pulmão de rato B. Fotografia da ressecção do lobo médio	22
Figura 04.	Fotomicrografia do tecido pulmonar observado através de ocular equipada com retículo de retas e pontos.....	23
Figura 05.	Resistência do sistema respiratório	29
Figura 06.	Elastância do sistema respiratório	30
Figura 07.	Índice de hipertensão	32
Figura 08.	Peso do pulmão	33
Figura 09.	Volume do lobo direito inferior	34
Figura 10.	Intercepto linear médio	37
Figura 11.	Porcentagem de fibras elásticas	38
Figura 12.	Porcentagem de fibras colágenas	39
Figura 13.	Foto das fibras elásticas e de colágeno com 2 semanas.....	40
Figura 14.	Fator de crescimento endotelial vascular.....	45

Lista de tabelas

Tabela 1.	Peso corporal médio em gramas no momento do sacrifício.....	28
Tabela 2.	Gasometria arterial.....	31
Tabela 3.	Total de células, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células epiteliais.....	36
Tabela 4.	Índice de edema, número de mononucleares e número de polimorfonucleares.....	42
Tabela 5	Densidade de superfície alveolar, Volume total da região respiratória, Volume total do espaço aéreo respiratório e Volume de tecido respiratório.....	44

Resumo

O enfisema pulmonar é um dos maiores problemas de saúde pública atualmente. É caracterizado pela destruição permanente das paredes alveolares levando ao alargamento do espaço aéreo, à perda de retração elástica, à diminuição da superfície de troca gasosa, à hiperexpansão pulmonar e ao aumento do trabalho respiratório. Diferentes abordagens cirúrgicas são realizadas em pacientes enfisematosos, sendo a cirurgia redutora de volume pulmonar (CRVP) uma das mais utilizadas, devido à melhora imediata da qualidade de vida dos pacientes. Várias hipóteses são consideradas para explicar essa melhora, como o aumento do fluxo expiratório máximo, o aumento da elasticidade pulmonar, o aumento da capacidade vital e o crescimento pulmonar compensatório (CPC), sendo esta última uma das mais estudadas. Em modelos animais, a lobectomia (LBX) é utilizada para mimetizar a CRVP, pois o pulmão remanescente sofre rápido CPC, com restabelecimento de peso, volume, quantidade de DNA e níveis de proteínas do pulmão após 3 semanas. Este estudo teve o objetivo de investigar as mudanças estruturais e funcionais que ocorrem no pulmão após a LBX através de parâmetros morfométricos. Para tanto, utilizamos um modelo animal de enfisema pulmonar induzido pela instilação intratraqueal de elastase pancreática suína. Os efeitos do CPC foram avaliados 2 (T2), 4 (T4) e 16 (T16) semanas após a bilobectomia (ressecção dos lobos médio e cardíaco do pulmão direito). Os animais enfisematosos submetidos à LBX apresentaram: diminuição do intercepto linear médio (T2 e T16); aumento da proporção de fibras elásticas (T2 e T16); melhora da elastância pulmonar (T4 e T16); e CPC devido ao aumento de peso e volume pulmonar (T2 e T4) e aumento do volume total da região respiratória (T4 e T16) e do tecido respiratório (T2, T4 e T16). Concluímos que a bilobectomia promoveu o CPC nos animais enfisematosos com a reestruturação da arquitetura alveolar e melhora da função respiratória.

Descritores: enfisema pulmonar, elastase pancreática, bilobectomia pulmonar, pulmão/cirurgia, ratos Wistar.

Summary

Currently, the pulmonary emphysema is a major public health issues. It is characterized by permanent destruction of alveolar walls leading to airspace enlargement, elastic retraction loss, gas exchange surface reduction, lung overexpansion and increased breathing effort. Different surgical approaches are performed in patients with emphysema. Lung volume reduction surgery (LVRS) is one of the most widely used, due to immediate improvement in life quality of these patients. Several hypotheses are considered to explain this improvement, such as increasing the maximum expiratory flow, improved lung elasticity, increased vital capacity, and compensatory lung growth (CLG), which is one of the most studied. In animal models, lobectomy (LBX) is used to mimic LVRS because the remaining lung undergoes rapid CLG, with restoration of weight, volume, amount of DNA and protein levels of the lung after three weeks. This study investigated the structural and functional changes that occur in the lungs after LBX by morphometric parameters. We used an animal model of pulmonary emphysema induced by intratracheal instillation of porcine pancreatic elastase. The CLG effects were evaluated 2 (T2), 4 (T4) and 16 (T16) weeks after bilobectomy (resection of the middle and cardiac lobes of the right lung). After lobectomy, the emphysematous animals presented: mean linear intercept decrease (T2 and T16); increased proportion of elastic fibers (T2 and T16); lung elastance improvement (T4 and T16); and CLG due to the increase of both weight and volume of the lung (T2 and T4), beside the increase of total volume of respiratory region (T4 and T16) and respiratory tissue (T2, T4 and T16). We conclude that bilobectomy promoted the CLG in emphysematous animals by the restructuring of alveolar architecture and respiratory function improvement.

Descriptors: pulmonary emphysema, pancreatic elastase, pulmonary bilobectomy, lung/surgery, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem no mundo cerca de 300 milhões de asmáticos, 210 milhões de pessoas acometidas por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e 100 milhões que sofrem de distúrbio respiratório do sono (GOLD, 2008). Cerca de 12% de todas as autorizações de internação hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS) acontecem por diagnósticos de asma, pneumonia e DPOC, representando gastos para o governo superiores a 600 milhões de reais por ano.

1.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC

No Brasil, estima-se que cerca de cinco milhões de pessoas tenham DPOC. Nos últimos dois anos foram mais de 235 mil internações, que custaram cerca de 170 milhões de reais ao governo federal. O número de mortes aumentou 12% nos últimos cinco anos, passando de 33.616 em 2005 para 37.592 em 2010. Agora, os pacientes que sofrem com a DPOC na rede pública passarão a ter acesso a medicamentos para tratar os sintomas da patologia. O Ministério da Saúde vai incorporar ao Sistema Único de Saúde (SUS) os medicamentos budesonida, beclometasona (corticóides inalatórios), fenoterol, sabutamol, formoterol e salmeterol (broncodilatadores). Atualmente, esses remédios já estão disponíveis no SUS para outras finalidades, como tratamento da asma, mas agora eles poderão ser indicados também para a DPOC (Portal da Saúde).

A DPOC é uma doença que pode ser previsível e tratada, caracterizada pela obstrução do fluxo aéreo, que é usualmente progressiva e associada com o aumento da resposta inflamatória crônica, nas vias aéreas, a partículas nocivas ou gases. A limitação crônica ao fluxo de vias aéreas é causada pela doença das pequenas vias aéreas (bronquite) e destruição do parênquima (enfisema), sendo que a contribuição relativa dessas duas alterações varia de pessoa para pessoa. A inflamação crônica causa mudança estrutural e estreitamento das pequenas vias aéreas. A destruição do parênquima pulmonar, também por processo inflamatório, leva à perda alveolar e diminuição da elasticidade pulmonar, por sua vez, estas alterações diminuem a

capacidade das vias aéreas de permanecerem abertas durante a expiração (GOLD, 2011).

O impacto da DPOC em um paciente não depende apenas do grau de limitação do fluxo aéreo, mas também da gravidade dos sintomas – especialmente, os respiratórios e a diminuição da capacidade de exercício. Existe uma relação imperfeita entre o grau de limitação do fluxo aéreo e a presença de sintomas. Os sintomas característicos da DPOC são dispneia crônica e progressiva, tosse e produção de escarro. A gravidade da DPOC é classificada em estágios de 0 a 4, tendo como base principal o parâmetro do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) (GOLD, 2011).

Estudos recentes têm mostrado claramente que a DPOC está associada não só com a resposta inflamatória anormal do parênquima pulmonar (GOLD, 2011), mas também com inflamação sistêmica, incluindo estresse oxidativo, ativação de células inflamatórias e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Agusti et al., 2003; Groneberg & Chung, 2004). Outros efeitos são: perda de peso, alterações nutricionais e disfunção muscular esquelética (Schols et al., 1998; Agusti et al., 2003). Estas manifestações sistêmicas ganharão mais importância sócio-econômica com o aumento crescente da DPOC nos próximos anos (Groneberg & Chung, 2004).

A maioria dos pacientes é diagnosticada com DPOC na quinta ou sexta década de vida, embora os doentes que apresentam deficiência de alfa 1-antitripsina (AAT) possam manifestar a doença mais precocemente (Tobin et al., 1983). As estimativas sugerem que 75 a 85% das pessoas com deficiência da AAT desenvolverão enfisema. Acredita-se que o tabagismo seja o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de enfisema entre pessoas que não são deficientes de AAT. Esta deficiência parece estar associada também com uma vida útil mais curta. Entre os fumantes, a redução leve e moderada nos níveis AAT pode estar associada ao declínio mais rápido da função pulmonar (Ranes & Stoller, 2005).

A fumaça de cigarro contém mais de 4000 compostos químicos, dos quais 200 são altamente tóxicos (Brunnemann & Hoffmann, 1991). O tabagismo é o fator de

risco mais importante para o desenvolvimento e progressão da DPOC, representando cerca de 80% dos casos (Hogg, 2004).

O desafio atual na investigação da DPOC é identificar o papel dos vários mediadores e mecanismos moleculares que podem estar envolvidos na sua fisiopatologia, objetivando a obtenção de novos tratamentos. Além disso, é de fundamental importância compreender melhor o efeito do tabagismo sobre o processo patogênico dessa doença (Groneberg & Chung, 2004).

1.1.2. Enfisema pulmonar

O enfisema é caracterizado pela destruição permanente das paredes alveolares levando ao alargamento dos espaços aéreos, perda elástica, diminuição da superfície de troca gasosa, hiper distensão pulmonar e aumento do trabalho respiratório (Snider et al., 1986; Barnes, 2000).

A patogênese do enfisema é explicada por três eventos interligados: 1) a exposição crônica à fumaça do cigarro pode levar ao recrutamento de células inflamatórias aos espaços aéreos terminais do pulmão; 2) estas células inflamatórias liberam proteínas elastolíticas que danificam a matriz extracelular do pulmão; e 3) a reparação ineficaz da elastina e talvez de outros componentes da matriz extracelular resultando em enfisema pulmonar (Shapiro, 2003).

Uma hipótese aceita é que a fumaça de cigarro induz o enfisema pelo desequilíbrio entre proteases e antiproteases. Esta hipótese foi desenvolvida a partir de duas observações principais: primeiro, Laurell e Eriksson (1963), relataram que os pacientes deficientes em alfa 1-antitripsina desenvolvem enfisema cedo; e segundo, Gross et al. (1965) descreveram a indução do enfisema em ratos através da instilação de uma protease, a papaína. Essas observações levaram à idéia de que o enfisema se desenvolve como resultado da fumaça de cigarro mediando o influxo de células inflamatórias no trato respiratório inferior, resultando na liberação de proteases que destroem a matriz parenquimatosa.

O fumo induz a enorme produção de espécies reativas de oxigênio, que são liberadas pela ativação das células inflamatórias, incluindo neutrófilos, eosinófilos,

macrófagos, ou células estruturais como as células epiteliais (Van Der Toorn et al., 2009). O estresse oxidativo induz uma resposta inflamatória nas vias aéreas terminais, causando metaplasia mucosa no epitélio, hipertrofia e proliferação no músculo liso, remodelamento da parede brônquica e fibrose, assim como espessamento da mucosa e hipersecreção de muco (Barnes et al., 2003). Além da inflamação, o estresse oxidativo causado pela inalação do fumo de cigarro, desempenha um papel significativo na geração do enfisema. A principal consequência do estresse oxidativo é a ativação do fator de transcrição nuclear kappa beta ($\text{TNF}\kappa\beta$), que ativa a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Rahman & Kilty, 2006; Yang et al., 2006).

Os neutrófilos desempenham papel importante na fisiopatologia da DPOC, liberando vários mediadores e enzimas que degradam os tecidos como a elastase, que podem orquestrar a destruição tecidual e a inflamação crônica (Stockley, 2002). Pacientes com alto grau de limitação de fluxo aéreo têm mais neutrófilos no escarro induzido do que indivíduos sem limitação ao fluxo aéreo. O aumento destas células está relacionado com a redução acelerada do VEF1 e esta neutrofilia no escarro também é mais prevalente nos indivíduos com tosse crônica (Stanescu et al., 1996).

O segundo tipo de célula envolvida no processo inflamatório são os macrófagos (Shapiro, 1999). Eles podem liberar várias substâncias que contribuem para destruição tecidual como as enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) (Churg et al., 2002). Neutrófilos e macrófagos estão aumentados no lavado broncoalveolar de tabagistas (Hunninghake & Crystal, 1983)

A mobilização de células inflamatórias para o pulmão leva à liberação de mediadores potencialmente destrutivos, incluindo proteases de tecido e citocinas, que contribuem diretamente para destruição e remodelamento tecidual. Esses mediadores incluem fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, que servem para atrair mais células inflamatórias. A resposta inflamatória serve como um gatilho para acionar células estruturais, incluindo células endoteliais vasculares e células epiteliais, para produzir níveis substanciais de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros mediadores (Sharafkhaneh et al., 2008).

O fator de crescimento tumoral beta 1 (TGF β 1) é uma citocina pró-angiogênica importante produzida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e outros tipos celulares (Seghezzi et al., 1998; Berse et al., 1999; Ferrara et al., 2003), que regula respostas imunes, proliferação e diferenciação celular, reparo tecidual e produção da matriz extracelular (Sporn & Roberts, 1989; Letterio & Roberts, 1998). Evidências de estudos animais sugerem que anormalidades na sinalização do TGF β 1 influenciam a patogênese da DPOC. Morris et al. (2003) demonstraram, em modelo animal, que o aumento do TGF β 1 no parênquima pulmonar pode proteger contra enfisema via inibição de metaloproteinase da matriz 12 (MMP-12). Estes resultados sugerem que a sinalização comprometida do TGF β 1 pode estar correlacionada com o desenvolvimento de enfisema.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator conhecido para a sobrevivência das células endoteliais, inicialmente caracterizado como um fator que aumenta a permeabilidade endotelial e induz o crescimento das células endoteliais (Senger et al., 1983 e Neufeld et al., 1999). Embora o VEGF seja muito abundante no pulmão, sua atividade biológica normal nesse órgão não é bem compreendida. Acredita-se que a sinalização do VEGF pode ser necessária para a manutenção das estruturas alveolares e ainda contribui para apoptose em pulmões de adultos (Kasahara et al., 2000).

1.1.3. Modelos de enfisema pulmonar

O enfisema pulmonar pode ser reproduzido de várias maneiras, como através da administração exógena de proteinases, de produtos químicos e da exposição à fumaça do cigarro, os quais induzem à destruição do parênquima pulmonar de forma similar ao que ocorre em humanos (Mahadeva & Shapiro, 2002).

A administração de oxidantes como dióxido de nitrogênio e ozônio, dois poluentes do ar, também causam injúria pulmonar. Repetitivas administrações de dióxido de nitrogênio resultam, em longo prazo, em enfisema leve local, enquanto o ozônio resulta em fibrose (Chitano et al., 1995). O pó de carvão e sílica também resultam em enfisema local. Em modelos animais a inflamação é complexa e a injúria oxidante com a ruptura do tecido conectivo é mediada por neutrófilos (Li et al.,

1996). A exposição a altos níveis de dióxido sulfúrico (200 a 700 ppm) por quatro a oito semanas leva a inflamação por neutrófilos, mudanças morfológicas, produção de muco e metaplasia de células mucosas e dano no epitélio ciliado (Kodavanti et al., 2000). O agente químico cloreto de cádmio já foi amplamente usado para gerar alargamento do espaço aéreo, no entanto o alargamento parece ser secundário à fibrose (Snider et al., 1986; Wright, 1995).

Existe uma variedade de máquinas construídas ou comerciais que têm sido utilizadas em modelos animais de fumo; alguns sistemas usam apenas exposição nasal, e outros a exposição de corpo inteiro. Há uma teoria negativa para a exposição de corpo inteiro, pois os animais podem ingerir substâncias com a nicotina e/ou alcatrão ao limpar sua pele (Wright et al., 2008). No entanto, Mauderly et al. (1989) mostraram que houve menos carboxihemoglobina e perda de peso nos animais expostos de corpo inteiro do que os que receberam somente exposição nasal. A hipótese convencional para o enfisema induzido pela fumaça de cigarro é que ele induz ao enorme influxo de células inflamatórias no pulmão, que resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases, degradação da matriz e morte das células estruturais (Antunes & Rocco, 2011).

Normalmente, são utilizados pequenos animais como modelo de DPOC com exposição ao cigarro: camundongos, ratos e cobaias. As cobaias oferecem inúmeras vantagens: enfisema facilmente reconhecido, maior marcação de remodelamento de vias aéreas, e desenvolvimento de metaplasia de células caliciformes nas vias aéreas. Os camundongos e ratos desenvolvem apenas uma mínima metaplasia de células caliciformes nas pequenas vias aéreas, embora os ratos demonstrem metaplasia nas grandes vias aéreas (Wright & Churg, 1990). Os camundongos oferecem a vantagem do baixo custo, ampla disponibilidade de genes, proteínas e anticorpos, e a disponibilidade de inúmeras linhagens com diferentes reações ao fumo e a capacidade de produzir animais geneticamente modificados para estudar específicos processos dentro da DPOC (Wright et al., 2008). A grande desvantagem do modelo de exposição à fumaça de cigarro é o tempo necessário (alguns meses) para que os animais desenvolvam o enfisema.

A instilação com papaína foi muito utilizada na década de 80 e 90, porém os estudos recentes têm utilizado elastase pancreática suína (PPE) ou elastase neutrofílica humana (HNE). A PPE oferece a vantagem de ser mais barata e fácil de obter. Uma única dose intrapulmonar de proteinases, como elastase pancreática suína, papaína e elastase neutrofílica humana, causa enfisema panacinar (Snider et al., 1986). A sua eficácia foi diretamente relacionada à sua atividade elastolítica. O enfisema mediado por elastase pancreática suína foi acompanhado por metaplasia das células secretoras e função pulmonar anormal, hipoxemia e hipertrofia ventricular direita que são características da forma humana de DPOC. Após administração intratraqueal de elastase, existe uma primeira perda de elastina e colágeno. Ao longo do tempo, a elastina e as glicosaminoglicanas voltam ao normal e o colágeno é reforçado, mas a matriz extracelular permanece reduzida e distorcida e a arquitetura do pulmão continua anormal (Kuhn et al., 1976).

Vários pesquisadores têm mostrado que uma única dose de elastase induz dano alveolar difuso e rápida destruição dos septos alveolares, resultando no alargamento do espaço aéreo (Shapiro, 2000; Mahadeva & Shapiro, 2002).

Uma grande variedade de animais já foi utilizada em modelos de enfisema com elastase. Trabalhos anteriores, bem como alguns mais recentes, realizados com hamsters, mostraram que estes animais desenvolvem a forma mais grave da doença. A razão dessa maior susceptibilidade dos hamsters são os baixos níveis da alfa1-antitripsina (Lieberman, 1976; Janoff, 1985; Borzone et al., 2007).

1.2. Cirurgia redutora de volume pulmonar (CRVP)

Pacientes com doença obstrutiva crônica grave e muito grave devem receber reabilitação pulmonar. Em pacientes com doença muito grave, o transplante pulmonar ou outro tratamento cirúrgico, como a CRVP, muitas vezes são indicados (Sussman, 2007).

Diferentes abordagens e técnicas cirúrgicas são realizadas em pacientes enfisematosos, a maioria dos autores recomenda a redução do volume pulmonar bilateral por cirurgia torácica vídeo-assistida. Esta opção tem sido utilizada como

alternativa terapêutica em pacientes que são candidatos ao transplante pulmonar, sendo que vários grupos já puderam demonstrar que o transplante pode ser adiado por 2 a 4 anos após CRVP bilateral. O processo em si não compromete as chances de sucesso subsequentes ao transplante (Petrov et al., 2006).

A CRVP é um procedimento paliativo para pacientes com enfisema grave cuja mecânica respiratória está severamente prejudicada devido à hiperinflação dos pulmões e do tórax. O objetivo da cirurgia é reduzir a hiperinflação por remoção das porções mais destruídas do pulmão, e assim, melhorar a mecânica respiratória, dispneia, tolerância ao exercício e qualidade de vida (Sanchez et al., 2010). O conceito de redução do volume de pulmão foi introduzido por Brantigan, Mueller e Kress em 1959. Seu procedimento resultou em alta mortalidade operatória, e apesar de muitos de seus pacientes relatarem melhora clínica, a falta de documentação objetiva conduziu ao ceticismo quanto ao valor do procedimento.

A CRVP tem sido cada vez mais utilizada como um tratamento paliativo para pacientes com enfisema grave (Cooper et al., 1996). Com um adequado critério de seleção dos pacientes, reduz a hiperinsuflação do pulmão, melhora a expirometria, a falta de ar, o desempenho ao exercício e a qualidade de vida (Fishman et al., 2003). A vasta quantidade de informações sobre a patogenia, expressão clínica, e tratamentos da DPOC emergiu ao longo das últimas duas décadas. A investigação e implementação da CRVP como modalidade terapêutica para os pacientes com enfisema grave contribuiu muito para esse acúmulo de informações. A CRVP facilitou o estudo intensivo para a caracterização radiológica de diferentes fenótipos da DPOC, e o exame patológico dos tecidos do pulmão ressecados durante a CRVP promoveu percepções sobre a patogênese e prognóstico da doença de vias aéreas (Criner et al., 2011).

O grupo pesquisa e tratamento de enfisema nacional (NETT) fez um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, em grande escala (N = 1218) para avaliar os efeitos da CRVP (NETT, 1999). Resultados globais do NETT, dois anos pós-randomização indicam que CRVP melhora a capacidade de exercício, mas não a sobrevida, em comparação com a terapia médica. Os doentes do grupo CRVP

também relataram melhora do estado de saúde e menos dispneia comparado com o grupo terapia. Um subgrupo das análises mostrou que os pacientes com enfisema predominante do lobo superior e com baixa capacidade de exercício obteve melhora na sobrevida após a CRVP, em comparação com a terapia médica; já os pacientes com enfisema nos demais lobos e alta capacidade de exercício, a melhora na sobrevida foi reduzida. Nova atenção foi direcionada para o uso de anestésicos e cuidados operatórios para pacientes com enfisema avançado. A otimização da terapia médica antes da CRVP aumentou o conhecimento de oxigenação e reabilitação pulmonar (Fishman, 2003).

Inicialmente, foi proposto que o aumento do fluxo expiratório máximo observado após a CRVP era devido, principalmente, a uma melhora da elasticidade do pulmão após o procedimento cirúrgico (Gelb et al., 1996). Essa hipótese não explica totalmente o aumento do fluxo expiratório máximo de cada paciente (Gelb et al., 1996), nem explica o aumento da capacidade vital (CV), geralmente observada após CRVP (Fessler & Permutt, 1998). Outra hipótese seria o crescimento regenerativo ou compensatório do tecido pulmonar remanescente.

1.2.1. Crescimento compensatório

O termo "crescimento regenerativo" denota a substituição direta de um órgão ou apêndice que foi perdido, ao passo que o "crescimento compensatório" denota acelerada hiperplasia e/ou hipertrofia do tecido remanescente em um órgão danificado para restabelecer a função normal.

Hiperplasia ocorre quando alguns órgãos têm a capacidade de aumentar indefinidamente o número de unidades estruturais sobre as quais suas funções dependem. Na hipertrofia os órgãos passam por um processo fisiológico menos compensador de aumentar o tamanho das unidades referidas (Goss et al., 1966). O crescimento no pulmão e no rim é muito semelhante, ocorre hiperplasia e hipertrofia celular, por vezes, ao mesmo tempo. No entanto a hiperplasia é a resposta principal. Haasler (1892) foi o primeiro a publicar as evidências experimentais de que o crescimento do pulmão remanescente ocorre após a ressecção do tecido pulmonar por lobectomia ou pneumonectomia.

Tanto o CPC como o crescimento fisiológico são expressões do conteúdo tecidual de proteínas que variam em função do equilíbrio entre as taxas de síntese e degradação. Mudanças nas taxas de degradação ou síntese de colágeno, proteína estrutural que representa de 15-20% da proteína pulmonar, além de outras proteínas, têm papel relevante no CPC (Mcanulty et al., 1988). Estudos bioquímicos de DNA, RNA e proteínas podem responder se existe apenas hiperinsuflação alveolar, ou se, de fato, substâncias intracelulares são aumentadas (hipertrofia) ou há o aumento no número de células (hiperplasia). O conteúdo de DNA aumentado, que é predominantemente nuclear, sugere um aumento no número de células, isso é um marcador de hiperplasia celular, enquanto que o RNA e o conteúdo de proteínas são marcadores de hipertrofia (Rannel et al., 1989).

Historicamente, crescimento regenerativo e compensatório são mais difíceis de definir no pulmão do que em órgãos sólidos por várias razões: 1) o volume de tecido de troca gasosa, em relação ao volume pulmonar total, é pequeno e aproximadamente igual ao volume de sangue dos capilares pulmonares (cerca de 8% do volume pulmonar); 2) as relações anatômicas são complexas entre componentes estruturais derivados de diferentes folhetos embrionários, que devem obedecer a restrições geométricas dentro do recipiente torácico relativamente rígido; 3) as relações da estrutura/função são complexas, pois as amplas flutuações no fluxo convectivo e na perfusão, bem como no fluxo de gás que deve ser acomodado no pulmão, não são vistas em nenhum outro órgão (Hsia, 2004).

Alguns estudos mostraram que a ressecção pulmonar induz crescimento compensatório nos tecidos remanescentes do pulmão em crianças doentes e experimentos com pequenos animais (Fisher & Simnett, 1973; McBride et al., 1980). Após a remoção cirúrgica de um lobo pulmonar, as células epiteliais alveolares dão início à proliferação nos lobos restantes, a qual está associada com o aumento de peso pulmonar (Cagle et al., 1990). Este fenômeno é considerado como uma resposta benéfica para compensar a perda funcional no lobo. Durante os eventos adaptativos, a regeneração das células epiteliais alveolares reconstitui a rede, que é chamado de septação alveolar (Massaro et al., 1985; Hind et al., 2002). Considerando que a extensa destruição das redes alveolares é uma característica do enfisema, a indução

da septação alveolar pelo desafio terapêutico pode contribuir ou melhorar o resultado da CRVP em pacientes com enfisema. No entanto, ainda é desconhecido se, e como, a CRVP induz ou reforça o crescimento compensatório, mesmo no tecido pulmonar com enfisema (Shigemura et al., 2005).

O CPC é mais vigoroso e a restauração é mais completa em cães submetidos à pneumonectomia (PNX) (Takeda et al., 1999). No cachorro adulto, o CPC é iniciado somente quando mais de 50% do pulmão é removido, sugerindo que existe um limiar de sinais mecânicos que deve ser excedido antes do crescimento celular ser reiniciado (Hsia et al., 2000), bem como a possibilidade de efeitos aditivos dos sinais mecânicos independentes provenientes de fontes diferentes, ou seja, maturação, PNX e crescimento alveolar.

1.2.2. Modelos experimentais de lobectomia (LBX)

A ressecção de partes do pulmão por PNX é um modelo estabelecido para estudar o CPC em mamíferos. O modelo de PNX tem vantagem de mimetizar a perda de unidades pulmonares funcionais que são destruídas em doenças pulmonares: a perda de tecido pode ser definida e reprodutível, o pulmão remanescente é normal, e a resposta compensatória pode ser quantificada sem dificuldades (Hsia et al., 2004). Shigemura et al. (2005) alerta que este é um modelo conceitual para mimetizar a CRVP em modelo experimental de enfisema.

A mimetização da CRVP já foi testada previamente em um modelo de enfisema induzido por papaína em nosso laboratório, onde os animais tiveram a melhora do recolhimento elástico após bilobectomia (Fusco et al., 2005). A PNX parcial, remoção cirúrgica de um ou mais lobos pulmonares, diminui substancialmente a capacidade de difusão, reduzindo o número total de alvéolos e da vasculatura disponível para as trocas gasosas. O desafio imediato para um animal submetido à PNX é manter uma troca gasosa adequada após ressecção do tecido pulmonar. A compensação fisiológica para a perda de massa pulmonar é conseguida primariamente através de dois mecanismos: reforço da capacidade de difusão do pulmão remanescente e/ou geração de novas unidades de troca gasosa pulmonar (Brown et al., 2001). Em experimentos animais, o pulmão remanescente sofre rápido

CPC após PNX, que restabelece o peso, o volume, a quantidade de DNA e os níveis de proteínas do pulmão dentro de três semanas (Brody, 1975; Berger & Burri, 1985; Kuboi et al., 1992; Hsia et al., 2004).

Le Cras et al. (2005) demonstraram, em ratos, que o CPC ocorre no pulmão esquerdo após LBX direita, que é acompanhado pelo aumento do crescimento vascular, proporcional à quantidade de tecido pulmonar removido. Neste estudo, no entanto, a remoção de mais de 50% do total da massa pulmonar (superior direito, médio, e lobos inferiores) também resultou em alterações vasculares que levaram à hipertensão pulmonar. Ruiz Junior et al. (2005) observaram em ratos trilobectomizados a recuperação do conteúdo de DNA no tecido pulmonar semelhante aos submetidos a ressecção pulmonar. Para o conteúdo de proteínas e RNA, apesar de ocorrer o CPC no lobo remanescente e no pulmão contra-lateral, não foi o suficiente para atingir os valores do grupo não ressectado, sugerindo que, no rato adulto desnutrido, o CPC depois da trilobectomia ocorre mais por hiperplasia celular do que por hipertrofia, sendo muito diferente de ratos bem nutridos, em que a hipertrofia foi muito mais pronunciada (Ruiz Junior et al., 1998). A produção de colágeno, elástica e do depósito destes componentes da matriz extracelular foi reiniciada nos pulmões adultos pós PNX, resultando na arquitetura pulmonar normal (Kon et al., 1996). Voswinckel et al. (2004) demonstraram que o CPC resulta na restauração completa da troca gasosa no septo alveolar em três semanas. Fehrenbach et al. (2008) observaram, 20 dias após a cirurgia, o aumento de 33% no número de alvéolos com relação ao grupo controle. Wada et al. (2012) estudaram a transplantação de células tipo II alveolar estimulando a regeneração alveolar em ratos adultos depois da LBX e observaram que depois da PNX o CPC depende principalmente do alargamento do tecido pulmonar, pois a análise histológica mostrou que os espaços alveolares estão sempre mais aumentados nos ratos PNX do que nos controles.

Justificativa

Os mecanismos pelos quais a LBX induz ou reforça o crescimento compensatório no tecido pulmonar com enfisema ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que este crescimento ocorra por hipertrofia e ou hiperplasia das unidades alveolares. Modelos animais podem ajudar a entender melhor as mudanças estruturais e funcionais do pulmão, dando margens a novas discussões sobre o que ocorre com as estruturas pulmonares ao longo do tempo no pulmão enfisematoso após a CRVP. Estudos que englobam várias medidas morfométricas (densidade de superfície alveolar, volume total da região respiratória, volume total de espaço aéreo respiratório e volume total de tecido respiratório), além de fatores de crescimento, regeneração, angiogênese e remodelamento são fundamentais para entender o que ocorre no pulmão enfisematoso.

2. OBJETIVOS

Estudar os efeitos fisiológicos do crescimento pulmonar compensatório depois da bilobectomia em ratos enfisematosos, segundo os seguintes aspectos:

1. Processo inflamatório;
2. Área de troca gasosa; e
3. Remodelamento e angiogênese.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Todos os procedimentos descritos e executados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (CAPPesq número 0750/09). Foram utilizados 120 ratos machos adultos da linhagem Wistar ($200,2 \pm 17,2$ g), provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP e mantidos no biotério de manutenção dos LIMs 20 e 61 desta faculdade. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e umidade, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração.

3.2. Desenho experimental

Os animais foram distribuídos, por sorteio, em quatro grupos:

- **Grupo SS** (salina sem LBX, n=25);
- **Grupo SX** (salina com LBX, n=23);
- **Grupo ES** (elastase sem LBX, n=24);
- **Grupo EX** (elastase com LBX, n=23)

Os procedimentos ocorreram nos tempos -6, 0, 2, 4 e 16 semanas. A administração de solução salina, para os grupos SS e SX, e da elastase, para os grupos ES e EX, ocorreu seis semanas antes (T -6) do procedimento cirúrgico (T 0). A partir daí, os animais foram eutanasiados em diferentes tempos: duas semanas (T2), quatro semanas (T4) e 16 semanas (T16) (figura 1).

Figura 1. Desenho Experimental.

3.3. *Indução do enfisema pulmonar*

Os animais foram sedados com isoflurano (5 %) e, com auxílio de um laringoscópio pediátrico adaptado para roedores, entubados orotraquealmente com cânula de polietileno. A seguir, a cânula foi conectada a um ventilador para pequenos animais (flexiVent®, SCIREQ, Canadá), conforme apresentado na figura 2. Os animais foram ventilados com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 120 ciclos por minuto e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 2 cmH₂O. A anestesia geral foi mantida durante um minuto com 2 % de isoflurano em O₂ puro distribuídos através de um vaporizador de gases (1223, K. Takaoka, Brasil). A elastase pancreática suína (E1250-100 mg, SIGMA®, USA, 5 UI/100 g de peso do animal), diluída em 600 µL de solução salina estéril 0,9 %, foi administrada através da cânula de polietileno posicionada na traquéia do animal no instante T -6. Os grupos SS e SX receberam apenas o veículo.

Figura 2. Ventilador flexiVent®: 1, controle (conexão PC); 2, pistão; 3, êmbolo; 4, transdutor de pressão; 5, válvula inspiração; 6, válvula expiração; 7, coluna de H₂O (PEEP); 8, conexão para a cânula.

3.4. Procedimento cirúrgico

No instante T 0, sob anestesia geral e ventilação mecânica, conforme descrito anteriormente, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização da tricotomia da região torácica e toracotomia no 5º espaço intercostal com prévia assepsia. Então, os lobos médio e cardíaco do pulmão direito foram ressecados em bloco, após ligadura com fio de algodão 2.0 dos respectivos hilos (figura 3). A seguir, o tórax foi fechado em três planos, com posicionamento de um dreno em selo d'água para verificar a presença de fístulas aéreas, bem como para a retirada de secreções decorrentes do ato operatório. Por fim, a oferta de isoflurano foi interrompida e a cânula traqueal removida após recuperação dos movimentos respiratórios espontâneos. A analgesia foi realizada com dipirona sódica (10 mg/Kg). Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento, com exceção dos pertencentes aos grupos SS e ES, nos quais não ocorreu a bilobectomia, sendo denominados “sham LBX” ou “falsos-operados”.

Figura 3. A. Anatomia do pulmão de rato: D-S, lobo direito superior; D-M, lobo direito médio; D-I, lobo direito inferior; D-C, lobo direito cardíaco; E, lobo esquerdo. B. fotografia da ressecção do lobo médio: 1, lobo médio; 2, hilo; 3, fio de algodão.

3.5. Avaliação da mecânica pulmonar

Após 2, 4 e 16 semanas, os animais foram anestesiados, entubados e conectados ao FlexiVent® para avaliação da mecânica ventilatória, conforme protocolo descrito acima.

Utilizou-se o modelo linear de um compartimento, também conhecido como "equação do movimento", que realiza uma avaliação do sistema respiratório utilizando a resposta, em pressão, à aplicação de um volume com padrão senoidal (1,5 Hz), amplitude próxima ao volume corrente e duração de 1,5 segundos. Este modelo é mais robusto em relação à ocorrência de ruídos e fornece uma idéia geral do sistema respiratório como um todo. Assim, a resistência e a elastância do sistema respiratório foram obtidas a partir da seguinte equação:

$$Ptr(t) = E_{sr} \cdot V(t) + R_{sr} \cdot V'(t) + P_0$$

onde $Ptr(t)$ é a pressão traqueal em função do tempo, E_{sr} é a elastância do sistema respiratório, $V(t)$ é o volume em função do tempo, $V'(t)$ é o fluxo em função do tempo, R_{sr} é a resistência do sistema respiratório e P_0 é aproximadamente o valor da PEEP (Bates, 2009).

O modelo foi aplicado utilizando-se o software de aquisição e análise do próprio flexiVent®.

3.6. Gasometria arterial

Após coleta dos dados de mecânica ventilatória, foi realizada uma esternotomia mediana para coleta de sangue arterial por punção da aurícula esquerda, utilizando-se uma seringa. A análise das amostras de sangue foi realizada em equipamento apropriado (Stat Profile 10, Nova Biomedical, EUA), obtendo-se os parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH); pressão parcial de dióxido de carbono ($paCO_2$); pressão parcial de oxigênio (paO_2); hematócrito (Hct_c); saturação de oxigênio (SO_2) e concentração de lactato (Lac).

3.7. Eutanásia

Logo após a coleta de sangue, os animais foram mortos, através da secção total da artéria aorta abdominal.

3.8. Índice de hipertensão pulmonar

Após a eutanásia, o coração foi excisado na altura dos vasos da base para avaliação da hipertrofia do ventrículo direito (VD), usada como um indicador de hipertensão pulmonar (Le Cras et al., 2005). O coração foi dissecado, isolando-se a parede livre do VD do restante da massa muscular cardíaca. A razão entre o peso do VD e o peso corpóreo foi utilizada como índice de hipertrofia do VD (Índice de hipertrofia = peso do VD (mg) / peso corpóreo (mg)).

3.9. Peso e volume pulmonar

O pulmão foi removido em bloco, seco com papel absorvente e pesado em balança analítica (AG204, Mettler Toledo, Brasil). A seguir, o lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado conforme descrição abaixo. Após o LBA, o pulmão esquerdo e o lobo superior direito foram descartados. O lobo inferior direito foi, então, instilado intratraquealmente com paraformaldeído 4 %, a uma pressão de 25 cmH₂O, a traquéia ocluída e o lobo submerso em recipiente contendo volume conhecido da mesma solução. O volume do lobo foi determinado por meio do volume de líquido deslocado. Os índices de volume e peso do pulmão foram obtidos pela relação destes com o peso final dos animais (mL/kg e mg/g, respectivamente) (Fernandez et al., 2007). Nos animais dos grupos SS e ES (sem LBX), os lobos médio e cardíaco foram retirados antes das medidas de peso e volume.

3.10. Coleta e análise do LBA

O LBA foi realizado com instilação de 10 mL de solução salina pela traqueia e, a seguir, centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos a 5°C. Depois da centrifugação e retirada do sobrenadante, o botão celular foi ressuspensionado com 5 mL de PBS para a contagem do número total de células por mL, realizada em câmara de Neubauer. Foram confeccionadas lâminas de cytopspin (Cytopspin-2, Shandon Instruments

Sewickley, EUA), que foram posteriormente coradas com *Diff-Quik* para a contagem diferencial celular (300 células/lâmina).

3.11. Histologia

Após a determinação do volume, o lobo inferior continuou imerso em solução de paraformaldeído por 24 h para fixação do tecido. Após este período os pulmões foram transferidos para uma solução de etanol 70 %, e as peças foram submetidas a processamento de rotina para confecção de lâminas histológicas com cortes de 5 μm .

Para avaliar as alterações estruturais e quantificação das células, as lâminas contendo cortes histológicos foram submetidas às colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), para medida do intercepto linear médio (Lm), índice de edema, número de mononucleares, número de polimorfonucleares, densidade de superfície alveolar, volume total da região respiratória, volume total do espaço aéreo respiratório, e volume total de tecido respiratório; coloração de Resorcina-Fucsina, para quantificação de fibras elásticas, e coloração de Picrossírius, para as fibras colágenas.

A quantificação através da técnica de morfometria foi realizada utilizando-se um retículo de 50 retas e 100 pontos acoplado à ocular de um microscópio ótico (Axiostar plus, Zeiss, Alemanha) (Kaza et al., 2002) (figura 4).

Figura 4. Fotomicrografia do tecido pulmonar observado através de ocular equipada com retículo de retas e pontos, em aumento de 200x.

O Lm indica o grau de distensão alveolar e é determinado a partir da contagem do número de intersecções entre os septos alveolares e as retas do retículo, em 15

campos distintos por lâmina. No aumento de 200 vezes, a soma do comprimento das 50 retas é de 2.500 μm . Assim, o Lm para cada animal foi calculado pela equação $Lm = 2.500 / m$, onde m é a média do número de intersecções dos 15 campos observados.

O índice de edema perivascular (E_p) é definido a partir da equação $E_p = e / cm$, onde 'e' é número de pontos que incidem sobre a área de edema e 'cm' é o número de interseptos que cruzam o limite externo da camada muscular (Vieira et al., 2008).

A densidade de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) foi avaliada nos septos alveolares do parênquima pulmonar, quantificando-se o número de pontos que incidiram no tecido alveolar em 10 campos aleatórios e o número de células MN ou PMN presentes nos septos alveolares. A densidade de células foi determinada pelo número de células em cada campo dividido pela área de tecido no aumento de 1000x. Os resultados estão expressos como células por unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$) (Vieira et al., 2008).

As análises da densidade de superfície alveolar, do volume total da região respiratória, do volume total de espaço aéreo respiratório e do volume total de tecido respiratório, foram realizadas da seguinte forma:

Primeiramente, no aumento de 400x, contou-se o número de pontos no espaço aéreo intra-acinar e seus tecidos associados, designados como *Pr*. Regiões não respiratórias, que incluem vias aéreas extra-acinares e vasos maiores que 0,5 mm de diâmetro, foram ignoradas. A densidade de volume da região respiratória (V_{vr}) foi calculada usando-se a equação $V_{vr} = Pr / 50 \times 100$, que representa a porcentagem de pulmão composta de tecido respiratório (alveolar) e espaço aéreo.

A seguir, no aumento de 200x, contou-se o número de pontos que sobrepõem o espaço aéreo respiratório designado como *Pra*. O volume da densidade do espaço aéreo respiratório (V_{ra}) foi calculado usando-se a equação: $V_{ra} = Pra / 50 \times 100$. O número de pontos que caem no tecido respiratório foram contados e chamados de *Prt*. O volume da densidade de tecido respiratório (V_{rt}) foi calculado usando a equação: $V_{rt} = Prt / 50 \times 100$. Estes valores representam a porcentagem do pulmão que é composta pelo espaço aéreo alveolar (V_{ra}) e tecido respiratório (V_{rt}). A densidade de superfície alveolar (S_v), que expressa a área de superfície alveolar por

unidade de volume, foi determinada pela equação $S_v = 2 / d \times (I_s/P_p)$, onde d é o comprimento da linha do retículo, I_s é o número de linhas que interceptam o espaço aéreo, e P_p é o número total de pontos do parênquima. O volume total da região respiratória (TV_{vr}) foi calculado como $TV_{vr} = V_{vr} \times V_l$, onde V_l é o volume total do pulmão. TV_{vr} é a medida do volume total de alvéolos e tecido de troca gasosa associado. O volume total do espaço aéreo respiratório (TV_{ra}) foi calculado como $TV_{ra} = V_{vr} \times V_{ra} \times V_l$. Esta é a medida do volume do espaço aéreo alveolar no pulmão. O volume total de tecido respiratório (TV_{rt}) foi calculada como $TV_{rt} = V_{vr} \times V_{rt} \times V_l$. Esta é a medida do volume de tecido alveolar no pulmão.

3.12. Análise de imagem

A quantificação da proporção de fibras elásticas e colágenas em relação à área do parênquima pulmonar foi realizada por meio de análise de imagem (Image Pro Plus 6.0 for Windows, Media Cybernetics, EUA) a partir de 15 fotografias obtidas em microscópio óptico (BM4000B, Leica, Alemanha) de cada lâmina, em aumento de 400 vezes.

Para a quantificação, foi executada a limiarização para segmentar as imagens (Gonzalez e Woods, 2000) e a rotulação, no qual a imagem é agrupada por seus pixels – que compartilham valores de intensidade similares (componentes baseados na avaliação manual do pesquisador). Deste modo, o avaliador desenvolve e processa duas macros para cada análise das imagens: a macro “área total” e a macro “resorcina fucsina ou picrossírius”.

- macro “área total”: o analisador agrupa todos os pixels equivalente aos padrões de cores do fundo branco da lâmina, ou seja a área sem tecido e calcula também a área total da imagem. Deste modo subtraindo-se a área total da imagem do fundo branco resta a área total de parênquima pulmonar.
- macro “resorcina fucsina e picrossírius”: o analisador agrupa todos os pixels equivalente aos padrões de cores das fibras da imagem, ao processar a imagem ele obtém o total de fibras naquela imagem.

Portanto, com o processamento das duas macros para a mesma imagem obtém-se a proporção de fibras no parênquima pulmonar equivalente dividindo-se o valor total de fibras da imagem pela área total de parênquima pulmonar da mesma.

3.13. Western blotting

A avaliação da expressão na forma integral e fosforilada da proteína VEGF foi realizada através da técnica de Western Blotting. Resumidamente, o tecido pulmonar foi coletado do lobo superior e imediatamente homogenizado em solução de extração de proteínas (em 0.5 ml de solução para o lysis celular; RIPA Lysis Buffer, incluído inibidores de proteases e fosfatases, Santa Cruz, EUA) deixando em banho de gelo por 15 minutos. Após a incubação em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a 4 graus a 13300 rpm por 15 minutos e o conteúdo protéico (sobrenadante) foi coletado e imediatamente armazenado a -70 °C. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de BCA (BCA Pierce Thermo Scientific, EUA). Trinta microgramas de proteína foram transferidas para um gel de poliacrilamida e então transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com o anticorpo primários anti-VEGF (1:500, Santa Cruz) em TBS-Tween 3% BSA. As proteínas foram visualizadas utilizando-se anticorpos secundários horseradish conjugados seguido por quimiluminescência. A avaliação densitométrica das bandas foram realizadas utilizando-se o software Image J (NIH, EUA).

3.14. Análise estatística

As análises descritivas para os dados quantitativos com distribuição normal foram realizadas apresentando as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados, respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene.

Utilizamos a análise de variância de triplo fator para a comparação intergrupos de todos os parâmetros avaliados no momento da eutanásia. Na presença de diferença estatística ($p < 0,05$), utilizamos o teste *post hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas de médias.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Package for social Sciences* (SPSS 13.0 for Windows, IBM, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Número de animais

Foram utilizados 120 animais, sendo distribuídos 40 animais para cada tempo estudado. No tempo T2 foram instilados 18 animais com solução salina (02 perdas) e 22 com elastase (06 perdas), totalizando 32 animais e 8 perdas. Em T4 também foram instilados 18 animais com solução salina (03 perdas) e 22 com elastase (05 perdas), totalizando 32 animais e 08 perdas. No tempo T16 foram instilados 18 animais com solução salina (02 perdas) e 22 com elastase (07 perdas), totalizando 31 animais e 09 perdas. Assim, dos 120 animais instilados, apenas 95 participaram do estudo.

4.2. Peso

Os valores médios de peso (em gramas) dos animais ao final do estudo estão mostrados na tabela 1. Em T16, os animais dos grupos ES e EX apresentaram peso menor em comparação aos grupos SS e SX, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 1. Peso corporal médio em gramas no momento do sacrifício.

LBX		Peso (g)
		Média $\pm$ DP
T2	SS	394,3 $\pm$ 40,8
	SX	394,3 $\pm$ 31,4
	ES	421,6 $\pm$ 37,7
	EX	409,6 $\pm$ 31,6
T4	SS	458,1 $\pm$ 16,0
	SX	437,7 $\pm$ 42,9
	ES	462,5 $\pm$ 24,8
	EX	426,6 $\pm$ 39,3
T16	SS	576,1 $\pm$ 47,9
	SX	580,8 $\pm$ 102,6
	ES	509,2 $\pm$ 22,1 *
	EX	478,5 $\pm$ 56,1 **

T2, 2 semanas; T4, 4 semanas; T16, 16 semanas; SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; DP, desvio padrão; * vs SS; ** vs SX; $p < 0,05$.

4.3. Resistência e elastância do sistema respiratório

A resistência do sistema respiratório foi maior, em T16, no grupo ES comparado a SS ($p < 0,05$). Na análise ao longo do tempo, a resistência dos animais dos grupos ES e EX foi maior no tempo T16 do que em T2 (Figura 5).

Figura 5. Resistência do sistema respiratório. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; § vs T2; $p < 0,05$.

Na avaliação da elastância do sistema respiratório, os grupos EX nos tempos T4 e T16 apresentaram maior elastância quando comparados aos grupos SX e ES. Na avaliação entre tempos, a elastância foi menor no grupo SS em T16 comparado a T2 e T4 e menor no grupo SX em T16 comparado ao T2, e maior no grupo EX em comparação a T2 e T4 (Figura 6).

Figura 6. Elastância do sistema respiratório. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; ** vs SX; † vs ES; ≠ vs T2 e T4; $p < 0,05$.

4.4. Gasometria arterial

Em T2, o valor de paO_2 foi maior no grupo EX em relação ao SX. Os valores de Hct_c do grupo SX foram maiores em T4 e menores em T16 quando comparados aos dos grupos SS nos respectivos tempos. Na análise ao longo do tempo, o valor da $paCO_2$ do grupo SS foi menor em T4 em relação a T2 e T16. Já os grupos SX e EX apresentaram valor de Hct_c maior em T4 do que nos outros tempos estudados. O grupo ES apresentou valores menores de $paCO_2$ e maiores de Lac no tempo T4 em relação a T2 (Tabela 2).

Tabela 2. Gasometria arterial.

LBX		pH	$paCO_2$ (mmHg)	paO_2 (mmHg)	Hct_c (%)	SO_2 (%)	Lac (mmol/L)
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
T2	SS	7,5 ± 0,1	19,1 ± 3,7	96,1 ± 19,4	40,3 ± 2,8	98,1 ± 0,5	4,6 ± 1,3
	SX	7,5 ± 0,0	18,6 ± 1,9	101,2 ± 23,5	39,9 ± 3,7	98,4 ± 1,1	4,6 ± 1,1
	ES	7,5 ± 0,0	20,6 ± 3,1	105,7 ± 22,3	40,0 ± 1,7	98,0 ± 1,7	3,8 ± 1,0
	EX	7,5 ± 0,1	19,6 ± 1,6	128,9 ± 25,1**	40,7 ± 1,7	99,3 ± 0,4	4,8 ± 1,0
T4	SS	7,6 ± 0,1	12,1 ± 3,5 §	88,7 ± 24,1	41,4 ± 3,5	96,7 ± 1,7	5,9 ± 2,0
	SX	7,5 ± 0,0	15,1 ± 4,7	99,2 ± 19,3	46,2 ± 1,0 *§	96,9 ± 1,4	5,6 ± 1,4
	ES	7,5 ± 0,1	15,4 ± 2,7 ≠	97,7 ± 21,2	44,4 ± 5,0	96,2 ± 2,2	6,1 ± 1,1 ≠
	EX	7,5 ± 0,1	17,2 ± 2,2	100,7 ± 19,7	46,3 ± 1,9 §	97,4 ± 1,1	5,9 ± 1,2
T16	SS	7,6 ± 0,1	18,4 ± 4,5	90,3 ± 38,9	43,8 ± 6,2	97,1 ± 2,1	4,6 ± 1,3
	SX	7,6 ± 0,1	15,4 ± 5,9	99,8 ± 21,9	37,9 ± 2,9 *	98,5 ± 0,7	5,4 ± 2,0
	ES	7,6 ± 0,2	19,1 ± 1,9	95,6 ± 28,1	40,3 ± 4,0	95,8 ± 7,0	5,3 ± 0,7
	EX	7,5 ± 0,1	16,3 ± 3,1	102,0 ± 35,9	36,1 ± 2,3	97,2 ± 3,1	5,2 ± 1,6

T2, 2 semanas; T4, 4 semanas; T16, 16 semanas; SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; DP, desvio padrão; * vs SS; ** vs SX; § vs T2 e T16; ≠ vs T2; p<0,05.

4.5. Medida das câmaras cardíacas

Houve aumento do VD nos grupos SX e ES comparados ao SS nos tempos T4 e T16, e no grupo EX comparado ao SX em T16. Na comparação entre tempos, o grupo EX apresentou o VD maior no tempo T16 comparado aos T2 e T4 (Figura 7).

Figura 7. Índice de hipertensão. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; ** vs SX; § vs T2 e T4; $p < 0,05$.

4.6. *Peso e volume pulmonar*

Em T2 e T4, o peso pulmonar corrigido pelo peso corporal foi significativamente maior nos grupos SX e EX em relação aos grupos SS e ES, respectivamente. Em T16, os grupos SX e ES apresentaram aumento significativo do peso comparado a SS. Ao longo do tempo, o grupo SS apresentou menor peso em T16 comparado com T2, e o grupo SX também apresentou peso menor em T4 e T16 comparado com T2 (Figura 8).

Figura 8. Peso do pulmão/peso corporal. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; † vs ES; § vs T2; $p < 0,05$.

Quanto à medida de deslocamento de volume do lobo direito inferior, em T2 e T4, os grupos SX e EX apresentaram valores maiores que os grupos SS e ES, respectivamente. O volume também foi maior em T4 no grupo ES comparado a SS. Em T16 os grupos SX e ES apresentaram volume maior que SS. Ao longo do tempo, os grupos SX e EX apresentaram volume menor em T16 comparado com T2, e o grupo ES apresentou volume maior em T16 comparado com T2 e T4 (Figura 9).

Figura 9. Volume do lobo direito inferior/peso corporal. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; † vs ES; & vs T2; ¶ vs T2 e T4; $p < 0,05$.

4.7. Lavado broncoalveolar (LBA)

O número total de células na câmara de Neubauer e o número de macrófagos e neutrófilos na contagem diferencial foi maior nos animais ES e EX, comparados com SS e SX em T4 (exceto neutrófilos) e T16. Em T2, o número total de células no grupo ES e de eosinófilos no grupo SX foi maior em relação ao SS. Em T4, o número de eosinófilos do grupo EX foi maior em comparação com os grupos SX e ES, e o número de linfócitos foi maior no grupo ES comparado a SS. Em T16, o grupo ES apresentou maior número de eosinófilos quando comparado a SS; já o número de linfócitos foi maior nos grupos ES e EX comparados a SS e SX, respectivamente, e menor no grupo EX comparado a ES; por fim, o número de células epiteliais foi maior no grupo EX comparado a SX (Tabela 3).

Na comparação entre tempos, o grupo SX apresentou valores menores de total de células no tempo T16 comparado com T2 e T4, e de macrófagos em T16 comparado a T4. O grupo EX apresentou número maior de total de células e neutrófilos em T4 e T16 comparados com T2 e de macrófagos e eosinófilos em T4 comparado com T2 e T16 (Tabela 3).

Tabela 3. Total de células, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células epiteliais.

LBX		Total de Células ($\times 10^4$ /mL) Média $\pm$ DP	Macrófagos ($\times 10^4$ /mL) Média $\pm$ DP	Neutrófilos ($\times 10^4$ /mL) Média $\pm$ DP	Eosinófilos ($\times 10^4$ /mL) Média $\pm$ DP	Linfócitos ($\times 10^4$ /mL) Média $\pm$ DP	Células Epiteliais ($\times 10^4$ /mL) Média $\pm$ DP
T2	SS	78,3 $\pm$ 37,9	39,3 $\pm$ 27,0	24,6 $\pm$ 22,5	0,0 $\pm$ 0,0	3,2 $\pm$ 1,6	10,0 $\pm$ 4,6
	SX	113,8 $\pm$ 29,5	52,0 $\pm$ 15,9	39,9 $\pm$ 26,2	0,7 $\pm$ 0,8 *	7,1 $\pm$ 3,6	13,9 $\pm$ 9,5
	ES	132,5 $\pm$ 48,2 *	67,4 $\pm$ 26,6	46,2 $\pm$ 21,4	0,0 $\pm$ 0,0	4,9 $\pm$ 4,1	14,1 $\pm$ 8,1
	EX	95,4 $\pm$ 28,5	55,0 $\pm$ 24,5	19,4 $\pm$ 12,3	0,2 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 3,4	16,4 $\pm$ 6,3
T4	SS	83,4 $\pm$ 30,1	46,1 $\pm$ 23,4	20,4 $\pm$ 15,6	0,3 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 2,4	13,8 $\pm$ 6,7
	SX	116,3 $\pm$ 39,7	64,1 $\pm$ 30,7	26,8 $\pm$ 24,6	0,5 $\pm$ 0,9	7,5 $\pm$ 6,9	17,5 $\pm$ 8,5
	ES	165,5 $\pm$ 46,1 *	84,1 $\pm$ 22,1 *	49,2 $\pm$ 34,4	0,1 $\pm$ 0,1	10,9 $\pm$ 7,8 *	21,3 $\pm$ 13,3
	EX	178,5 $\pm$ 41,3 ** $\neq$	97,6 $\pm$ 28,4 ** $\#$	57,3 $\pm$ 34,4 $\neq$	1,4 $\pm$ 1,1 ** $\dagger$ $\#$	9,9 $\pm$ 6,5	12,4 $\pm$ 8,3
T16	SS	54,6 $\pm$ 28,6	25,4 $\pm$ 13,1	11,9 $\pm$ 10,0	0,0 $\pm$ 0,0	5,3 $\pm$ 3,7	12,1 $\pm$ 8,0
	SX	46,1 $\pm$ 11,5 §	18,7 $\pm$ 9,3 §	15,6 $\pm$ 9,6	0,1 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 2,9	7,5 $\pm$ 6,6
	ES	183,9 $\pm$ 91,0 *	58,2 $\pm$ 24,9 *	88,0 $\pm$ 58,0 *	0,8 $\pm$ 1,1 *	25,5 $\pm$ 16,8 *	11,5 $\pm$ 9,0
	EX	164,6 $\pm$ 71,8 ** $\neq$	61,2 $\pm$ 45,5 **	69,7 $\pm$ 30,6 ** $\neq$	0,3 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 9,3 ** $\dagger$	18,8 $\pm$ 5,7 **

T2, 2 semanas; T4, 4 semanas; T16, 16 semanas; SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; DP, desvio padrão; * vs SS; ** vs SX; $\dagger$ vs ES; § vs T2 e T4; $\neq$ vs T2; § vs T4; $\#$ vs T2 e T16; $p < 0,05$.

4.8. Morfometria e análise de imagem

4.8.1. Lm

Os valores de intercepto linear médio (Lm) foram maiores nos grupos ES e EX comparados com SS e SX, respectivamente, em todos os tempos estudados. O grupo EX apresentou Lm menor que o ES nos tempos T2 e T16.

Ao longo do tempo, os grupos SS e SX apresentaram Lm menor em T16 em relação a T4. O grupo ES apresentou Lm maior em T4 comparado com T2, e o grupo EX obteve Lm maior em T4 em relação a T2 e T16 (Figura 10).

Figura 10. Intercepto linear médio (Lm). SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; ** vs SX; † vs ES; § vs T4; ≠ vs T2; # vs T2 e T16; p<0,05.

4.8.2. Fibras elásticas

A porcentagem de fibras elásticas foi menor no grupo ES em relação ao SS e EX, em T2, e maior no grupo EX em relação ao SX e ES em T16. Ao longo do tempo, os grupos SS e SX apresentaram menor quantidade de fibras em T4 e T16 em relação a T2; e o grupo EX apresentou menos fibras em T4 comparado a T2 (Figura 11 e 13).

Figura 11. Porcentagem de fibras elásticas. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; ** vs SX; † vs ES; †† vs EX; ¶ vs T2; $p < 0,05$.

4.8.3. Fibras colágenas

A porcentagem de fibras colágenas foi maior nos grupos ES e EX comparados a SS e SX, respectivamente, em T2 e T4. Ao longo do tempo, todos os grupos apresentaram maior quantidade de fibras de colágeno em T16 em relação a T2 e T4 (Figura 12 e 13).

Figura 12. Porcentagem de fibras colágenas. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; *vs SS; ** vs SX; ¥ vs T2 e T4; $p < 0,05$.

Figura 13. Porcentagem de fibras com 2 semanas. A, Fibras elásticas; B. Fibras de colágeno; SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX.

4.8.4. Índice de edema

Não houve diferença de edema entre os grupos em cada tempo estudado. Ao longo do tempo, os grupos SS, SX e EX apresentaram maior índice de edema em T4 comparado com T16 (Tabela 4).

4.8.5. Número de células mononucleares (MN)

O grupo ES apresentou maior número de MN por área de tecido comparado ao SS nos três tempos (T2, T4 e T16) e comparado ao EX em T4. Em T2, o número de MN foi maior no grupo EX em comparação a SX. Ao longo do tempo, o número de MN foi menor nos grupos SS e ES em T16 comparado a T4, e no grupo EX em T16 comparado com T2 (Tabela 4).

4.8.6. Número de células polimorfonucleares (PMN)

O grupo ES apresentou mais PMN comparado ao SS nos tempos T2 e T16. O número de PMN no grupo EX foi menor comparado com ES em T2, e maior comparado com SX em T16. Na comparação entre tempos, o número de PMN foi menor tanto nos grupos SX e ES em T4 comparado a T2, quanto no grupo EX em T4 comparado com T2 e T16 (Tabela 4).

Tabela 4. Índice de edema, número de mononucleares e número de polimorfonucleares.

LBX		Índice de Edema Média ± DP ($\times 10^2$)	Número de Mononucleares (mm ²) Média ± DP	Número de Polimorfonucleares (mm ²) Média ± DP
T2	SS	0,6 ± 0,1	207,0 ± 50,2	23,3 ± 11,8
	SX	0,7 ± 0,1	219,0 ± 45,4	29,1 ± 14,4
	ES	0,6 ± 0,1	312,5 ± 44,6 *	49,1 ± 17,5 *
	EX	0,6 ± 0,1	311,6 ± 60,3 **	34,2 ± 17,9 †
T4	SS	0,6 ± 0,1 ¶	203,1 ± 72,3	18,3 ± 7,8
	SX	0,7 ± 0,1 ¶	245,9 ± 38,2	8,9 ± 3,5 &
	ES	0,6 ± 0,1	317,2 ± 72,8 * ††	20,8 ± 9,1 &
	EX	0,7 ± 0,1 ¶	237,3 ± 90,7	17,0 ± 5,1 #
T16	SS	0,5 ± 0,1	124,5 ± 39,3 §	13,6 ± 5,3
	SX	0,5 ± 0,1	159,1 ± 22,2	14,7 ± 3,9
	ES	0,6 ± 0,1	229,8 ± 71,2 *§	35,0 ± 15,1 *
	EX	0,5 ± 0,1	215,2 ± 31,5 ≠	38,3 ± 12,9 **

T2, 2 semanas; T4, 4 semanas; T16, 16 semanas; SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; DP, desvio padrão; * vs SS; ** vs SX; † vs ES; †† vs EX; ¶ vs T16; § vs T4; ≠ vs T2; & vs T2; # vs T2 e T16; p<0,05.

4.8.7. Densidade de superfície alveolar (Sv)

A Sv foi maior no grupo ES comparado ao SS em T2, T4 e T16, e comparado ao EX em T2 e T16. Ao longo do tempo o grupo EX apresentou maior Sv em T4 em relação a T16 (Tabela 5).

4.8.8. Volume total da região respiratória (TVvr)

O grupo EX apresentou o TVvr maior em relação ao SX em T2, e o grupo ES foi maior que o SS em T16. O grupo EX apresentou volume maior comparado a ES em T2 e T16. Na comparação ao longo do tempo, o grupo ES apresentou maior valor de TVvr em T16 em relação a T2 e T4. O grupo EX em T16 foi maior em relação a T4 (Tabela 5).

4.8.9. Volume total do espaço aéreo respiratório (TVra)

O TVra foi maior no grupo ES e EX comparados aos SS e SX, respectivamente nos três tempos (T2, T4 e T16). O grupo SX apresentou o espaço aéreo maior comparado com SS nos tempos T2 e T4. O grupo EX foi maior que ES no tempo T4. Ao longo do tempo, o grupo ES apresentou maior espaço aéreo em T16 em relação a T2 e T4 (Tabela 5).

4.8.10. Volume de tecido respiratório (TVrt)

O TVrt foi menor no grupo ES comparado com SS nos tempos T2 e T4 e comparado com EX em T2, T4 e T16. O grupo SX apresentou TVrt maior que SS em T2. Ao longo do tempo, o TVrt do grupo SX foi maior em T2 comparado com T4 e T16. Já o grupo ES apresentou TVrt maior em T16 do que em T4. O TVrt do grupo EX foi menor em T4 que em T2 e T16, sendo que o TVrt desse grupo em T16 foi maior que em T2 (Tabela 5).

Tabela 5. Densidade de superfície alveolar, Volume total da região respiratória, Volume total do espaço aéreo respiratório e Volume de tecido respiratório.

LBX		Sv (cm ³ /cm ²) Média ± DP	TVvr (mL) Média ± DP	TVra (mL) Média ± DP	TVrt (mL) Média ± DP
T2	SS	0,02 ± 0,01	1,3 ± 0,1	70,7 ± 17,1	38,5 ± 5,4
	SX	0,02 ± 0,00	1,6 ± 0,2	93,8 ± 13,6 *	57,9 ± 2,1 *¶
	ES	0,04 ± 0,02 *††	1,3 ± 0,1	98,0 ± 20,0 *	28,3 ± 2,8 *††
	EX	0,02 ± 0,00	1,8 ± 0,3 **†	119,1 ± 22,2 **	52,2 ± 9,9
T4	SS	0,02 ± 0,00	1,1 ± 0,1	60,1 ± 8,8	37,9 ± 7,5
	SX	0,02 ± 0,00	1,4 ± 0,2	86,6 ± 16,8 *	42,3 ± 6,1
	ES	0,03 ± 0,01 *	1,2 ± 0,1	90,2 ± 21,9 *	27,7 ± 6,1 *††
	EX	0,03 ± 0,00 §	1,5 ± 0,2 †	112,2 ± 21,2 **†	40,4 ± 5,1 ¥
T16	SS	0,01 ± 0,00	1,2 ± 0,1	64,6 ± 6,6	39,1 ± 4,3
	SX	0,01 ± 0,00	1,4 ± 0,4	74,6 ± 29,2	44,4 ± 9,3
	ES	0,04 ± 0,01 *††	1,7 ± 0,3 *&	134,7 ± 24,6 *&	37,6 ± 5,0 ††
	EX	0,02 ± 0,00	2,0 ± 0,4 †≠	135,1 ± 14,7 **	63,8 ± 11,0 **

T2, 2 semanas; T4, 4 semanas; T16, 16 semanas; SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; DP, desvio padrão; * vs SS ** vs SX; † vs ES; †† vs EX; § vs T16; & vs T2 e T4; ≠ vs T4; # vs T2; ¶ vs T4 e T16; ¥ vs T2 e T16; p<0,05.

4.9. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Houve um aumento da expressão de VEGF nos animais do grupo ES comparados a EX em T4 e T16. O grupo ES também apresentou aumento de VEGF em relação ao SS em T16. Na comparação entre tempos, o grupo ES em T16 é maior que T2 e T4 (Figura 14).

Figura 14. Fator de crescimento endotelial vascular. SS, salina + sham LBX; SX, salina + LBX; ES, elastase + sham LBX; EX, elastase + LBX; * vs SS; †† vs EX; § vs T2 e T4; $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Existem vários modelos animais que tentam reproduzir a DPOC que acomete os seres humanos. Ela pode ser reproduzida através da inalação de partículas da poluição do ar, poeira, fumo, biomassa de combustíveis, administração exógena de proteinases, químicos ou modificações genéticas (Mahadeva & Shapiro, 2002; Wright et al., 2008).

O fumo é o maior responsável pelo desenvolvimento do enfisema pulmonar. Com isso o modelo que mais se aproxima do enfisema pulmonar humano são os que utilizam inalação de cigarro, porém, demoram muito para serem produzidos, uma vez que os animais precisam ser expostos à fumaça de cigarro durante longos períodos de tempo (Antunes & Rocco, 2011). Além disso, o modelo de exposição ao cigarro tem a desvantagem de perder as suas características caso os animais deixem de ser expostos por algumas semanas (Braber et al., 2010). Por isso, neste trabalho optamos pela instilação traqueal de elastase pancreática suína em ratos devido ao rápido e significativo alargamento dos espaços aéreos seguido pelo acúmulo de neutrófilos e macrófagos no pulmão com uma única dose. O alargamento do espaço aéreo é contínuo ao longo do primeiro mês de instilação e depois estabiliza, mantendo as características ao longo de meses (Shapiro, 2000; Mahadeva & Shapiro, 2002).

As doses utilizadas para este modelo de enfisema por elastase variam muito dependendo da espécie. Para as linhagens de rato Sprague Dawley, Wistar, Lewis e Brown Norway, as mais utilizadas nos últimos anos, as doses variaram de 0,2 a 300 UI/100 g de peso do animal. Objetivando estabelecer uma dose capaz de produzir um enfisema moderado e verificar se a droga (elastase) seria distribuída uniformemente, realizamos um estudo piloto com as doses de 3 e 5 UI/100 g. O Lm nos animais instilados com a dose de 3 UI foi de 75 μ m, enquanto que os animais instilados com 5 UI apresentaram média de 95 μ m, valor semelhante ao encontrado por Emami et al. (2008), que classificaram como sendo um enfisema moderado. Além disso, não encontramos diferença entre os lobos analisados separadamente, indicando que a droga instilada com o auxílio do ventilador para pequenos animais foi distribuída de forma homogênea.

Os pacientes com DPOC apresentam, em muitos casos, distúrbios nutricionais e consequente diminuição da massa muscular esquelética, resultando em perda de peso (Schols et al., 1998; Agusti et al., 2003). Contudo, não encontramos na literatura

muitos relatos dessas perdas em trabalhos que usam ratos como modelo. No nosso estudo observamos peso menor apenas nos animais tratados com elastase e estudados 16 semanas após a cirurgia. As perdas de peso e musculatura podem estar relacionadas com a inflamação pulmonar destes animais, observada na citologia do LBA e no número de células mononucleares e polimorfonucleares no tecido pulmonar. Langen et al. (2006) estudaram a perda de peso e massa muscular em camundongos através de um modelo de ultraexpressão de TNF- α , demonstrando que a inflamação pulmonar crônica resultou na atrofia do músculo em consequência da ampliação do TNF- α no pulmão, que se estendeu a partir do pulmão para o músculo esquelético.

A hipertensão pulmonar secundária, em pacientes enfisematosos, pode ocorrer em consequência tanto da doença quanto da CRVP. Para verificar se isso ocorreu neste modelo, utilizamos uma técnica indireta de quantificação do índice de massa do ventrículo direito em relação à massa corporal, e verificamos um aumento desse índice em todos os animais operados e nos enfisematosos, sendo significativo nos grupos de T4 e T16, o que corrobora os achados em humanos. Em modelos experimentais de enfisema ou pneumonectomia, nem sempre a hipertensão pulmonar é detectada. Polonio et al. (2012) avaliaram dois modelos de hipertensão arterial pulmonar, utilizando quatro grupos: controle (C), pneumonectomia (P), monocrotalina (M) e monocrotalina + pneumonectomia (MP). Através das medidas das câmaras cardíacas e cateterismo, verificou-se que apenas os grupos M e MP desenvolveram hipertensão. Em modelo de enfisema com camundongos expostos ao tabaco por 12 ou 24 semanas, a hipertensão foi verificada pelo aumento do VD e da pressão sistólica ventricular direita (Han et al., 2011). Fernandez et al. (2007) verificaram, em ratos, que a hipertensão pulmonar pode ser proporcional à quantidade de massa pulmonar removida, sendo que o grupo em que apenas o pulmão esquerdo foi removido (PNX) não apresentou hipertensão, enquanto que o grupo em que houve PNX + LBX (lobo superior e médio) apresentou hipertensão.

A CRVP deve ser considerada apenas para pacientes com enfisema grave depois de serem submetidos a tratamento clínico. A CRVP é um procedimento no qual partes não funcionais do pulmão são ressecadas com o objetivo de reduzir a hiperinsuflação pulmonar e permitir que porções funcionais de parênquima, antes com atelectasia,

possam se expandir, aumentando a força do recolhimento elástico no pulmão, melhorando o fluxo expiratório e a troca gasosa. Além disso, a CRVP torna os músculos respiratórios um gerador de pressão mais eficaz pelo aumento de sua eficiência mecânica. Por outro lado, devido à natureza frágil dos pacientes enfisematosos, a cirurgia apresenta altos índices de morbidade e mortalidade (Naunheim et al., 2006).

Os pacientes submetidos à CRVP podem, ou não, apresentar melhora da troca gasosa. Cremona et al. (2011) verificaram que após a CRVP os pacientes apresentaram melhora de paO_2 , mas sem alteração de $paCO_2$, sendo que houve grande variedade em ambos os parâmetros. Já no NETT, os pacientes apresentaram aumento de paO_2 e diminuição de $paCO_2$ em 6, 12 e 24 meses após a CRVP. Shiguemura et al. (2005) observaram que ratos tratados com elastase manifestaram diminuição progressiva na troca gasosa alveolar (paO_2) e na tolerância ao exercício (VO_{2max}), sendo mais intensa logo após a instilação da elastase e continuando ao longo do tempo. No presente estudo, entre os parâmetros gasométricos avaliados, a única alteração mais significativa foi o aumento da paO_2 nos animais EX em T2, sugerindo que a CRVP colaborou para melhora da oxigenação apenas na fase pós operatória imediata.

A LBX tem sido estudada, mais frequentemente, em cachorros, coelhos, ratos e camundongos; porém, na última década, os ratos tem sido o modelo mais utilizado. Na maioria das espécies de mamíferos, a remoção de um pulmão resulta no crescimento compensatório do pulmão remanescente próximo aos níveis basais. Com o objetivo de avaliar o CPC, os trabalhos apresentam diversos padrões de ressecção pulmonar. Le Cras et al. (2005) ressecaram os lobos superior e médio (LBX2) e os lobos superior, médio e inferior (LBX3) e compararam com animais controle; o crescimento compensatório só ocorreu no grupo LBX3. Fernandez et al. (2007) estudaram três grupos de ratos (*sham*, pneumonectomia (PNX) e pneumonectomia + bilobectomia (LBX)) após quatro semanas da cirurgia e verificaram que o peso total do pulmão não foi diferente nos três grupos; porém, o volume dos lobos inferior+cardíaco foi maior no grupo PNX+LBX em relação ao PNX, e maior neste em comparação ao *Sham*. Observaram também que a Sv nos grupos PNX e PNX+LBX foi menor que no grupo sham e que as medidas de TVvr, TVra e TVrt foram maiores nestes grupos. Kim et al.

(2003) verificaram que após 10 meses de cirurgia os animais enfisematosos apresentaram um volume 35 % maior que os animais controle. Por outro lado, Shiguemura et al. (2005), ressecando apenas o lobo inferior direito, observaram que os animais tratados com uma dose alta de elastase apresentaram menor CPC em relação aos tratados com solução salina. Assim, o CPC pode ocorrer independentemente da quantidade de lobos ressecados.

Com base no estudo de Fusco et al. (2005) e na CRVP em humanos, optamos pela ressecção dos lobos médio e cardíaco do pulmão direito, o que representa 35% da massa pulmonar. Para determinar se existe diferença no CPC depois da LBX, utilizamos o peso pulmonar total, o deslocamento do lobo inferior, a densidade de superfície alveolar, o volume total da região respiratória, o volume total do espaço aéreo respiratório e o volume de tecido respiratório.

Em nosso estudo, os animais submetidos à bilobectomia (SX e EX) apresentaram maior peso e volume pulmonar que os animais sham (SS e ES) em T2 e T4, sem a incidência de edema em nenhum dos grupos estudados, indicando que houve crescimento nos lobos remanescentes independentemente da ação da elastase. A arquitetura do tecido pulmonar dos animais enfisematosos operados, muitas vezes, se confunde com a do grupo salina sham, o que nos faz acreditar que a LBX tenha promovido muito mais que a hipertrofia das células existentes. Nossos dados de morfometria sugerem que houve uma possível hiperplasia alveolar em decorrência da cirurgia tanto nos animais tratados com solução salina quanto nos animais tratados com elastase, devendo ser melhor investigada através de fatores de crescimento e proliferação alveolar.

Alguns trabalhos foram feitos com o objetivo de verificar o crescimento compensatório após PNX com a adição de fatores de crescimento. Kaza et al. (2002) administraram fator de crescimento de queratinócitos nos animais PNX, e observaram o aumento de peso e volume pulmonar, Sv, TVvr e proliferação alveolar tanto no grupo PNX quanto no grupo PNX + queratinócitos. Na investigação do ácido retinóico, Kaza et al. (2001) também observaram o aumento de peso e volume pulmonar, proliferação alveolar, TVvr e TVra e diminuição Sv nos animais PNX e PNX+ ácido retinóico. Isso

reforça a ideia de que existe o aumento da área respiratória independentemente do estímulo. Porém, a transplantação de células do tipo II alveolar estimulou a regeneração durante CPC, aumentando o peso e o volume pulmonar (Wada et al., 2012).

No nosso trabalho, os níveis de VEGF do tecido pulmonar apresentaram maior expressão no grupo ES em T4 e T16, porém a expressão de VEGF nos animais operados não apresentou alterações. Braber et al. (2010) estudaram camundongos expostos a fumaça de cigarro por 20 semanas e camundongos expostos por 20 semanas + 8 semanas sem exposição e os resultados mostraram alta expressão de VEGF no BAL dos dois grupos. Konerding et al. (2012) avaliaram o CPC pós LBX nos 4 lobos remanescentes de camundongos e verificaram que o lobo cardíaco apresentou maior peso e heterogeneidade vascular na região subpleural. Estudando esta região com detalhes através de imunohistoquímica, verificaram o aumento da expressão de VEGFA e GLUT1, fatores associados à angiogênese.

Muitos métodos morfométricos têm sido utilizados para verificar a presença e gravidade do enfisema pulmonar, sendo a análise do intercepto linear médio (Lm) o mais utilizado, seguido da proporção de fibras elásticas e fibras colágenas. O Lm é definido como a medida da distância média entre as paredes alveolares, que se apresenta aumentado com o grau de comprometimento do parênquima pulmonar doente. Em nosso estudo, obtivemos um Lm, nos três tempos avaliados, compatíveis com outros trabalhos (Emami et al., 2008; Brewer et al., 2003), sugerindo que nossos animais estavam enfisematosos, mesmo com uma baixa dose de elastase. Ao analisar os animais tratados com elastase, verificamos que todos eles apresentaram menor valor de Lm após LBX, sugerindo que o CPC pode recuperar as áreas de parênquima funcional.

No parênquima pulmonar, devido à disposição das fibras, a elastina, especialmente em níveis mais baixos de estresse, é responsável por fornecer elasticidade; enquanto que as fibras de colágeno, por estarem frouxamente arranjadas, são requisitadas somente com a distensão do parênquima. Essas fibras diferem significativamente em suas propriedades mecânicas: a elastina é altamente

elástica antes de se romper, enquanto o colágeno é muito mais duro e muito menos elástico. Evidências recentes sugerem que os defeitos na montagem de fibras elásticas pode aumentar a susceptibilidade à digestão enzimática (Kelleher et al., 2005). No presente estudo, os animais enfisematosos submetidos à LBX apresentaram aumento de fibras elásticas nos três tempos, indicando que houve um remodelamento em consequência da cirurgia.

A análise histoquímica demonstra o aumento de colágeno no pulmão em doenças agudas e crônicas. Em nosso trabalho, todos os grupos de animais tratados com elastase apresentaram maior proporção destas fibras em T2 e T4. Curiosamente, todos os animais estudados em T16 apresentaram maior proporção destas fibras independentemente do tratamento. Acreditamos que a idade destes ao término do experimento tenha influenciado, uma vez que estes animais tinham aproximadamente sete meses. Escolar et al. (1997) investigaram as modificações da parede alveolar, fibras elásticas e colágenas de ratos com idade de 5 e 18 meses, e observaram maior Lm e proporção de fibras elásticas, e tendência ao aumento de fibras de colágeno nos ratos de 18 meses.

As mudanças na função pulmonar são uma das principais características da DPOC. Os testes de função pulmonar em modelos experimentais são menos sensíveis que a morfometria, pois detectam apenas graus mais severos de remodelamento de vias aéreas ou destruição de parênquima (Wright et al., 2008). Com isso, encontramos poucos trabalhos na literatura que relatam os dados de mecânica em modelos experimentais de elastase com ratos. Inoue et al. (2010), mesmo utilizando uma alta dose de elastase (20 e 160 UI), não encontraram diferença na mecânica pulmonar de ratos. Por sua vez, Brewer et al. (2003) administraram apenas 2 UI de elastase em ratos e observaram, após quatro semanas, que os valores de resistência de vias aéreas, em diferentes pressões, foram maiores nos animais enfisematosos em comparação aos controles.

Observamos pouca diferença nos parâmetros da mecânica ventilatória em nosso modelo de enfisema. Os valores de resistência do sistema respiratório praticamente não apresentaram alterações, contrariando o princípio de que quanto

mais colágeno, mais duro deve ser o pulmão, e, portanto, maior o valor da resistência. Já os valores de elastância do sistema respiratório mostraram-se aumentados nos animais do grupo EX nos tempos T4 e T16, sugerindo que a LBX foi benéfica nestes grupos.

A inflamação crônica da DPOC é caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos B e T, particularmente nas pequenas vias aéreas (Hogg et al., 2004). A inflamação aumenta com o grau de gravidade da doença, segundo a classificação do GOLD. Inoue et al. (2010) verificaram o aumento no número total de células e de macrófagos 21 dias após instilação de elastase e uma tendência ao aumento de neutrófilos em relação ao grupo controle. Gamze et al. (2007) encontraram após 16 dias que a porcentagem de neutrófilos e macrófagos foi maior no grupo elastase em comparação ao controle; porém, houve diminuição no total dessas células no grupo elastase tratado com o inibidor de endotélio bosentan. Mineo et al. (2010) avaliaram 28 pacientes com enfisema grave comparando a CRVP com reabilitação respiratória durante 12 meses e não encontraram diferença nas células inflamatórias dos dois grupos, apenas quando comparados ao controle. No presente estudo, encontramos aumento no número total de células, macrófagos e neutrófilos no LBA, e de células MN e PMN de todos os animais tratados com elastase, indicando aumento da inflamação pulmonar destes animais. Contudo, a LBX não se mostrou capaz de diminuir este quadro inflamatório.

Para finalizar, gostaríamos de relatar as dificuldades com a instilação da elastase pancreática suína e as perdas ocorridas durante o período. As perdas com a instilação de elastase (27 %) estão compatíveis com outros estudos. Borzone et al. (1998) e Borzone et al. (2009) obtiveram uma mortalidade de 40 e 20 %, respectivamente, com a instilação de 28 e 0,55UI de elastase pancreática suína em ratos. Mesmo estando seguros de termos usado a técnica e a dosagem adequadas, conforme descrito na literatura, consideramos que, para um próximo trabalho, deveremos testar outros esquemas de administração da elastase, objetivando um modelo com características morfofuncionais cada vez mais próximo do enfisema descrito em seres humanos.

Visando compreender melhor o que acontece após uma CRVP em pacientes enfisematosos, procuramos desenvolver este modelo, que, segundo nosso conhecimento, é o primeiro trabalho experimental com administração de elastase seguido de bilobectomia, com avaliação de parâmetros da mecânica ventilatória e de morfometria. Entendemos a importância em aperfeiçoar o modelo e aprofundar as análises para conhecer melhor os mecanismos que levam ao crescimento compensatório do pulmão doente remanescente e as possíveis vias para estimular esse crescimento.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que o crescimento pulmonar compensatório após bilobectomia em ratos enfisematosos causou os seguintes efeitos fisiológicos:

1. O processo inflamatório observado nos animais enfisematosos não foi revertido pela LBX;
2. Houve melhora da área de troca gasosa devido ao aumento do tecido e da região respiratória; e
3. Houve aumento da proporção de fibras elásticas.

7. REFERÊNCIAS

Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21:347-360.

Antunes MA, Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc*. 2011;83(4):1385-1396.

Barnes PJ. Medical progress: chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000;343:269-280.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672-688.

Bates JHT. Lung mechanics: An inverse modeling approach. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.

Berger LC, Burri PH. Timing of the quantitative recovery in the regenerating rat lung. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:777-783.

Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, Fava RA. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGFbeta) and IL-1) -induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 1999;115:176-182.

Borzone G, Ramírez B, Reyes T, Moreno R, Lisboa C, González S. Experimental pulmonary emphysema in rats. Inflammatory phenomena and progression of lung damage. *Rev Med Chil*. 1998;126(10):1153-1160.

Borzone G, Liberona L, Olmos P, Sáez C, Meneses M, Reyes T, Moreno R, Lisboa C. Rat and hamster species differences in susceptibility to elastase-induced pulmonary emphysema relate to differences in elastase inhibitory capacity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(3):1342-1349.

Borzone GR, Liberona LF, Bustamante AP, Saez CG, Olmos PR, Vecchiola A, Villagrán A, Serrano C, Reyes TP. Differences in lung glutathione metabolism may account for rodent susceptibility in elastase-induced emphysema development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(4):1113-1123.

Braber S, Henricks PA, Nijkamp FP, Kraneveld AD, Folkerts G. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. *Respir Res*. 2010;11:99.

Brantigan O, Mueller E, Kress M. A surgical approach to pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1959;80:194-202.

Brewer KK, Sakai H, Alencar AM, Majumdar A, Arold SP, Lutchen KR, Ingenito EP, Suki B Lung and alveolar wall elastic and hysteretic behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. *J Appl Physiol*. 2003;95(5):1926-1936.

Brody JS. Time course of and stimuli to compensatory growth of the lung after pneumonectomy. *J Clin Invest*. 1975;56:897-904.

Brown LM, Rannels SR, Rannels DE. Implications of post-pneumonectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and disease. *Respir Res*. 2001;2:340-347.

Brunnemann KD, Hoffmann D. Analytical studies on tobacco-specific Nnitrosamines in tobacco and tobacco smoke. *Crit Rev Toxicol*. 1991;21(4):235-240.

Cagle PT, Langston C, Goodman JC, Thurlbeck WM. Autoradiographic assessment of the sequence of cellular proliferation in postpneumonectomy lung growth. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3:153-158.

Cazzola M, Donner CF, Hanania NA. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiratory Medicine*. 2007;101:1049-1065.

Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE, Fabbri LM. Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system: insights from experimental animal research. *Eur Respir J*. 1995;8(8):1357-1371.

Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:368-374.

Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early postnatal lung growth. *Thorax*. 1982;37(8):580-583.

Cooper JD, Patterson GA, Sundaresan RS, Trulock EP, Yusef RD, Pohl MS, Lefrak SS. Results of 150 consecutive bilateral lung volume reduction procedures in patients with severe emphysema. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112:1319-1330.

Cremona G, Barberà JA, Melgosa T, Appendini L, Roca J, Casadio C, Donner CF, Rodriguez-Roisin R, Wagner PD. Mechanisms of gas exchange response to lung volume reduction surgery in severe emphysema. *J Appl Physiol*. 2011;110(4):1036-1045.

Criner GJ, Cordova F, Sternberg AL, Martinez FJ. The National Emphysema Treatment Trial (NETT): Part I: Lessons learned about emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(7):763-770.

Emami K, Cadman RV, Woodburn JM, Fischer MC, Kadlecsek SJ, Zhu J, Pickup S, Guyer RA, Law M, Vahdat V, Friscia ME, Ishii M, Yu J, Gefter WB, Shrager JB, Rizi RR. Early changes of lung function and structure in

an elastase model of emphysema - a hyperpolarized ³He MRI study. *J Appl Physiol*. 2008;104(3):773-786.

Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child*. 1960;35:544-547.

Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R. Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat. *Anat Rec*. 1997;248(1):63-69.

Fehrenbach H, Voswinckel R, Michl V, Mehling T, Fehrenbach A, Seeger W, Nyengaard JR. Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice. *Eur Respir J*. 2008;31(3):515-522.

Fernandez LG, Mehta CK, Kron IL, and Laubach VE. Reinitiation of compensatory lung growth after subsequent lung resection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134:1300-1305.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676.

Fessler HE, Permutt S. Lung volume reduction surgery and airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:715-722.

Fisher JM, Simnett JD. Morphogenetic and proliferative changes in the regenerating lung of the rat. *Anat Rec*. 1973;176:389-396.

Fishman A, Martinez F, Naunheim K, Piantadosi S, Wise R, Ries A, et al. National Emphysema Treatment Trial Research Group. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med*. 2003;248:2059-2073.

Fusco LB, Fonseca MH, Pego-Frenandes PM, Pazetti R, Capelozzi V, Jatene FB, Oliveira SA. Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. *J Bras Pneumol*. 2005;31(1):34-40.

Gamze K, Mehmet HM, Deveci F, Turgut T, Ilhan F, Ozercan I. Effect of bosentan on the production of proinflammatory cytokines in a rat model of emphysema. *Exp Mol Med*. 2007;39(5):614-620.

Gelb AF, Zamel N, McKenna RJ Jr, Brenner M. Mechanism of short-term improvement in lung function after emphysema resection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:945-951.

GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (UPDATED 2011).

Gonzales RC & Woods RE. Processamento de imagens digitais. São Paulo. Edgard Blucher Ltda, 2000.

- Goss RJ. Hypertrophy versus hyperlasia. *Science*. 1966;153:1615-1620.
- Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*. 2004;5:18.
- Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema: its production in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health*. 1965;11:50-58.
- Haasler G. Ueber compensatorische hypertrophie der lunge. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol*. 1892;128:527-536.
- Han W, Dong Z, Dimitropoulou C, Su Y. Hydrogen sulfide ameliorates tobacco smoke-induced oxidative stress and emphysema in mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(8):2121-2134.
- Hind M, Corcoran J, Maden M. Alveolar proliferation, retinoid synthesizing enzymes, and endogenous retinoids in the postnatal mouse lung: different roles for Aldh-1 and Raldh-2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26:67-73.
- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004;364:709-721.
- Hsia CC, Takeda SI, Wu EY, Glenny RW, Johnson RL Jr. Adaptation of respiratory muscle perfusion during exercise to chronically elevated ventilatory work. *J Appl Physiol*. 2000;89:1725-1736.
- Hsia CW. Signals and mechanisms of compensatory lung growth. *J Appl Physiol*. 2004;97:1992-1998.
- Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128:833-838.
- Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Takano H. Extensive Analysis of Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats: ALP in the Lung, a New Biomarker for Disease Progression? *J Clin Biochem Nutr*. 2010;46(2):168-176.
- Janoff A. Elastases and emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:417-433.
- Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J. Clin. Invest*. 2000;106:1311-1319.
- Kaza AK, Kron IL, Kern JA, Long SM, Fiser SM, Nguyen RP, Tribble CG, Laubach VE. Retinoic acid enhances lung growth after pneumonectomy. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(5):1645-50.

Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, Tribble CG, Laubach VE. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation*. 2002;106:120-124.

Kelleher CM, Silverman EK, Broekelmann T, Litonjua AA, Hernandez M, Sylvia JS, Stoler J, Reilly JJ, Chapman HA, Speizer FE, Weiss ST, Mecham RP, Raby BA. A functional mutation in the terminal exon of elastin in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(4):355-362.

Kim DK, Zhu J, Kozyak BW, Burkman JM, Rubinstein NA, Lankford EB, Stedman HH, Nguyen T, Levine S, Shrager JB. Myosin heavy chain and physiological adaptation of the rat diaphragm in elastase-induced emphysema. *Respir Res*. 2003;4:1-10.

Kodavanti UP, Jackson MC, Ledbetter AD, Starcher BC, Evansky PA, Harewood A, Winsett DW, Costa DL. The combination of elastase and sulfur dioxide exposure causes COPD-like lesions in the rat. *Chest*. 2000;117(5 Suppl 1):299S-302S.

Koh DW, Roby JD, Starcher B, Senior RM, Pierce RA. Postpneumonectomy lung growth: a model of reinitiation of tropoelastin and type I collagen production in a normal pattern in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15(5):611-623.

Konerding MA, Gibney BC, Houdek JP, Chamoto K, Ackermann M, Lee GS, Lin M, Tsuda A, Mentzer SJ. Spatial dependence of alveolar angiogenesis in post-pneumonectomy lung growth. *Angiogenesis*. 2012;15(1):23-32.

Kuboi S, Mizuuchi A, Mizuuchi T, Taguchi T, Thurlbeck WM, Kida K. DNA synthesis and related enzymes altered in compensatory lung growth in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 1992;52:707-715.

Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. *Lab Invest*. 1976;34:372-380.

Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Van Der Velden JL, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35:689-696.

Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 1963;15:132-140.

Le Cras TD, Fernandez LG, Pastura PA, Laubach VE. Vascular growth and remodeling in compensatory lung growth following right lobectomy. *J Appl Physiol*. 2005;98:1140-1148.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-161.

Li K, Keeling B, Churg A. Mineral dusts cause elastin and collagen breakdown in the rat lung: a potential mechanism of dust-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(2):644-649.

Lieberman J. Elastase collagenase emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Chest*. 1976;70:62-67.

Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease 3. Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57:908-914.

Mauderly JL, Bechtold WE, Bond JA, Brooks AL, Chen BT, Cuddihy RG, Harkema JR, Henderson RF, Johnson NF, Rithidech K. Comparison of 3 methods of exposing rats to cigarette smoke. *Exp Pathol*. 1989;37(1-4):194-197.

Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P. Postnatal development of alveoli: regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest*. 1985;76:1297-1305.

Mcanulty RJ, Staple LH, Guerreiro D. Extensive changes in collagen synthesis and degradation during compensatory lung growth. *Am J Physiol*. 1988;255:C754-759.

McBride JT, Wohl MEB, Strieder DJ, Jackson AC, Morton JR, Zwerdling RG, Griscom NT, Treves S, Williams AJ, Schuster S. Lung growth and airway function after lobectomy in infancy for congenital lobar emphysema. *J Clin Invest*. 1980;66:962-970.

Mineo D, Ambrogio V, Cufari ME, Gambardella S, Pignotti L, Pompeo E, Mineo TC. Variations of inflammatory mediators and alpha1-antitrypsin levels after lung volume reduction surgery for emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(8):806-814.

Morris DG, Huang X, Kaminski N, et al. Loss of integrin alpha-(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature*. 2003;422:169-173.

Naunheim KS, Wood DE, Krasna MJ, DeCamp MM Jr, Ginsburg ME, McKenna RJ Jr, Criner GJ, Hoffman EA, Sternberg AL, Deschamps C, National Emphysema Treatment Trial Research Group. Predictors of operative mortality and cardiopulmonary morbidity in the National Emphysema Treatment Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;131(1):43-53.

Neufeld, G, Cohen, T, Gengrinovitch, S, and Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. *FASEB J*. 1999;13:9-22.

Petrov D, Manolov E, Iankov G. Lung volume reduction surgery in treatment of diffusion pulmonary emphysema in case of chronic obstructive pulmonary disease. *Khirurgiia (Sofiia)*. 2006;3:41-46.

Portal da saúde – Ministério da Saúde do Governo Federal. (citado em 26/09/2012). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/7358/162/medicamentos-para-doenca-pulmonar-estacao-no-sus.html>.

NETT (The National Emphysema Treatment Trial Research Group). Rationale and design of The National Emphysema Treatment Trial: a prospective randomized trial of lung volume reduction surgery. *Chest*. 1999;116:1750-1761.

Rahman I, Kilty I. Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets*. 2006;7:707-720.

Ranes J, Stoller JK. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005;26(2):154-166.

Rannels DE. Role of physical forces in compensatory growth of the lung. *Am J Physiol*. 1989;257:L179-L189.

Ruiz Jr, RL, Burirni RC, Caetano AJM. Compensatory lung growth: lung protein, DNA and RNA contents in trilobectomized rats. *Acta Cir Bras*. 1998;13(1):18-25.

Ruiz Júnior RL, de Carvalho LR, Cataneo AJ. Compensatory lung growth: protein, DNA and RNA lung contents in undernourished trilobectomized rats. *Acta Cir Bras*. 2005;20(3):219-224.

Sanchez PG, Kucharczuk JC, Su S, Kaiser LR, Cooper JD. National Emphysema Treatment Trial redux: accentuating the positive. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;140(3):564-572.

Schols AMWJ, Soeters PB, Dingemans AMC, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EFM. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147:1151-1156.

Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1791-1797.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol*. 1998;141:1659-1673.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-985.

Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest*. 2000;117:223-227.

Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J*. 2003;22:(44)30s-32s.

Sharafkhaneh A, Hanania NA, and Kim V. Pathogenesis of Emphysema: From the Bench to the Bedside. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:475-477.

Shifren A, Mecham RP. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(5):428-433.

Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Minami M, Okumura M, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H. Induction of compensatory lung growth in pulmonary emphysema improves surgical outcomes in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(11):1237-1245.

Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133:149-169.

Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor- β - Multiple actions and potential clinical applications. *JAMA*. 1989;262:938-941.

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;51:267-271.

Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest*. 2002;121:151S-155S.

Sussman R. Part I: Identifying chronic obstructive pulmonary disease in patients with respiratory symptoms. *Curr Med Res Opin*. 2007;23(3):S5-S12.

Takeda S, Ramanathan M, Estrera AS, Hsia CCW. Postpneumonectomy alveolar growth does not normalize hemodynamic and mechanical function. *J Appl Physiol*. 1999;87:491-497.

Tobin MJ, Cook PJL, Hutchison DCS. Alpha1antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z a survey by the British Thoracic Association. *Br J Dis Chest*. 1983;77:14-27.

Van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF, Bakker SJ, Gans RO, Koëter GH, Choi AM, Van Oosterhout AJ, Slebos DJ. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(1):L109-L114.

Vieira RP, de Andrade VF, Duarte AC, Dos Santos AB, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(4):L670-L679.

Voswinckel R, Motejl V, Fehrenbach A, Wegmann M, Mehling T, Fehrenbach H, Seeger W I. Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. *Eur Respir J*. 2004;24:524-532.

Yang SR, Chida AS, Bouter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L46-L57.

Wada H, Yoshida S, Suzuki H, Sakairi Y, Mizobuchi T, Komura D, Sato Y, Yokoi S, Yoshino I. Transplantation of alveolar type II cells stimulates lung regeneration during compensatory lung growth in adult rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;143(3):711-719.

Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(6 Pt 1):1422-1428.

Wright JL. Emphysema: concepts under change; a pathologists perspective. *Mod Pathol*. 1995; 8:873–880.

Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:L1-L15.