RODRIGO DE LAS HERAS KOZMA

Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2012

RODRIGO DE LAS HERAS KOZMA

Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Kozma, Rodrigo de Las Heras.
Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro. / Rodrigo de Las Heras Kozma. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Modelos experimentais de doenças pulmonares.

Versão do título para o inglês: Experimental model of pulmonary emphysema by exposure of cigarrete smoke.

1. Enfisema pulmonar 2. Modelo animal 3. Fumaça de cigarro 4. Aparato para exposição à fumaça de cigarro I. Paes, Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0115/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Rodrigo de Las Heras Kozma.

Título da Dissertação: Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro.

Orientador(a): Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "***Transplante autólogo de células mesenquimais em modelo animal de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro***", Registro n° 001/2011, sob responsabilidade do(a) Pesquisador **João Tadeu Ribeiro Paes**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido no período de Setembro/2010 a Dezembro/2012, sendo que o Relatório Parcial deverá ser entregue em Dezembro/2011 e o Relatório Final em Janeiro/2013.

Assis, 21 de outubro de 2011.

Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Av. Dom Antônio, 2100 - ASSIS/SP - CEP. 19806-900 - Fone: (18) 3302-5740 – 3302-5811
http//www.assis.unesp.br – e-mail:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER DA CEUA/FCL/UNESP-ASSIS

Registro nº : 001/2011
Título da Pesquisa/Aula: Transplante autólogo de células mesenquimais em modelo animal de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro
Executor/Professor Responsável: Rodrigo de las Heras Kozma
Orientador Responsável: João Tadeu Ribeiro Paes
Colaborador(es):

Em reunião realizada nesta data, tendo em vista a legislação vigente no que tange ao respeito aos princípios éticos na experimentação animal, a CEUA considerou o protocolo:

(X) APROVADO, com as seguintes deliberações:

- É vetada a coexistência de ratos e camundongos no mesmo espaço, ao mesmo tempo (biotério experimental onde a experiência está sendo realizada) pois o rato, sendo predador do camundongo, vai ocasionar situação de stress;
- É obrigatória a manutenção de animais controle em ambiente livre da fumaça de cigarro;
- É obrigatória a existência de duas caixas semelhantes: uma para inalação da fumaça do cigarro e outra para animais controle.

RELATÓRIOS: Parcial: Dezembro/2011
Final: Janeiro/2013

Assis, 21 de outubro de 2011.

Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Av. Dom Antônio, 2100 - ASSIS/SP - CEP. 19806-900 - Fone: (18) 3302-5740 – 3302-5811
http//www.assis.unesp.br – e-mail:

Aos meus pais, familiares e amigos

por todo apoio durante meus estudos.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, meu orientador, por todo o apoio e paciência durante meus estudos.

A equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular, Gente Cel, Talita Stessuk, Válter Abraão Barbosa de Oliveira, Nathália Longhini, Edson Marcelino, Camila Yamashita, Ana Catarina Stenico, Antônio Assay e Laila Mariê Francisco, por toda ajuda durante a execução do projeto.

Aos meus pais, Emilia Bravo e Roberto Kozma, por todo incentivo e força.

Ao meu irmão, Lucas Kozma, pelo ombro amigo durante as fases mais complicadas.

A minha madrasta, Eliana Kozma, por toda sabedoria e conhecimento transmitido à minha pessoa.

A Dra. Isabel Cristina Cherice Camargo, por toda ajuda prestada e apoio durante as fases do meu mestrado.

Ao Laboratório de Terapêutica Experimental, LIM 20, em especial ao Dr. Milton. Arruda Martins e a Dra. Fernanda Lopes por todo o suporte e experiência passados.

A Faculdade de Medicina de Catanduva, em especial a Dra. Maria José Ribeiro Paes, pela ajuda e amizade que construímos juntos.

“Os obstáculos não devem impedir você.

Se você se deparar com um muro, não vire e desista.

Imagine como fazer para pular, atravessar ou dar a volta.”

(Michael Jordan)

RESUMO

Kozma RH. Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) destaca-se como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O enfisema pulmonar, dentro do espectro das DPOC, apresenta como principal característica o alargamento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal resultante da destruição do parênquima pulmonar, sem fibrose significativa. O tabagismo é considerado o principal fator relacionado ao surgimento da patologia. Considerando a escassez de aparelhos comercializados para exposição à fumaça de cigarro, bem como o elevado custo dos existentes, o presente projeto propôs um modelo de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro em ratos utilizando um novo aparato. Foram realizadas avaliações morfométricas e funcionais nos pulmões de animais expostos à fumaça ou ao ar ambiente. Além disso, o peso dos animais foi aferido semanalmente. Os resultados mostraram redução do ganho de peso nos animais expostos. Com relação aos parâmetros morfométricos, houve aumento no valor do intercepto linear médio (Lm) nos animais expostos à fumaça, o que reflete o alargamento dos espaços aéreos resultante da destruição do parênquima pulmonar. Os dados funcionais por sua vez mostraram não haver diferença significativa entre os grupos expostos à fumaça ou ao ar. O corrente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um aparelho que represente uma alternativa menos custosa e altamente eficiente para a realização de estudos experimentais relacionados à indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça.

Palavras-chave: Enfisema pulmonar. Modelo animal. Fumaça de cigarro. Aparato para exposição à fumaça de cigarro.

ABSTRACT

Kozma RH. Experimental model of pulmonary emphysema by exposure of cigarette smoke. [masters thesis (Biotechnology)] São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

The Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) stands out as a serious public health problem in Brazil and in the world. The pulmonary emphysema, in the spectrum of COPD, has as main feature the enlargement of the airspaces distal to terminal bronchioles resulting from destruction of lung parenchyma without significant fibrosis. Smoking is considered the main factor related to the development of pathology. Considering the lack of machines marketed for exposure to cigarette smoke, as well as the high cost of devices available, the currently project has proposed a model of pulmonary emphysema induced by cigarette smoke exposure in rats by the use of a new apparatus. Were performed morphometric and functional measurements in the lung of animals exposed to cigarette smoke or clean air. Further, the animal weight was measured weekly. The results showed reduction of the weight gain in the exposed animals. Regarding the morphometric parameters the results showed increase in the value of the mean linear intercept (Lm) in animals exposed to cigarette smoke, which reflects the enlargement of the airspaces resulting from destruction of lung parenchyma. The functional data on the other hand not showed difference between groups exposed to smoke or air. The current study aimed to the development of a machine that represents a less expensive alternative and highly efficient for experimental studies related to the induction of pulmonary emphysema by exposure to smoke.

KeyWords: Pulmonary emphysema. Animal model. Smoke cigarette. Smoke cigarette apparatus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da hipótese do desequilíbrio protease-antiproteases.....19

Figura 2 - Principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia do enfisema pulmonar.....21

Figura 3 - Visão geral do CS Generator ®.....33

Figura 4 - TE-2 Manual Smoking Machune®.....34

Figura 5 - In Expose®.....35

Figura 6 - Aparato para exposição à fumaça de cigarro.....39

Figura 7 - Esquema do aparato para exposição à fumaça de cigarro.....40

Figura 8 - Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória.....42

Figura 9 - Aparato adaptado pelo Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel do Departamento de Ciências Biológicas, UNESP, Campus de Assis, utilizado para perfusão do tecido pulmonar.....44

Figura10 - Retículo empregado para determinação do Lm do parênquima pulmonar.....44

Figura 11 - Variação da média de ganho de peso dos animais experimentais e controle (em gramas) durante 30 semanas de exposição à fumaça de cigarro.....46

Figura 12 - Média de ganho de peso dos animais experimentais e controle após 30 semanas de exposição à fumaça de cigarro.....47

Figura 13 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões esquerdos dos grupos GC e GF 50

Figura 14 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões direitos dos grupos GC e GF.....50

Figura 15 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões direito e esquerdo dos grupos GC e GF.....51

Figura 16 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões direito e esquerdo dos grupos GC e GF.....51

Figura 17 - Fotomicrografias dos cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE).....52

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens entre os principais modelos experimentais para indução de DPOC.....31

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros funcionais dos animais expostos a fumaça de cigarro e os animais controle.....48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bg - Beige mice

cmH_2O - Centímetros de água

dp - desvio-padrão

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Ers - Elastância pulmonar

***f* -** Freqüência

GC - Grupo controle

GF - Grupo fumaça

GOLD - Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, do inglês Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

Gtis - Resistência tecidual

HE - Hematoxilina-Eosina

Htis - Elastância do tecido pulmonar

Hz - Hertz

***i* -** Unidade imaginária

I_{aw} - Inertância das vias aéreas

IFN-γ - Gama Interferon

IL - Interleucina

kg - quilogramas

Lm - Intercepto linear médio

mg - miligramas

mL - mililitros

MMP - Metaloproteinase de matriz

pa - Pallid mice

$\mathbf{P}_{ao}$ - Pressão de abertura das vias aéreas

$\mathbf{P}_{cyl}$ - Pressão interna do cilindro

PEEP - Pressão Positiva Final de Expiração

PPE - Elastase Pancreática de Porco, do inglês porcine pancreatic elastase

p.p.m - Partes por milhão

$\mathbf{R}_{aw}$ - Resistência das vias aéreas

Rrs - Resistência pulmonar

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral

Tsk - Tight skin

V - Volume

V’ - Fluxo

V_{cyl} - Posição do pistão

x - Média

Zrs - Impedância do sistema respiratório

µm - micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....18
1.1 DPOC e enfisema pulmonar.....18
1.2 Modelos experimentais de DPOC.....22
1.2.1 Indução de DPOC pelo do uso de proteases.....23
1.2.2 Modelos genéticos de DPOC.....25
1.2.3 Modelos de indução de DPOC por exposição à fumaça de cigarro.....26
1.3 Aparatos comercias para exposição à fumaça de cigarro.....32
2 OBJETIVOS.....37
2.1 Objetivo principal.....37
2.2 Objetivos secundários.....37
3 METODOLOGIA.....38
3.1 Animais.....38
3.2 Grupos experimentais.....38
3.3 Avaliação do ganho de peso.....38
3.4 Aparato para exposição à fumaça de cigarro.....38
3.5 Modelo experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro.....41
3.6 Mecânica ventilatória.....41
3.7 Procedimento para retirada dos pulmões.....43
3.8 Análise histológica.....43
3.9 Morfometria - medida do Intercepto Linear Médio (Lm).....44
3.10 Análise estatística.....45
3.11 Aspectos éticos do projeto.....45
4 RESULTADOS.....46
4.1 Influência da exposição à fumaça de cigarro sobre o ganho de peso.....46
4.2 Análise funcional.....48
4.3 Análise morfométrica.....49
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....55
REFERÊNCIAS.....60

1 INTRODUÇÃO

1.1 DPOC e Enfisema Pulmonar

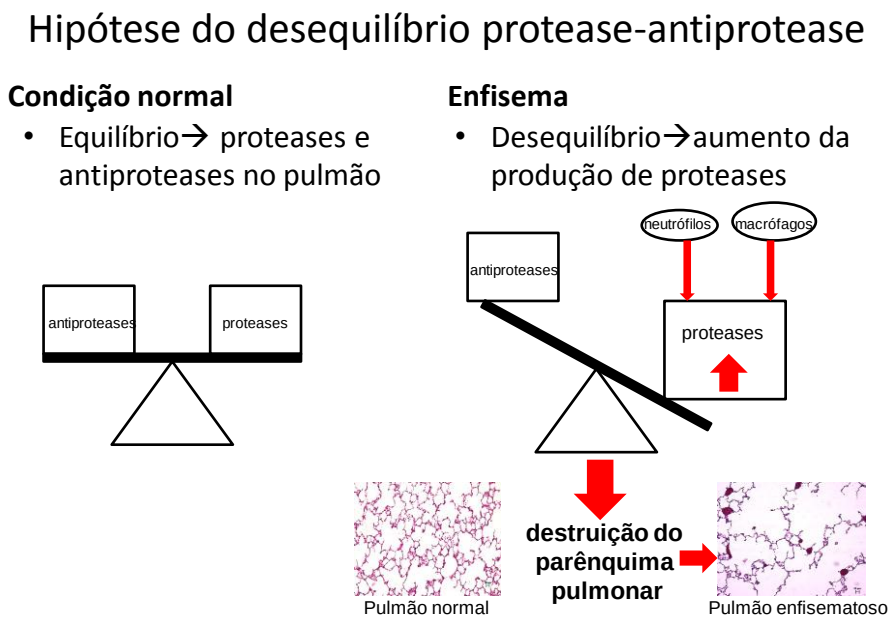
A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) destaca-se como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A DPOC apresenta alta prevalência e elevado custo econômico-social ocupando assim o patamar de quinta principal causa de morte. Projeta-se que será a terceira causa de morte em 2020 (Campos, 2003; Global Initiative for Chronic Obstrutive Lung Disease, 2009; Lopez et al., 2006; Mannino, 2011; Murray e Lopez, 1997). Considerando-se que os tabagistas representam cerca de 24% da população brasileira e que, do total de fumantes, 15 % irão desenvolver DPOC , pode-se estimar uma prevalência de 5 a 6 milhões de pessoas acometidas por doença pulmonar obstrutiva no Brasil (Jardim et al., 2004; Oliveira et al., 2000) . Considerando-se também os aspectos epidemiológicos, como a alta morbidade e mortalidade, bem como o impacto social e familiar provocados por essa condição patológica, há uma intensa pesquisa visando novas alternativas de tratamento (Ribeiro-Paes et al., 2011).

Segundo a Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (GOLD), o termo DPOC refere-se a patologias que apresentam, concomitantemente, caráter crônico e obstrutivo, com limitação da capacidade respiratória não totalmente reversível, sendo geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases tóxicos. De acordo com essas características compõe o conjunto da DPOC a bronquite crônica e o enfisema pulmonar (Cosio e Agustí, 2011; GOLD, 2009; Manino, 2011; Sangani e Ghio, 2011).

O enfisema pulmonar, dentro do espectro das DPOC, apresenta como principal característica o alargamento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal resultante da destruição do parênquima pulmonar, sem fibrose significativa. O prejuízo oxidativo, decorrente da ação de espécies reativas de oxigênio condicionado ao pulmão, bem como a inflamação verificada como resposta a agentes irritantes, tais como os provenientes da poluição atmosférica e fumaça do cigarro, contribuem para a aceleração da perda funcional e morfológica, com limitação lenta e gradual das trocas gasosas (Lee et al., 2011). Como consequência, o paciente evolui para um quadro de dispnéia progressiva que em estágios mais avançados está presente até mesmo ao realizar tarefas simples, como tomar banho e barbear-se (Anciães et al., 2011; Barnes et al., 2003; GOLD, 2009; Oliveira et al., 2000).

A hipótese mais aceita para explicar a patogênese do enfisema pulmonar propõe um possível desequilíbrio entre proteases responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar e antiproteases que inibem a ação das enzimas proteolíticas (Rufino et al., 2006). A Figura 1 mostra um esquema representativo da hipótese de desequilíbrio proteases-antiprotease.

Figura 1 - Esquema representativo da hipótese do desequilíbrio protease-antiproteases.



Em condições normais, o efeito destrutivo das proteases produzidas naturalmente é inibido pela produção de antiproteases (α1-antitripsina). Em contrapartida, em indivíduos que apresentam quadro enfisematoso, ocorre um aumento da produção de proteases (macrófagos e neutrófilos), gerando um desequilíbrio que resulta na destruição do parênquima pulmonar.
Fonte: Kozma (2012).

Dentre os principais tipos celulares relacionados à fisiopatologia da DPOC destacam-se os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD8+ (Rufino et al., 2006). Além destes tipos celulares as células epiteliais presentes no próprio tecido pulmonar são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios quando ativadas por fatores irritantes exógenos, que contribuem para a progressão do processo inflamatório ligado a DPOC (Takizawa et al., 2001).

As manifestações fisiopatológicas do enfisema são resultantes de um processo de inflamação crônica e estresse oxidativo persistente mediado primeiramente pelos macrófagos (células-chave da imunidade inata). Os neutrófilos são responsáveis pela liberação de enzimas

elastolíticas, como a elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase-3, que estão intimamente ligadas e destruição do parênquima pulmonar e ao processo inflamatório (Rufino et al., 2006). Adicionalmente, essas células secretam outras substâncias, como a interleucina-8 (IL-8), que promovem a quimiotaxia e ativação de outros neutrófilos, amplificando o processo inflamatório neutrofílico (Do e Chin, 2012; Rufino et al., 2006).

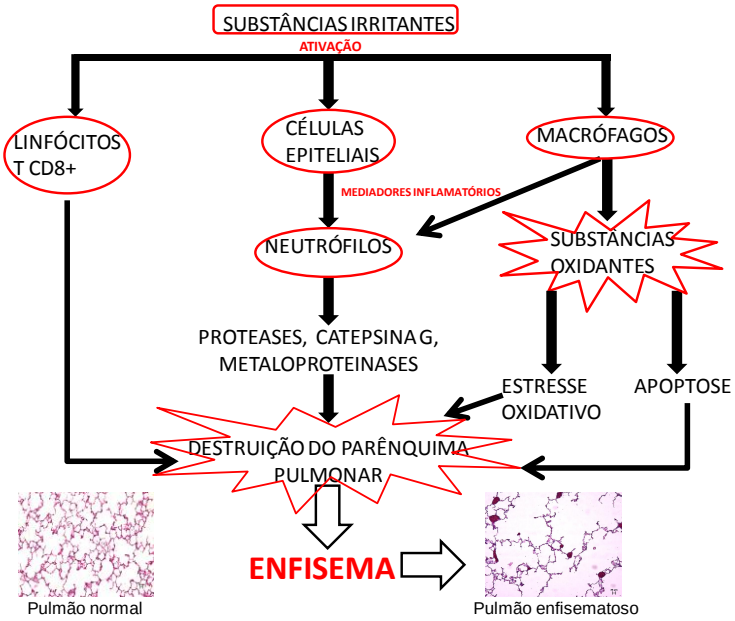
Os macrófagos alveolares ativados por fatores exógenos, como a matéria particulada que constitui a fumaça de cigarro, promovem a secreção de elastase, além de mediadores inflamatórios (IL-8, fator de necrose tumoral – TNF-α) responsáveis pela ativação dos neutrófilos, espécies reativas de oxigênio e as metaloproteinases de matriz (MMPs), (Do e Chin, 2012; Russel, 2002).

A ativação dos linfócitos T CD8+ leva a citólise de células infectadas ou alteradas do hospedeiro por meio da liberação do gama interferon (IFN-γ) e do TNF-α (Rufino et al., 2006). Em contrapartida, é demonstrado na literatura, que a ativação excessiva ou anormal dessas células em modelos experimentais de DPOC resulta em lesões pulmonares (Barnes, 2004; Rufino et al., 2006).

O processo inflamatório persistente, bem como o estresse oxidativo induzido por partículas tóxicas levam a apoptose anormal das células do trato respiratório, com consequente rompimento do citoplasma dessas células e liberação de mediadores inflamatórios, o que resulta em uma amplificação da doença (Demets et al., 2006).

Considerando esses aspectos pode-se inferir que os principais mecanismos responsáveis pelo surgimento e desenvolvimento da doença incluem estresse oxidativo induzido por partículas tóxicas (principalmente fumaça de cigarro), processo inflamatório persistente, degradação da matriz extracelular resultante da atividade lítica das proteases, além da apoptose e reparação anormal das células alveolares (MacNee e Tuder, 2009; Sangani e Ghio, 2011; Yoshida e Tuder, 2007). Os principais mecanismos e células envolvidas no desenvolvimento do enfisema pulmonar estão representados na Figura 2.

Figura 2 - Principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia do enfisema pulmonar.



Substâncias irritantes como as presentes na fumaça de cigarro são responsáveis pela ativação de diversos tipos celulares, como os macrófagos e células epiteliais. A liberação de mediadores inflamatórios leva a ativação de neutrófilos, que secretam proteases, responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar. Outros mecanismos como o estresse oxidativo e a apoptose anormal das células do trato respiratório contribuem para o desenvolvimento do enfisema pulmonar.
Fonte: Kozma (2012).

A grande maioria, cerca de 90 %, dos casos de DPOC apresenta um padrão multifatorial, relacionado à interação entre fatores genéticos e agentes agressores. Uma outra parcela, menos significativa do ponto de vista epidemiológico, que corresponde à cerca de 1 a 3% dos casos, é decorrente da deficiência da protease sérica α1-antitripsina, anomalia genética com padrão de herança autossômico recessivo (Ribeiro-Paes et al., 2009). Os demais fatores de risco incluem: tabagismo, vapores e resíduos ocupacionais, poluição atmosférica, idade, infecções, asma, bem como fatores socioeconômicos (GOLD, 2009).

O tabagismo, contudo, é consolidado como a principal causa relacionada à DPOC, seja por exposição ativa ou passiva à fumaça de cigarro e corresponde a 15 - 20% dos casos clínicos de enfisema pulmonar. A fumaça do cigarro possui em suas fases gasosa e particulada uma quantidade considerável de substâncias oxidantes. Estima-se em torno de 1.017 o número de tipos de partículas presentes na fumaça de cigarro. As células epiteliais ativadas pela fumaça de cigarro ou por meio de outros agentes nocivos produzem mediadores inflamatórios, que por sua vez, proporcionam a ativação de diversos tipos de células do sistema de defesa,

como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B (Hellermann et al., 2002; Huang et al., 2001). Em fumantes o aumento de macrófagos no tecido e no espaço alveolar, estimulados pelas células dendríticas em contato com substâncias exógenas, é em média 25 vezes maior em relação aos não fumantes. Em enfisematosos os macrófagos situados nas paredes alveolares são ativados em resposta à fumaça de cigarro, o que resulta na liberação de mediadores inflamatórios e diversas espécies de oxigênio reativo. Além da destruição alveolar, a fumaça de cigarro induz disfunção endotelial e remodelamento vascular pulmonar com proliferação anormal de células pouco diferenciadas (Antunes e Rocco, 2011; Barnes et al., 2003; Elwing e Panos, 2008; Retamales et al., 2001; Russel et al., 2002).

As diversas estratégias clínicas, associadas às técnicas de reabilitação pulmonar, têm, inegavelmente, contribuído para o prolongamento e melhora na qualidade de vida dos portadores de enfisema. Apesar dos avanços significativos resultantes da introdução de novas abordagens terapêuticas medicamentosas e de reabilitação, não se logrou até o presente uma forma de tratamento eficaz, que não componha a esfera paliativa. O tratamento cirúrgico envolve procedimentos de alta complexidade e, no caso específico do transplante pulmonar, a escassez de doadores. Considerando esses aspectos, vários modelos experimentais têm sido propostos, objetivando o avanço no conhecimento sobre os processos fisiopatológicos e novas abordagens terapêuticas do enfisema pulmonar (Fusco et al., 2005; GOLD, 2009; Martorana et al., 1989; Mahadeva e Shapiro, 2002; Nikula et al., 2000; Ribeiro-Paes et al., 2009, 2011).

1.2 Modelos Experimentais de DPOC

Tendo em vista o aspecto paliativo dos tratamentos existentes para a DPOC, a utilização de modelos animais para estudo da doença é uma ferramenta muito importante, uma vez que pode mimetizar uma série de características da doença humana. Os modelos experimentais de DPOC possibilitam, dessa forma, estudos sobre a fisiopatologia da doença, além da aplicação de novas abordagens terapêuticas. Dentre os modelos existentes na literatura, destacam-se o uso de proteases, exposição à fumaça de cigarro e a utilização de linhagens que apresentam mutações naturais ou induzidas por manipulação genética.

1.2.1 Indução de DPOC pelo do uso de proteases

O uso de modelos animais de indução de enfisema por meio da instilação de proteases tem importante papel no entendimento da hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease que explica o desenvolvimento do enfisema pulmonar (March et al., 2000). A utilização das proteases, principalmente a elastase apresenta uma série de vantagens que fazem deste um modelo amplamente estudado (March et al., 2000). Trata-se de uma metodologia simples, de fácil aplicação e, portanto altamente reprodutível (March et al., 2000; Shapiro, 2000). Os sintomas referentes à doença aparecem rapidamente, cerca de 21 dias em camundongos, se comparadas a outras metodologias, como o uso de fumaça de cigarro (cerca de 6 meses para o aparecimento dos sintomas em camundongos) (Wright et al., 2008). Outro aspecto interessante do modelo é a reprodução de várias características da doença humana, relacionados principalmente a morfologia (destruição do parênquima pulmonar) (Fujita e Nakanishi, 2007; March et al., 2000; Shapiro, 2000).

A metodologia de instilação intratraqueal de papaína, proposta pioneiramente por Gross e colaboradores, em 1965, representa um modelo original para indução de enfisema pulmonar utilizando esse tipo de metodologia. A partir dos resultados obtidos por Gross et al. (1965) uma série de modelos de indução de enfisema por instilação de papaína foram criados, buscando ampliar as bases do conhecimentos sobre as características fisiopatológicas da doença, bem como na busca de novas vertentes terapêuticas para o tecido pulmonar lesado aguda ou cronicamente (Anciães et al., 2011; Fló et al., 2006; Fujita e Nakanishi, 2007; Fusco et al., 2002; Pushpakom et al., 1970).

Pushpakom et al. (1970) induziram enfisema em cães por meio de instilação intra-traqueal de papaína, gerando quadro similar ao enfisema panlobular humano. Hyatt et al. (2000) testando também a indução por meio de papaína obtiveram resultados satisfatórios, para um modelo de enfisema em cães. Fusco et al. (2002) obtiveram um modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzidos por papaína, demonstrando manifestação fisiopatológica do enfisema após um curto período de tratamento, aproximadamente 40 dias. Em outro estudo, Anciães et al. (2011) realizaram instilação de papaína em modelo murino e posterior análise de parâmetros morfométricos e mecânicos (1, 3, 15, 28 e 40 dias após a instilação). Os resultados mostraram alterações morfométricas e funcionais indicando a presença do enfisema 28 dias após a instilação. Não foram observadas alterações funcionais 40 dias após a instilação, apesar disso, os parâmetros morfométricos mantiveram-se alterados,

indicando a persistência da doença. Dessa forma, o estudo demonstrou que os parâmetros moformétricos apresentaram-se mais confiáveis com relação à detecção do enfisema em modelo experimental, em comparação a análise funcional medida por meio da mecânica respiratória.

Dentre as proteases conhecidas, a elastase pancreática de porco (porcine pancreatic elastase - PPE) é a mais amplamente utilizada. A instilação intratraqueal de PPE resulta em alargamento rápido e significante dos espaços aéreos pulmonares, seguido de acúmulo neutrofílico e macrofágico no pulmão, além de hemorragia (Fujita e Nakanishi, 2007; Kawakami et al., 2008; Shapiro, 2000). O aumento dos espaços aéreos é resultante da degradação da elastina e a posterior deposição desorganizada das fibras elásticas, o que leva à perda do poder de retração elástica do tecido pulmonar (Antunes e Rocco, 2011; Kuhn et al., 1976; March et al., 2000; Shapiro, 2000; Snider e Lucey, 1986). Desta forma, a instilação de elastase promove, em modelos animais, lesão estrutural e inflamação sistêmica semelhantes ao enfisema pulmonar humano (Antunes e Rocco, 2011). A indução do enfisema por proteases apresenta como vantagens a praticidade e rapidez do procedimento, e reforça a hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease na etiopatogenia do enfisema. Além disso, os modelos experimentais de indução de enfisema por meio da instilação de elastase geram alterações morfológicas e funcionais que são detectáveis após longos períodos posteriores à administração da protease (Antunes e Rocco, 2011).

Apesar predominância dos modelos empregando PPE, outras elastases também são utilizadas para indução de enfisema pulmonar em modelos animais, como a elastase neutrofílica (Janoff et al., 1977; Shapiro, 2000; Senior et al., 1977) e as proteinases-3 (Kao et al., 1988; Shapiro, 2000). Todas estas enzimas podem determinar quadros de destruição do parênquima pulmonar de padrão enfisematoso, resultante da digestão protéica do tecido pulmonar (Shapiro, 2000).

Uma série de estudos demonstram que a severidade do enfisema gerado está relacionada à dosagem enzimática administrada (Antunes e Rocco, 2011; Kawakami et al., 2008; Lüthje et al., 2009). Kawakami et al. (2008) realizam análise seqüencial e quantitativa em modelo murino de enfisema por meio da instilação de elastase. Os resultados mostram persistência das alterações morfológicas no tecido pulmonar após 4 semanas da administração da protease. Em 2009, Lüthje et al. demonstraram que instilações repetidas de elastase induzem estado enfisematoso mais severo em modelo animal, quando comparado a

administração de uma única dose. As principais alterações observadas foram a diminuição da capacidade dos animais se exercitarem, perda de peso e hipertensão pulmonar.

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pelo modelo, existem vários aspectos divergentes entre os resultados obtidos pela aplicação dessa metodologia e a doença humana. Com relação à fisiopatologia da doença, um aspecto relacionado a esse tipo de modelo é a ausência de componentes inflamatórios, responsáveis pela obstrução das vias aéreas e por conseqüência do fluxo aéreo, existentes no quadro fisiopatológico do enfisema humano (March et al., 2000). Além disso, a destruição gerada pela instilação de elastase em alguns modelos murinos não se mostrou progressiva, apresentando localização paracinar, ao contrário das lesões predominantemente presentes no enfisema humano, que são centriacrinares (March et al., 2000). Essas diferenças podem estar ligadas às diferenças anatômicas existentes entre humanos e camundongos, como por exemplo, a menor quantidade de bronquíolos e ramificações presentes nos modelos murinos (March et al., 2000).

Em resumo, não obstante as desvantagens apresentadas pelos modelos de indução de DPOC por meio da instilação de proteases, a simplicidade e a alta reprodutividade justificam seu amplo uso nos estudos relacionados à doença, principalmente na avaliação da eficácia de alternativas terapêuticas, como o uso de fármacos, com o potencial de reparação do tecido pulmonar lesado pela ação proteolítica das enzimas (Antunes e Rocco, 2011; Shapiro, 2000).

1.2.2 Modelos genéticos de DPOC

Atualmente são conhecidas varias linhagens de camundongos que apresentam mutações naturais ou induzidas (*gene targeting*), que geram anormalidades no desenvolvimento animal culminando no surgimento da DPOC (Shapiro, 2000; Wright et al., 2008). As mutações geralmente estão relacionadas à baixa ou disfuncional produção de proteínas relacionadas à arquitetura pulmonar, ou à antiproteases, como a α_1-antitripsina. Entre as linhagens descritas, a Tight skin (Tsk-/+), Pallid mice (pa/pa) e Beige mice (bg) estão entre as mais estudadas (March et al., 2000).

Os camundongos Tsk-/+ apresentam uma mutação no gene da fibrilina-1, proteína relacionada à organização das fibras elásticas que compõe o tecido pulmonar (Kietly et al., 1998). Os animais portadores dessa mutação apresentam alargamento torácico e distensão pulmonar precocemente. Com relação aos aspectos morfológicos, mostram aumento irregular dos espaços aéreos, resultando em um aumento do valor do Intercepto linear médio (Lm).

Outra linhagem natural que desenvolve a DPOC é a Pallid mice (pa/pa), que apresenta deficiência na produção de α_1-antitripsina, porém ao contrario da linhagem Tsk-/+, apresentam destruição do parênquima pulmonar moderada e de ocorrência mais tardia (Kietly et al., 1998; March et al., 2000; Martorana et al., 1995). Os camundongos Beige mice (bg) desenvolvem alterações no tecido pulmonar características da DPOC (Keil, 1996; March et al., 2000) resultantes de deficiência na formação de grânulos neutrofilicos primários (Nagle et al., 1996; Perou et al., 1996; Shapiro, 2000), porém sua capacidade de desenvolvimento de enfisema pulmonar ainda é controversa (Shapiro, 2000).

O uso de camundongos como ferramenta para estudo do enfisema pulmonar não se limita apenas às linhagens naturais. Uma série de trabalhos propõem a criação de linhagens obtidas por meio da manipulação do genoma desses animais (Brusselle et al., 2006; Mahadeva e Shapiro, 2002; Tuder et al., 2003; Vlahos et al., 2006). A geração de camundongos transgênicos e *gene target* se mostra como uma poderosa ferramenta para o estudo dos aspectos fisiopatológicos de uma série de doenças, dentre elas a DPOC (Shapiro, 2000).

A criação e utilização de modelos genéticos é uma ferramenta de grande importância para o estudo da DPOC, uma fez que as linhagens mimetizam uma série de aspectos ligados a fisiopatologia da doença humana, principalmente em relação à deficiência da α_1-antitripsina presente nas linhagens *Tsk e pa* (March et al., 2000). Outro aspecto importante refere-se ao entendimento do papel de determinadas proteases no desenvolvimento da patologia, assim como dos processos inflamatórios envolvidos. Com a criação de linhagens de animais deficientes em determinadas proteases é possível um melhor entendimento relativo ao surgimento e evolução do quadro clínico da DPOC.

1.2.3 Modelos de indução de DPOC por exposição à fumaça de cigarro

O uso de enzimas (proteases) para indução de enfisema em modelo animais apesar de eficiente, uma vez que geram o aumento significativo dos espaços aéreos, não reproduzem precisamente os mecanismos de destruição alveolar conseqüentes à inalação de fumaça, e, portanto, não reproduzem a sequência de eventos patológicos característicos do enfisema que ocorre em humanos (Cendon et al., 1997; Wrigth et al., 2008). Tendo em vista este fato, a utilização de modelos animais de enfisema induzido por meio de fumaça de cigarro representa uma tentativa de aproximação dos modelos experimentais com a doença humana,

principalmente em relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na geração do enfisema (Wrigth et al., 2008).

Considerando a fumaça de cigarro como sendo a principal causa para o surgimento e desenvolvimento da DPOC, seria lógico o uso de modelos experimentais a partir dessa metodologia. A exposição crônica à fumaça de cigarro em modelos murinos reproduz uma série de aspectos relacionados à anatomia e fisiopatologia da DPOC humana (enfisema, remodelamento das vias aéreas inferiores e hipertensão pulmonar) (Wright e Churg, 2010). De acordo com os relatos da Primeira Conferência Internacional de Siena em Modelos Animais de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica realizada na Universidade de Siena em 2001, as lesões induzidas usando esse modelo são similares às observadas em humanos enfisematosos, destacando a importância do estímulo por meio de fumaça nos modelos experimentais de DPOC (Hele, 2002).

Apesar disso, modelos animais de indução de DPOC a partir da exposição à fumaça de cigarro são relativamente recentes se comparados a outras metodologias (Wrigth et al., 2008). Até o início da década de 80 os estudos envolvendo a indução de enfisema pulmonar em animais por exposição à fumaça de cigarro eram escassos e sua confiabilidade questionada (March et al., 2000). Huber e colegas em 1981 realizaram, pioneiramente, estudo detalhado sobre modelo de indução de enfisema em animais por exposição à fumaça de cigarro. Alguns resultados obtidos nesse estudo, relacionados a aspectos morfométricos e fisiológicos serviram de base para os estudos que se seguiram.

Posteriormente, Cendon et al. (1997) propuseram um modelo de indução passiva de enfisema por meio de fumaça. Os animais (ratos da linhagem *Wistar*) foram expostos 3 vezes ao dia a 10 cigarros por período, durante 45 e 90 dias. Os pesquisadores analisaram aspectos funcionais, como o fluxo aéreo, o volume pulmonar e também aspectos morfológicos dos animais expostos a fumaça. Os resultados mostraram que após 45 dias de exposição houve a destruição do espaço aéreo distal e diminuição da elastância, além de elevados graus de inflamação, características que se verificam no paciente enfisematoso.

Em trabalho realizado por Xu et al. (2004) ratos *Wistar* foram expostos diariamente à fumaça de cigarro (6 horas de exposição diária), 5 dias por semana, durante 16 semanas (3 meses e meio). A análise dos parâmetros funcionais mostrou um aumento da resistência pulmonar e diminuição da complacência pulmonar nos animais expostos à fumaça de cigarro em relação aos animais não expostos. Esses resultados são coerentes com o padrão respiratório observado em pacientes enfisematosos humanos.

Zheng et al. (2009) realizam análise dinâmica da evolução do enfisema em modelo animal, utilizando ratos da linhagem *Wistar,* expostos 2 horas por dia à fumaça de cigarro. O período de exposição variou de 2 a 36 semanas, sendo analisados aspectos histológicos e funcionais dos animais expostos. Os resultados mostraram que a tempo de exposição está relacionado à gravidade da doença, uma vez que os animais expostos a períodos mais longos (24 e 36 semanas) apresentaram maiores valores de resistência das vias aéreas e elastância, além de maiores valores de intercepto médio (Lm) e uma maior resposta inflamatória, caracterizando quadros mais graves da doença.

Toledo et al. (2012) utilizaram camundongos da linhagem C57Bl/6 para indução de enfisema pulmonar. A exposição dos animais foi realizada diariamente, 30 minutos por dia, 5 dias por semana durante 6 meses. Os resultados demonstraram o desenvolvimento do enfisema pulmonar nos animais expostos à fumaça de cigarro, além da presença de infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar dos animais.

Em estudo com objetivo terapêutico, Huh et al. (2011) expuseram ratos da linhagem Lewis diariamente à 20 cigarros, 5 dias por semana durante 6 meses. Os animais expostos à fumaça de cigarro que não receberam tratamento apresentaram destruição alveolar severa, representada por aumento no valor do intercepto linear médio (Lm), mesmo após a cessação da exposição.

Apesar da grande variedade de modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro, a progressão da doença ainda é pouco estudada em modelos experimentais. Rinaldi et al. (2012) realizaram estudo pioneiro sobre a progressão do enfisema em camundongos expostos à fumaça de cigarro. Os animais dos grupos controle e experimental foram expostos à fumaça de cigarro ou ar ambiente, diariamente, 5 dias por semana, durante 3 e 6 meses. Os animais de ambos os grupos foram divididos em duas séries: na primeira série, parte dos animais dos grupos controle e experimental sofreram duas medições da função pulmonar, a primeira após 3 meses de exposição e a segunda após 6 meses. Os animais da segunda série realizaram apenas uma medição da função pulmonar, após 3 meses de exposição, sendo sacrificados após a coleta dos dados. Os resultados mostraram que após 3 meses de exposição houve aumento significativo da capacidade pulmonar total (TLC) e a complacência pulmonar (Cchord) nos animais expostos à fumaça em relação ao grupo controle. Após 6 meses de exposição, a coleta dos dados funcionais dos mesmo animais mostrou uma maior diferença entre os parâmetros avaliados do grupo exposto e não exposto à fumaça de cigarro.

A análise de estudos prévios demonstra que existe uma série de variáveis que devem ser consideradas com relação ao estudo de modelos experimentais de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro. No que se refere ao número de cigarros bem como o tempo de exposição diário e total há, na literatura, uma grande variação entre diferentes autores. De maneira geral, os melhores resultados são obtidos durante os períodos crônicos de exposição (acima de 6 meses) (Bracke et al., 2006; Wrigth et al., 2008; Zheng et al., 2009).

Quanto aos métodos de exposição, são reportadas duas formas principais: a exposição à fumaça ocorre no animal como um todo (Cendon et al., 1997; Huh et al., 2011; Zheng et al., 2009) ou somente por via nasal (Jardim et al., 2010; Rinaldi et al., 2012; Xu et al., 2004). A exposição do animal como um todo apresenta como fator negativo a possibilidade de ingestão de nicotina e alcatrão durante o comportamento de auto limpeza, o que poderia gerar interferência nos resultados obtidos no estudo. Apesar dessa limitação, os dois procedimentos têm sido empregados como modelo de estudo da fisiopatologia do enfisema pulmonar (Wrigth et al., 2008).

A fumaça que entra em contato com os animais também é um fator divergente entre os modelos existentes. Uma série de estudos utilizam a fumaça da queima do cigarro para indução do enfisema nos animais, o que simularia as condições fisiológicas de um fumante passivo, enquanto que outros realizam a exposição dos animais a fumaça resultante da sucção ("tragada") do cigarro, realizada nesses casos por meio de uma bomba, que emite a fumaça proveniente da sucção do cigarro para outro compartimento, onde se encontram os animais, simulando, dessa maneira, uma condição de um fumante ativo (Huh et al., 2011; Jardim et al., 2010; Toledo et al., 2012; Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2009). Em ambos os casos, ocorre a geração do enfisema nos animais, sendo o grau da doença relacionado ao tempo de exposição (Wrigth et al., 2008). Não existem, no entanto, estudos confrontando as duas metodologias (exposição à fumaça proveniente da queima do cigarro e fumaça proveniente da sucção), o que não permite uma comparação entre o grau do enfisema induzido em animais expostos durante o mesmo período de tempo a cada um dos métodos.

A escolha da espécie animal a ser utilizada para indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça é considerada como fator essencial para construção de um modelo experimental que mimetize de forma fidedigna as características fisiopatológicas da doença humana. Dentre as espécies amplamente reportadas na literatura, estão os roedores (ratos, camundongos e *guinea pig* - *Cavia porcellus*) (Wrigth et al., 2008). O uso de *guinea pig* tem como principal vantagem à geração de enfisema marcante, de fácil reconhecimento se

comparado à doença gerada em outras espécies de roedores. Em contrapartida, o uso dessa espécie demanda elevado custo, além de não permitir uma grande quantidade de estudos moleculares (pobreza de anticorpos) (Wrigth et al., 2008). Outra espécie amplamente utilizada para criação de modelos experimentais de enfisema são os camundongos. O uso dessa espécie animal tem como vantagens a possibilidade de realização de ampla gama de testes moleculares, além da existência de inúmeras linhagens naturais que apresentam diferentes reações a fumaça, tornando-os mais ou menos suscetíveis ao desenvolvimento do enfisema (Bracke et al., 2006; Guerassov et al., 2004; Wrigth et al., 2008). Apesar disso, os camundongos têm como desvantagem a dificuldade de análises funcionais mais detalhadas, devido ao tamanho reduzido dos animais se comparado aos outros roedores (Wrigth et al., 2008). A utilização de ratos como ferramenta para criação de modelos experimentais de DPOC é amplamente descrito na literatura, gerando resultados satisfatórios tanto para exposições à fumaça da queima do cigarro, como em modelos que utilizam bomba de sucção. O uso dessa espécie animal permite a realização de ampla gama de análises funcionais, relativamente aos camundongos (Huh et al., 2011; Xu et al., 2004; Zheng et al., 2009). Em contrapartida, essa espécie tem como principal desvantagem o fato da doença gerada ser mais branda sob o aspecto fisiopatológico, o que pode dificultar a comparação de parâmetros funcionais dos animais expostos à fumaça de cigarro em relação aos não expostos (Wrigth et al., 2008).

Não obstante ao grande número de estudos utilizando modelos de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro, há uma série de limitações metodológicas relacionadas ao uso desses modelos, tais como, o emprego de diferentes tipos de câmaras inaladoras, necessidade de longo período de exposição à fumaça (cerca de 6 meses), quantidade de cigarros inalados por dia, que dificultam a reprodutibilidade dos modelos experimentais (Fox e Fitzgerald, 2004; Jardim et al., 2010; Zheng et al., 2009;). A maior limitação dessa metodologia, porém, está no fato da doença gerada em modelos animais corresponder a estágios GOLD I e II da patologia humana (estágios mais brandos da doença) (GOLD, 2009; Wrigth et al., 2008). Além disso, em pacientes humanos que se encontram em estágios avançados da doença (estágios GOLD III e IV), ocorre a progressão da DPOC mesmo após o paciente ter abandonado o hábito tabágico (Churg et al., 2011). Em modelos experimentais esse fenômeno não é observado, uma vez que a cessação da exposição resulta em um enfisema estável e não progressivo (Wrigth et al., 2008). Outro aspecto controverso está relacionado à persistência do processo inflamatório em modelos animais. Enquanto alguns

estudos demonstraram que após o término da exposição à fumaça houve persistência do processo inflamatório, em outros modelos ocorre a diminuição da resposta inflamatória nos pulmões após a cessação da exposição (Churg et al., 2011; Motz et al., 2008; Wright e Churg, 2002). Apesar dos questionamentos envolvendo alguns parâmetros relacionados aos modelos de indução de enfisema utilizando fumaça de cigarro, trata-se uma abordagem promissora no que concerne à aproximação com um modelo de patologia humana, principalmente quanto aos aspectos fisiopatológicos e morfológicos que caracterizam a DPOC em seres humanos (March et al., 2000; Wright e Churg, 2010).

O quadro a seguir apresenta, de forma sintética, uma comparação entre os principais modelos animais de indução de DPOC, destacando as vantagens e desvantagens das diferentes metodologias empregadas (Fujita e Nakanishi, 2007; March et al., 2000; Shapiro, 2000; Zheng et al., 2009).

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens entre os principais modelos experimentais para indução de DPOC

(continua)

Modelo de indução de DPOC	**Vantagens**	**Desvantagens**
Instilação de proteases	- Método simples, fácil aplicação - Resultados rápidos - Alta reprodutividade -Aspectos morfológicos semelhantes à doença humana	- Pobreza de constituintes inflamatórios - Geração de lesão paracinar (menos comum na doença humana) - Mascaramento de efeitos de outras substancias inaladas - Processo fisiológico que culmina surgimento da doença é diferente do humano
Modelos genéticos	- Reproduzem vários aspectos da patologia, principalmente em relação à deficiência de α_1-antitripsina - Demonstram o papel das diferentes proteases e outras proteínas no desenvolvimento da doença - Possibilidade de manipulação dos genes pelo pesquisador	- Necessidade de mais estudos com relação a aspectos ligados a mecanismos inflamatórios e destruição do tecido pulmonar - Reprodução individual dos aspectos ligados a patologia - Limitação quanto a aspectos fisiológicos da doença

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens entre os principais modelos experimentais para indução de DPOC

(conclusão)

Fumaça de cigarro	- Reprodução de uma série de aspectos ligados a DPOC, inclusive com relação aos processos inflamatórios envolvidos - Lesão centrolobular, a de maior incidência em pacientes enfisematosos - Modificações nas vias aéreas condizentes com as que ocorrem na doença humana - Tempo para aparecimento dos sintomas semelhante com a patologia em humanos	- Questionamento com relação à confiabilidade do modelo - Cuidado na comparação dos resultados em roedores em humanos, devido a diferenças na anatomia das espécies - Longo tempo de exposição para surgimento dos sintomas Parâmetros de tempo diário e total de exposição muito variáveis - Câmaras de indução diferentes, questionamento quanto à confiabilidade

Fonte: Adaptado de Ribeiro-Paes et al. (2012).

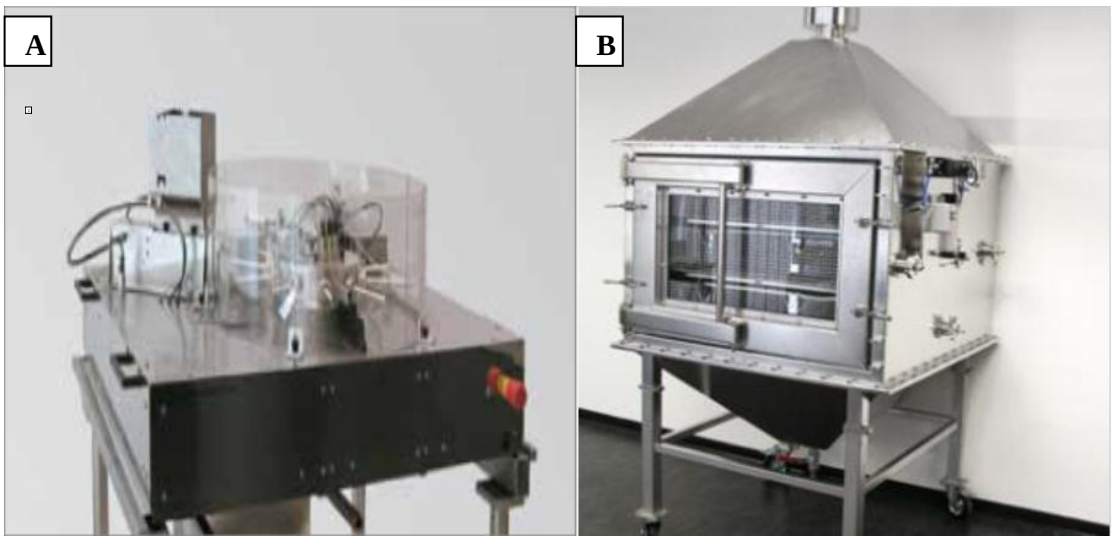
Tendo em vista todos os aspectos abordados, pode-se inferir a grande importância dos modelos experimentais, sobretudo no que concerne à ampliação do conhecimento sobre aspectos fisiopatológicos da DPOC, muito embora, como comentado anteriormente, nenhum desses modelos mimetize por completo todas as características que compõe a doença humana (Wright et al., 2008). Os resultados obtidos em modelos animais poderão fundamentar a elaboração de novas alternativas terapêuticas com consequente ampliação na sobrevida e melhora na qualidade de vida dos pacientes com DPOC (Ribeiro-Paes et al., 2012).

1.3 Aparatos comercias para exposição à fumaça de cigarro

Apesar do grande número de estudos utilizando modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro existem poucos aparatos de exposição comercializados no mercado. De forma geral, o aparato básico descrito por diferentes autores e empresas, consiste em um módulo de queima de cigarro conectado a uma câmara onde os animais são colocados (Huh et al., 2011; Rinaldi et al., 2012; Toledo et al., 2012; Xu et al., 2004; Zheng et al., 2009).

Vale destacar alguns modelos comerciais disponíveis no mercado. A empresa TSE-systems produz um aparato denominado CS Generator ® (TSE systems International Group, Bad Homburg, Hessen, Alemanha) (Figura 3), que apresenta dois modos para exposição: um sistema completamente automático (carregamento, recarregamento, tragada e ejeção do cigarro) e outro semi-automático (acendimento manual). Ambos os modelos expõe todo o corpo do animal à fumaça. O aparato é capaz de coletar tanto a fumaça proveniente da queima quanto da tragada do cigarro, além de permitir a regulagem dos tempos de tragada de cada cigarro. O CS Generator ® possibilita a exposição de modelos murinos não somente à fumaça de cigarro, mas também à fumaça proveniente de outras fontes, como da combustão de combustíveis fósseis (utilização de peças adaptadoras). Em estudo realizado por Huang et al. (2008) utilizando o CS Generator ® ratos da linhagem Wistar foram expostos aos gases provenientes do sistema de exaustão de motocicletas, diariamente por duas horas, durante quatro semanas. Os pesquisadores puderam constatar alterações histológicas nos tecidos reprodutores e diminuição da fertilidade dos animais expostos. Apesar dos resultados obtidos utilizando esse aparato, não é possível encontrar na literatura estudos que utilizem o CS Generator ® para indução de enfisema pulmonar em modelos animais.

Figura 3 - Visão geral do CS Generator ®.



Em detalhe, Sistema automático de captação de fumaça (A). Câmara de inalação para animais (B).
Fonte: TSE systems International Group (2012).

Outro aparato para exposição à fumaça de cigarro existente atualmente no mercado é o TE-2 Manual Smoking Machune® (Teague Entrepises, Woodland, Califórnia, EUA) (Figura 4), produzido pela Teague Entrepises. O aparato é composto por uma câmara de inalação hermeticamente fechada, que comporta até quatro gaiolas para ratos (três ratos por gaiola). Os

cigarros são carregados e ejetados manualmente, sendo que o aparelho é capaz de tragar até dois cigarros simultaneamente. A exposição da fumaça ocorre por todo o corpo do animal. Além disso, o aparato é capaz de coletar tanto a fumaça proveniente da queima do cigarro como a da tragada. D' Agostini et al. (2001) realizaram estudo sobre modelo de tumor pulmonar utilizando o TE-2 Manual Smoking Machune®. Três linhagens de camundongos foram expostas diariamente (6 horas diárias) a três condições: fumaça da queima do cigarro, fumaça da tragada e um condensado composto por ambas às fumaças. Os resultados mostraram que após 6 meses de indução a incidência de tumores pulmonares foi maior nos animais expostos à fumaça, quando comparados aos animais controle. Apesar disso, não existem modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro que utilizem o TE-2 Manual Smoking Machune®.

Figura 4 - TE-2 Manual Smoking Machune®.

Fonte: Empresa Teague Entrepises (2012).

A Scientific Respiratory Equipaments Inc. (©SCIREQ) é responsável pela produção do In Expose® (Scientific Respiratory Equipaments Inc. ©SCIREQ, Montreal, Quebec, Canadá), aparato de exposição à fumaça de cigarro e outros poluentes (Figura 5). O aparato possui um subsistema que expõe todo o corpo do animal a fumaça e outro que expõe somente o focinho, além de permitir a coleta tanto a fumaça proveniente da queima do cigarro como a da tragada. O sistema de exposição do aparelho permite a aplicação da metodologia em até 48 camundongos ou em 16 ratos simultameamente. Além disso, pode ser totalmente programado para realizar as trocas de cigarro, acendimento e ejeção de forma automática. Em trabalho

realizado por North et al. (2011), camundongos são expostos à partículas finas concentradas (CAP) e ozônio durante 3 dias (subagudo) e 12 meses (crônico) para avaliação da hiperesponsividade das vias aéreas em modelo de asma. A exposição dos animais foi realizada utilizando o In Expose®. Os resultados mostraram que em ambos os modelos (subagudo e crônico) houve aumento da hiperesponsividade das vias aéreas, caracterizando quadros clínicos do asma.

Rinaldi et al. (2012) expuseram camundongos da linhagem C57Bl/6 utilizando o In Expose® durante 3 e 6 meses, 5 dias por semana. As análises funcionais mostraram aumento da complacência e da capacidade total pulmonar após 3 meses de exposição à fumaça. Em contrapartida, as alterações funcionais se tornaram significativas somente após 6 meses de exposição. Esses resultados demonstram a eficiência do In Expose® para indução experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro.

Figura 5 - In Expose®.

Fonte: Scientific Respiratory Equipaments Inc. ©SCIREQ (2012).

Considerando a escassez de aparelhos comercializados para exposição à fumaça de cigarro, bem como o elevado custo dos aparatos existentes no mercado e tendo em vista o crescente número de trabalhos relacionados ao estudo do enfisema pulmonar em modelos animais, é de extrema importância o desenvolvimento de alternativas que apresentem baixo custo e ao mesmo tempo gerem resultados satisfatórios quanto ao desenvolvimento da patologia.

Em função desses aspectos, o presente trabalho propõe um modelo de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro em ratos Wistar utilizando um novo

aparato desenvolvido pelo laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel), Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho” (Unesp – Campus Assis). Busca-se , dessa forma, o desenvolvimento e adequação de um novo aparelho que represente uma alternativa mais econômica e, ao mesmo tempo, altamente eficiente para a realização de estudos relacionados à indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça em modelos animais. Adicionalmente, o corrente trabalho busca avançar no conhecimento sobre os processos fisiopatológicos da DPOC, bem como um maior embasamento teórico e metodológico que permita a elaboração de novas estratégias de tratamento em modelos experimentais e a possível extrapolação desses resultados para pacientes humanos com doença pulmonar obstrutiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O presente estudo teve como objetivo adequar um modelo de indução de enfisema pulmonar em ratos da linhagem Wistar por exposição à fumaça de cigarro utilizando um novo aparato desenvolvido pela equipe do laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel) Unesp – Campus Assis: Rodrigo de las Heras Kozma, Válter Abraão Barbosa de Oliveira e Edson Marcelino Alves, sob orientação do Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

2.2 Objetivos secundários

a) realizar análises morfométricas comparativas com determinação do intercepto alveolar médio nos grupos controle e experimental;
b) realizar análises funcionais com determinação da resistência pulmonar e elastância nos animais do grupo controle e experimental;
c) avaliar a influência da exposição á fumaça de cigarro em relação ao ganho de peso dos animais.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos adultos da linhagem Wistar. Todos os animais com peso médio em torno de 400 g a 450 g e idade inicial de 12 semanas mantidos em caixas forradas com serragem, em sala com temperatura (22 ^{o}C) e luminosidade controladas. Os animais durante todo o procedimento experimental receberam dieta sólida e água filtrada *ad libitum* e tiveram sua massa corpórea monitorada semanalmente.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: animais (n=12) expostos à fumaça de 12 cigarros comerciais, 3x/dia (no total de 36 cigarros/dia), 7 dias/semana, (grupo fumaça "GF") e animais (n=12) submetidos as mesmas condição da caixa, entretanto, sem nenhum tipo contato com a fumaça do cigarro (grupo controle "GC").

3.3 Avaliação do ganho de peso

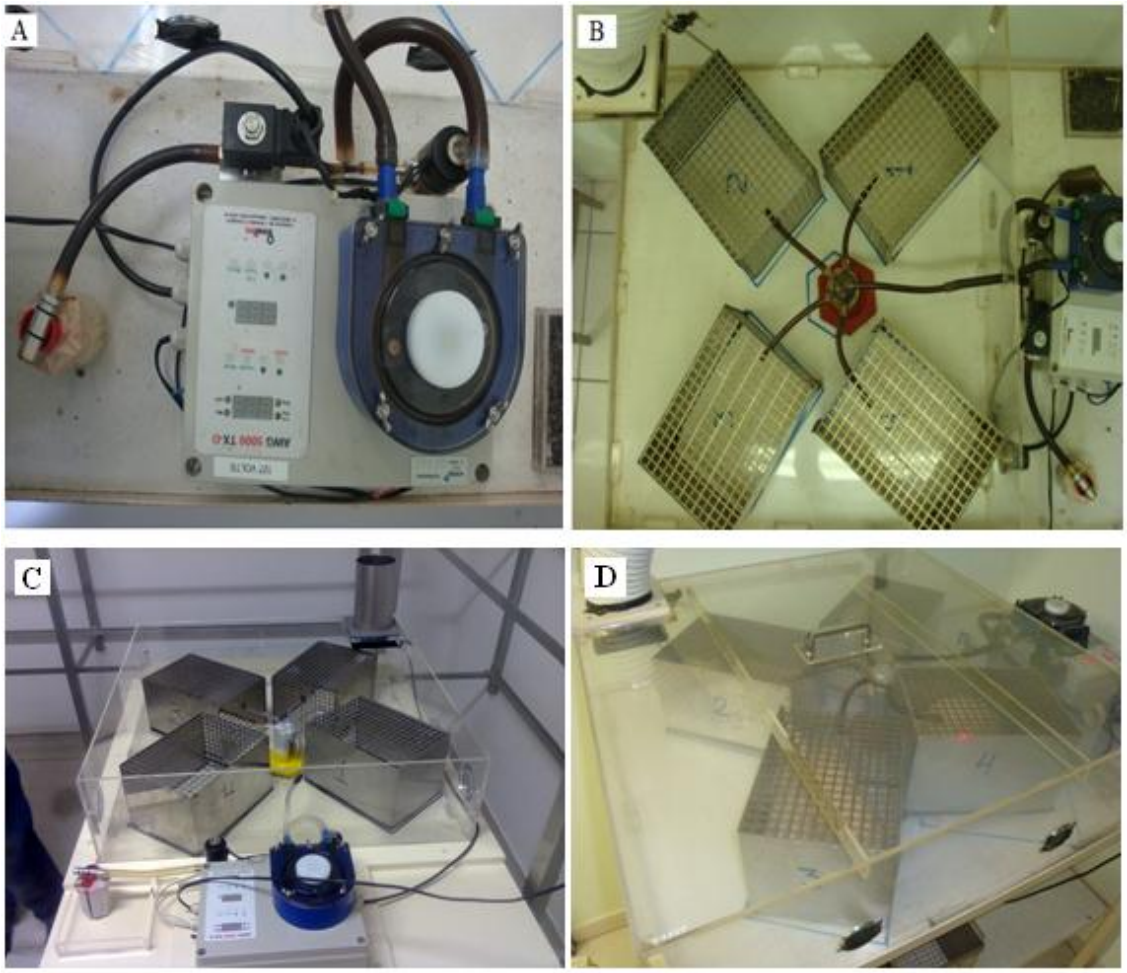
O peso dos animais dos grupos GF e GC foi aferido por meio de balança analítica semanalmente. A pesagem foi feita sempre nos mesmo dia da semana e horário.

3.4 Aparato para exposição à fumaça de cigarro

O aparelho consiste em um sistema de contenção de animais e um de captação e distribuição da fumaça de cigarro (Figura 6). O sistema de contenção dos animais compreende quatro gaiolas cúbicas de metal 24 cm x 17 cm x 15 cm, superiormente fechadas, cada uma com capacidade de três animais. O aparelho permite, dessa maneira, aplicar a metodologia em um total de doze animais simultaneamente. As quatro gaiolas encontram-se equidistantes no interior de uma caixa de acrílico (70 cm x 70 cm x 20 cm) com tampa hermeticamente fechada. O sistema de captação e distribuição da fumaça compreende um suporte externo para cigarro conectado por mangueira a uma bomba elétrica de sucção com temporizador

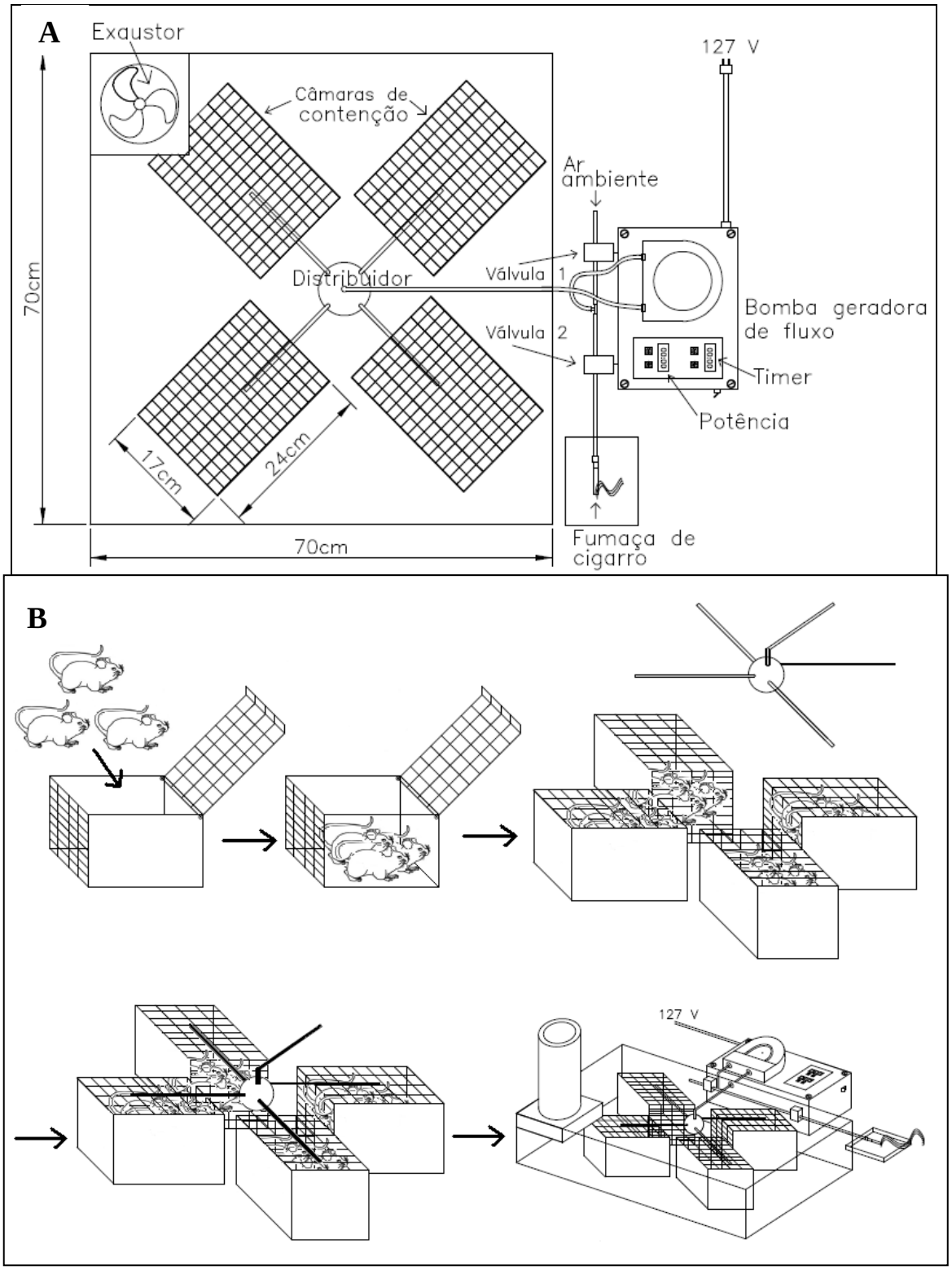
automático. A bomba possui programação que permite definir períodos de sucção de fumaça intercalados com períodos de sucção de ar ambiente para evitar asfixia dos animais. Destarte, a bomba gera uma pressão negativa que obriga a fumaça da combustão a passar pelo interior do cigarro, percorrendo a mangueira em direção ao interior da caixa de acrílico. A mangueira, já no interior da caixa de acrílico, ramifica-se, com o auxílio de um distribuidor de vidro, em quatro direções perpendiculares cooplanares de modo que cada uma das direções alimenta uma gaiola. A fumaça é lançada verticalmente no sentido súpero-inferior a partir da parte superior da gaiola, alcançando os animais e difundindo-se por toda a caixa. A Figura 7 mostra um esquema do aparato desenvolvido pela equipe do laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel) Unesp – Campus Assis.

Figura 6 - Aparato para exposição à fumaça de cigarro.



Sistema de captação e distribuição de fumaça (A) e sistema de contenção dos animais (B). Aparato em funcionamento (C e D).
Fonte: Kozma (2012).

Figura 7 - Esquema do aparato para exposição à fumaça de cigarro.



Vista superior do aparato (A). Sistema de contenção dos animais (B).
Fonte: Kozma (2012).

3.5 Modelo experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

Ratos machos (12 animais) da linhagem Wistar de aproximadamente 12 semanas de idade foram expostos diariamente, durante 30 semanas à fumaça de cigarro ou ar ambiente, três vezes ao dia. O procedimento foi realizado às 8, 12 e 16 horas, totalizando assim, três horas de exposição por dia. Durante cada período de exposição, foram feitas três sessões de quinze minutos de exposição a quatro cigarros, com intervalos de cinco minutos entre cada sessão. A concentração média de monóxido de carbono no interior da caixa variou entre 350 – 400 p.p.m durante os períodos de exposição. Nos intervalos, os animais foram submetidos apenas ao ar ambiente. Foram utilizados cigarros comerciais da marca Derby - Vibrante® (Souza Cruz S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) embalagem vermelha com 20 unidades, cada cigarro contendo filtro, 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono. Outro grupo de ratos (12 animais) foi submetido às mesmas condições de confinamento em outro aparato de exposição (nunca utilizado para exposição à fumaça de cigarro), para simulação das condições de estresse a que foram submetidos os animais expostos à fumaça.

3.6 Mecânica Ventilatória

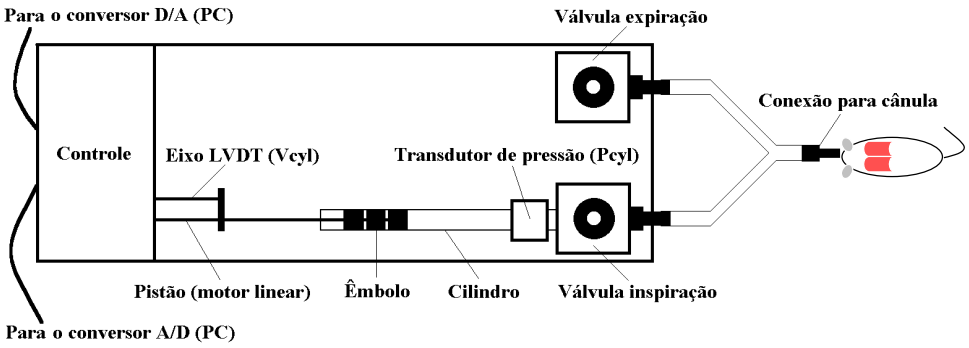
Após 30 semanas de exposição diária os animais foram submetidos a testes funcionais no Laboratório de Terapêutica Experimental I – Lim 20 (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP). Os animais de cada grupo foram anestesiados com Tiopenthax® (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil), traqueostomizados com um cateter intravascular 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Um diagrama esquemático do respirador mecânico utilizado é apresentado na Figura 8.

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Utilizou-se um PEEP de 5 cmH_2O conectado à válvula expiratória do ventilador. Posteriormente foi induzida uma paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de Brometo de Pancurônio (1 mg/kg).

Foi calculada a impedância do sistema respiratório (Zrs) dos animais de cada grupo, para tanto foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação

mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações. Após a perturbação, os dados foram coletados.

Figura 8 - Esquema do respirador para pequenos animais (Flexivent-Scireq), utilizado para a coleta dos dados de mecânica respiratória.



Fonte: Adaptado de Anciães et al. (2011).

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

A perturbação de 16 segundos é composta por uma soma de senóides com frequências primas que vão de 0,25 a 19,625 Hz, evitando, assim, distorção harmônica (Hantos et al., 1992). As amplitudes das senóides decrescem hiperbolicamente com a freqüência.

Para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (Bates et al., 1989). V_{cyl} foi corrigido para obtermos o volume que efetivamente chega ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido, nos dando o valor de P_{ao}, pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de V, obtivemos o fluxo (V').

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

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

Nota: Legenda
Raw: resistência das vias aéreas
I_{aw}:inertância das vias aéreas
i:unidade imaginária,
f : frequência.
G: amortecimento/resistência do tecido pulmonar
H: elastância do tecido pulmonar
Fonte: Kozma (2012).

$$\alpha = 2/\pi.\arctan(H/G)$$

Nota: Legenda
G: amortecimento/resistência do tecido pulmonar
H: elastância do tecido pulmonar
Fonte: Kozma (2012).

Diferentemente do modelo que utiliza a equação do movimento para a obtenção dos dados de resistência e da elastância do sistema respiratório, no tempo, este modelo de fase-constante considera o sistema pulmonar de forma multicompartimentar, permitindo a obtenção de parâmetros de diferentes compartimentos dos pulmões; o parâmetro Raw (resistência de vias aéreas), nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro Rrs corresponde à resistência do sistema pulmonar, enquanto Ers representa a elastância do sistema respiratório. O parâmetro Gtis avalia a resistência tecidual, enquanto que o parâmetro Htis seria a elastância do tecido pulmonar.

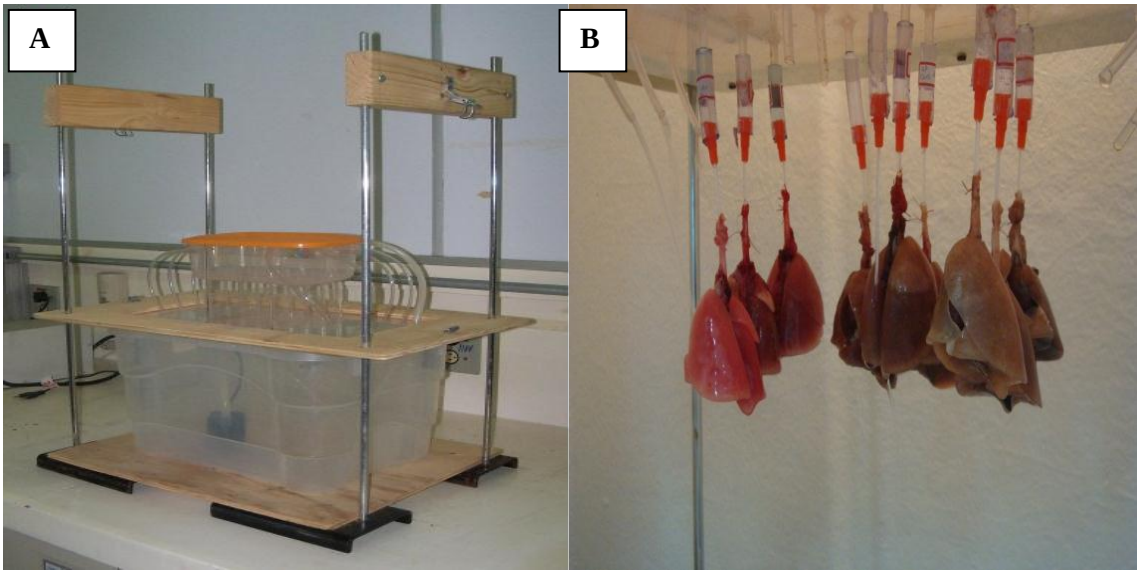
3.7 Procedimento para retirada dos pulmões

Imediatamente após a avaliação mecânica do sistema respiratório os animais foram exsanguinados para retirada dos pulmões e coração em monobloco. Os animais foram imobilizados em bandeja com parafina para o acesso e perfuração do diafragma. Foi aberta a caixa torácica para liberação do conjunto coração-pulmão. Os pulmões foram conectados a uma cânula inserida na traquéia e, a seguir, acoplou-se a cânula com o pulmão ao aparato de perfusão, conforme apresentado na Figura 9.

3.8 Análise histológica

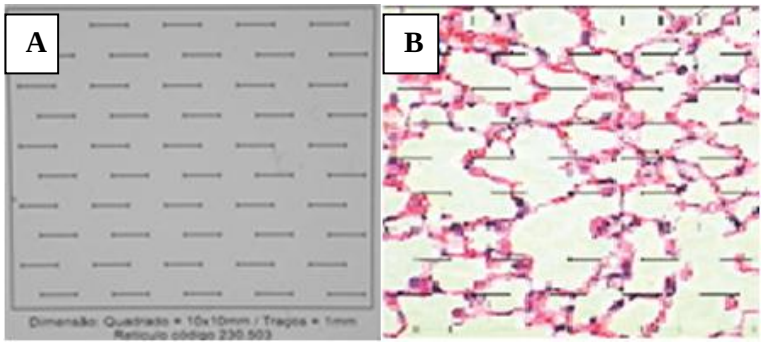
Os pulmões permaneceram por um período de 24 horas insuflados com pressão positiva constante de uma coluna líquida de 20 cm contendo uma solução de paraformaldeído a 4%, em um aparato (Figura 9) adaptado e modificado pelo grupo do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (Unesp – Campus de Assis). Os pulmões foram incubados em parafina, e posteriormente realizaram cortes de 5 µm de espessura, que foram corados em hematoxilina e eosina (HE) e feita a análise de morfometria (Intercepto Linear Médio – Lm) utilizando o retículo de Weibel (Figura 10).

Figura 9 - Aparato adaptado pelo Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel, do Departamento de Ciências Biológicas, Unesp, Campus de Assis.



Aparato utilizado para perfusão do tecido pulmonar (A). Pulmões submetidos à perfusão com paraformaldeído a 4% (B).
Fonte: Kozma (2012).

Figura 10 - Retículo empregado para determinação do Lm do parênquima pulmonar proposto por Weibel (1963).



Visão geral do retículo de Weibel (A). Retículo sobre o parênquima pulmonar (B).
Fonte: Kozma (2012).

3.9 Morfometria - Medida do Intercepto Linear Médio (Lm)

A avaliação histológica do enfisema pulmonar foi realizada mediante cálculo do Lm, ou seja, indicador do Intercepto linear médio, em micrômetros, consoante proposição de Weibel (1963). O intercepto linear médio é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Foram analisados dez campos aleatórios não coincidentes das lâminas do tecido pulmonar em aumento de 400 vezes. Utilizando o retículo sobreposto ao parênquima

pulmonar nas regiões mais periféricas do parênquima, foram contados o número de vezes que os interceptos cruzavam as paredes dos alvéolos. Foi feita uma média dos dez campos para cada lâmina e calculado o Lm por meio da seguinte equação:

$$Lm = L_{tot} / NI$$

Onde NI = média do número de vezes que os inteceptos cruzaram as paredes dos alvéolos.

O valor L_{tot} é obtido através da aferição do retículo utilizado, por meio de uma régua da fabricante Zeiss (Carl Zeiss Microlmaging GmH – Göttingen - Alemanha). O tamanho de cada segmento de reta é medido utilizando-se a régua em um microscópio com o retículo. A somatória de todos os segmentos do retículo resulta no valor L_{tot}.

3.10 Análise estatística

Foram analisados e comparados os resultados obtidos, pela aplicação da Análise de Variância One Way, por meio do ANOVA, com nível de significância 5%. Foi utilizado o Teste *t student* para comparação entre as médias.

3.11 Aspectos Éticos do Projeto

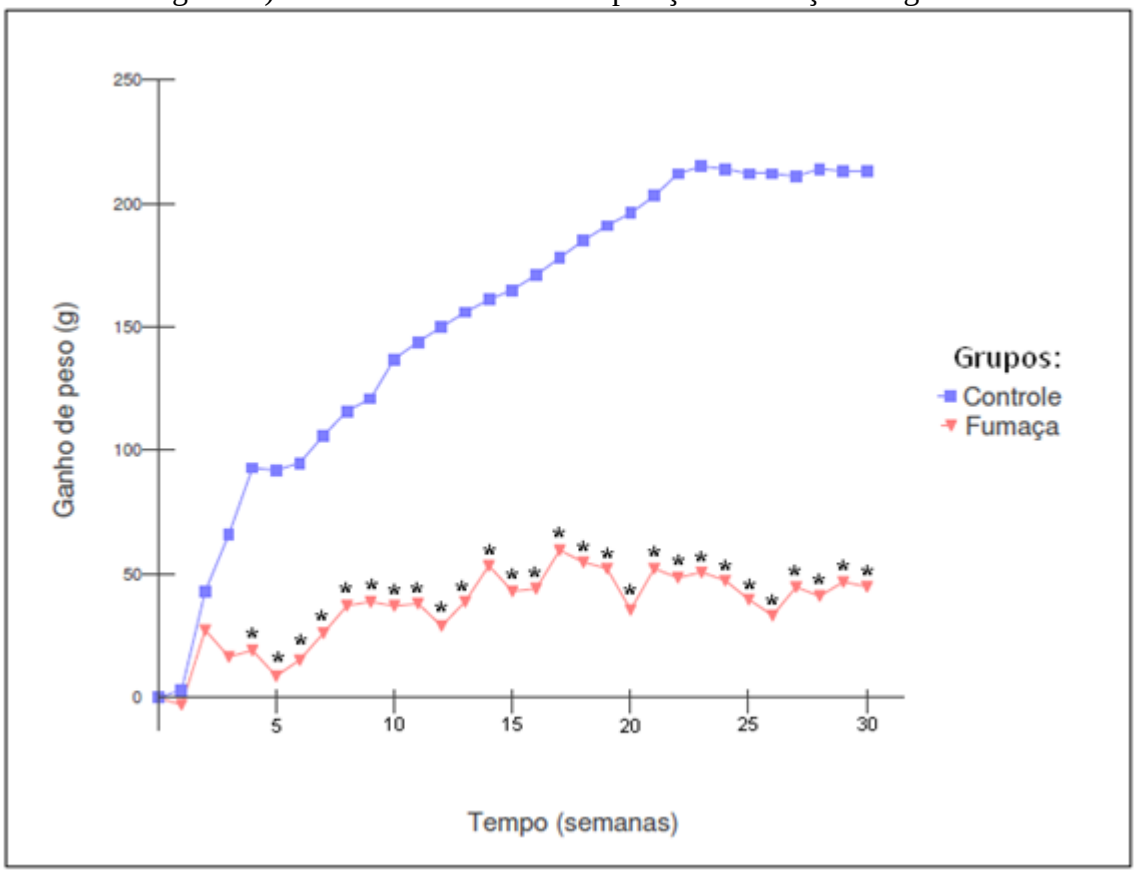
Foram rigorosamente seguidas neste projeto as normas estabelecidas nas portarias 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde. Deve-se salientar que o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unesp-Campus de Assis. O projeto foi aprovado e possui número de registro: 001/2011.

4 RESULTADOS

4.1 Influência da exposição à fumaça de cigarro sobre o ganho de peso

A fim de avaliar o ganho de peso dos animais experimentais e controle (em gramas) foi feita a pesagem semanal e os valores registrados estão apresentados na Figura 11. O tempo zero indica o início da exposição à fumaça de cigarro nos animais do grupo experimental e ao ar ambiente nos animais do grupo controle.

Figura 11 - Variação da média de ganho de peso dos animais experimentais e controle (em gramas) durante 30 semanas de exposição à fumaça de cigarro e ao ar ambiente.

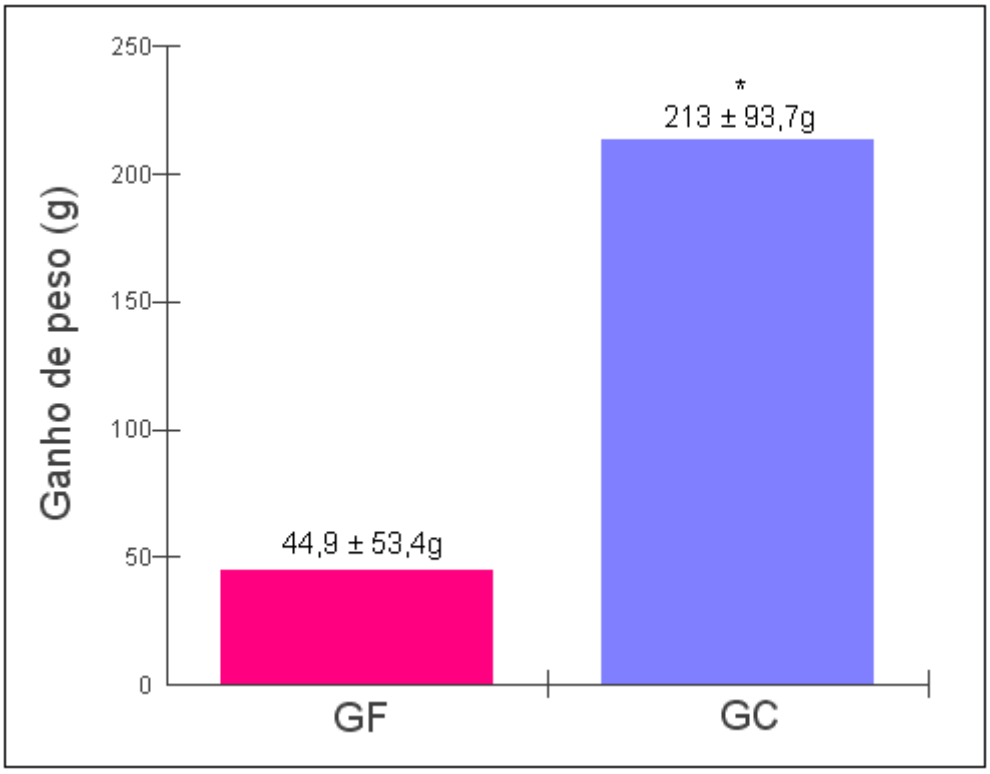


O tempo zero indica o início da exposição (*p<0,05).
Fonte: Kozma (2012).

A Figura 11 mostra a variação da média de ganho de peso dos animais experimentais e controle. Por meio da análise da Figura 11 observa-se que as médias iniciais de ganho de peso entre os grupos GC (grupo controle: animais expostos somente ao ar ambiente) e GF (grupo experimental: animais exposto à fumaça de cigarro) foram semelhantes não apresentando diferenças estatísticas. A partir da 2ª semana de exposição, verificou-se que o ganho de peso

dos animais expostos à fumaça foi inferior ao do grupo controle. Observou-se diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre o ganho de peso dos grupos GF e GC após a 4ª semana, sendo que nas semanas seguintes até o fim do período de exposição a média de peso de GC foi sempre superior à de GF. Após 30 semanas, conforme apresentado na Figura 12, observou-se que o aumento de peso do grupo GC foi de 213 ± 93,7 g em relação ao peso inicial enquanto o aumento de peso do grupo GF foi de apenas 44,9 ± 53,4 g. Esses valores representam ganho de peso do grupo GF (fumaça) de apenas 21,01 % em relação ao grupo GC (controle) a partir do início da exposição à fumaça de cigarro.

Figura 12 - Média de ganho de peso (g) dos animais experimentais (GF) e controle (GC) após 30 semanas de exposição à fumaça de cigarro.



* (*p*<0,05).
Fonte: Kozma (2012).

4.2 Análise funcional

Buscando avaliar os aspectos funcionais dos animais expostos à fumaça de cigarro de forma comparativa àqueles expostos ao ar ambiente foi utilizado um ventilador para pequenos animais (flexiVent, Scireq, Montreal, Canadá). Os parâmetros avaliados foram: resistência das vias aéreas (Raw), amortecimento/resistência do tecido pulmonar (Gtis), resistência pulmonar (Rrs), elastância do tecido pulmonar (Htis) e elastância pulmonar (Ers). As médias e desvios-padrões são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias (x) e desvios-padrão (dp) dos parâmetros funcionais dos animais expostos a fumaça de cigarro (GF) e os animais controle (GC).

Grupos	Raw ($cmH_2O/ml/s$)	Rrs ($cmH_2O/ml/s$)	Gtis ($cmH_2O/ml/s^{(1-\alpha)}$)	Hits ($cmH_2O/ml/s^{(1-\alpha)}$)	Ers ($cmH_2O/ml/s^{(1-\alpha)}$)
	x ± dp	x ± dp	x ± dp	x ± dp	x ± dp
GF	0,09 ± 0,07	0,15 ± 0,07	0,35 ± 0,10	1,21 ± 0,24	1,37 ± 0,24
GC	0,04 ±0,02	0,12 ± 0,07	0,22 ± 0,18	0,96 ± 0,89	1,14 ± 0,25

Nota: Abreviaturas (em inglês):
Raw: resistência das vias aéreas
Gtis: amortecimento/resistência do tecido pulmonar
Rrs: resistência pulmonar
Htis: elastância do tecido pulmonar
Ers: elastância pulmonar.
Fonte: Kozma (2012).

A análise da tabela mostra uma tendência de aumento nos valores dos parâmetros avaliados (Raw, Gtis, Rrs, Htis e Ers) nos animais GF em comparação aos animais GC. Apesar disso não houve diferença significativa entre os parâmetros respiratórios analisados. Esses resultados podem ser decorrentes da alta variação, representada pelos elevados valores de desvio-padrão (dp), entre as medidas funcionais dos animais expostos e não expostos à fumaça que foram submetidos à avaliação funcional por meio do flexiVent.

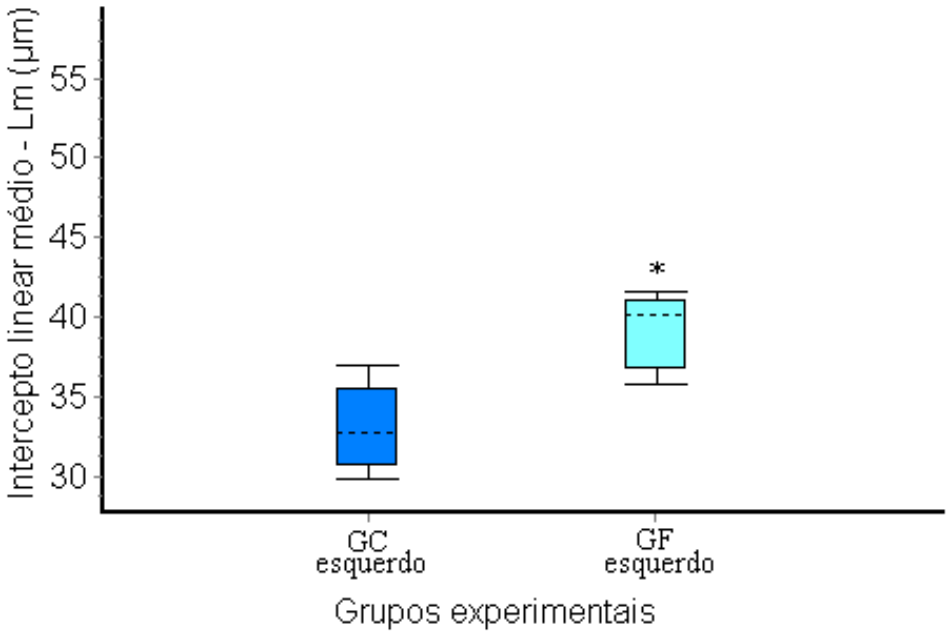
4.3 Análise morfométrica

Com o objetivo de avaliar o alargamento dos espaços aéreos (destruição do parênquima alveolar) dos animais expostos à fumaça de cigarro em comparação aos expostos ao ar ambiente foram realizadas as medidas do Intercepto linear médio (Lm). Foram analisados separadamente os valores de Lm referentes aos pulmões esquerdo (Figura 13) e direito (Figura 14) dos grupos GC e GF. Além disso, foi feita uma média de Lm correspondente a análise dos dois pulmões (esquerdo e direito) dos animais dos grupos GC e GF (Figuras 15 e 16).

A análise das Figuras 13 a 15 mostrou haver diferença significativa entre os valores do Intercepto linear médio (Lm) dos grupo controle (GC) em relação ao grupo exposto à fumaça (GF). A Figura 13 mostra os valores de Lm referentes aos pulmões esquerdos. Neste caso houve um aumento de 15,4% na medida de Lm de GF em comparação à GC. Em relação aos pulmões direitos o aumento do valor de Lm em GF foi ainda maior, 31,2% (Figura 14). A análise agrupando ambos os pulmões (Figura 15) mostrou um aumento de 25% do valor de Lm em GF comparado a GC. Na Figura 16, os valores de Lm dos pulmões direito e esquerdo dos animais GC e GF foram agrupados em um único gráfico. A análise da Figura 16 mostra que os valores de Lm referentes aos pulmões direito e esquerdo dos animais do grupo GC foram semelhantes, enquanto os valores de Lm dos pulmões direito e esquerdo dos animais do grupo GF apresentaram diferença significativa, o que sugere diferentes graus de alargamento dos espaços aéreos nos pulmões direito e esquerdo dos animais expostos à fumaça de cigarro.

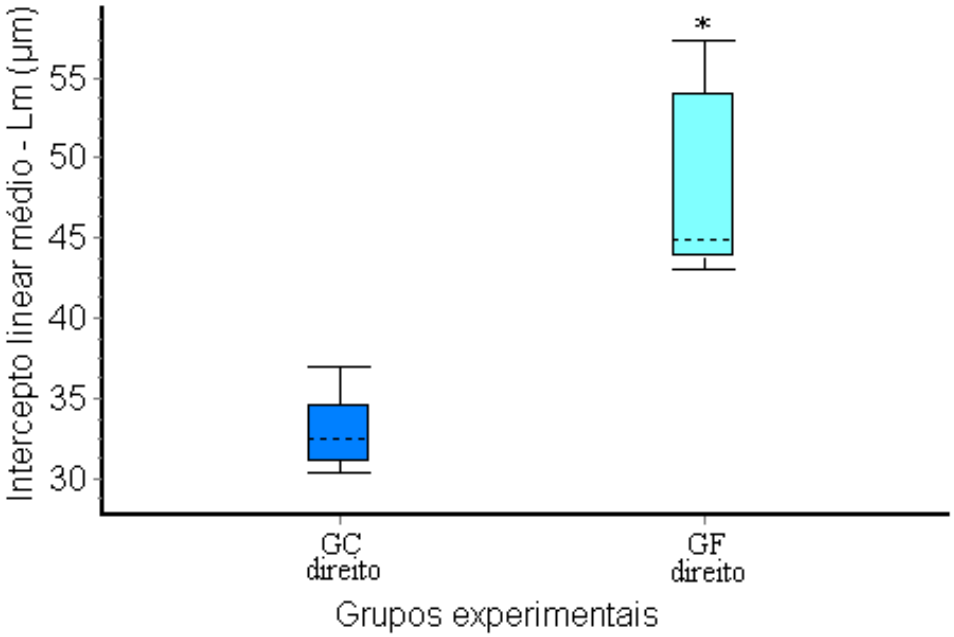
Animais expostos à fumaça de cigarro (GF) apresentaram destruição do parênquima alveolar estatisticamente significativa em relação aos animais expostos ao ar ambiente (GC), fato representado quantitativamente por meio da análise dos valores de Lm. A diferença quanto ao padrão morfológico dos grupos GC e GF está expressa, de forma qualitativa a partir de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (Figura 17). A análise da Figura 17 mostra que o grupo de animais expostos à fumaça de cigarro diariamente durante 30 semanas (GF) desenvolveram alargamento dos espaços aéreos, resultante da destruição do parênquima pulmonar, quando comparados ao grupo controle exposto ao ar ambiente (GC). Dessa forma, pode-se inferir que a exposição à fumaça de cigarro resultou no desenvolvimento do enfisema pulmonar nos animais do grupo GF.

Figura 13 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões esquerdos dos grupos GC e GF.



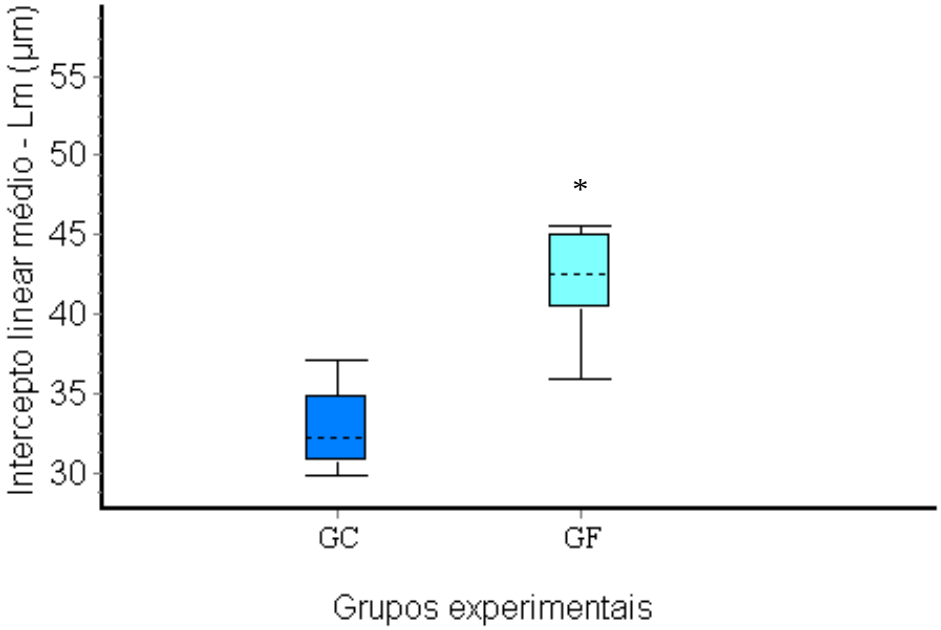
* (*p*<0,01).
Fonte: Kozma (2012).

Figura 14 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões direitos dos grupos GC e GF.



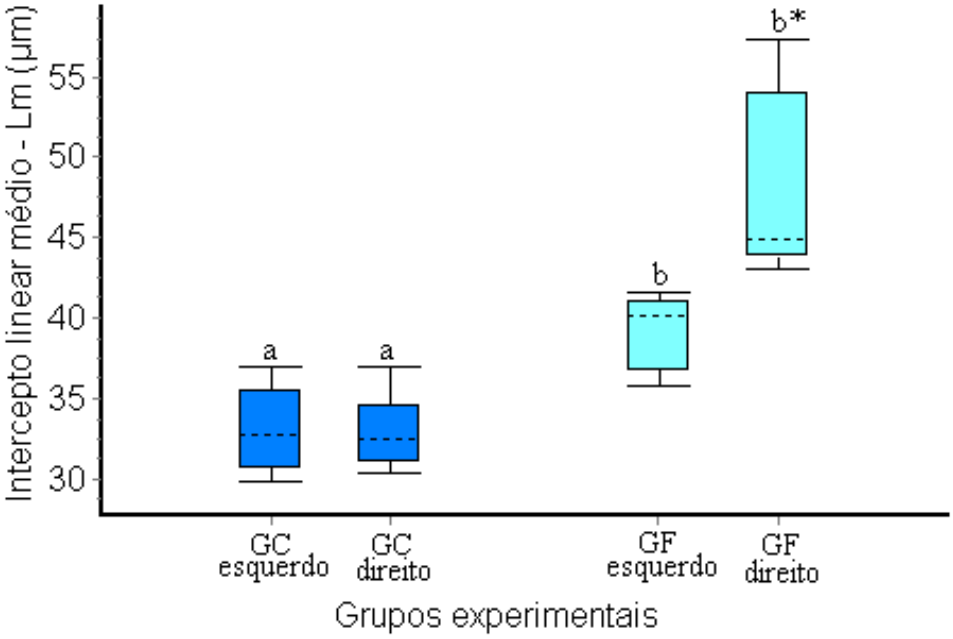
* (*p*<0,01).
Fonte: Kozma (2012).

Figura 15 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões direito e esquerdo dos grupos GC e GF.



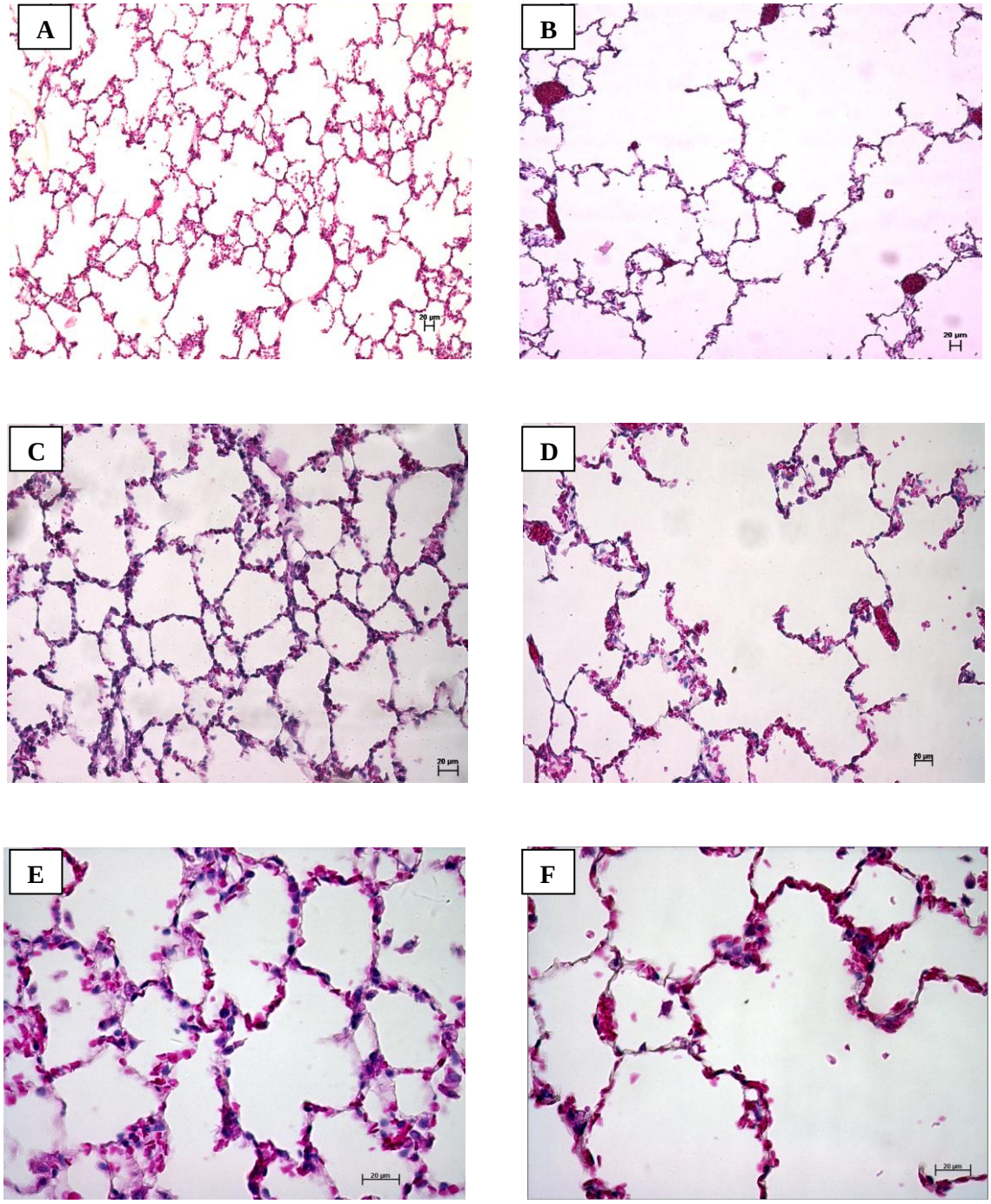
* (p<0,01).
Fonte: Kozma (2012).

Figura 16 - Valores do Intercepto linear médio – Lm referentes aos pulmões direito e esquerdo dos grupos GC e GF.



Valores semelhantes de Lm dos pulmões esquerdo e direito dos animais do grupo GC (a). Diferença significativa entre os valores de Lm dos pulmões esquerdo e direito dos animais do grupo GF (b)*(p<0,01).
Fonte: Kozma (2012).

Figura 17 - Fotomicrografias dos cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE).



Cortes pulmonares em aumento de 100x (A e B), de 200x (C e D) e de 400x (E e F) em microscópio de campo claro. Animais expostos à fumaça de cigarro (B, D e F) e animais expostos ao ar ambiente (A, C e E).
Fonte: Kozma (2012).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em modelos animais, é reportado na literatura o desenvolvimento de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro em diferentes condições experimentais (Cendon et al., 1997; Huh et al., 2011; Nikula et al., 2000; Toledo et al., 2012; Xu et al., 2004; Zheng et al., 2009). Apesar de alguns questionamentos relacionados ao tempo e quantidade de cigarros utilizados, acredita-se que os modelos criados por exposição à fumaça de cigarro são os que mais se aproximam do quadro clínico apresentado por pacientes enfisematosos humanos, sendo, portanto, uma metodologia mais adequada para o estudo dos aspectos fisiopatológicos da doença humana (Jardim et al., 2010; March et al., 2000).

Há, também, em modelos experimentais uma grande variação quanto aos parâmetros de tempo de exposição dos animais à fumaça de cigarro. Na literatura são reportados uma série de trabalhos utilizando ratos em que o período de exposição à fumaça varia de 8 a 36 semanas (Cendon et al., 1997; Xu et al., 2004; Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2009), correspondendo a um intervalo entre um décimo a cerca de metade do tempo de vida desses animais (considerando a expectativa de vida dos ratos em torno de 21 meses). Se projetarmos uma expectativa de vida para um ser humano, em torno de 80 anos, esses tempos de exposição corresponderiam a um histórico tabágico variando entre 8 a 40 anos. Além disso, em uma série de trabalhos, a exposição fumaça ocorre apenas de três a cinco dias por semana (Cendon et al., 1997; Churg et al., 2007; Guerassimov et al., 2004; Smith et al., 2002; Xu et al., 2004), o que não simula de forma concreta as condições de um ser humano que apresenta hábito tabágico diário, ou seja, que fuma 7 dias por semana. Tendo em vista estes aspectos, o modelo empregado neste estudo buscou mimetizar de forma fidedigna as condições fisiopatológicas de um fumante ativo humano, uma vez que a exposição à fumaça de cigarro foi realizada diariamente, sete dias por semana, durante 30 semanas. Este tempo de exposição corresponderia a um humano com uma história de tabagismo de cerca de 30 anos.

Com relação aos aparatos para exposição à fumaça de cigarro, apesar do grande número de estudos sobre modelos experimentais de enfisema pulmonar, existem poucos aparelhos comercializados no mercado. O TE-2 Manual Smoking Machune®, produzido pela Teague Entrepise e o CS Generator ® da empresa TSE sytems, apesar da capacidade comprovada em estudos envolvendo modelo de tumor pulmonar e com relação à ação de poluentes sobre os tecidos reprodutores, não foram utilizados até o momento para indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro, o que não permite a comparação

quanto à eficiência na indução experimental do enfisema pulmonar, com o aparato desenvolvido em nosso laboratório.

O aparelho In Expose®, produzido pela empresa ©SCIREQ é utilizado atualmente em uma ampla gama de estudos relacionados à exposição de fumaça de cigarro e outros poluentes, inclusive para indução experimental de enfisema pulmonar. Rinaldi et al. (2012) expuseram camundongos da linhagem C57Bl/6 utilizando o In Expose® durante 3 e 6 meses, o que resultou em alterações funcionais e morfológicas condizentes ao quadro enfisematoso.

Tendo em vista a escassez de aparelhos comercializados para exposição à fumaça de cigarro, bem como o elevado custo dos aparatos existentes no mercado e considerando, também, o crescente número de trabalhos relacionados ao estudo experimental do enfisema pulmonar, objetivamos elaborar um modelo de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro em ratos Wistar utilizando um novo aparato desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Terapia Celular - GenTe Cel - Unesp – Campus Assis. O principal objetivo do corrente trabalho foi o desenvolvimento e adequação de um novo aparelho que represente uma alternativa mais econômica e, ao mesmo tempo, altamente eficiente para investigação de aspectos fisiopatológicos e morfológicos relativos à indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça em modelos animais.

O aparato desenvolvido por nosso grupo de pesquisa possui uma série de características semelhantes aos modelos comercializados, como o fato da exposição à fumaça ocorrer no animal como um todo. Outra característica do aparelho criado pela nossa equipe está relacionada ao fato da fumaça bombeada para o interior da caixa ser proveniente da sucção do cigarro, simulando, dessa maneira, a situação de um fumante ativo humano. Além disso, o aparato permite, de maneira similar aos existentes no mercado, definir a potência de sucção, bem como períodos de sucção de fumaça intercalados com períodos de sucção de ar ambiente, por meio de temporizador presente na bomba. A principal vantagem de nosso aparelho seja o baixo custo do nosso aparelho é o baixo custo, se comparado aos modelos comercializados (cerca de 10 a 20 vezes inferior), o que viabiliza, em escala nacional, a aplicação em projetos de pesquisa orientados para análise de processos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de novas terapias em doenças pulmonares.

O enfisema pulmonar é caracterizado, sob o aspecto histopatológico, como uma dilatação dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal. As alterações morfológicas são resultantes da ativação de mediadores inflamatórios por agentes nocivos, no caso, a fumaça de cigarro, responsáveis pela ativação de uma série de tipos celulares, dentre eles os macrófagos

e neutrófilos. Essas células são responsáveis pela produção de enzimas, como a elastase, que atuam na destruição do parênquima pulmonar, gerando alargamento dos espaços aéreos (Anciães et al., 2011; Toledo et al., 2012; Wright et al., 2008). Weibel propôs, em 1963, um método pioneiro e muito elegante para análise morfométrica do pulmão. O autor desenvolveu um retículo, com um conjunto de retas paralelas desenhado na ocular do microscópio. A imagem do retículo projeta-se sobre a imagem do parênquima pulmonar fixado e corado. Este recurso metodológico permite a determinação do Intercepto linear médio – Lm. A aferição do Lm consiste na mensuração do número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa intercepta um conjunto de retas coerentes, utilizando o retículo desenvolvido por Weibel (1963) acoplado à ocular do microscópio com um sistema de 50 linhas e 100 pontos. Portanto, se houver degradação do tecido pulmonar em animais dos grupos experimentais, no caso, expostos à fumaça de cigarro, o número de interceptos das estruturas alveolares será menor, quando comparado aos animais controle. A análise do Lm é considerada primordial para definição do grau do enfisema pulmonar em modelos animais, uma vez que o aumento do valor de Lm é diretamente proporcional ao aumento dos espaços aéreos do pulmão, e por consequência, à destruição do parênquima pulmonar.

Xu et al. (2004) obteve aumento significativo do valor de Lm e diminuição do número médio de alvéolos no grupo de animais expostos à fumaça de cigarro em relação aos animais não expostos. A exposição à fumaça resultou em mudanças histológicas condizentes àquelas encontradas em humanos que apresentam enfisema pulmonar. No modelo desenvolvido em nosso laboratório, a exposição diária de animais (ratos *Wistar*) durante 30 semanas levou a um aumento significativo no valor de Lm dos animais do grupo GF (animais expostos à fumaça de cigarro) em relação ao grupo GC (animais expostos ao ar ambiente). Conforme apresentado na Figura 15 (análise agrupando os dois pulmões – direito e esquerdo), houve aumento de 25% no valor de Lm no grupo GF em comparação a GC. Esses resultados estão em conformidade com aqueles reportados por Zheng et al. (2009) que obtiveram, em ratos *Wistar* expostos à fumaça de cigarro por período de 24 semanas, um aumento no valor do Lm de 24,6%, comparado ao grupo controle.

Um aspecto interessante do corrente modelo foi o fato da análise morfológica, por intermédio do Lm, ter sido realizada nos pulmões direito e esquerdo separadamente. Os resultados mostraram, conforme apresentado anteriormente, maior distensão alveolar no tecido do pulmão direito (31,2% de aumento no valor do Lm) em relação ao pulmão esquerdo (15,4%). Não há na literatura relatos prévios de análises morfométricas comparativas do

comprometimento alveolar entre os pulmões direito e esquerdo. Trata-se de uma metodologia relevante, uma vez que possibilita evidenciar a heterogeneidade relacionada à destruição do parênquima no enfisema induzido experimentalmente. Uma possível explicação para os resultados obtidos em nosso modelo poderia estar nas diferenças anatômicas existentes entre os pulmões direito e esquerdo dos ratos. Segundo Cataneo e Reibscheid (1988), a traqueia dos ratos apresenta um desvio para a direita e os brônquios comportam-se como em seres humanos, sendo o direito mais curto e de maior calibre. Além disso, o brônquio direito parece ser uma continuidade da traquéia, enquanto o esquerdo parece brotar lateralmente. Tendo em vista esses aspectos, poderia ocorrer um maior direcionamento de fumaça para o pulmão direito, o que resultaria em maior ativação das células de defesa (neutrófilos e macrófagos) e por consequência aumento da secreção de proteases responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar. Dessa forma, as diferenças anatômicas entre os pulmões direito e esquerdo dos animais poderiam explicar o fato do valor de Lm ter sido maior no pulmão direito em relação ao esquerdo nos animais expostos à fumaça de cigarro. É importante que estes aspectos sejam ponderados na análise do Lm a fim de não se criar um viés analítico.

Cendon et al. (1997) realizou análise morfológica e funcional em ratos da linhagem *Wistar* expostos à fumaça de cigarro. Os resultados mostraram que após 45 dias de exposição houve destruição do espaço aéreo distal e diminuição da elastância, além de elevados graus de inflamação. Xu et al. (2004) obtiveram alterações significativas nos parâmetros respiratórios de ratos *Wistar* expostos diariamente à fumaça de cigarro, durante 16 semanas. Os resultados mostraram um aumento da resistência pulmonar e diminuição da complacência pulmonar nos animais expostos à fumaça de cigarro em relação aos animais não expostos. Zheng et al. (2009), realizam uma análise dinâmica da evolução do enfisema em modelo animal, utilizando ratos da linhagem *Wistar*. Animais expostos à fumaça durante períodos crônicos (24 e 36 semanas) apresentaram aumento da resistência das vias aéreas (Raw), além de uma maior resposta inflamatória, caracterizando quadros mais graves da doença. Neste contexto, os resultados do presente estudo não mostraram diferença significativa entre os valores de resistência das vias aéreas e elastância pulmonar entre animais expostos diariamente durante 30 semanas à fumaça (GF) em comparação aos animais expostos ao ar ambiente (GC). Apesar destes resultados, foi possível notar uma tendência de aumento da resistência das vias aéreas (Raw) nos animais do grupo GF. No trabalho foram analisados 6 animais GF e 12 animais GC, sendo esta desigualdade entre os tamanhos da amostra um possível fator responsável pela

não obtenção de diferença estatística significativa entre os parâmetros respiratórios dos animais expostos à fumaça em relação aos controles.

Outra questão relevante que pode justificar os resultados de mecânica ventilatória obtidos é a espécie animal analisada. Apesar do uso de ratos possibilitar uma série de análises funcionais, essa espécie animal apresenta como principal desvantagem o fato da doença gerada corresponder a um estágio brando quando comparada à patologia desenvolvida em outras espécies de roedores (Wrigth et al., 2008). Este achado poderia justificar que, apesar da comprovação do desenvolvimento de enfisema pulmonar nos animais expostos à fumaça de cigarro por análises morfométricas (Lm) e da diferença estatística conforme verificado nas Figuras 13 a 16, não foi observado, no corrente modelo, diferença significativa nos parâmetros funcionais analisados.

O uso dos testes funcionais é uma ferramenta válida para avaliação do desenvolvimento do enfisema pulmonar em modelos experimentais. Apesar disso, trata-se, nas condições e aparatos atualmente disponíveis, de uma metodologia com menor sensibilidade relativamente à análise morfológica (Lm), esta sim, com uma maior capacidade de resolução no que se refere à capacidade de verificação de danos causados ao parênquima. Dessa forma, animais que apresentam enfisema moderado ou médio geralmente apresentam valores funcionais normais se comparados a animais sadios, enquanto que somente animais com grau avançado da doença possuem parâmetros respiratórios alterados de forma significativa (Wrigth et al., 2008). Esses resultados foram comprovados por outros grupos de pesquisa. Foronjy et al. (2005) expôs duas linhagens de camundongos C57 à fumaça de cigarro por longo tempo, gerando aumento significativo nos valores de Lm desses animais em relação aos seus respectivos grupos controle. Apesar disso, não houve alteração nos parâmetros respiratórios dos animais expostos em relação aos grupos controles. Os resultados do corrente estudo obtidos por meio da mecânica ventilatória, assim como trabalhos anteriores, mostram que apesar de haver uma provável correlação entre o alargamento dos espaços aéreos com alterações nos parâmetros respiratórios, os métodos de análise funcional existentes não permitem, em todas as análises, a observação de diferenças estatisticamente significativas.

Quanto à influência da exposição à fumaça de cigarro sobre o ganho de peso em modelos experimentais, alguns trabalhos mostram que a fumaça proveniente do cigarro pode afetar o eixo hipotalâmico do controle do apetite no sistema nervoso central provocando diminuição do consumo alimentar (Chen, 2006; Lüthje et al., 2009; Mineur et al., 2011; Zheng et al., 2009). Mineur et al. (2011) demonstrou que a nicotina (uma das substâncias que

compõe os cigarros) leva a diminuição da ingestão de alimento e peso corporal. De acordo com os autores, a ativação do receptor hipotalâmico nicotínico α3β4 pela nicotina leva a estimulação de um grupo específico de neurônios (pró-opiomelanocortina), que juntamente com os receptores melanocortina 4, estão associados a sensação de saciedade. Considerando essas evidências, no presente modelo, a exposição à fumaça de cigarro durante 30 semanas pode explicar o fato do ganho de peso dos animais GF (expostos à fumaça de cigarro) ter sido inferior ao ganho dos animais GC (expostos ao ar ambiente). Em trabalho realizado por Zheng et al. (2009), ratos (idade inicial de 8 semanas) expostos à fumaça de cigarro durante 24 semanas, apresentaram ganho de peso próximo à 60% em relação aos controles. Em contrapartida, na corrente pesquisa, animais com idade inicial de 12 semanas expostos durante 24 semanas à fumaça de cigarro apresentaram ganho de peso correspondente a cerca de 25% em relação aos animais controles. Com os resultados do ganho de peso é possível inferir que animais que iniciam a exposição à fumaça de cigarro em idade mais avançada apresentam maior diferença do ganho de peso (em comparação a animais não expostos) do que animais que iniciam a exposição à fumaça com menor idade.

Em síntese, apesar de não ter sido observado alterações funcionais significativas nos animais expostos à fumaça de cigarro, as análises morfológicas mostraram que houve aumento estatisticamente significativo dos espaços aéreos (representado pelo aumento no valor do Lm) nos animais expostos (GF) em comparação aos controles. Dessa forma, foi comprovado, do ponto de vista morfológico o desenvolvimento do enfisema pulmonar nos animais GF, evidenciando a validade da metodologia aplicada, bem como do aparato desenvolvido pelo nosso laboratório. Além disso, a análise da variação do peso dos animais GF e GC mostrou grande influência da exposição à fumaça de cigarro sobre o ganho de peso dos animais.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que o modelo adotado é viável, exequível e abre novas perspectivas de ampliação do conhecimento sobre os processos fisiopatológicos da DPOC, bem como maior embasamento teórico e metodológico que permita a elaboração de novas estratégias de tratamento em modelos experimentais e pacientes humanos com doença pulmonar obstrutiva. Além disso, foi demonstrada a eficiência do aparelho desenvolvido pelo laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel) Unesp – Campus Assis para indução experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro. Considerando a escassez e o alto custo dos aparatos atualmente comercializados para exposição de animais à fumaça, o aparelho empregado neste trabalho representa uma alternativa metodológica eficiente e economicamente viável, tornando exequível seu emprego

em projetos de pesquisa direcionados para análise de processos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de novas terapias em doenças crônico-degenerativas do pulmão.

REFERÊNCIAS

Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto TS, Moriya HT, Mauad T, Martins MA, Lopes FDTQS. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. Clinics. 2011;66(10):1797-1803.

Antunes MA, Rocco PRM. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. An Acad Bras Cienc. 2011;83(4):1385-95.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and celular mechanisms. Eur Resp J. 2003;22:672-88.

Barnes PJ. Small airways in COPD. N Engl J Med. 2004;350(26):2645-53.

Bates JHT, Abe T, Romero PV, Sato J. Measurements of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. J Appl Physiol. 1989;67:488-92.

Bracke KR, D'hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. J Immunol. 2006;177:4350–9.

Brusselle GG, Bracke KR, Maes T, D'hulst AI, Moerloose KB, Joos GF, Pauwels RA. Murine models of COPD. Pulm Pharmacol Ther. 2006;19:155–65.

Campos HS. O preço da DPOC. Pulmão. 2003;12:5-7.

Cataneo AJM, Reibscheid SM. Broncografia e planimetria torácicos – estudo experimental no rato. J Pneumol. 1988;14(2):66-9.

Cendon S, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohlnikoff M, Pereira P, Conceição G, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. Braz J Med Biol Res. 1997;30:1241-7.

Chen BR, Hansen MJ, Jones JE, Vlahos R; Bozinovski S, Anderson GP. Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic neuropeptide Y axis to promote weight loss. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173:1248-54.

Churg A,Wang R,Wang X, Onnervik PO, Thim K,Wright JL. Effect of an MP-9/MMP-12 inhibitor onsmoke-induced emphysema and airway remodeling in guinea pigs. Thorax. 2007;62:706–13.

Churg A, Don D. Sin, Joanne L. Wright1 Everything Prevents Emphysema Are Animal Models of Cigarette Smoke–Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease Any Use? Am J Respir Cell Mol Biol 2011;45:1111–5.

Cosio BG, Agustí A. Update in chronic obstrutive pulmonar disease. Am Respir Crit Care Med. 2010;181:655-60.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org.

D'Agostini F, Balansky RM, Bennicelli C, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Pilot studies evaluating the lung tumor yield in cigarette smoke-exposed mice. Int J Oncol. 2001;18(3):607-15.

Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pawels RA. Role of apoptosis in pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. Respir Res. 2006;7:53-9.

Do NL, Chin BY. Chronic obstructive pulmonary disease: emphysema revised. In: Ong CK, editor. Chronic obstructive pulmonary disease: current concepts and practice. Croácia: InTech; 2012. Cap 3. p.33-46.

Elwing J, Panos RJ. Pulmonary hypertension associated with COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2008;3:55-70.

Flo´ C, Lopes FDTQS, Kasahara DI, Silva ACD, Jesus RCC, Rivero DHRF, et al. Effects of exercise training on papain-induced pulmonary emphysema in Wistar rats. J Appl Physiol. 2006;100:2815.

Foronjy RF, Mercer BA, Maxfield MW, Powell CA, D'Armiento J. Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoking model. Exp Lung Res. 2005;31:547–62.

Fox JC, Fitzgerald MF. Models of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current status. Drug Discovery Today: disease models. 2004;1:319-28.

Fujita M, Nakanishi Y. The pathogenesis of COPD: Lessons learned from in vivo animal models. Med Sci Mon. 2007;13:19-24.

Fusco L, Pêgo-Fernandes P, Xavier A, Pazetti R, Rivero D, Capelozzi V, Jatene F. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. Jornal de Pneumologia. 2002;28:1-7.

Fusco LB, Fonseca MH, Pêgo-Fernandes PM, Pazetti R, Capelozzi VL, Jatene FB, Oliveira SA.Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. J Bras Pneumol. 2005;31:34-40.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. [Internet]. Executive Sumary: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2009 [cited from: 2011 Dez 11]. Available from: <www.goldcopd.com>.

Gross P, Pfitzer E, Tolker M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. Arch Environ Health. 1965;11:50-8.

Guerassimov A, Hoshino M, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzo H, et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. Am J Respir Crit Care Med. 2004;170:974–80.

Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. J Appl Physiol. 1992;72(1):168-78.

Hele D. First Siena International Conference on animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res. 2002;3:1-3. [Siena International Conference on animal models of chronic obstructive pulmonary disease, Certosa de Pontignamo; 2001; Siena, Italy].

Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. Respir Res. 2002;3:22.

Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee JS, Ta QV, Kim MJ, et al. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011; 301(3):L255-66.

Huang Q, Liu D, Majenwski PLC, Korn J, Young RA, Lander E, Hacohen N. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. Science. 2001;294:870-5.

Huang JY, Liao JW, Liu YC, Lu SY, Chou CP, Chan WH, et al. Motorcycle exhaust induces reproductive toxicity and testicular interleukin-6 in male rats. Toxicol Sci. 2008;103(1):137–48.

Hyatt R.E.; Farkas G.; Schroeder M. pulmonary mechanics of papain emphysema in dogs. Chest. 2000;117:246S-247S.

Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, et al. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. Am Rev Respir Dis. 1977;115:461–78.

Jardim JR, de Oliveira JA, Nascimento O. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). J Bras Pneumol. 2004;5:S1–S42.

Jardim JR, Bizeto L, FleigMayer A, Camelier A, Rosa FW, Oliveira D, et al. Modelo de cámara inhaladora para los estúdios controlados sobre la toxicidad del humo del tabaco em los roedores. Arch Bronconeumol. 2010;46(9):455–8.

Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, et al. Proteinase 3: a distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. J Clin Invest. 1988;82:1693–9.

Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T; Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. Biol Pharm Bul. 2008;31:1434–38.

Keil M, Lungarella G, Cavarra E, Van Even P, Martorana PA. A scanning electron microscopic investigation of genetic emphysema in tight-skin, pallid, and beige mice, three different C57 BL/6J mutants. Lab Invest. 1996;74(2):353–62.

Kielty C, Raghunath M, Siracusa L, Sherratt M, Peters R, Shuttleworth C, Jimenez S. The tight skin mouse: Demonstration of mutant .brillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. J Cell Biol. 1998;140:1159–66.

Kozma RH. Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2012.

Kuhn C, Yu S, Chraplyvy M, et. al. The induction of emphysema with elastase. Changes in connective tissue. Lab Invest. 1976;34:372-80.

Lee J, Sandford A, Man P. Is the aging process accelerated in chronic obstructive pulmonary disease? Curr Opin Pulm Med. 2011;17:90-7.

Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hanssell AL, Held LS. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projectiosn. Eur Resp J 2006; 27:397-412.

Lüthje L, Raupach T, Michels H, Unsold B, Hasenfuss G, Kogler H; Andreas S. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. Respir Res. 2009;10:7.

MacNee W, Tuder RM. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. Proc Am Thorac Soc. 2009;6:527-31.

Mannino DM. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. Pneumonol Alergol Pol. 2011;79(2):139-43.

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

March T, Green F, Hahn F, Nikula K. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease. Inhalation Toxicology. 2000;12:155–87.

Martorana PA, Even PV, Gardi C, Lungarella G. A 16-Month Study of Development of genetic emphysema in Tight-skin mice. Am Rev Respir Dis. 1989;139:226-32.

Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gündisch D, et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. Science. 2011;332(6035):1330-2.

Motz GT, Eppert BL, Sun G, Wesselkamper SC, Linke MJ, Deka R, Borchers MT. Persistence of lung CD8 T cell oligoclonal expansions upon smoking cessation in a mouse model of cigarette smoke–induced emphysema. J Immunol. 2008;181:8036–43.

Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997;349:1269-76.

Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. Nat Genet. 1996;14:307–11.

Nikula KL, March TH, Seagrave J, Finch G, Barr E, Menache M, Hahn F, Hobbs C. A mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. Chest. 2000;117:246S-247S.

North ML, Amatullah H, Khanna N, Urch B, Grasemann H, Silverman F, et al. Augmentation of arginase 1 expression by exposure to air pollution exacerbates the airways hyperresponsiveness in murine models of asthma. Respir Res. 2011;12:19.

Oliveira JCA, Jardim JRB, Rufino. I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). J Pneumol. 2000;26:S1-S44.

Perou CM, Justice MJ, Pryor RJ, et al. Complementation of the beige mutation in cultured cells by episomally replicating murine yeast artificial chromosomes. Proc Natl Acad Sci. 1996;93:5905–9.

Pushpakom R, Hogg J, Woolcock A, Angus A, Macklem P, Thurlbeek W. Experimental papain-induced emphysema in dogs. Am J Crit Care Med. 1970;102:778-9.

Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. Am J Res Cri Care Med. 2001;164:469-73.

Ribeiro Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Alves-de-Moraes LB, Stessuk T, Faria CA. Terapia celular em doenças pulmonares: Existem perspectivas? Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31:140-8.

Ribeiro Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. Int J COPD. 2011;6:63–71.

Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Kozma RH. Cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art and perspectives. In: Ong CK, editor. Chronic obstructive pulmonary disease: current concepts and practice. Croácia: InTech; 2012. Cap 23. p.455-74.

Rinaldi M, Maes K, Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeken EK, Decramer M, et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. Dis Model Mech. 2012;5:333-41.

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

Russel RE, Thorley A, Culpitt SV. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metallo-protinases, cysteine, and serine proteases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002; 283:1867-73.

Sangani RG, Ghio AJ. Lung injury after cigarette smoking is particle related. Int J COPD. 2011;6:191–8.

Scientific Respiratory Equipaments Inc. ©SCIREQ. Catalogue of equipment [homepage on internet]. 2012 [cited 2012 Jan 12]. Available from: <www.scireq.com/products/inexpose/ix.html>.

Senior RM, Tegner H, Kuhn C, et al. The induction of pulmonary emphysema induced with human leukocyte elastase. Am Rev Respir Dis. 1977;116:469–77.

Shapiro, S. Animal Models for COPD. Chest. 2000;117:223–7.

Smith KR, Uyeminami DL, Kodavanti UP, Crapo JD, Chang LY, Pinkerton KE. Inhibition of tobacco smoke-induced lung inflammation by a catalytic antioxidant. Free Radic Biol Med. 2002;33:1106–14.

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

Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtosh M, Ito K, Satoh M, et al. Increased expression of transforming growth factor α1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with COPD. Am J Crit Care Med. 2001;163:1476-83.

Teague Entrepises. Catalogue of equipment [homepage on internet]. 2012 [cited 2012 Feb 21]. Available from: <www.teague-ent.com/catalog/scatalog>.

Toledo AC, Magalhães RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli JC, Moriya HT, Mauad T, Lopes FDTQS, Martins MA. Aerobic exercise attenuate pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. ERJ Express. 2012;39(2):254-64.

TSE systems International Group. Catalogue of equipment [homepage on internet]. 2012 [cited 12 Mar 2012]. Available from: <www.tsesystems.com/products/inhalation/exposure-units/index.htm>.

Tuder RM, McGrath S, Neptune E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? Pulm Pharmacol Ther. 2003;16:67–78.

Vlahos R, Bozinovski S, Gualano RC, Ernst M, Anderson GP. Modelling COPD in mice. Pulm Pharmacol Ther. 2006;19:12–17.

Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Physiol Rev. 2007;87:1047-82.

Weibel E. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab Invest. 1963;12:131-55.

Wright JL, Churg A. Smoking cessation decreases the number of metaplastic secretory cells in the small airways of the guinea pig. Inhal Toxicol. 2002;14:101–7.

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

Wright JL, Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Expert Rev Respir Med. 2010;4(6):723-34.

Xu L, Cai BQ, Zhu YJ. Pathogenesis of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic effects of glucocorticoids and N-acetylcysteine in rats. Chin Med J 2004;117:1611–9.

Zhang X, Zhang C, Sun Q, LI Dan, Luo R, Wan Z, Ye X, et al. Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats. Chin Med J. 2011;124(16):2502-6.

Zheng H, Liu Y, Huang, T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. Toxicology Letters. 2009;189:225–34.