

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

LUCIANA COSTA TEODORO

**ESTUDO MORFO-FUNCIONAL DO PULMÃO EM
MODELO DE ENFISEMA INDUZIDO POR ELASTASE
EM CAMUNDONGOS**

Alfenas/MG
2011

LUCIANA COSTA TEODORO

**ESTUDO MORFO-FUNCIONAL DO PULMÃO EM
MODELO DE ENFISEMA INDUZIDO POR ELASTASE
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Dra. Roseli Soncini.

Co-orientadora: Profa. Dra. Patricia Riecken Macêdo Rocco.

Alfenas/MG
2011

LUCIANA COSTA TEODORO

**ESTUDO MORFO-FUNCIONAL DO PULMÃO EM
MODELO DE ENFISEMA INDUZIDO POR ELASTASE
EM CAMUNDONGOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas
pela Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.
Orientadora: Profa. Dra. Roseli Soncini.
Co-orientadora: Profa. Dra. Patricia Riecken Macêdo
Rocco.

Aprovada em: __/__/__

Profa Dra. Roseli Soncini

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa Dra. Jalile Amin Naves Ventura

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Instituição: USP-RP

Assinatura:

Dedico a DEUS pela constante presença em minha vida;

A minha Mãe pela imensa dedicação e por sempre acreditar em mim;

Aos meus irmãos, Lívia e Ângelo, pela confiança depositada;

Ao Flávio pela força e pelo companheirismo;

Aos meus amigos e aos demais familiares pelo grande incentivo.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer a algumas pessoas, em especial, que contribuíram para a realização deste estudo.

- Profa. Roseli Soncini, minha orientadora, pela dedicação e pela confiança depositada.
- Profa. Patricia Rocco, minha co-orientadora, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.
- Mariana e Soraia, colaboradoras de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.
- André, Jaqueline e D.Ana, sempre prontos a nos auxiliar dentro no Laboratório de Investigação Pulmonar.
- Marina e José Reis, pelo auxílio e pelo “bom-humor” do Laboratório de Fisiologia.
- Clarice, Michael, Maria Ângela e Fabiana; ingressamos e estivemos sempre juntos durante este percurso. Não chegaria até aqui sem a contribuição de vocês!
- Professores e demais funcionários do Laboratório de Patologia, especialmente Maria Ângela, Profa. Estela e Prof. Alessandro, que me acolheram durante a análise histológica.
- Bruno, pelo auxílio nas fotomicrografias.
- Aos demais professores e alunos do Laboratório de Fisiologia. Muito obrigada!

RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais causas de morte e incapacitação no mundo. É um problema de saúde pública cuja fisiopatologia necessita ser melhor elucidada. Logo, o presente estudo objetivou desenvolver modelos de enfisema induzido por elastase pancreática de porco (PPE) na tentativa de obter alterações morfo-funcionais do pulmão que possam se assemelhar ao enfisema humano e, assim, propiciar melhor entendimento fisiopatológico. Foram utilizados 36 camundongos Swiss machos (25-30g) que foram aleatoriamente subdivididos em grupo controle e grupo enfisema. O grupo controle (subdividido em Sal x 1 e Sal x 2) recebeu instilação intratraqueal de solução fisiológica, dose única e dupla e; o grupo enfisema (subdividido em 0,3U x 1, 0,3U x 2, 0,6U x 1 e 0,6U x 2) recebeu instilação intratraqueal de elastase 0,3U ou 0,6U, dose única (x1) e dupla (x2). Vinte dias após a primeira instilação, todos os animais foram sedados, anestesiados e paralisados. Os parâmetros da mecânica pulmonar: pressão resistiva ($\Delta P1,L$), viscoelástica ($\Delta P2,L$) e elastância estática (Est,L) foram aferidos pelo método de oclusão ao final da inspiração. Os pulmões foram preparados para a análise morfométrica e quantificação de fibras elásticas e colágenas no tecido pulmonar. A exposição pulmonar à PPE promoveu alteração funcional no grupo 0,3U x 2 através da redução do recuo elástico; alteração estrutural no pulmão através do aumento do diâmetro alveolar médio nos grupos 0,6U x 1 e 0,3U x 2; aumento do influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar em todos os grupos induzidos ao enfisema; redução do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar em todos os induzidos ao enfisema e aumento do conteúdo de fibras colágenas nos animais do grupo 0,6U x 1 e 0,6U x 2. Em conclusão, todos os modelos empregados para a indução do enfisema pulmonar por elastase neste estudo apresentaram características morfológicas similares a encontradas em humanos, sendo que o grupo 0,3U x 2 foi o único a apresentar alterações morfo-funcionais.

Palavras-chave: Enfisema pulmonar. Elastase Pancreática. Camundongo. Mecânica respiratória. Histologia.

ABSTRACT

The chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of death and disability worldwide. It is a public health problem and the pathophysiology needs to be better elucidated. Therefore, the present study aimed to develop models of pancreatic elastase-induced emphysema (PPE) in an attempt to obtain lung functional and morphological changes that resemble human emphysema and, thus, improve the understanding of its pathophysiology. Thirty-six Swiss male mice (25-30g) were randomly divided into control group and emphysema. The control group (subdivided into Sal x 1 and Sal x 2) received intratracheal instillation of saline while emphysema group (subdivided into 0,3 U x 1, 0,3 U x 2, 0,6 U x 1, 0,6 U x 2) received intratracheal instillation of elastase 0,3 U or 0,6 U, single (x1) and double (x2). Twenty days after the first instillation, all animals were sedated, anesthetized and paralyzed. Lung mechanical parameters: resistive pressure ($\Delta P_{1,L}$), viscoelastic ($\Delta P_{2,L}$) and elastance (Est, L) were measured by end-inflation occlusion method. Lungs were prepared for analysis of morphometry and quantification of elastic and collagen fibers in lung tissue. The pulmonary exposure to PPE led to functional changes in 0.3U x 2 group by reducing the elastic recoil; lung morphological modifications by increasing the mean linear intercept in 0,6U x 1 and 0,3U x 2 groups; increased of inflammatory cells influx in the lung parenchyma and reduced of elastic fiber content in alveolar septa in all groups, and increased collagen fiber deposition in 0,6U x 1 and 0,6U x 2 groups. In conclusion, all developed elastase induced-emphysema models in the present study presented morphological changes similar to those found in human emphysema, but only 0.3 U x 2 group showed functional and morphological changes.

Keywords: Pulmonary emphysema. Pancreatic elastase. Mouse. Respiratory mechanics. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação esquemática dos grupos experimentais.....	27
Figura 2-	Montagem experimental para a medida da mecânica pulmonar.....	29
Figura 3-	Método de Oclusão ao Final da Inspiração.....	31
Figura 4-	Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizados para a quantificação dos parâmetros morfométricos.....	34
Figura 5-	Elastância estática no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U e elastase 0,6U.....	38
Figura 6-	Variações de pressão resistiva, viscoelástica e total no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U e elastase 0,6U.....	38
Figura 7-	Fração de área ocupada por alvéolos normais no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U e elastase 0,6U.....	39
Figura 8-	Fração de área ocupada por alvéolos hiperinsuflados no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U e elastase 0,6U.....	40
Figura 9-	Fração de área ocupada por alvéolos colapsados no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U e elastase 0,6U.....	40
Figura 10-	Diâmetro alveolar médio de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U e elastase 0,6U.....	41
Figura 11-	Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar (200x).....	44
Figura 12-	Fotomicrografias representativas de fibras elásticas no parênquima pulmonar (400x).....	45
Figura 13-	Fotomicrografias representativas de fibras colágenas no parênquima pulmonar (400x).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fluxo aéreo e volume corrente.....	37
Tabela 2-	Celularidade do parênquima pulmonar.....	42
Tabela 3-	Conteúdo de fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BALF:** Fluido do lavado broncoalveolar
- CG:** Catepsina G
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico
- DPOC:** Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- Est, L:** Elastância estática do pulmão
- HNE:** Elastase de neutrófilo humano
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- IL:** Interleucina
- INF α -:** Interferon-alfa
- INF- γ :** Interferon-gama
- i.p:** Intraperitoneal
- i.v:** Intravenoso
- Lm:** Diâmetro alveolar médio
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- LTB₄:** Leucotrieno B₄
- MEC:** Matriz extracelular
- MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade
- MN:** Células mononucleares
- MMP:** Metaloproteinase
- NF- κ B:** Fator de transcrição nuclear Kappa B
- NK:** Célula Natural Killer
- NO₂:** Dióxido de nitrogênio
- O₂⁻:** Ânion superóxido
- .OH:** Radical hidroxil
- Δ P:** Variação de pressão
- Δ P₁:** Variação de pressão resistiva
- Δ P₂:** Variação de pressão viscoelástica
- Δ P_{tot}:** Variação de pressão total
- PEEP:** Pressão positiva ao final da expiração
- Pel, L:** Pressão de retração elástica do pulmão

Pi L: Ponto de inflexão

PL: Pressão transpulmonar

Pmáx: Pressão máxima

PMN: Células polimorfonucleares

PPE: Elastase pancreática de porco

PR3- Proteinase 3

Ptr: Pressão traqueal

RNA_m: Ácido ribonucleico mensageiro

PL: Pressão transpulmonar

Req: Resistência total do equipamento

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SO₂: Dióxido de enxofre

Th: *T helper*

TIMP: Inibidor de metaloproteinase.

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TNF- β : Fator de necrose tumoral beta

V': Fluxo aéreo

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

VT: Volume corrente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DPOC.....	13
1.3	DEFINIÇÃO DE ENFISEMA PULMONAR.....	14
1.4	CLASSIFICAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR.....	15
1.5	PATOGÊNESE DA DPOC.....	15
1.5.1	Desequilíbrio protease-antiprotease	15
1.5.2	Apoptose	17
1.5.3	Estresse oxidativo	18
1.5.4	Processo inflamatório	19
1.5.5	Ativação imunológica	20
1.6	MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENFISEMA PULMONAR.....	21
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	MÉTODOS	26
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	26
4.2	PREPARO DOS ANIMAIS.....	26
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
4.4	MECÂNICA PULMONAR.....	28
4.5	MÉTODO DE OCLUSÃO AO FINAL DA INSPIRAÇÃO.....	30
4.6	REMOÇÃO DOS PULMÕES.....	32
4.7	HISTOLOGIA PULMONAR.....	33

4.7.1	Fixação e preparo das lâminas.....	33
4.7.2	Análise morfométrica.....	33
4.7.3	Quantificação de fibras elásticas e colágenas.....	35
4.8	ANÁLISE ESTÁTÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	MECÂNICA PULMONAR.....	37
5.2	HISTOLOGIA PULMONAR.....	39
5.2.1	Análise morfométrica.....	39
5.2.2	Quantificação de fibras elásticas e colágenas.....	42
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A denominação da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) engloba uma série de doenças de diferentes etiologias que têm em comum a presença de obstrução ao fluxo aéreo não completamente reversível. A limitação ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e/ou a gases irritantes (INOUE et al., 2010a). Dentre os pacientes com DPOC, aproximadamente 20% apresentam enfisema pulmonar, enquanto os outros 80% têm bronquite crônica ou, ainda, uma combinação destas duas afecções (MONTEIRO et al., 2004).

O principal fator de risco para o desenvolvimento e progressão da DPOC é a fumaça de cigarro (acima de 80%) (HOGG, 2004; BRABER et al., 2010). Entretanto, a poluição aérea tem alcançado destaque no desenvolvimento, na aceleração, na exacerbação e na mortalidade da DPOC (ZANOBETTI; BIND; SCHAWARTZ, 2008; INOUE et al., 2010a).

Esta patologia é mais comumente vista em fumantes a longo-prazo e sua progressão aumenta com a idade (CROXTON et al., 2002; MANNINO; BUIST, 2007; INOUE et al., 2010b).

1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DPOC

A DPOC é uma das principais causas de morte e incapacitação em todo mundo; estimativas revelam que há 210 milhões de indivíduos afetados no mundo sendo mais de 16 milhões só nos Estados Unidos (BARNES, 2003). Ao contrário de diversas doenças crônicas que estão em declínio, a progressão da DPOC é alarmante, exibindo números mundialmente crescentes (PAUWELS et al., 2001). Atualmente, é a quinta causa de morte (PAUWELS; RABE, 2004; WRIGTH; CHURG, 2008), porém prevê-se que até 2020 será a terceira causa de morte mais freqüente no mundo, sendo superada apenas pela doença cardíaca isquêmica e pela doença vascular cerebral (PAUWELS et al., 2001).

Estimativas revelam que a prevalência mundial da DPOC, em adultos acima de 40 anos de idade, é cerca de 9-10% (HALBERT et al., 2006) sendo também maior em homens do que mulheres (LÜTHJE et al., 2009). No entanto, há grande variação regional desta medida, quer por diferença na exposição das populações aos fatores de risco, quer por diferenças nas definições de DPOC utilizadas em muitos estudos epidemiológicos. Esta prevalência aumenta progressivamente com a idade, acompanhando a perda funcional pulmonar que ocorre em todos os indivíduos (MENEZES et al., 2005).

No Brasil, a DPOC é responsável por cerca de 30 mil óbitos/ano, sendo a quinta causa de morte mais freqüente. Estima-se que haja, atualmente, três milhões de portadores da doença em nosso país e a cada ano são hospitalizados 280 mil brasileiros com DPOC (MONTEIRO et al., 2004).

1.3 DEFINIÇÃO DE ENFISEMA PULMONAR

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

Atualmente, o enfisema é caracterizado pela destruição da matriz extracelular alveolar que resulta no alargamento do espaço aéreo e redução na área de troca alvéolo-capilar, levando a obstrução parcialmente reversível do fluxo aéreo que é frequentemente progressiva e associada com a resposta inflamatória do pulmão a gases ou partículas tóxicas (INOUE et al., 2010b).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR

Todas as alterações anatômicas que caracterizam o enfisema podem atingir apenas uma parte do ácino ou toda a estrutura acinar, indicando a etiologia e o comportamento fisiopatológico do enfisema (FUSCO et al., 2002).

O enfisema centrolobular apresenta o ácino pulmonar comprometido associado a um alargamento ou destruição dos bronquíolos respiratórios, predominantes em zonas apicais, freqüente nos indivíduos tabagistas (KIM et al., 1991; SNIDER, 2000).

O enfisema panacinar, encontrado em pacientes portadores de deficiência de α -1 antitripsina (SNIDER; LUCEY; STONE, 1986), resulta em uma destruição uniforme das paredes alveolares e alargamento difuso do ácino pulmonar, predominante em zonas basais (KIM et al., 1991; SNIDER, 2000).

O enfisema acinar distal ou parasseptal compromete a região periférica do ácino, ductos e sacos alveolares (TARANTINO, 1990). O enfisema parasseptal localizado encontra-se associado ao pneumotórax espontâneo, em adultos jovens, e bolhas pulmonares em idosos. Enfisema unilateral ou síndrome de MacLeod ocorre devido a complicações decorrentes de infecções causadas por varíola ou adenovírus na infância (DUNNILL, 1982) e o enfisema lobular congênito surge, geralmente, em crianças antes do sexto mês de vida (TARANTINO, 1990).

1.5 PATOGÊNESE DA DPOC

1.5.1 Desequilíbrio protease-antiprotease

A hipótese que prevalece desde 1960 para a patogênese da DPOC tem sido a teoria do desequilíbrio protease-antiprotease. De acordo com esta teoria, a exposição crônica à fumaça do cigarro leva a invasão de células inflamatórias dentro das vias aéreas, que por sua vez, liberam grande quantidade de proteases, levando ao desequilíbrio protease-antiprotease com destruição do tecido pulmonar (AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003). Deste modo, esta

alteração do balanço entre proteases e antiproteases nos pulmões de pacientes portadores de DPOC, resulta em atividade proteolítica (DEMEDTS et al., 2005) e conseqüente destruição do parênquima pulmonar acarretando o enfisema pulmonar. Este aumento da atividade proteolítica pode ser conseqüência da inflamação (liberação de enzimas proteolíticas por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos) ou devido a fatores genéticos (deficiência de α -1 antitripsina) (DEMEDTS et al., 2006).

Na DPOC, dentre as proteases derivadas de neutrófilos merecem destaque: proteinases neutrofílicas, elastase neutrofílica, catepsina G neutrofílica, metaloproteinase neutrofílica (gelatinase B e colagenase neutrofílica) e; as derivadas de macrófagos: cisteína (tiol) proteinase do macrófago (lisossomol-tiol-proteinase e catepsinas B, H, L e S) e metaloproteinases do macrófago (colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases e metaloelastases). Todas atuam como enzimas que degradam substâncias específicas da matriz celular como a elastase neutrofílica que possui atividade contra as proteínas de matriz, em especial a elastina e; as metaloproteinases neutrofílicas que atuam na degradação do colágeno intersticial, da gelatina, da membrana basal e da elastina (RUFINO; SILVA, 2006).

Entre os inibidores de proteases (antiproteases) envolvidos na DPOC estão a α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina, inibidores de leucoproteases e inibidores de metaloproteinases (TIMP1 e TIMP2). A α 1-antitripsina é uma glicoproteína sintetizada primariamente pelo fígado, sendo o principal inibidor da atividade proteolítica da elastase neutrofílica e de outras proteinases, sendo que a inibição das proteinases neutrofílicas dá-se com maior rapidez do que com outras proteinases (SHAPIRO, 1994; FINLAY et al., 1997; RUFINO; SILVA, 2006). A exposição à fumaça do cigarro potencializa a lesão pulmonar, reduzindo a atividade desta molécula como antiprotease em aproximadamente 2000 vezes, sendo um importante fator no desenvolvimento do enfisema pulmonar (CAMELIER et al., 2008). A deficiência genética desta proteína está relacionada com o desenvolvimento do enfisema em idades precoces, terceira ou quarta década de vida de indivíduos fumantes e, por volta da quinta ou sexta década em indivíduos que nunca fumaram (FREGONESE; STOLK, 2008).

As α 2-macroglobulinas são sintetizadas na corrente sanguínea e inibe várias proteinases (SHAPIRO, 1994; RUFINO; SILVA, 2003). Os inibidores de leucoproteinase são produzidos pelas células epiteliais das vias aéreas e pelos pneumócitos tipo 2 e inibem elastase neutrofílica, catepsina G e outras proteinases (SHAPIRO, 2000; RUFINO; SILVA, 2006). Com relação aos inibidores de metaloproteinases, estes são secretados por várias

células como pelos macrófagos e inibem metaloproteinases específicas (SHAPIRO, 1994; FINLAY et al., 1997; SHAPIRO, 2000; RUFINO; SILVA, 2006).

1.5.2 Apoptose

A apoptose celular é o mecanismo relacionado à destruição das estruturas pulmonares vista no enfisema (KASAHARA et al., 2000; SHAPIRO, 2000; AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003).

Os mecanismos envolvidos na apoptose (morte celular programada) são muito complexos, dentre eles: redução nos fatores de crescimento, aberrações mitóticas, perda do contato com a matriz extracelular, indução direta por células imunológicas e danos causados por estresse (MORISSETE; PARENT; MILOT, 2009).

Estudos recentes têm mostrado aumento no número de células apoptóticas epiteliais (KASAHARA et al., 2001; SEGURA-VALDEZ et al., 2000) e endoteliais (SEGURA-VALDEZ et al., 2000; DEMEDTS et al., 2006) nos pulmões com enfisema (KASAHARA et al., 2001; SEGURA-VALDEZ et al., 2000). Outros estudos descreveram que além do aumento das células apoptóticas há incremento da expressão de caspase-3 no enfisema (IMAI et al., 2005; DEMEDTS et al., 2006). Além disso, a expressão das proteínas relacionadas com a manutenção das células endoteliais: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) encontra-se reduzida no enfisema, favorecendo a morte das células epiteliais e endoteliais alveolares e contribuindo na patogênese da DPOC (KASAHARA et al., 2001; DEMEDTS et al., 2006).

Em modelos animais de enfisema induzidos por inativação de VEGF e VEGFR, a apoptose de células epiteliais e endoteliais acarreta o enfisema, entretanto, tais modelos apresentam pouca atividade inflamatória nos pulmões (AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003; DEMEDTS et al., 2006).

Estudos relataram que o aumento da atividade proteolítica nos pulmões interfere no processo de apoptose. Aoshiba e colaboradores (2003) relataram que a atividade elastolítica induziu apoptose em células epiteliais pulmonares de camundongos com enfisema. Ademais, proteases como a metaloproteinase (MMP) ativam ligante de faz contribuindo para o processo de apoptose (POWELL et al., 1999; DEMEDTS et al., 2006).

1.5.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é outro fator envolvido na patogênese do enfisema (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003; DEMEDTS et al., 2006) e resultam em prejuízos aos lipídeos, às proteínas e ao material genético (DNA) (REPINE; BAST; LANKHORST, 1997; MACNEE, 2001; HENRICKS; NIJKAMP, 2001; BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003).

No caso do enfisema, moléculas oxidantes têm duas principais origens: a) a primeira é devido à exposição à fumaça do cigarro, uma vez que o fumo contém mais de 1.017 partículas e muitas apresentam alto poder oxidante como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RUFINO; SILVA, 2006; PRYOR, 1997; MORISSETTE; PARENT; MILOT, 2009). b) a segunda origem vem da inflamação crônica inerente ao enfisema que persiste mesmo após a cessação do fumo (WILLEMSE et al., 2004); macrófagos e neutrófilos são ativados nos pulmões enfisematosos e produzem mais espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à danos oxidativos importantes (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; BRITTON et al., 1995; SCHUNEMANN; FREUDENHEIM; GRANT, 2001; BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003). De fato, comparando pulmões de fumantes com enfisema, fumantes sem enfisema e ex-fumantes, maiores danos em proteínas e lipídeos são observados nos pulmões com enfisema (RAHMAN et al., 2002; MORISSETTE; PARENT; MILOT, 2009). Porém, embora mediadores inflamatórios também aumentem a produção de oxidantes na inflamação, ainda não está claro se a exclusão destes mediadores poderia ainda resultar na lesão tecidual pulmonar (VALENÇA; PORTO, 2008).

O estresse oxidativo pode levar a apoptose em células endoteliais e epiteliais e induzir danos à matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento do enfisema (MAJO; GHEZZO; COSIO, 2001; KASAHARA et al., 2000; TUDER; GRATH; NEPTUNE, 2003; DEMEDTS et al., 2006). Além disso, o estresse oxidativo influencia no desequilíbrio de protease-antiprotease pela ativação de proteases e inibição das antiproteases, acelerando a degradação da elastina no parênquima pulmonar (TAGGART et al., 2000, BARNES, 2003). Adicionalmente, os oxidantes contribuem para a reação inflamatória pela ativação do fator de transcrição NF- κ B, induzindo assim a transcrição de genes pró-inflamatórios (DEMEDTS et al., 2006).

No pulmão, antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase reduzem o estresse oxidativo (RAHMAN; BISWASSK, 2006). Compostos com

atividade antioxidante previnem o processo de apoptose reduzindo o dano ao parênquima pulmonar e consequentemente o enfisema (MORISSETTE; PARENT; MILOT, 2009).

1.5.4 Processo inflamatório

Os neutrófilos são abundantes no sangue, mas praticamente ausentes nos tecidos pulmonares em pessoas saudáveis. Em uma reação inflamatória produzem-se vários fatores quimiotáxicos para estas células que rapidamente migram para o sítio de inflamação, onde exercem função fagocítica e liberam substâncias lesivas aos tecidos, desempenhando papel central na fisiopatologia do enfisema (DALLEGRI; OTTONELLO, 1997; WAGNER; ROTH, 2000; RUFINO; SILVA, 2006; BARNES, 2003).

No caso do tecido pulmonar, há indícios que fumantes apresentam infiltração neutrofílica nos pulmões (MACNEE et al., 1989). Substâncias proteicas são liberadas dos grânulos de neutrófilos, como elastase neutrofílica, fosfatase ácida, betaglucuronidases, mieloperoxidases, metaloproteinases (MMP-8, MMP-9), lipocaína associada à gelatinase, proteinase 3 (PR3) e catepsina G (CG); e tais substâncias podem participar direta ou indiretamente da destruição do parênquima pulmonar. Além disso, estas células contribuem para a destruição do parênquima pela liberação de oxidantes como ânion superóxido (CONDLIFFE; KITCHEN; CHILVERS, 1998; BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003).

Outros produtos com capacidade de promover quimiotaxia e ativação de outros neutrófilos, como IL-8 e o leucotrieno B4 (LTB4), são liberados pelos neutrófilos. Tais mediadores amplificam e perpetuam o processo inflamatório neutrofílico, contribuindo para o desequilíbrio entre produção e degradação de proteínas de matriz extracelular, levando à destruição da parede alveolar (JEFFERY, 1999; HASLETT, 1999; RUFINO; SILVA, 2006).

Os macrófagos apresentam um importante papel no desenvolvimento da DPOC, encontrando-se em número aumentado no parênquima pulmonar, especialmente nos espaços alveolares, sendo o tipo celular mais freqüente dentre os que residem no pulmão. São células derivadas da medula óssea e do monócito sanguíneo e desempenham várias funções: fagocitam partículas ou antígenos, participam da apresentação de antígenos aos linfócitos T e são capazes de liberar várias citocinas e metabólitos ativos do ácido araquidônico (NIEWOEHNERN; KLEINERMAN; RICE, 1974; HOGG; SÊNIOR, 2002).

Em indivíduos com enfisema, há um aumento de 25 vezes no número de macrófagos no tecido e no espaço alveolar comparado com fumantes normais (RETAMALES et al., 2001). Há evidências que estas células podem ter sobrevivência prolongada em pulmões de fumantes e de pacientes portadores de DPOC (TOMITA et al., 2002).

Macrófagos ativados pela exposição à fumaça do cigarro liberam mediadores inflamatórios incluindo: IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α e γ , IL-10, IL-12, IL-15, fator inibitório de macrófagos; metabólitos do ácido araquidônico; metabólitos de oxigênio – ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$); enzimas elastocísticas – metaloproteinases (MMP-2, MMP-19, MMP-12), catepsinas K, L e S, elastases e óxido nítrico (RUFINO; SILVA, 2006; BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003).

As metaloproteinases que participam da degradação de proteínas da matriz, também desempenham papel na inflamação, uma vez que, propiciam a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (VALENÇA; PORTO, 2008). Células epiteliais também podem ser uma importante fonte de mediadores inflamatórios e proteases na DPOC. Quando ativadas pela fumaça do cigarro produzem mediadores inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-8 (MIO et al., 1997; HELLERMANN et al., 2002; FLOREANI et al., 2003).

1.5.5 Ativação imunológica

Evidências acumuladas nos últimos anos sugerem que a DPOC é uma doença com forte participação de linfócitos T CD8+ citotóxicos. A associação e o equilíbrio da imunidade inata, feita por neutrófilos, macrófagos e células Natural Killer (NK), entre outras, e da imunidade adaptativa, que dependem preferencialmente dos linfócitos, fortalecem o sistema de defesa contra microorganismos potencialmente patogênicos e outros antígenos (LIU et al., 1996).

Há um aumento no número total de linfócitos T no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC, com um grande aumento de células CD8+ e CD4+ (RETAMALES et al., 2001; FINKELSTEIN et al., 1995; MAJO; GHEZZO; COSIO, 2001; SAETTA et al., 1999; O'SHAUGHNESSY et al., 1997). Há uma correlação positiva entre o número de células T e quantidade de destruição alveolar (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003).

Alguns autores evidenciaram aumento da concentração de linfócitos CD8+ nos pulmões de pacientes fumantes com DPOC (O'SHAUGHNESSY et al., 1997; SAETTA et al., 1998), bem como no sangue periférico. Porém, o mecanismo pelo qual as células CD8+, e em menor extensão CD4+, acumulam-se nos pulmões ainda não é compreendido, acredita-se que tais células perpetuem o processo inflamatório (DE JONG et al., 1997; RUFINO; SILVA, 2006).

Células Natural Killer (NK, CD56+) são células que participam da defesa contra infecções virais e encontram-se reduzidas na circulação de pacientes com DPOC (PRIETO et al., 2001) e em fumantes normais (ZEIDEL et al., 2002). Com relação às células dendríticas, é provável que desempenhem um importante papel na resposta pulmonar à fumaça do cigarro e a outros agentes inalatórios nocivos, pois ativam uma variedade de células imunes e inflamatórias, podendo ser elemento chave na DPOC. Além disso, estudos indicam que células epiteliais também podem estar envolvidas na resposta imune adaptativa (BANCHEREAU et al., 2000).

1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENFISEMA PULMONAR

Na tentativa de melhor compreender aspectos fisiopatológicos e mecanismos envolvidos na gênese do enfisema pulmonar para obter estratégias terapêuticas efetivas, vários modelos experimentais têm sido empregados. Entretanto, existem limitações para o uso de modelos experimentais em animais, uma vez que são modelos não espontâneos da doença e não mimetizam por inteiro o fenótipo da doença (GRONEBERG; CHUNG, 2004). A escolha de qualquer modelo animal (espécie ou linhagem) apresenta restrições que devem ser consideradas: 1) diferenças entre as espécies quanto ao desenvolvimento e à maturação dos pulmões; 2) diferenças entre espécies quanto à anatomia pulmonar, e 3) diferenças entre espécies e linhagens da mesma espécie quanto à suscetibilidade aos agentes que causam injúrias (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008).

Atualmente os métodos mais utilizados para a indução de enfisema são:

1) Instilação de proteases: Esse modelo procura mimetizar o enfisema ocorrido em humanos fumantes com base na hipótese protease-antiprotease. Essa hipótese (já anteriormente citada) foi desenvolvida a partir de observações realizadas por Laurell e Eriksson (1963) que

identificaram que pacientes com deficiências de α 1-antitripsina desenvolviam precocemente enfisema. Posteriormente, Gross et al (1965) descreveram a indução do enfisema com a instilação de proteases de plantas (papaína). A partir de tais estudos chegou-se ao conhecimento de que o cigarro promovia o influxo de células inflamatórias no trato respiratório inferior a partir da liberação de proteases que destroíam a matriz do parênquima pulmonar. Há uma variedade de enzimas que podem ser usadas para provocar a destruição (“digestão”) das elastinas pulmonares para caracterização patológica do enfisema e vários são os tipos de animais utilizados (JANOFF, 1985; WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008).

Existem pontos positivos e negativos na administração de protease por meio de instilações (intratraqueal) ou inalação (aerosol). Os pontos positivos são: desenvolvimento rápido do enfisema (cerca de 20 dias), na qual se pode ter o domínio do desenvolvimento e da gravidade do enfisema pela seleção da enzima (elastase pancreática de porco – PPE ou elastase de neutrófilos humano - HNE) e da dose administrada. É aceito que a exposição do pulmão a esta enzima em roedores promova inflamação pulmonar aguda (LUCEY et al., 2002; HAYES; KORTHY; SNIDER, 1975) seguida por mudanças morfológicas (SNIDER; LUCEY; STONE, 1986) e comprometimento da função pulmonar (TEPPER et al., 2000; MAO et al., 2002), assemelhando-se assim ao enfisema humano (INOUE et al., 2010b). Além disso, há a possibilidade de se utilizar inibidores enzimáticos para melhor ajuste da doença em animais experimentais. Hantos et al., (2008) argumentam que o tratamento com elastase (PPE) em camundongos produz dano pulmonar similar ao enfisema dos seres humanos que fumam durante 5 anos. Alguns pontos negativos estão relacionados a falta de informações sobre os mecanismos de ação da elastase (WRIGHT; CHURG, 2008).

2) Inalação de fumaça de cigarro: O primeiro modelo utilizando-se fumaça de cigarro em cobaias foi apresentado por Wright e Churg (1995). Tal modelo parece ser o mais fiel na retratação das alterações progressivas da função pulmonar (melhor retrata a forma moderada do enfisema centrolobular) e desenvolvimento da metaplasia de células caliciformes das vias aéreas que ocorrem com os seres humanos. Apesar disso, faltam ferramentas para o estudo molecular (por ex.: anticorpos e reagentes) do enfisema em cobaias. Ratos e camundongos não apresentam o mesmo padrão de respostas das cobaias, no entanto, camundongos são bastante utilizados (GUERRASSIMOV et al., 2004; TAKUBO et al., 2002; DHAMI et al., 2000). Outro ponto que merece destaque é que não há uma padronização desse modelo de indução do enfisema. Há variações de laboratório para laboratório principalmente quanto ao sistema e ao protocolo de exposição à fumaça de cigarro e tipos de cigarros utilizados. Esse modelo requer

longo e cuidadoso tempo de exposição à fumaça do cigarro e as lesões não progridem após cessada a exposição (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008).

Além da instilação de proteases, há modelos que utilizam instilação repetida de LPS intratraqueal para produzir resposta inflamatória exacerbada. Além da inalação da fumaça de cigarro, outros modelos eficazes no desenvolvimento de DPOC têm sido empregados como a exposição a diferentes gases como SO_2 , NO_2 , material particulado e gases oxidantes (BISELLI, 2008; WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A DPOC é uma das principais causas de morte e incapacitação em todo mundo (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003), é responsável por um quarto do total da população adulta hospitalizada com problemas respiratórios e está em primeiro lugar nas estatísticas de mortalidade por doenças respiratórias. Porém, o enfisema pulmonar trata-se de um problema de saúde pública cuja fisiopatologia perdura controversa. O estudo da fisiopatologia do enfisema em seres humanos é restrito ao uso de observações morfológicas e moleculares de fragmentos de tecidos extraídos de pacientes submetidos à cirurgia e os modelos animais desta doença apresentam limitações uma vez que não são espontâneos e não mimetizam por inteiro o fenótipo da doença (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008).

Os modelos atualmente existentes são em ratos, camundongos e cobaias que são expostos à fumaça do cigarro, à proteases (como por exemplo, as elastases), animais geneticamente modificados entre outros, não sendo esses amplamente aceitos pela comunidade científica. Nesse contexto, o presente estudo objetiva desenvolver modelos de enfisema induzidos por elastase na tentativa de obter não só alterações estruturais, como também inflamatórias e funcionais pulmonares que se assemelhem ao enfisema humano, propiciando melhor entendimento fisiopatológico da doença.

3 OBJETIVO

O presente estudo visa a desenvolver modelos de enfisema induzido por elastase, na tentativa de obter alterações morfo-funcionais pulmonares similares às aquelas observadas em humanos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Analisar as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas do pulmão;
- 2) Quantificar os achados morfométricos pulmonares para dar suporte aos achados funcionais;
- 3) Quantificar o conteúdo de fibras elásticas e colágenas no septo alveolar com o intuito de avaliar o remodelamento do parênquima pulmonar.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 36 camundongos Swiss machos (25-30g) oriundos do biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram divididos, inicialmente e de forma aleatória, em dois grupos principais: grupo controle e grupo enfisema.

Todos os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo comitê de cuidados e uso dos animais de laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América (*U.S. Department of Health and Human Care Services*, 1985). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alfenas – MG (Protocolo 256/2009) e do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-019).

Todos os animais foram inicialmente abrigados no biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*, com ciclo diário de 12 horas de exposição à luz para aclimatização em suas gaiolas.

4.2 PREPARO DOS ANIMAIS

Para a realização de cada instilação, os camundongos foram pesados, anestesiados com sevoflurano e submetidos a uma pequena cirurgia para a abertura de óstio anterior na traquéia, onde a devida solução foi administrada por seringa (Hamilton) conectada agulha gengival (3G) através de uma cânula de polietileno.

As instilações intratraqueais de salina foram administradas nos animais do grupo controle e as instilações de elastase pancreática de porco (PPE) (Sigma, St. Louis, MO) na dose 0,3 ou 0,6U foram administradas para a indução do enfisema pulmonar no grupo enfisema.

No 10º dia da primeira instilação, metade dos animais recebeu uma segunda dose.

Após 20 dias, todos os animais foram submetidos á análise mecânica pulmonar e retirada dos pulmões para a histologia pulmonar.

A medida da mecânica pulmonar e a análise da histologia por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF^o) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo salina (50 µl, intratraqueal) e grupo enfisema (elastase na dose de 0,3U ou 0,6U, no volume de 50 µL). O grupo salina foi subdividido em: grupo Sal x 1- animais instilados com salina uma única vez e grupo Sal x 2 – animais que receberam salina dose dupla. O grupo enfisema foi subdividido em grupo 0,3U x 1 – animais instilados com dose única de 0,3U de elastase; grupo 0,3U x 2 – animais instilados com dose dupla de 0,3U de elastase; grupo 0,6U x 1 – animais instilados com dose única de 0,6U de elastase e grupo 0,6U x 2 – animais instilados com dose dupla de 0,6U de elastase (Figura 1). A segunda dose de salina ou elastase (grupo Sal, 0,3U e 0,6U x 2) foi realizada 10 dias após a primeira instilação. Decorrido 20 dias da primeira instilação, todos os grupos foram submetidos à análise da mecânica e histologia pulmonares.

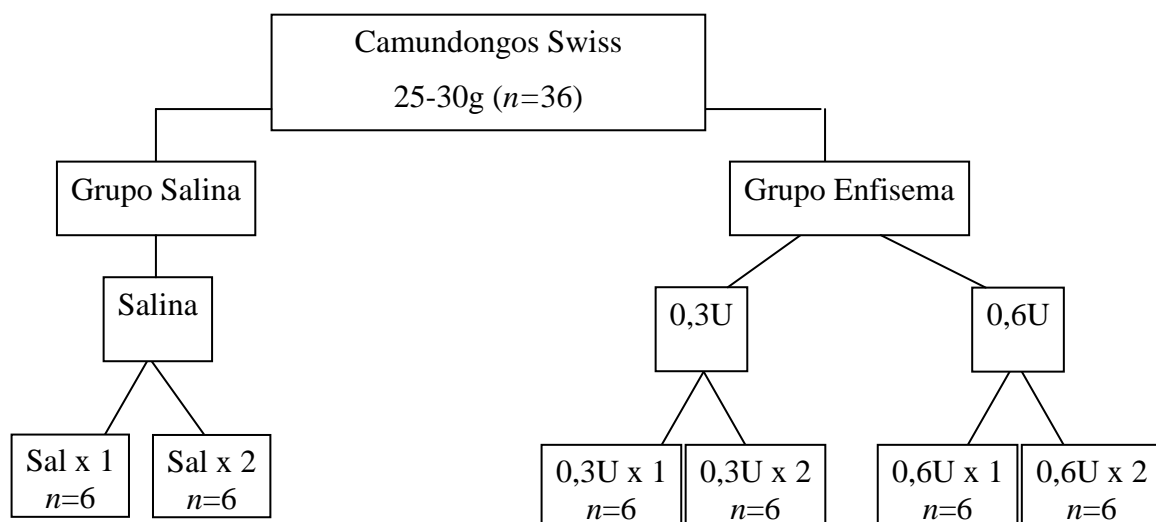


Figura1- Representação esquemática dos grupos experimentais.

4.4 MECÂNICA PULMONAR

Vinte dias após a primeira instilação, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com tiopental sódico [Sodium Pentothal®, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EUA (20 mg/kg, i.p.)].

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueotomia com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com injeção intravenosa de brometo de vecurônio (0,005 mg/kg).

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória e ventilados por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (V_T) de 0,2 ml.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdome justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. Em seguida, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que por sua vez, foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Imediatamente antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O (SALDIVA et al., 1992). A utilização da PEEP evitou o colapso alveolar resultante da retirada da parede torácica.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e corte superior, abaixo da clavícula.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2$ ml) e fluxo ($V' = 1$ ml/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (KOCHI et al., 1988a; KOCHI et al., 1988b).

Durante os experimentos se evitou ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através da captação de 10-12 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração.

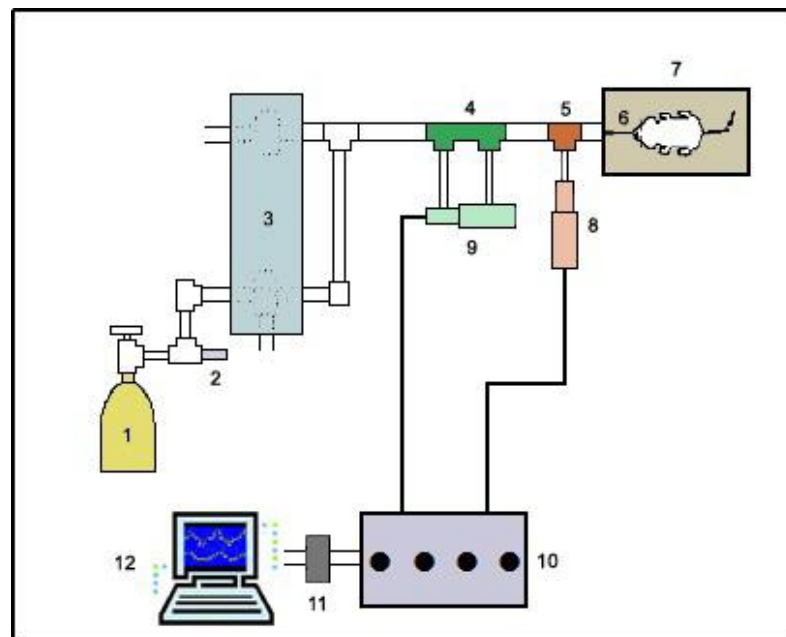


Figura 2- Montagem experimental para a medida da mecânica pulmonar.

- 1- Cilindro de ar comprimido.
- 2- Rotâmetro de agulha.
- 3- Ventilador de fluxo constante com duas válvulas solenóides.
- 4- Pneumotacógrafo.
- 5- Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6- Cânula traqueal.
- 7- Mesa cirúrgica.
- 8- Transdutor de pressão traqueal.
- 9- Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10- Scireq-24
- 11- Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 12- Microcomputador.

Fonte: OLIVEIRA, 2008.

4.5 MÉTODO DE OCLUSÃO AO FINAL DA INSPIRAÇÃO

O método de oclusão ao final da inspiração permite analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (BATES, et al., 1985; BATES; ROSSI; MILIC-EMILI, 1985; BATES; BACONNIER; MILIC-EMILI, 1988; BATES et al., 1988; BATES et al., 1989; KOCHI et al., 1988a; KOCHI et al., 1988b).

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal (P_{tr}) corresponde a pressão transpulmonar (P_L). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da P_L até um ponto de inflexão (P_i), a partir do qual, o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}). A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$), que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial (P_{max}) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde ao componente viscoso pulmonar, ou seja, reflete a pressão necessária para vencer a resistência do pulmão (KOCHI et al., 1988a; KOCHI et al., 1988b; BATES et al., 1988; BATES et al., 1989). A segunda variação de pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (*stress relaxation*) e/ou inhomogêneo (pendelluft) do tecido pulmonar (Figura 3). O valor da elastância estática do pulmão (Est,L) foi calculado dividindo-se P_{el} pelo V_T . As seguintes fórmulas serão utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$(1) \quad \Delta P_1 = P_{max} - P_i$$

$$(2) \quad \Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

$$(3) \quad Est = P_{el} / V_T$$

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o fluxo nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno volume. Esse fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da P_i e da P_{el} (Figura 3).

Foram registrados 10-12 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração (BATES, et al., 1985; BATES; ROSSI; MILIC-EMILI, 1985; BATES; BACONNIER; MILIC-EMILI, 1988; BATES et al., 1988; BATES et al., 1989; KOCHI et al., 1988a; KOCHI et al., 1988b), em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal

registraram os sinais de V' e PL, respectivamente. As respostas de frequências dos sistemas de registro da PL serão estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados [Scireq, Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá], filtrados, convertidos em sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bits (DT-2801A, Data Translation, Malboro, EUA) e amostrados a uma frequência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador para posterior análise, através do programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá) (Figura 2).

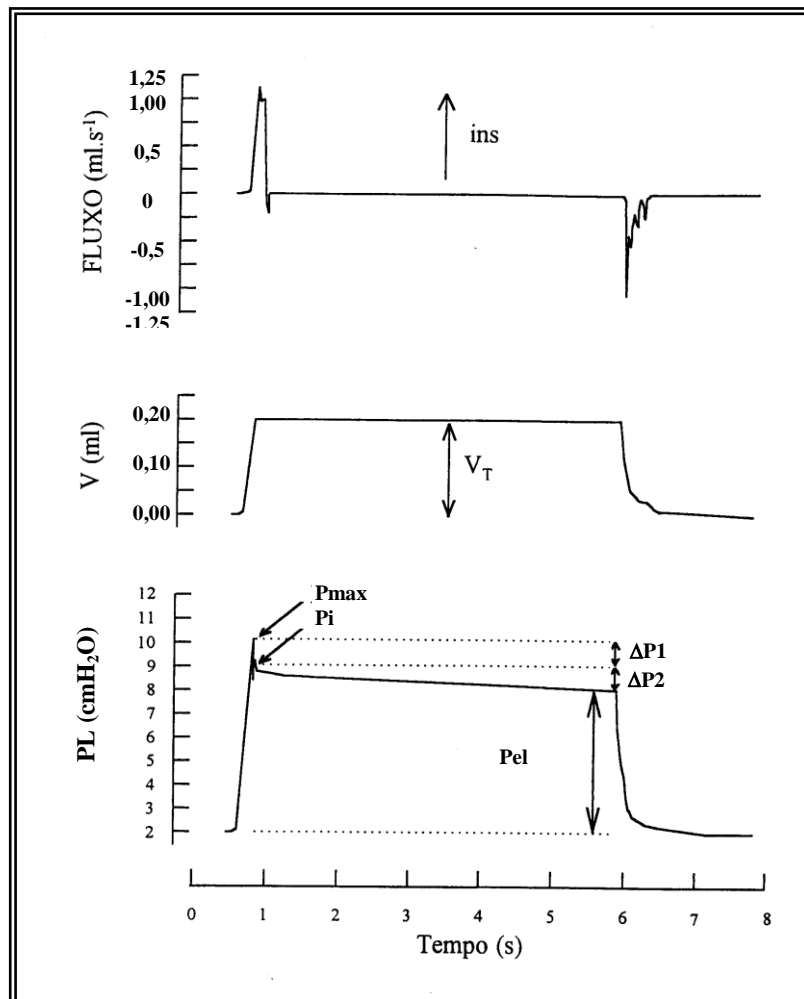


Figura 3- Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1$) que corresponde a $P_{max} - P_i$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

Fonte: OLIVEIRA, 2008

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi aferida previamente através da aplicação de diferentes fluxos de ar ao sistema (até fluxos de 26 mL/s, bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R_{eq} = \Delta P/V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A pressão resistiva do equipamento ($P_{eq} = R_{eq} \times V'$) foi subtraída da pressão resistiva dos pulmões de tal forma que os resultados representem as propriedades mecânicas intrínsecas. A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade do pneumotacógrafo) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG; MORTOLA, 1981; LORING; ELLIOT; DRAZEN, 1979).

4.6 REMOÇÃO DOS PULMÕES

Após a análise da mecânica pulmonar, 1 mL de heparina diluída (0,5 mL de heparina sódica em 0,5 mL de solução fisiológica) foi injetada na veia cava inferior e, após 1 minuto, os animais foram exanguinados por seção cirúrgica direta da aorta e veia cava inferior em suas porções abdominais. A traquéia foi, então, ocluída ao final da expiração com linha de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ocluído pelo fio de algodão e, posteriormente, o esôfago e o coração foram separados dos pulmões e vias aéreas por leve tração. Os brônquios fontes direito e esquerdo foram ocluídos por um fio de algodão e, após uma seção acima do fio, os pulmões direito e esquerdo foram separados, sendo mantidos no volume expiratório final.

4.7 HISTOLOGIA PULMONAR

4.7.1 Fixação e preparo das lâminas

Os pulmões direitos foram resfriados por imersão rápida em nitrogênio líquido (aproximadamente 3 minutos), retirados e mantidos em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70°C por 24 h. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol:

- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1h;
- etanol a 100%, a -20°C durante 1h e, em seguida, a -4°C durante 24h.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 μm de espessura.

4.7.2 Análise morfométrica

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica (BX51, ©*Olympus Latin America Inc.*, Miami, Flórida, EUA) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (WEIBEL, 1990), utilizando-se uma ocular, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo, acoplada ao microscópio.

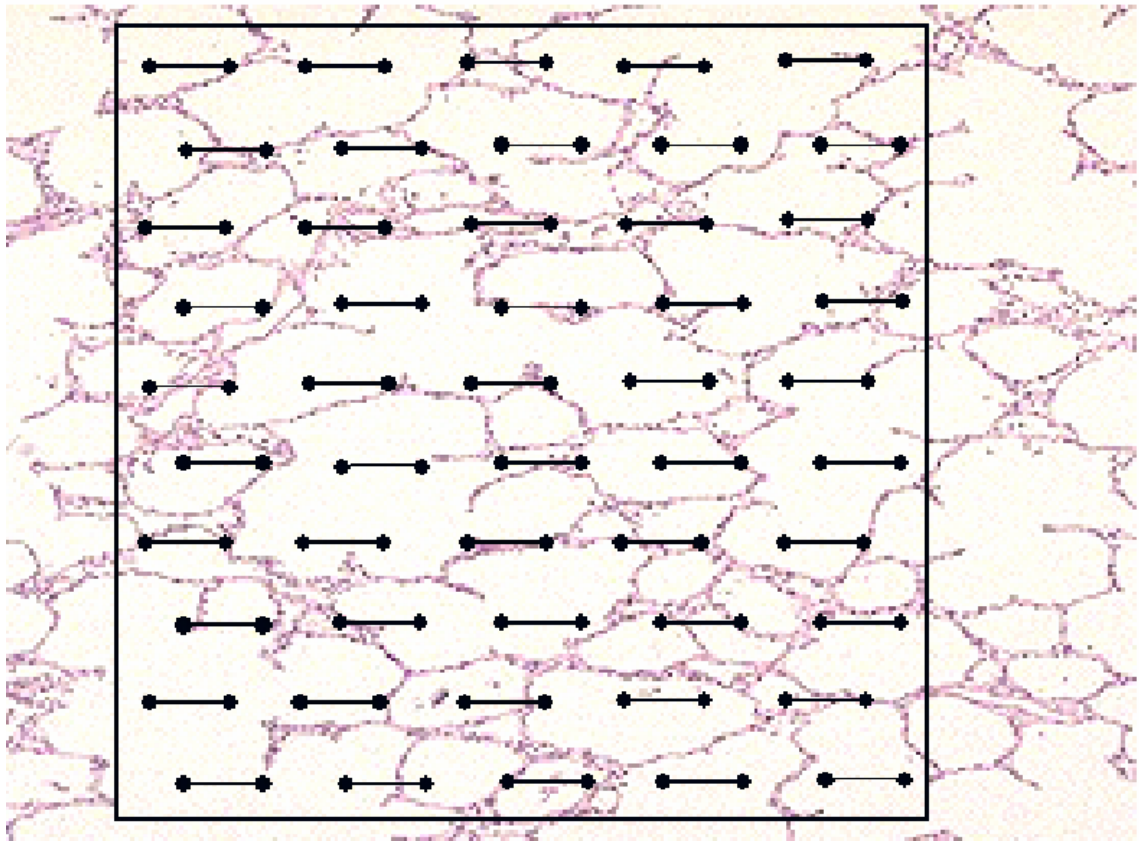


Figura 4- Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Fonte: OLIVEIRA, 2008.

Em um aumento de 200x, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (WEIBEL, 1990). O número de pontos que caíram em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado + hiperinsuflado) e expresso sob a forma de percentual.

Além disso, computou-se o diâmetro alveolar médio (L_m). Para tal foram contados os números de interceptos alveolares, em 20 campos aleatórios, em cada lâmina, em um aumento de 200x (NAGASE et al., 1996), sendo: $L_m = \text{Somatório do comprimento dos segmentos de reta (1250 mm)} / n^\circ \text{ de interceptos}$.

Em um aumento de 1000x foi avaliada a celularidade pulmonar, quantificando os seguintes parâmetros: tecido pulmonar, células polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares (MN) em dez campos aleatórios e não coincidentes. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. Assim, o resultado é apresentado como fração de área de tecido pulmonar. No caso de PMN e MN, foi quantificado o número de células presentes no septo

alveolar, no espaço alveolar e o número total de cada tipo celular, bem como a celularidade total (PMN + MN).

4.7.3 Quantificação de fibras elásticas e colágenas

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar.

Fibras elásticas: Foi utilizado o método de resorcina-fucsina de Weigert modificado com oxidação (FULLMER; SHEETZ; NARKATES, 1974), que permite a identificação das fibras elásticas.

Colágeno: Os tecidos foram corados em solução de Sirius Red dissolvido em solução saturada de ácido pícrico e observados sob microscopia de luz polarizada, uma vez que a acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de polarização de picrosirius é específica para estruturas colágenas (MONTES, 1996).

Nos cortes histológicos foram analisadas amostras do parênquima pulmonar. Em cada lâmina, foram avaliados 10 campos aleatórios e não-coincidentes do parênquima pulmonar. A quantificação envolveu o cálculo do percentual da área tecidual corada positivamente para fibras elásticas ou colágenas nas regiões de interesse. As medidas, considerando um aumento de 400x da imagem analisada, foram realizadas utilizando-se o *software* Image-Pro[®] Plus 6.3 para Windows[®] (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA), através de um microscópio óptico (microscópio Olympus corp; BX51; Tóquio, Japão). A área ocupada pelas fibras elásticas e colágenas foi determinada por densitometria digital. Brônquios e vasos sanguíneos foram excluídos das medidas. Os resultados foram expressos como fração de área de fibras elásticas ou colágenas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada a análise de variância seguida de teste de Tukey para a comparação entre os dados. Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%. A análise estatística foi realizada com o programa estatístico GrafPadPrism 5.

5 RESULTADOS

5.1 MECÂNICA PULMONAR

Os valores de volumes e fluxos utilizados durante o experimento estão mostrados na tabela 1 e não variaram significativamente entre os grupos estudados.

Tabela 1- Fluxo aéreo e volume corrente.

		Fluxo (mL/s)	Volume (mL)
Dose única (x 1)	Sal	1,00 ± 0,002	0,20 ± 0,002
	0,3U	0,99 ± 0,003	0,20 ± 0,001
	0,6U	0,99 ± 0,004	0,20 ± 0,002
Dose dupla (x 2)	Sal	1,00 ± 0,001	0,20 ± 0,001
	0,3U	0,99 ± 0,004	0,20 ± 0,001
	0,6U	0,99 ± 0,002	0,20 ± 0,001

Os valores representam média ± SEM de seis animais por grupo (10-12 determinações por animal). Camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U.

Dados da elastância estática do pulmão (Est,L) obtidos nos grupos controle e enfisema estão representados na figuras 5. A Est,L reduziu significativamente nos animais do grupo 0,3U x 2 em relação ao grupo Sal x 2 e ao grupo 0,3U x 1.

A figura 6 mostra que a instilação intratraqueal de elastase não provocou alteração significativa nos demais parâmetros da mecânica pulmonar, pois não houve alterações quanto a variação de pressão resistiva do pulmão ($\Delta P1,L$), variação de pressão viscoelástica do pulmão ($\Delta P2,L$) e variação de pressão total no pulmão ($\Delta Ptot,L$) de camundongos do grupo enfisema em relação aos animais do grupo controle.

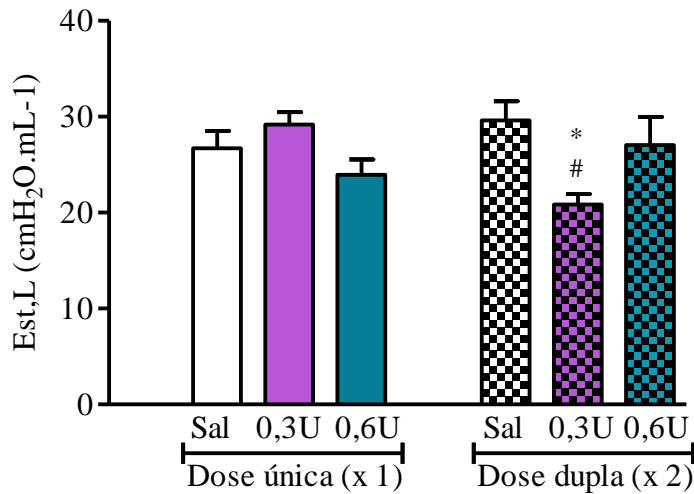


Figura 5- Elastância estática do pulmão (Est,L) de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Barras representam a média \pm SEM de seis animais por grupo (10-12 determinações por animal). * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo Sal e # $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo 0,3U x 1.

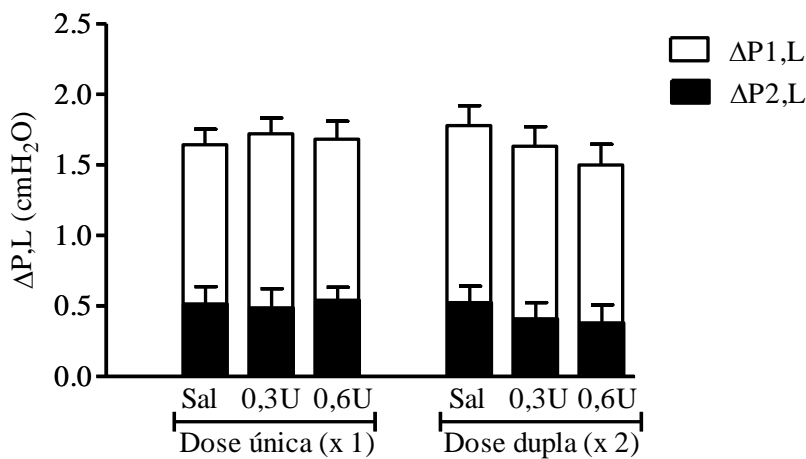


Figura 6- Variação de pressão resistiva do pulmão ($\Delta P1,L$), variação de pressão viscoelástica do pulmão ($\Delta P2,L$) e variação de pressão total no pulmão ($\Delta P_{tot},L$) de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Barras representam a média \pm SEM de seis animais por grupo (10-12 determinações por animal).

5.2 HISTOLOGIA PULMONAR

5.2.1 Análise morfométrica

A figura 7 apresenta valores em percentagem da área ocupada por alvéolos normais e esta foi significativamente menor em todos os grupos induzidos ao enfisema por elastase 0,3U e 0,6U dose única (x 1) e dupla (x 2) em relação aos animais do grupos Sal x 1 e Sal x 2, respectivamente. Dentre os animais do grupo enfisema, pode-se observar redução significativa desta percentagem do grupo 0,3U x 2 , 0,6U x 1 e 0,6U x 2 em relação aos animais do grupo 0,3U x 1.

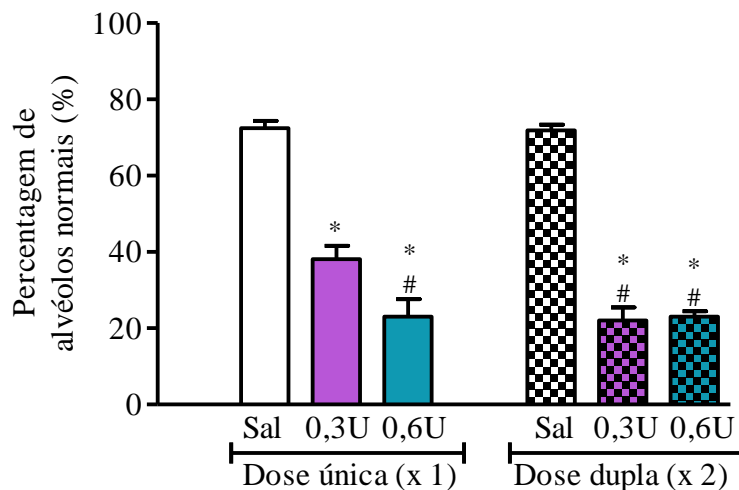


Figura 7- Fração de área ocupada por alvéolos normais no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Barras representam a média \pm SEM de seis animais por grupo (10-12 determinações por animal). Dados foram obtidos de dez campos randômicos, não-coincidentes por camundongo. * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo Sal e # $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo 0,3U x 1.

De acordo com a figura 8, os animais dos grupos 0,3U x 1 e 0,6U x 1 apresentaram aumento significativo da fração de área ocupada por alvéolos hiperinsuflados em relação ao grupo Sal x 1. Também houve aumento significativo desta fração nos animais instilados do grupo 0,3U x 2 em relação ao grupo Sal x 2. Dentre os animais do grupo enfisema, observa-se uma redução significativa da fração de área ocupada por alvéolos hiperinsuflados nos animais do grupo 0,6U x 2 em relação aos animais do grupo 0,3U x 2.

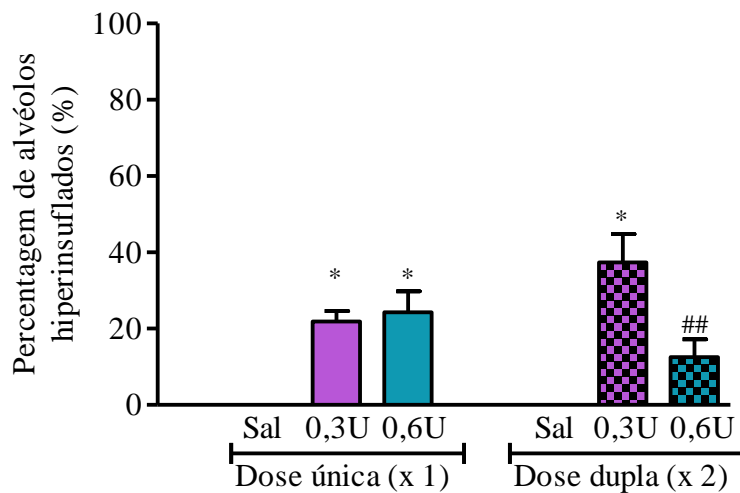


Figura 8- Fração de área ocupada por alvéolos hiperinsuflados no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Barras representam a média \pm SEM de seis animais por grupo (10-12 determinações por animal). Dados foram obtidos de dez campos randômicos, não-coincidentes por camundongo. * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo sal; ## $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo 0,3U x 2.

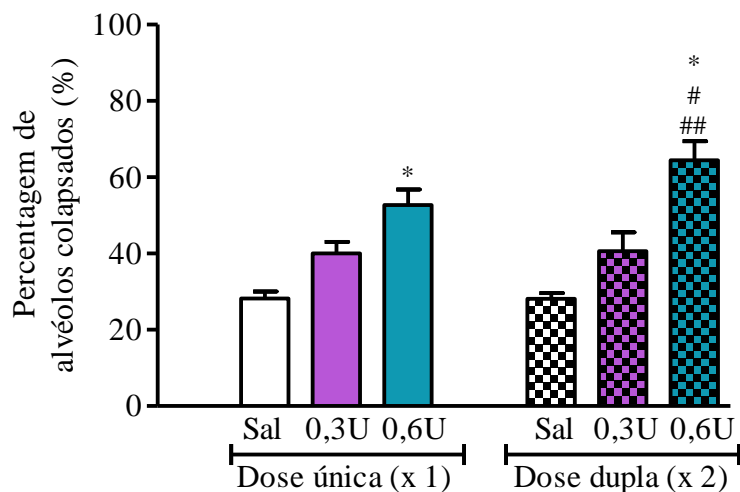


Figura 9- Fração de área ocupada por alvéolos colapsados no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Barras representam a média \pm SEM de seis animais por grupo (10-12 determinações por animal). Dados foram obtidos de dez campos randômicos, não-coincidentes por camundongo. * $p < 0,005$ significativamente diferente do grupo sal; # $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo 0,3U x 1 e ## $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo 0,3U x 2.

Está demonstrado na figura 9 que houve um aumento significativo da fração de área ocupada por alvéolos colapsados nos camundongos do grupo 0,6U x 1 em relação ao grupo Sal x 1. O mesmo padrão foi observado nos animais do grupo 0,6U x 2 em relação ao grupo

Sal x 2. Entre os animais do grupo enfisema, observa-se aumento significativo desta fração nos animais do grupo 0,6U x 2 em relação aos grupos 0,3U x 1 e 0,3U x 2.

De acordo com a figura 10, a instilação de elastase também provoca um aumento significativo do diâmetro alveolar médio (Lm) nos animais dos grupos 0,6U x 1 e do grupo 0,3U x 2 em relação aos grupo Sal x 1 e Sal x 2, respectivamente. Dentre os animais do grupo enfisema, observa-se aumento significativos do Lm no grupo 0,3U x 2 em relação aos demais grupos 0,3U x 1, 0,6U x 1 e 0,6U x 2.

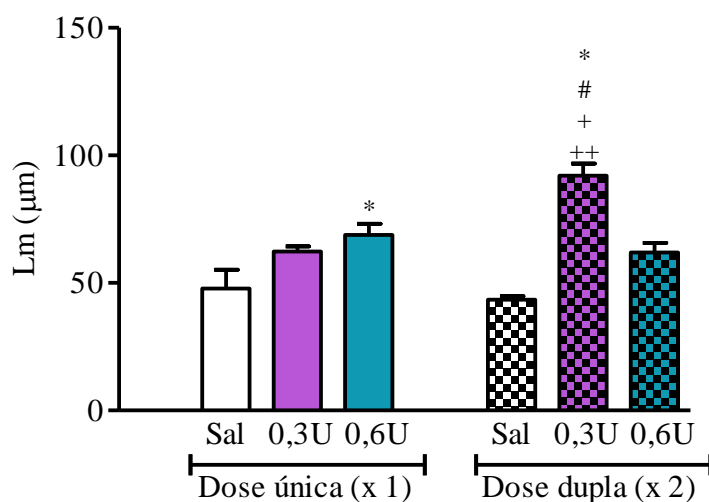


Figura 10- Diâmetro alveolar médio no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Barras representam a média + SEM de seis animais por grupo (10-15 determinações por animal). Dados foram obtidos de 20 campos randômicos, não-coincidentes por camundongo * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo sal; # $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo 0,3U x 1; + $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo 0,6U x 1 e ++ $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo 0,6U x 2.

A análise do parênquima pulmonar por microscopia óptica evidenciou aumento dos espaços aéreos e de tecido colapsado nos animais induzidos ao enfisema por elastase em relação ao grupo controle (Figura 11).

De acordo com a tabela 2, os animais do grupo 0,6U x 1 e 0,6U x 2 apresentaram aumento significativo da porcentagem de PMN (células polimorfonucleares) no parênquima pulmonar em relação ao grupo Sal x 1 e Sal x 2, respectivamente. Dentre os animais do grupo enfisema, ocorreu aumento significativo da porcentagem de PMN nos animais dos grupos 0,6U x 1 em relação ao grupo 0,3U x 1 e do grupo 0,6U x 2 em relação ao grupo 0,3U x 2.

A porcentagem de MN (células mononucleares) aumentou significativamente nos animais do grupo 0,3U x 2 e 0,6U x 2 em relação ao grupo Sal x 2. A celularidade total (PMN

+ MN) apresentou o mesmo perfil, aumentou significativamente no parênquima pulmonar dos camundongos dos grupos 0,3U x 2 e 0,6U x 2 em relação ao grupo Sal x 2.

Tabela 2- Celularidade do parênquima pulmonar.

		PMN (%)	MN (%)	Celularidade total (%)
Dose única (x 1)	Sal	1,02 ± 0,14	20,97 ± 1,32	21,62 ± 1,13
	0,3U	2,07 ± 0,18	25,48 ± 0,81	27,56 ± 0,94
	0,6U	4,09 ± 0,62 *, #	24,94 ± 1,12	29,03 ± 1,00
Dose dupla (x 2)	Sal	1,16 ± 0,14	19,30 ± 0,90	20,28 ± 1,19
	0,3U	1,98 ± 0,49	26,55 ± 2,43 *	33,95 ± 4,02 *
	0,6U	3,95 ± 0,76 *, ##	27,15 ± 1,51 *	31,11 ± 2,17 *

Porcentagem de células de PMN, MN e celularidade total no pulmão de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou e 0,6U. MN = células mononucleares, PMN = células polimorfnucleares. Valores correspondem à média ± SEM de seis animais por grupo. Dados foram obtidos de 10 campos randômicos, não-coincidentes por camundongo. *p<0,05 significativamente diferente do grupo Sal; #p<0,05 significativamente diferente do grupo 0,3U x 1 e ##p<0,05 significativamente diferente do grupo 0,3U x 2.

5.2.2 Quantificação de fibras elásticas e colágenas

O conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar, demonstrados na tabela 3 e na figura 12, reduziu significativamente nos grupo 0,3U x 1 e 0,6U x 1 em relação ao grupo Sal x 1). O mesmo padrão de redução significativa também foi observado nos grupos 0,3U x 2 e 0,6U x 2 em relação ao grupo Sal x 2. Dentre os animais do grupo enfisema, o conteúdo de fibras elásticas reduziu significativamente nos animais do grupo 0,6U x 2 em relação ao grupo 0,3U x 2.

Entretanto, o conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar aumentou significativamente nos grupos 0,6U x 1 e 0,6U x 2 em relação aos grupos Sal x 1 e Sal x 2, respectivamente. Dentre os animais induzidos ao enfisema, o conteúdo de fibras colágenas aumentou significativamente no grupo 0,6U x 1 em relação ao grupo 0,3U x 1.

Tabela 3- Conteúdo de fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar.

		Fibras elásticas	Fibras colágenas
Dose única (x 1)	Sal	5,18 ± 0,32	0,31 ± 0,04
	0,3U	2,93 ± 0,51 *	0,51 ± 0,09
	0,6U	1,67 ± 0,35 *	3,42 ± 1,18 *, #
Dose dupla (x 2)	Sal	6,06 ± 0,45	0,24 ± 0,12
	0,3U	3,74 ± 0,71 *	2,25 ± 0,98
	0,6U	2,30 ± 0,31*, ##	3,26 ± 0,22 *

Área ocupada pelas fibras elásticas e colágenas no parênquima pulmonar de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Valores correspondem à média ± SEM de seis animais por grupo. Dados foram obtidos de dez campos randômicos, não-coincidentes do parênquima pulmonar *p<0,05 significativamente diferente do grupo Sal; #p<0,05 significativamente diferente do grupo 0,3U x 1 e ##p<0,05 significativamente diferente do grupo 0,3U x 2 .

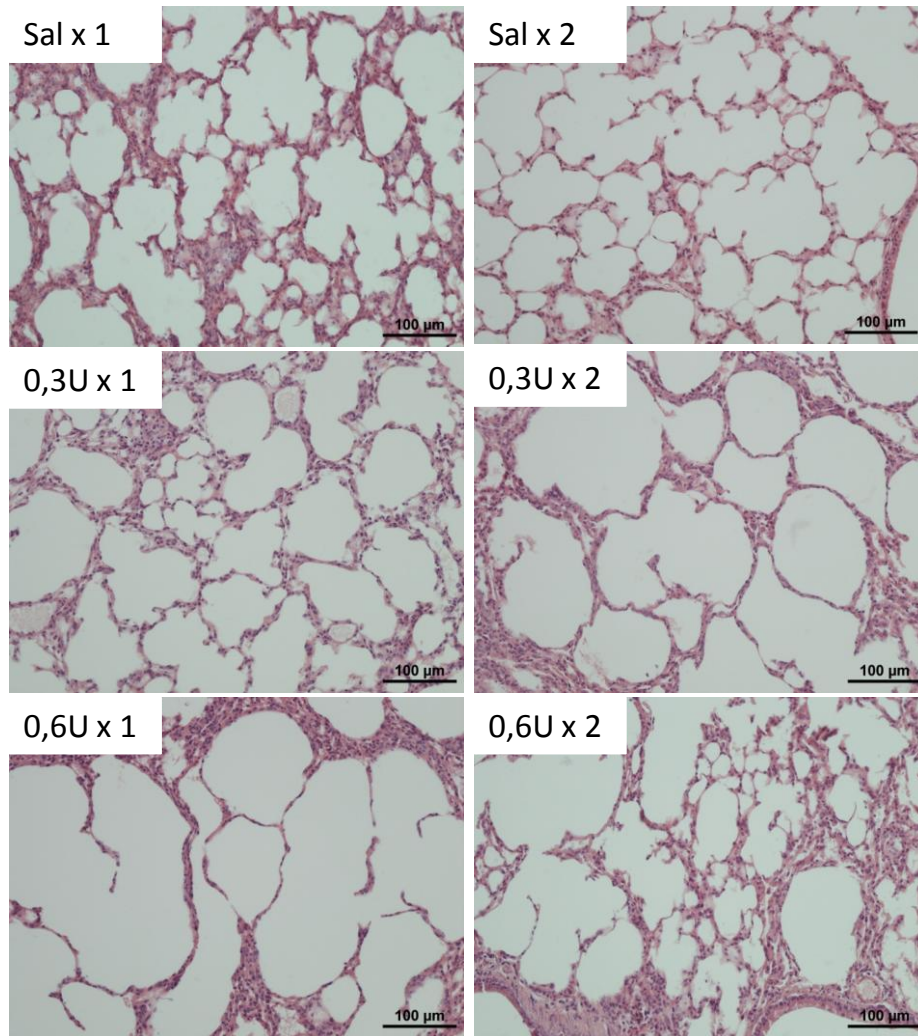


Figura 11- Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar coradas com hematoxilina-eosina de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Aumento original: 200X.

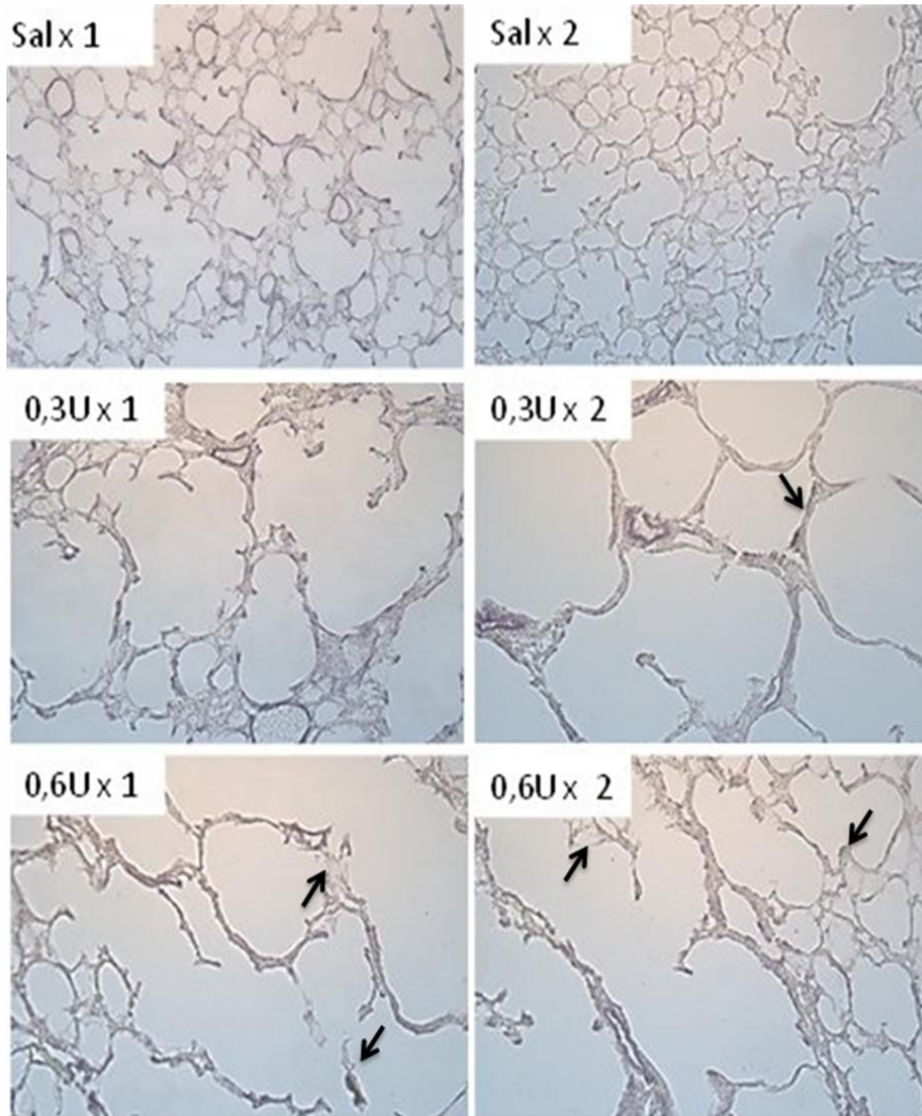


Figura 12- Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar coradas com resorcina-fucsina oxidada para a identificação de fibras elásticas de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Aumento original: 400X.

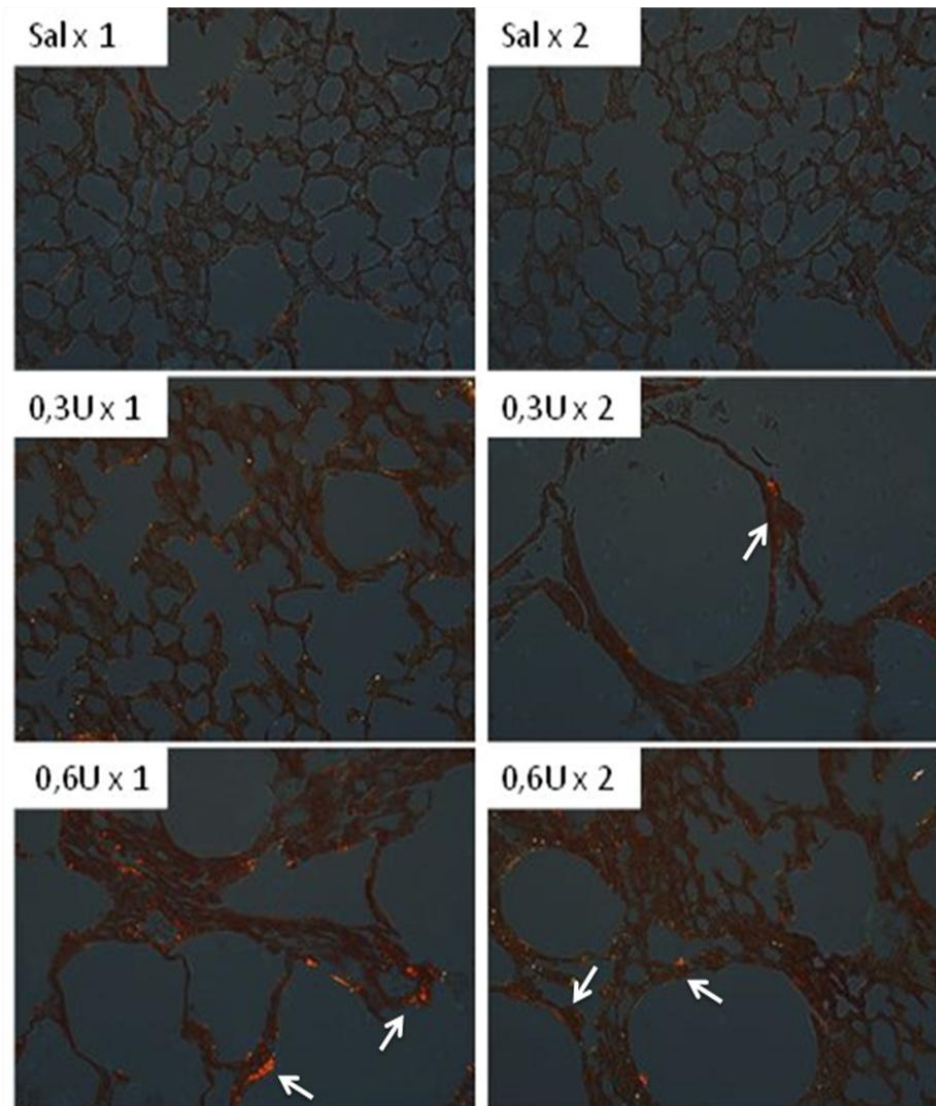


Figura 13- Fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar coradas com solução de Sirius Red dissolvido em solução saturada de ácido pícrico para a identificação de fibras colágenas de camundongos instilados com dose única (x 1) e dupla (x 2) de salina, elastase 0,3U ou 0,6U. Aumento original: 400X.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada alterações funcionais e morfológicas do enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática de porco (PPE) em camundongos. Todas as instilações utilizadas induziram alterações estruturais, inflamatórias e/ou do conteúdo de fibras no parênquima pulmonar compatíveis com o enfisema humano, incluindo aumento de espaços aéreos, influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar e alteração do conteúdo de fibras elásticas e colágenas. Entretanto somente o modelo de instilação dupla da dose de 0,3U promoveu, além das alterações das variáveis descritas, redução da elastância estática pulmonar, mimetizando mudanças funcionais observadas no enfisema pulmonar moderado.

Os modelos experimentais existentes auxiliam no estudo de estruturas e órgãos de difícil acesso em seres humanos e têm sido de fundamental importância para o estudo da fisiopatologia e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC (WRIGTH; CHURCH, 2008). O modelo de instilação intratraqueal de PPE em roedores tem sido bem utilizado por provocar rapidamente o enfisema. Além disso, é aceito que a exposição pulmonar a esta enzima nestes animais promova inflamação pulmonar aguda (LUCEY et al., 2002; HAYES; KOTHY; SNIDER, 1975) seguida por mudanças morfológicas (SNIDER; LUCEY; STONE, 1986) e comprometimento da função pulmonar (TEPPER et al., 2000; MAO et al., 2002; HANTOS et al., 2008; HAMAKAWA et al., 2010), assemelhando-se assim, ao enfisema humano (INOUE et al., 2010b).

O modelo que utiliza instilações de proteases reflete as principais alterações vistas em pacientes com enfisema, porém apresenta limitações: 1) a lesão pulmonar é causada por instilações súbitas, diferentemente da exposição contínua a baixos níveis de inflamação que se acredita estar presente na lesão pulmonar conseqüente ao tabagismo (DAWKINS; SOCKLEY, 2001); 2) a PPE produz lesão localizada, seguida de resposta imunológica e processo de remodelamento que são diferentes do que é visto em humanos (HAMAKAWA et al., 2010; ITO et al., 2005; SLY et al., 2003). Entretanto, os modelos experimentais de enfisema induzido por instilação de proteases nas vias respiratórias são extremamente úteis no estudo da doença, como foi observado em nosso estudo.

Os modelos de enfisema são principalmente desenvolvidos em roedores. Porém, estes possuem limitações uma vez não conseguem reproduzir com fidelidade a DPOC vista em humanos (WRIGTH; CHURCH, 2008). São elas: 1) a morfologia do sistema respiratório de

camundongos apresenta pequena quantidade de glândulas submucosas, menos ramificações de vias aéreas e são desprovidos de bronquíolos respiratórios, o sítio inicial do enfisema centrolobular (LÜTHJE et al., 2009); 2) a parede torácica é mais complacente, 3) o tempo de vida dos camundongos e o desenvolvimento do enfisema é mais rápido que em humanos (HAMAKAWA et al., 2010; ITO et al., 2005; SLY et al., 2003). Porém, o camundongo é uma boa escolha de modelo animal, pois seu genoma tem sido extensivamente estudado, mostrando apresentar grandes similaridades com o genoma humano (LÜTHJE et al., 2009) e devido a abundância de anticorpos disponíveis (VLAHOVIC et al., 1999). Além disso, estes apresentam menores níveis de antiproteases α -1 anti-tripsina que ratos, tendo maior predisposição ao desenvolvimento do enfisema (IHRIG; KLEINERMAN; RYNBRANT, 1971). Hamakawa et al. (2010) aponta que por meio do uso de camundongos que é possível investigar com detalhes a evolução do enfisema avaliando a mecânica pulmonar com o tórax aberto, sendo assim um modelo animal de fácil manuseio. Adicionalmente, sugere-se o camundongo como modelo animal, pois a utilização de fármacos é em menor quantidade.

O protocolo experimental utilizado no presente trabalho foi baseado em estudos prévios que utilizaram doses similares de PPE, com única e/ou repetidas instilações intratraqueal (HANTOS et al., 2008; LÜTHJE et al., 2009; INOUE et al. 2010a), porém diferindo quanto a linhagem de camundongo utilizada e a metodologia empregada. Optou-se pela utilização de camundongos Swiss e pela administração intratraqueal de PPE, por ser uma enzima capaz de promover à curto prazo alterações relacionadas ao enfisema panacinar (CHRISTENSEN et al., 1977; GORDON; SNIDER, 2000). O volume administrado foi de 50 μ L instilados uma ou duas vezes nas doses de 0,3 ou 0,6 U de PPE por animal na tentativa de encontrar modelos com alterações morfo-funcionais pulmonares mais semelhantes ao enfisema humano.

Diversos estudos que utilizaram elastase para a indução do enfisema falham por não avaliarem parâmetros histológicos e funcionais que caracterizam enfisema pulmonar. Sendo alguns exemplos, Mattson e Polle (1998) avaliaram a capacidade oxidativa das enzimas do músculo esquelético em hamsters induzido ao enfisema pela instilação de PPE via intratraqueal (25U/100g peso corpóreo dissolvida em 0,3mL de salina); Marchand et al. (2000) avaliaram a contratilidade do músculo diafragma após uma cirurgia de redução do volume pulmonar em hamsters induzidos ao e enfisema pela administração de PPE via intratraqueal (40U/100g peso corpóreo dissolvido em 0,4mL de solução fisiológica) e Degens et al., (2007) analisaram a apoptose e a expressão de Id2 em hamsters induzidos ao enfisema pela instilação de PPE (40U dissolvida em 0,3 mL de salina/ 100g de peso corpóreo).

Embora inúmeras informações estejam disponíveis na literatura acerca das alterações estruturais secundárias à exposição à PPE poucos estudos abordam o comportamento funcional do pulmão neste modelo. Tal escassez deve-se provavelmente à maior dificuldade de realização de medidas funcionais em camundongos. Mensurar parâmetros da função pulmonar em animais tão pequenos quanto estes representam um desafio. Entretanto, está comprovado que, com o equipamento adequado, como foi o caso, as medidas são fiéis e fornecem informações importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças pulmonares (BATES et al., 1988). Há várias técnicas desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, porém o método de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração difundiu-se por apresentar a vantagem de individualizar variações de pressões em seus componentes resistivos, elásticos e viscoelásticos e/ou inomogêneos (BATES; ROSSI; MILIC-EMILIC, 1985).

No presente estudo foi encontrada redução significativa do componente elástico (Est,L) nos camundongos que receberam dose dupla de elastase 0,3U (grupo 0,3U x 2). Tal redução da elastância estática caracteriza o enfisema moderado no qual ocorre perda de recolhimento elástico do tecido pulmonar em uma fase inicial da doença, indicando um pulmão ainda pouco rígido e mais complacente (FIGUEIRÔA, 2009). Em estudo recente demonstrou-se também esta redução do recuo elástico em camundongos expostos a uma associação de PPE (1.2U) e LPS (7 µL) administrados intranasal por quatro semanas consecutivas (GANESAN et al 2010). Segundo Fusco et al. (2002) esta perda de recuo elástico é determinada pelas fibras do parênquima pulmonar.

A complacência é a tangente da curva pressão-volume e a variável correspondente ao inverso da Est,L. Deste modo, estudos que utilizaram outras metodologias para a avaliação da função pulmonar corroboram com nosso ao observarem aumento da complacência pulmonar em modelos de enfisema induzido por PPE (CHRISTENSEN et al., 1977; INOUE et al., 2010a; HANTOS et al., 2008; HAMAKAWA et al, 2010). Lüthje et al., 2009 encontraram aumento significativo da complacência em camundongos que receberam doses repetidas de PPE (3.3U/100g peso corpóreo) e não nos animais que receberam apenas instilação única (5U/100g peso corpóreo). Apesar das doses utilizadas pelos mencionados autores serem superiores ao usado neste estudo, a repetição da instilação parece ter sido um fator determinante para produzir alteração funcional (redução da Est,L) vista nos animais que receberam dose dupla de PPE 0,3 U.

Até momento são poucos estudos que ilustram uma correlação direta entre alargamento dos espaços aéreos e alterações da complacência. No recente estudo de

Hamakawa et al (2010) demonstraram uma relação entre aumento da complacência e alterações da estrutura dos espaços aéreos em camundongos C57BL/6 cuja indução do enfisema foi realizada pela administração de PPE. Hantos et al. (2008), também apresentaram aspectos complementares aos vistos por Hamakawa et al. (2010).

No presente estudo, nenhuma alteração foi encontrada quanto ao $\Delta P1$ e ao $\Delta P2$ que reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais (SIMILOWSKI, 1989) e a pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (BATES et al., 1988), respectivamente. Em contrapartida, Figueirôa (2009) encontrou aumento de $\Delta P2$ e de ΔE (componente viscoelástico da elastância) em camundongos BALB/c induzidos ao enfisema por instilação de papaína (10U dissolvido em 50 μ L de salina), sugerindo uma lesão mais grave e com presenças de áreas inhomogêneas na periferia.

A destruição alveolar característica do enfisema é responsável por reduzir a força de retração elástica e conseqüentemente, do fluxo expiratório, ocasionando um quadro progressivo de hiperinsuflação pulmonar (HOGG, 2004). Para a quantificação destas características estruturais do modelo murino de enfisema, utilizou-se no presente estudo a técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) proposta por Weibel (1990). Foi obtido menor fração de área ocupada por alvéolos normais (em todos os grupos induzidos ao enfisema), maior fração de área ocupada por alvéolos hiperinsuflados (em todos os grupos com exceção ao grupo 0,6U x 2) e maior fração de área ocupada por alvéolos colapsados (grupos 0,6U x 1 e 0,6U x 2).

Além desta análise morfométrica, a quantificação do tamanho do espaço aéreo utilizando o diâmetro alveolar médio (Lm) é indispensável (WRIGTH; COSIO; CHURG, 2008) sendo talvez o indicador mais sensível de enfisema. No modelo murino de enfisema, foi constatado aumento significativo do Lm nos grupos 0,6U x 1 e 0,3U x 2. Este aumento de Lm também foi encontrado nos diferentes modelos de enfisema pulmonar (FUSCO et al., 2002; LUCEY et al., 2002, FORONJY et al., 2005; FIGUEIRÔA, 2009).

Lucey et al. (2002), através de estudos realizados com camundongos Knockout para os receptores IL-1 β , TNF- α e para ambos, observaram a ocorrência da redução significativa dos valores de Lm e de apoptose nestes animais com relação a camundongos wild-type, demonstrando a grande influência do processo inflamatório no enfisema induzido por PPE. De acordo com estes dados, os autores sugeriram que somente 20% do enfisema observado no 21º após a instilação está relacionado ao efeito direto da PPE ao passo que cerca de 80% está relacionado à inflamação pulmonar.

Desse modo, o processo inflamatório representa componente central na fisiopatologia do enfisema, sendo igualmente bem documentada a resposta inflamatória induzida por exposição a proteases com participação central de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (INOUE et al., 2010a).

Estudos cinéticos indicam que a elastase exógena é removida do pulmão dentro de 24 horas (STONE et al., 1988). Os resultados deste estudo mostraram que o tempo para desenvolver alargamento dos espaços aéreos, característica do processo enfisematoso, em camundongos wild-type, continua por 10 ou mais dias após o tratamento com PPE. Este fenômeno é bem conhecido (SNIDER; SHERTER, 1977) e tem alcançado a possibilidade que a progressão do enfisema pode estar relacionada com o processo inflamatório.

Em modelo crônico, Birrel et al. (2005) não esclareceram se o dano do parênquima induzido pela PPE é uma conseqüência direta da atividade elastolítica ou um resultado indireto induzido do processo inflamatório. Em publicações utilizando modelos de enfisema similares, administrando elastase neutrofílica humana (HNE), os autores sugerem que o enfisema experimental é resultado de ambas as ações da elastase, direta e indireta (KURAKI et al., 2002).

O processo inflamatório visto neste estudo foi caracterizado pelo aumento significativo do número de células polimorfonucleares (grupos 0,6U x 1 e 0,6U x 2), de células mononucleares e da celularidade total nos animais induzidos ao enfisema (grupos 0,3U x 2 e 0,6 U x 2) quando comparado com o grupo controle.

Inoue et al., (2010a), utilizaram diferentes dosagens de PPE (0,25; 1 e 2U) em camundongos e observaram, 21 dias após a instilação, resposta pró-inflamatória pulmonar através do aumento de células inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no homogenato do tecido pulmonar comparado com grupo controle. Em contrapartida, ratos Sprague-Dawley tratados com PPE (120U/kg) tiveram um significativo aumento de neutrófilos e de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) dentro do lúmen da via aérea e do tecido pulmonar apenas na fase aguda que foi acompanhada pelo aumento de várias citocinas e atividade proteolítica (BIRREL et al., 2005).

Exatamente como a PPE causa inflamação das vias aéreas ainda não está claro, mas sugere-se que haja danos celulares induzidos pela PPE (YANG et al., 1996) e/ou a geração de fragmentos de elastina que são conhecidos ser quimioatraentes (HUNNINGHAKE et al., 1981; SENIOR et al., 1984).

Independente de eventuais particularidades nos principais tipos celulares envolvidos no processo inflamatório, a presença de inflamação tem sido diretamente relacionada ao grau de destruição alveolar e gravidade da doença, tanto clínica (SAETTA et al., 1998) quanto experimentalmente (INOUE et al., 2010a; CHURG et al., 2007). Além disso, tem sido demonstrado que a inflamação crônica nas vias aéreas leva ao aumento da complacência pulmonar, bem como ao aumento do volume pulmonar (SENIOR; SHAPIRO, 1998; BRABER et al., 2010).

O aumento do número de células inflamatórias correlaciona-se com o comprometimento do parênquima pulmonar (SAETTA; TUARTO; LUPPI, 2002). Lucey et al., (2002) descrevem a participação do processo inflamatório no comprometimento dos componentes da matriz extracelular (MEC), demonstrando que macrófagos ativados liberam mediadores como IL-1 β e TNF- α que podem ativar diretamente as vias de transdução de sinais, afetando a produção de matriz do tecido conjuntivo, síntese de enzimas proteolíticas e a apoptose.

Sabe-se que no enfisema há comprometimento dos tecidos conectivos dos pulmões que, por sua vez, são compostos de células e MEC (SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003). A MEC consiste em macromoléculas fisicamente associadas: as proteínas estruturais fibrosas (fibras colágenas e elásticas) e a matriz intersticial composta de glicoproteínas embebidas em um gel de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (YUAN; INGENITO; SUKI, 1997). No pulmão normal, as células da matriz, mais precisamente os fibroblastos, são encarregadas de secretar suas proteínas. Essas proteínas encontram-se organizadas em uma rede de espaços que circundam as células, ocupando um volume significativo no tecido. A MEC não representa um material inerte, com função apenas estrutural, mas fornece informações sobre migração, ligação, diferenciação e organização das células, modulando uma série de processos (CHEN; FANG; CHANG, 2001; PARKS; SHAPIRO, 2001). As macromoléculas mais importantes na determinação dos processos mecânicos da MEC são: colágenos, elastina e proteoglicanos (SUKI et al., 2005; PELOSI et al., 2007). A organização e a interação entre colágeno e elastina e não só o número absoluto destas constituem importantes fatores que influenciam no comportamento mecânico (MIJAILOVICH et al., 1994; YUAN; INGENITO; SUKI, 1997). Estudos prévios sugerem que os conteúdos destas fibras influenciam diretamente a rigidez e viscosidade do parênquima pulmonar (FAFFE et al., 2002; FAFFE et al., 2006).

Com base no desequilíbrio protease-antiprotease implicado na patogênese do enfisema, proteinases derivadas de neutrófilos, particularmente a elastase neutrofílica, são

mediadores da destruição da matriz extracelular. Estas induzem lesão por sua ação proteolítica sobre diversas proteínas do tecido conectivo; embora a maioria dos estudos aponte a elastina como principal alvo de destruição no enfisema, as alterações fisiopatológicas também podem resultar de anormalidades na matriz de colágeno (LANG et al., 1994; ITO et al., 2005). Desse modo, colágeno e elastina são proteínas importantes no enfisema, mas a quantificação destas proteínas na matriz pulmonar apresenta muitas controversas. Muitos trabalhos têm focado na elastina (CHRZANOWSKIE et al., 1980) e poucos focam no colágeno.

A integridade das estruturas alveolares requer a manutenção de células e de matriz extracelular, entretanto a capacidade de reparo desses componentes ainda não está esclarecida (TUDER; GRATH; NEPTUNE, 2003; LIU et al., 2004). Estudos recentes têm evidenciado que o remodelamento da MEC, incluindo colágeno, elastina e proteoglicanos, ocorre durante o desenvolvimento do enfisema em humanos (CARDOSO et al., 1993; VLAHOVIC et al., 1999) e em modelos experimentais utilizando roedores (FINLAY et al., 1996; WRIGTH; CHURG, 1995). Assim, a degradação da elastina e o subsequente remodelamento do colágeno durante o reparo anormal do tecido pulmonar podem contribuir no progresso da doença (WRIGTH; CHURG, 1995) e no comportamento funcional do pulmão (SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003). Enfisema geralmente se desenvolve em fumantes na quinta e sexta década de vida sugerindo que a capacidade de reparo das membranas alveolares diminui com lesões repetitivas. Esse processo de reparo envolve a deposição coordenada de novos elementos da matriz, incluindo o colágeno e a elastina (RISHIKOF et al., 2006).

Neste estudo, observa-se redução significativa do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar em todos os grupos induzidos ao enfisema por PPE. Kuhn et al. (1976) relataram 15 dias pós-exposição uma destruição, anormal reparação e significativa redução de fibras elásticas nos pulmões de animais expostos a enzima proteolítica. Ito et al. (2005) também encontraram redução destas fibras em seu modelo murino de enfisema induzido por PPE através da quantificação de α -actina, porém nenhuma diferença estatística foi encontrada. As características de aumento da complacência e da perda do recuo elástico têm sido relacionadas somente com o metabolismo da elastina (LANG et al., 1994).

A presença de colágeno na MEC é fundamental para a integridade estrutural e para a capacidade funcional do pulmão. O colágeno é encontrado em vias aéreas, vasos, pleura, membrana basal e na parede alveolar. Qualquer alteração na parede alveolar é provavelmente consequência da mudança na composição de colágeno do tecido (LANG et al., 1994). O metabolismo de colágeno altera-se após lesão induzida pela PPE nos pulmões (GORDON; SNIDER, 2000; SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003). Em modelos experimentais de

enfisema pulmonar induzido por proteases observou-se uma inicial perda, seguida posteriormente de um aumento dos níveis de colágeno (KUHN et al., 1976). Estes resultados estão de acordo com o presente estudo que encontrou um aumento significativo do conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar nos grupos induzidos ao enfisema por PPE na dose de 0,6U (0,6U x 1 e 0,6U x 2). Sabe-se que a homeostase de colágeno no pulmão normal requer equilíbrio entre síntese e degradação desta proteína. Em condições patológicas como ocorre no enfisema, ocorre um desequilíbrio neste sistema que resulta em aumento da quantidade de colágeno no tecido da parede alveolar, embora ainda não esclarecido se é devido ao aumento da síntese ou à diminuição da degradação ou ambos (LANG et al., 1994).

Ito et al. (2005) também encontraram aumento do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de animais expostos à PPE através da quantificação do conteúdo de hidroxiprolina no tecido pulmonar. Estes autores sugerem que o remodelamento de colágeno dentro dos pulmões foi indiretamente desencadeado após a lesão elastolítica. Outros estudos têm mostrado que a progressão inicial do enfisema é devido à injúria proteolítica causada pela PPE e que a síntese de colágeno pelos fibroblastos é resultado do processo de reparo destes danos pulmonares (GARDI et al., 1994; KUHN et al., 1976). Entretanto, este processo de reparo não restaura a estrutura e função normal do tecido levando a alterações fisiológicas e patológicas (LAURENT, 1991).

Brewer et al., (2003) recentemente relataram que as paredes alveolares de ratos tratados com PPE, que também são envolvidas no remodelamento, aparecem mais extensíveis que as de ratos normais. Estes resultados sugerem diante do aumento do conteúdo de colágeno que as paredes alveolares e as fibras colágenas são provavelmente mais fracas no enfisema como consequência do processo de degradação e remodelamento (ITO et al., 2005). De fato, a ultraestrutura do colágeno no pulmão de indivíduos com enfisema revela fibras engrossadas e desorganizadas após o remodelamento (FINLAY et al., 1996). As fibras colágenas, mais rígidas, protegem o pulmão contra rupturas em grandes volumes. Desse modo, tem sido sugerido que o colágeno do parênquima também tem um importante papel na complacência pulmonar (SNIDER; SHERTER, 1977).

Finalmente, diante de inúmeros estudos que utilizam a instilação de PPE para a indução de enfisema em roedores, alguns encontram apenas alterações morfológicas relacionadas ao enfisema (CHRISTENSEN et al., 1977); outros encontram alterações estruturais relacionadas ao processo inflamatório (LUCEY et al., 2002; CHENG et al., 2009); outros encontram alterações no conteúdo das proteínas encontradas na MEC (RISHIKOF et al., 2006); enquanto ainda outros encontram alterações estruturais relacionadas a alterações

funcionais (MARCHAND et al., 2000; BIRREL et al., 2005; ITO et al., 2005; LÜTHJE et al., 2009; INOUE et al., 2010b).

Desse modo, nossos modelos murinos de enfisema pulmonar também apresentaram diferentes características quanto à dose administrada e ao número de instilações: grupo 0,3U x 1 apresentou alterações estruturais como aumento moderado da percentagem de alvéolos hiperinsuflados e alterações nos componentes da MEC como a redução moderada de fibras elásticas. O grupo 0,6U x 1 apresentou alterações estruturais como aumento da percentagem de alvéolos hiperinsuflados e aumento moderado de Lm; aumento do processo inflamatório caracterizado pelo aumento de células PMN e; redução de fibras elásticas e aumento de fibras colágenas no parênquima pulmonar. Com relação aos animais do grupo 0,3U x 2, estes apresentaram alterações funcionais caracterizada pela redução de recuo elástico; alterações estruturais como aumento relevante da percentagem de alvéolos hiperinsuflados e de Lm; evidente processo inflamatório caracterizado pelo aumento de células MN e da celularidade total e; redução do conteúdo de fibras elásticas no tecido pulmonar. Porém o grupo 0,6U x 2 não apresentou alterações morfológicas relacionadas ao enfisema mas sim um grande percentil de alvéolos colapsados; grande processo inflamatório caracterizado pelo aumento de todos os tipos de células inflamatórias (MN, PMN e celularidade total) e redução de fibras elásticas e aumento de fibras colágenas no parênquima pulmonar.

7 CONCLUSÃO

- 1) O modelo de enfisema com instilação dupla de 0,3U de elastase promoveu redução da elastância estática do pulmão de camundongos de acordo com estudos que indicam ser esse uma característica do enfisema moderado;
- 2) A morfometria pulmonar quantificou o aumento do diâmetro alveolar médio nos animais que receberam dose única de elastase 0,6U e dose dupla de elastase 0,3U e; aumento de células inflamatórias em todos os animais induzidos ao enfisema, caracterizando aspectos peculiares encontrados no enfisema como o alargamento dos espaços aéreos e o processo inflamatório;
- 3) O conteúdo de fibras elásticas foi reduzido em todos os grupos induzidos ao enfisema por elastase e o conteúdo de fibras colágenas foi aumentado no parênquima pulmonar dos animais que receberam dose única e dupla de elastase 0,6U, indicando o processo de destruição e remodelamento dos componentes da matriz extracelular visto no enfisema pulmonar humano.

Finalmente, todos os modelos empregados para a indução do enfisema pulmonar por elastase neste estudo apresentaram características morfológicas similares a encontradas em humanos, sendo que o grupo 0,3U x 2 foi o único a apresentar alterações morfo-funcionais. sugerindo-se a utilização desse modelo para proposta de estudo que foquem alterações morfo-funcionais, cujos processos de remodelamento ainda não estão evidenciados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOSHIBA, K.; YOKOHORI, N.; NAGAI, A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 28, p. 555-562, 2003.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARNES, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Rev Med**, v. 54, p. 113-29, 2003.

BARNES, P. J.; SHAPIRO, S. D.; PAUWELS, R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **Eur Respir J**, v. 22, p. 672-688, 2003.

BATES, J. H.; BACONNIER, P.; MILIC-EMILI, J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J Appl Physiol**, v. 64, p. 2204-2214, 1988.

BATES, J. H. et al. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J Appl Physiol**, v. 65, p. 408-414, 1988.

BATES, J. H. et al. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **J Appl Physiol**, v. 67, p. 488-492, 1989.

BATES, J. H. T. et al. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J Appl Physiol**, v. 59, p. 732-737, 1985.

BATES, J. H. T.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiration flow. **J Appl Physiol**, v. 58, p. 1840-1848, 1985.

BIRREL, M. A. et al. Steroid-resistant Inflammation in a Rat model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease is Associated with a Lack of Nuclear Factor- κ B Pathway Activation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 172, p. 74-84, 2005.

BISELLI, P. J. C. **Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos C57/B16**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2008.

BRABER, S. et al. Inflammatory changes in the airway of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. **Respiratory Research**, v. 11, p. 99, 2010.

BREWER, K. K. et al. Lung and alveolar wall elastic and hysteretic behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. **J Appl Physiol**, v. 95, p. 1926–1936, 2003.

BRITTON, J. R. et al. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, p. 1383–1387, 1995.

CAMELIER, A. et al. Alpha-1 Antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 7, p. 514-527, 2008.

CARDOSO, W. V. et al. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, p. 975–981, 1993.

CHANG, H. K.; MORTOLA, J. P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol**, v. 51, p. 218-225, 1981.

CHEN, C.; FANG, X.; CHANG, C. Surfactante and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury. **Crit Care Med**, v. 29, p. 2169-75, 2001.

CHENG, S. L. et al. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice. **Respiratory Research**, v. 10, p. 115, 2009.

CHRISTENSEN, T. G. et al. Irreversible Bronchial Goblet Cell Metaplasia in Hamsters whit Elastase-Induced Panacinar Emphysema. **The Journal of Clinical Inverstigation**, v. 59, p. 397-404, 1977.

CHRZANOWSKI, P. et al. Elastin content of normal and emphysematous lung parenchyma. **Am J Med**, v. 9, p. 351-8, 1980.

CHURG, A. et al. An MMP-9/-12 inhibitor prevents smoke-induced emphysema and small airway remodeling in guinea pigs. **Thorax**, v. 62, p. 706-713, 2007.

CIBA GUEST SYMPOSIUM REPORT. Terminology, definitions and classifications of chronic pulmonary emphysema and related conditions. **Thorax**, v. 14, p. 286-99, 1959.

CONDLIFFE, A. M.; KITCHEN, E.; CHILVERS, E. R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. **Clin Sci**, v. 94, p. 461–471, 1998.

CROXTON, T. L. et al. Future research directions in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. 838-844, 2002.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Methods**, v. 232, p. 3–14, 1999.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflamm Res**, v. 46, n. 10, p. 382-91, 1997.

DAWKINS, P. A.; STOCKLEY, R. A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 56, p. 972-977, 2001.

DE JONG, J. W. et al. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. **Respir Med**, v. 91, n. 2, p. 67-76, 1997.

DEGENS, H. et al. Apoptosis and Id2 expression in diaphragm and soleus muscle from the emphysematous hamsters. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 1, p. R135-44, 2007.

DEMEDTS, I. K. et al. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5, p. 257-263, 2005.

DEMEDTS, I. et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. **Respiratory Research**, v. 30, n. 7, p. 53, 2006.

DHAMI, R. et al. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1 antitrypsin. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, n. 2, p. 244-52, 2000.

DUNNILL, M. S. Emphysema. In: **Pulmonary pathology**. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1982. p.81-112.

FAFFE, D. S. et al. Comparison of rat and mouse pulmonary tissue mechanical properties and histology. **J Appl Physiol**, v. 92, p. 230-234, 2002.

_____. Mouse strain dependence of lung tissue mechanics: role of specific extracellular matrix composition. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 152, p. 186-196, 2006.

FIGUEIRÔA, S. F. S. **Dimorfismo sexual no modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína em camundongos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

FINKELSTEIN, R. et al. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 152, p. 1666–1672, 1995.

FINLAY, G. A. et al. Elastin and collagen remodeling in emphysema: a scanning electron microscopy study. **Am J Pathol**, v. 149, p. 1405–1415, 1996.

_____. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, p. 240–247, 1997.

FLOREANI, A. A. et al. Smoke and C5a induce airway epithelial ICAM-1 and cell adhesion. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, n. 4, p. 471-82, 2003.

FORONJI, R. F. et al. Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoking model. **Exp Lung Res**, v. 31, p. 547-562, 2005.

FREGONESE, L.; STOLK, J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 3, p. 16, 2008.

FULLMER, H. M.; SHEETZ, J. H.; NARKATES, A. J. Oxytalan connective tissue fibers: a review. **J Oral Pathol**, v. 3, p. 291-316, 1974.

FUSCO, L. B. et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema model in rats. **J Pneumol**, v. 28, n. 1, p. 107, 2002.

GANESAN, S. et al. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. **Respiratory Research**, v. 11, p. 131, 2010.

GARDI, C. et al. Collagen breakdown products and lung collagen metabolism: an in vitro study on fibroblast cultures. **Thorax**, v. 49, p. 312–318, 1994.

GORDON, L.; SNIDER. Clinical Relevance Summary: Collagen VS Elastin in Pathogenesis of Emphysema; Cellular Origin of Elastases; Bronchiolitis VS Emphysema as Cause of Airflow. **Chest**, v. 117, p. 244S-246S, 2000.

GRONEBERG, D. A.; CHUNG, F. K. Models of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research**, v. 5, n. 18, 2004.

GROSS, P. et al. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Arch Environ Health**, v. 11, p. 50-8, 1965.

GUERASSIMOV, A. et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, n. 9, p. 974-80, 2004.

HALBERT, R. J. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, v. 28, p. 523-532, 2006.

HAMAKAWA, H. et al. Structure-function Relations in an Elastase-induced Mouse Model of Emphysema. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2010 .

HANTOS, Z. et al. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. **J Appl Physiol**, v. 105, n. 6, p. 1864-72, 2008.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 5, p. S5-11, 1999.

HAYES, J. A.; KORTHY, A.; SNIDER, G. L. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamster. **J Pathol**, v. 117, p. 1-14, 1975.

HELLERMANN, G. R. et al. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. **Respir Res**, v. 3, p. 22, 2002.

HENRICKS, P. A, NIJKAMP, F. P. Reactive oxygen species as mediators in asthma. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 14, p. 409-420, 2001.

HOGG, J. C.; SENIOR, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease part 2: pathology and biochemistry of emphysema. **Thorax**, v. 57, n. 9, p. 830-4, 2002.

HOGG, J. Peripheral lung remodelling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, v. 24, p. 893-4, 2004.

HUNNINGHAKE, G. W. et al. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. **Science**, v. 212, p. 925-927, 1981.

IHRIG, J.; KLEINERMAN, J.; RYNBRANT, D. Serum antitrypsins in animals. **Am Rev Respir Dis**, v. 103, p. 377-387, 1971.

IMAI, K. et al. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. **Eur Respir J**, v. 25, p. 250-258, 2005.

INOUE, K. et al. Extensive Analysis of Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats: ALP in the Lung, a new Biomarker for Disease Progression? **J Clin Biochem Nutr**, v. 46, p. 168-176, 2010a.

INOUE, K. et al. Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: Effects of ambient existing particulate matters. **Int Immunopharmacol**, 2010b.

ITO, S. et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. **J App Physiol**, v. 98, p. 503-511, 2005.

JANOFF, A. Elastases and emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 132, p. 417-433, 1985.

JEFFERY, P. K. Inflammation in chronic obstructive lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, p. S3-S4, 1999.

KASAHARA, Y. et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. **J Clin Invest**, v. 106, p. 1311-1319, 2000.

KASAHARA. et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, p. 737-744, 2001.

KIM, W. K. et al. Centrilobular and panlobular in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. **Am Rev Resp Dis**, v. 144, p. 1385-90, 1991.

KOCHI, T. et al. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**, v. 64, p. 441-450, 1988a.

_____. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol**, v. 64, p. 2636-2646, 1988b.

KUHN, C. et al. The induction of emphysema with elastase. II. Changes in connective tissue. **Lab Invest**, v. 34, p. 372-380, 1976.

KURAKI, T. et al. A novel oral neutrophil elastase inhibitor (ONO-6818) inhibits human neutrophil elastase-induced emphysema in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, p. 496-500, 2002.

LAENECC, R. T. H. **A treatise on diseases of the chest and on mediate auscultation**. 4 th ed. London: Longmans, 1834.

LANG, M. R. et al. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. **Thorax**, v. 49, p. 319-326, 1994.

LAURELL, C. B.; ERIKSSON, S. The electrophoretic α_1 -globin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 15, p. 32-140, 1963.

LAURENT, G. J. Regulation of lung collagen production during wound healing. **Chest**, v. 99, p. 67S-69S, 1991.

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996.

_____. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like I protein. **Nat Genet**, v. 36, p. 178-182, 2004.

LORING, S. H.; ELLIOT, E. A.; DRAZEN, J. M. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung**, v. 156, p. 33-42, 1979.

LUCEY, E. C. et al. Severity of Elastase-Induced Emphysema Is Decreased in Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β Receptor-Deficient Mice. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 1, p. 79-85, 2002.

LÜTHJE, L. et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. **Respiratory Research**, v. 10, p. 7, 2009.

MACNEE, W. et al. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. **N Engl J Med**, v. 321, p. 924–928, 1989.

MACNEE, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. **Eur J Pharmacol**, v. 429, p. 195–207, 2001.

MAJO, J.; GHEZZO, H.; COSIO, M. G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. **Eur Respir J**, v. 17, p. 946-953, 2001.

MANNINO, D. M.; BUIST, A. S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. **Lancet**, v. 370, p. 765-773, 2007.

MAO, J. T. et al. A pilot study of all-trans-retinoic acid for the treatment of human emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, p. 718-723, 2002.

MARCHAND, E. et al. Lung Volume Reduction Surgery Does Not Improve Diaphragmatic Contractile Properties or Atrophy in Hamsters with Elastase-induced Emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, p. 1052-1057, 2000.

MATTSON, J. P.; POOLE, D. C. Pulmonary emphysema decrease hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. **J Appl Physiol**, v. 85, n. 1, p. 210-214, 1998.

MENEZES, A. M. B. et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. **Lancet**, v. 366, p. 1875-1881, 2005.

MIJAILOVICH, S. M. et al. Dynamic moduli of rabbit lung tissue and pigeon ligamentum propatagiale undergoing uniaxial cyclic loading. **J Appl Physiol**, v. 76, p. 773-782, 1994.

MIO, T. et al. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, p. 1770–1776, 1997.

MONTEIRO, R. et al. Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 19, n. 4, p. 341-347, 2004.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, p. 15-27, 1996.

MORISSETE, M. C.; PARENT, J.; MILOT, J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: What we know and what we need to know. **International Journal of COPD**, v. 4, p. 19-31, 2009.

NAGASE, et al. Airway and tissue behavior during early response in sensitized rats: role of 5-HT and LTD4. **J. Appl Physiol**, v. 80, p. 583-590, 1996.

NIEWOEHNER, D. E.; KLEINERMAN, J.; RICE, D. B. Pathologic changes in the peripheral airways of lung cigarette smokers. **N Engl J Med**, v. 291, n. 15, p. 755-8, 1974.

OLIVEIRA, G. P. **Efeitos da glutathiona em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por sepse**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

O'SHAUGHNESSY, T. C. et al. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ lymphocytes with FEV1. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, p. 852-7, 1997.

PARKS, W. C.; SHAPIRO, S. D. Matrix metalloproteinases in lung biology. **Respir Res**, v. 2, p. 10-19, 2001.

PAUWELS, R. A. et al. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI / WHO Global Initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) Workshop summary. **Am J Respir Crit Care**, v. 163, n. 5, p. 1256-76, 2001.

PAWELS, R. A.; RABE, K. F. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 364, p. 613-620, 2004.

PELOSI, P. et al. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. **An Acad Bras Cien**, v. 79, p. 285-297, 2007.

POWELL, W. C. et al. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. **Curr Biol**, v. 9, p. 1441-1447, 1999.

PRIETO, A. et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoprophosphopeptical (immunoferon). **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, p. 1578–1583, 2001.

PRYOR, W. A. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. **Environ Health Perspect**, v. 105, p. 875–882, 1997.

RAHMAN, I. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, p. 490–495, 2002.

RAHMAN, I.; BISWASSK, K. A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **Eur J Pharmacol**, v. 533, p. 222–239, 2006.

REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, p. 341–357, 1997.

RETAMALES, I. et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, n. 3, p. 339–40, 2001.

RISHIKOF, D. C. et al. Induction of the myofibroblast phenotype following elastolytic injury to mouse lung. **Histochem Cell Biol**, v. 125, p. 527–534, 2006.

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 241–8, 2006.

SAETTA, M. et al. CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, n. 3, p. 822–6, 1998.

_____. CD8⁺ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, p. 711–7, 1999.

SAETTA, M.; TURATO, G.; LUPPI, F. Inflammation in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Chronic Obstructive lung disease**. **BC Decker**, p. 114–126, 2002.

SALDIVA, P. H. et al. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J Appl Physiol**, v. 72, p. 302–306, 1992.

SCHUNEMANN, H. J.; FREUDENHEIM, J. L.; GRANT, B. J. Epidemiologic evidence linking antioxidant vitamins to pulmonary function and airway obstruction. **Epidemiol Rev**, v. 23, p. 248–267, 2001.

SEGURA-VALDEZ, L. et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. **Chest**, v. 117, p. 684-694, 2000.

SENIOR, R. M. et al. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblast and monocytes. **J Cell Biol**, v. 99, p. 870-874, 1984.

SENIOR, R. M.; SHAPIRO, S. D. Chronic obstructive pulmonary disease epidemiology, pathophysiology, and pathogenesis. **Fishmen's Pulmonary Disease and Disorders**, p. 1659-681, 1998.

SHAPIRO, S. D. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 150, n. 6, p. S160-4, 1994.

_____. Animal Models for chronic obstructive pulmonary disease: age of Klotho and Marlboro mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, p. 4-7, 2000.

SIMILOWSKI, T. et al. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J Appl Physiol**, v. 67, p. 2219-2229, 1989.

SLY, P. D. et al. Volume dependence of airway and tissue impedances in mice. **J Appl Physiol**, v. 94, p. 1460-1466, 2003.

SNIDER, G. L.; SHERTER, C. B. A one-year study of the evolution of elastase-induced emphysema in hamsters. **A J Appl Physiol**, v. 43, p. 721-729, 1977.

SNIDER, G. L. et al. Definition of emphysema. Report of a national Heart, Lung and Blood institute, Division of Lung Diseases. **Am Rev Respir Dis**, v. 133, p. 132-82, 1985.

SNIDER, G. L.; LUCEY, E. C.; STONE, P. J. Animal models of emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 133, p. 149-169, 1986.

SNIDER, G. L. Clinical relevance summary: collagen vs elastin in pathogenesis of emphysema: cellular origin of elastases; bronchiolitis vs emphysema as a cause of airflow obstruction. **Chest**, v. 117, p. 244-6, 2000.

STONE, P. J. et al. Defenses of the hamsters lung against human neutrophil and porcine pancreatic elastase. **Respiration**, v. 54, p. 1-15, 1988.

SUKI, B.; LUTCHEN, K. R.; INGENITO, E. P. On the progressive nature of emphysema. Roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, p. 516-521, 2003.

SUKI, B. et al. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 1892-1899, 2005.

TAGGART, C. et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in α 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. **J Biol Chem**, v. 275, p. 27258–27265, 2000.

TAKUBO, Y. et al. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 12, p. 1596-603, 2002.

TARANTINO, A. B. **Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

TEPPER, J. et al. Can retinoic acid ameliorate the physiologic and morphologic effects of elastase instillation in the rat? **Chest**, v. 117, p. 242S-244S, 2000.

TOMITA, K. et al. Increased p21CIP1/WAF1 and B cell lymphoma leukemia-xL expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, p. 724-31, 2002.

TUDER, R. M.; GRATH, S.; NEPTUNE, E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? **Pulm Pharmacol Ther**, v. 16, p. 67-78, 2003.

VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 10, p. 787-795, 2008.

VLAHOVIC, G. et al. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal wall in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, p. 2086-292, 1999.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 349-74, 2000.

WEIBEL, E. R. "Morphometry: stereological theory and practical methods", In: Gil J. (Ed.), **Models of lung disease-microscopy and structural methods**, New York, p. 199–247, 1990.

WILLEMSE, B. W. et al. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. **Eur Respir J**, v. 23, p. 464–476, 2004.

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 268, p. L17–L20, 1995.

_____. Animal models of COPD: Barriers, success, and challenges. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 696-698, 2008.

WRIGHT, J. L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animals models of obstructive pulmonary disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, p. L1:L15, 2008.

YANG, J. J. et al. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. **Am J Pathol**, v. 149, p. 1617-1626, 1996.

YUAN, H.; INGENITO, E. P.; SUKI, B. Dynamic properties of lung parenchyma: mechanical contributions of fiber network and interstitial cells. **J Appl Physiol**, v. 83, p. 1420-1431, 1997.

ZANOBETTI, A.; BIND, M. A.; SCHWARTZ, J. Particulate air pollution and survival in a COPD cohort. **Environ Health**, v. 7, p. 48, 2008.

ZEIDEL, A. et al. Immune response in asymptomatic smokers. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 46, p. 959–964, 2002.