

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Daniela Aparecida de Brito Cervilha

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA
RESPONSIVIDADE DAS VIAS AÉREAS EM
CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DO
ENFISEMA PULMONAR POR ELASTASE**

Alfenas/MG
2014

Daniela Aparecida de Brito Cervilha

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA
RESPONSIVIDADE DAS VIAS AÉREAS EM
CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DO
ENFISEMA PULMONAR POR ELASTASE**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Roseli Soncini.

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Marisa Ionta.

Alfenas/MG
2014

Cervilha, Daniela Aparecida de Brito.

Avaliação experimental da responsividade das vias aéreas em camundongos após indução do enfisema pulmonar por elastase / Daniela Aparecida de Brito Cervilha. - Alfenas, 2014.

76 f. -

Orientador: Roseli Soncini.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Elastase Pancreática. 2. Enfisema Pulmonar. 3. Resistência das Vias Respiratórias. 4. Elastina. 5. Colágeno Tipo III. I. Soncini, Roseli. II. Título.

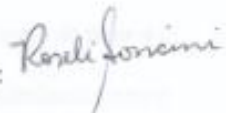
CDD: 616.248


Daniela Aparecida de Brito Cervilha

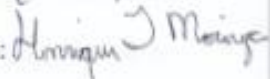
AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPONSIVIDADE DAS VIAS AÉREAS EM CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR POR ELASTASE

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 10/04/2014

Prof.^a Dra. Roseli Soncini
Instituição: UNIFAL-MG
Assinatura: 

Prof.^a Dra. Jalile Amin Naves Ventura
Instituição: UNIFAL-MG
Assinatura: 

Prof. Dr. Henrique Takachi Moriya
Instituição: USP- SP
Assinatura: 

Dedico

a DEUS, pois sem sua permissão nada seria possível;

ao meu marido Guilherme, meu porto seguro, meu companheiro, exemplo de pessoa e

profissional, pelo seu apoio, respeito, tolerância e amor;

aos meus pais Tarcísio e Sônia pelo amor incondicional, por jamais terem poupado esforços

na minha formação e, principalmente, por terem me ensinado a enfrentar os obstáculos da

vida com fé, coragem e honestidade;

aos meus irmãos Fábio, Wagner e Wander pelo apoio e incentivo;

aos meus amigos e demais familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela constante presença em minha vida, por todas as alegrias, pela saúde e pela permissão concedida para tornar meu sonho realidade.

Meu maior agradecimento é em forma de gratidão à minha orientadora Prof.^a Dra. Roseli Soncini, pois se não fosse a oportunidade dada e a confiança depositada eu não chegaria até aqui. Obrigada Rose, pelos momentos de amizade, pelo profissionalismo e pela ajuda em concretizar esse sonho.

Agradeço de forma incomensurável ao meu marido Guilherme, que sempre esteve ao meu lado e foi o maior incentivador na busca desse sonho. Obrigada por me fazer uma pessoa melhor a cada dia, pela paciência e compreensão. Sem você meu sonho ainda seria um sonho.

Aos meus pais agradeço de forma muito carinhosa, por terem sido um exemplo de vida, me apoiando em todos os momentos. Pai sua dedicação, honestidade e sua competência são exemplos que carrego sempre comigo. Mãe, sua paciência infinita e sua crença absoluta a mim atribuída foram sem dúvida os elementos propulsores desta conquista. Muito obrigada meus queridos pais!

Aos meus irmãos Fábio, Wagner e Wander, agradeço pela confiança e incentivo. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo distantes.

A minha Melzinha não poderia ficar de fora. Obrigada por fazer parte da minha família e me distrair nos momentos de estresse com suas brincadeiras. Obrigada por ouvir a minha voz e abanar seu rabinho me fazendo sentir importante.

A Prof.^a Dra. Marisa Ionta agradeço de coração pela amizade, pelo carinho, paciência, dedicação, ensinamentos e exemplo de pessoa e profissional. Meu espelho!

Aos membros da banca examinadora Prof.^a Jalile Amin Naves Ventura e Prof. Henrique Takachi Moriya pela disponibilidade, pelo tempo gasto na leitura deste trabalho e pelas

contribuições pessoais e científicas acerca desta dissertação.

Aos demais professores da UNIFAL, que mesmo não diretamente engajados contribuíram de alguma forma para minha formação pessoal e acadêmica.

Agradeço aos meus queridos amigos do Laboratório de Fisiologia Respiratória: Vanessa (minha companheira de tese) por tornar minha jornada mais leve, feliz e divertida, esse mestrado não teria sido tão bom se não fosse você minha amiga. Luiz, agradeço a paciência e os ensinamentos da prática laboratorial. Layla, obrigada pela amizade, boa vontade em ajudar sempre e por me emprestar sua inteligência sempre que necessário. Érika, agradeço por compartilhar experiências de vida e profissional. Francielle, Juliana e Glaice pela boa vontade e ajuda imensurável para a execução prática deste trabalho. A agregada Mara, obrigada pela amizade, companheirismo e pronta ajuda sempre. Pessoas, eu agradeço a DEUS por vocês existirem na minha vida. Vocês são essenciais sempre! Agradeço também aos demais colegas de pós-graduação pelo incentivo e por terem compartilhado comigo expectativas, angústias e conhecimentos. Obrigada!

Aos funcionários da fisiologia: Marina, Antonieta, Daniela, Marília e José Reis obrigada pela ajuda e momentos de descontração. Vocês sempre estarão em meu coração!

Ao Biotério Central da UNIFAL, em especial ao João e Fernando, por terem fornecido os animais que foram essenciais para a execução deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À UNIFAL por permitir a realização deste trabalho, me proporcionando a cada dia um novo conhecimento.

E por fim, mas não menos importante do que qualquer um citado neste trabalho o meu sincero e eterno agradecimento aos animais, que contribuíram oferecendo inocentemente suas vidas. Muito Obrigada!

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável".

Galileu Galilei

RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma patologia que apresenta obstrução ao fluxo aéreo. No enfisema ocorre destruição da matriz extracelular que resulta no alargamento do espaço aéreo. A hiper-responsividade brônquica pode ocorrer em pacientes com DPOC. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi averiguar a responsividade brônquica após desafio com metacolina (MCh) em um modelo de enfisema induzido por elastase pancreática de porco (PPE). Para tal utilizamos camundongos machos Swiss (25-30g), divididos aleatoriamente em três grupos: o grupo controle foi instilado via intratraqueal com solução salina e o grupo enfisema subdividido em dois grupos instilados com PPE (0,3 e 0,6U). Após 20 dias, os animais foram anestesiados, traqueostomizados, acoplados em ventilador para pequenos animais e submetidos à inalação de salina e MCh (50 e 100mg/mL). A avaliação da mecânica respiratória utilizou o modelo de fase constante e os parâmetros analisados foram resistência das vias aéreas (R_{aw}), resistência tecidual (G), elastância tecidual (H) e histeresividade (η). Após o teste, os pulmões foram removidos para análises histológicas e quantificação de proteínas. Os resultados da mecânica respiratória mostraram que os valores de R_{aw} , G e η , tanto basais quanto após nebulização com salina, não apresentaram diferenças entre os grupos quando comparado com o grupo controle, porém a H no grupo enfisema 0,6U foi menor quando comparado com o grupo controle. Após o desafio com MCh 100mg/mL, a R_{aw} foi atenuada nos animais com enfisema 0,3U. A G aumentou nos animais com enfisema 0,3U. A H nos animais com enfisema 0,6U diminuiu. A η após nebulização de MCh 50 e 100mg/ml elevou-se nos animais instilados com PPE 0,3 e 0,6U. Na análise morfológica, o grupo tratado com PPE 0,6U aumentou as áreas de colapso alveolar, o número de alvéolos hiperinsuflados foi maior nos grupos enfisema 0,3 e 0,6U, o intercepto linear médio elevou-se em ambos os grupos tratados com PPE e o número de alvéolos normais reduziu em ambos os grupos enfisema quando comparado com o grupo controle. A quantificação de proteínas mostrou diminuição de elastina no grupo 0,6U e aumento de colágeno tipo III nos grupos 0,3 e 0,6U. Os resultados mostraram que animais com enfisema induzido por PPE 0,3U apresentam atenuação da responsividade brônquica durante a inalação de MCh (100mg/mL), sugerindo que a perda da integridade do epitélio pulmonar e o remodelamento tecidual aumentam a heterogeneidade dos pulmões.

Palavras-chave: Elastase Pancreática. Enfisema pulmonar. Resistência das vias respiratórias. Elastina. Colágeno tipo III.

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a disease that presents airflow obstruction. In emphysema, there is destruction of the extracellular matrix resulting in enlargement of the airspace. The bronchial hyperresponsiveness can occur in patients with COPD. In this context, the objective of this study was to evaluate the responsiveness after bronchial challenge with methacholine (MCh) in a model of emphysema induced by porcine pancreatic elastase (PPE). Swiss male mice (25 - 30g) were randomly divided into three groups: the control group was intratracheally instilled with saline and emphysema group was subdivided into two other groups that were instilled with PPE (0.3 and 0.6 U). After 20 days the animals were anesthetized, tracheotomized, connected to ventilator for small animals and subjected to inhalation of saline and MCh (50 and 100mg/mL). The evaluation of respiratory mechanics used the model of constant phase and the parameters analyzed were airway resistance (R_{aw}), tissue resistance (G), tissue elastance (H) and hysteresivity (η). The lungs were removed for histological analysis and quantification of proteins after the test. The results of respiratory mechanics showed that the baseline and after nebulization with saline the parameters R_{aw} , G and η showed no differences between groups when compared with the control group, but the H in group emphysema 0.6U was lower. After challenge with MCh 100mg/mL R_{aw} was attenuated in animals with emphysema 0.3U. The G increased in animals with emphysema 0.3U. The H in animals with emphysema 0.6 U decreased. The η after misting of MCh 50 and 100mg/mL increased in animals instilled with PPE 0.3 and 0.6U. In the morphological analysis the group treated with PPE 0.6U increased areas of alveolar collapse, alveolar number of hyperinflation was higher in groups emphysema 0.3 and 0.6U, linear mean intercept increased in both groups treated with PPE and reduced number of normal alveoli in both groups emphysema when compared with the control group. The protein quantification showed decrease of elastin in the group 0.6 U and increased collagen type III in the groups treated with PPE. Our results show that animals with elastase-induced emphysema 0.3U have attenuation of bronchial hyperresponsiveness during inhalation of MCh (100mg/mL), suggesting that loss of integrity of the epithelial lung tissue and tissue remodeling increased the heterogeneity of lungs.

Keywords: Porcine pancreatic elastase. Pulmonary emphysema. Airway resistance. Elastin. Collagen III.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ACh	- Acetilcolina
β	- Beta
cm	- Centímetro
cmH₂O	- Centímetros de água
CCh	- Carbacol
CVF	- Capacidade vital forçada
COD	- Coeficiente de determinação
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DO	- Densidade óptica
DP	- Desvio padrão
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
<i>f</i>	- Frequência em Hz
Fig.	- Figura
g	- Grama
G	- Resistência tecidual do modelo de fase constante
H	- Elastância tecidual do modelo de fase constante
HRB	- Hiper-responsividade brônquica
Hz	- Hertz
<i>i</i>	- Unidade imaginária
<i>I_{aw}</i>	- Inertância das vias aéreas
IgG	- Imunoglobulina
IL - 1β	- Interleucina um beta
IL - 8	- Interleucina oito
i.p.	- Intraperitoneal
kDa	- Kilodalton
kg	- Quilograma
Lm	- Intercepto linear médio
M	- Molar
MEC	- Matriz extracelular
mA	- Miliampere
MCh	- Metacolina

Mg/mL	- Miligramas por mililitros
mM	- Milimolar
mRNA	- RNA mensageiro
M1-M5	- Receptores muscarínicos do tipo 1-5
η	- Histeresividade do modelo de fase constante
NaCl	- Cloreto de sódio
NO₂	- Dióxido de nitrogênio
NP-40	- Nonidet solução de detergente não iônico e não denaturante
P_{ao}	- Pressão de abertura das vias aéreas
P_{cyt}	- Pressão interna do cilindro
PE	- Polietileno
PEEP	- Pressão positiva expiratória final
pH	- Potencial hidrogeniônico
PPE	- Elastase pancreática de porco
PVDF	- Fluoreto de polivinilidene
R_{aw}	- Resistência de via aérea do modelo de fase constante
RIPA	- Radio Immuno Precipitation Assay Buffer
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
Salina/Sal	- Solução fisiológica 0,9% estéril
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SO₂	- Dióxido de enxofre
TBS	- Tris-buffered saline
TTBS	- Tris-buffered saline e tween
TEMED	- N, N, N, N tetra-metiletilenodiamina
TIMP 1	- Inibidor de metaloproteinase tipo um
TIMP 2	- Inibidor de metaloproteinase tipo dois
TLC	- Capacidade pulmonar total
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
Tris	- Tris hidroximetil aminometano
v	- Volume
V'	- Fluxo
V_{cyt}	- Posição do pistão
VEF1	- Volume expiratório forçado no primeiro segundo
U	- Unidade

x	- Multiplicação
Z (f)	- Impedância em função da frequência
Z_{rs}	- Impedância do sistema respiratório
μg	- Micrograma
μL	- Microlitros
μm	- Micrômetro
α	- alfa
%	- Porcentagem
°C	- Grau Celsius
<	- Menor
±	- Mais ou menos
π	- Pi

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aparência de cortes de um pulmão normal e enfisematoso.	19
Figura 2 – Classificação do enfisema pulmonar: centroacinoso e panacinoso.....	19
Figura 3 – Representação esquemática da responsividade brônquica.	27
Figura 4 – Representação esquemática dos grupos experimentais.....	33
Figura 5 – Diagrama do ventilador mecânico usado para coleta dos dados de mecânica respiratória.....	34
Figura 6 – Esquema temporal do protocolo de medidas mecânicas.....	35
Figura 7 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	38
Figura 8 – Efeito na R_{aw} , resistência das vias aéreas, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina, PPE 0,3 e 0,6U.....	44
Figura 9 – Efeito na G, resistência tecidual, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina e PPE 0,3 e 0,6U.....	44
Figura 10 – Efeito na H, elastância tecidual, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina e PPE 0,3 e 0,6U.....	45
Figura 11 – Efeito na η , histeresividade, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina e PPE 0,3 e 0,6U.....	45
Figura 12 – Fotomicrografia representando o parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina (HE).....	46
Figura 13 – Perfil de expressão de elastina em tecido pulmonar.....	47
Figura 14 – Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunorreativas para elastina.	47
Figura 15 – Perfil de expressão de colágeno III em tecido pulmonar.....	48
Figura 16 – Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunorreativas para colágeno III.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros basais da mecânica respiratória.....	41
Tabela 2 - Parâmetros da mecânica respiratória após nebulização com salina.....	42
Tabela 3 - Histologia Pulmonar.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR.....	18
2.2	ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DA DPOC.....	19
2.3	PATOGÊNESE DA DPOC.....	20
2.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENFISEMA PULMONAR.....	23
2.5	MECÂNICA RESPIRATÓRIA.....	25
2.6	RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA: RECEPTOR MUSCARÍNICO.....	26
2.7	REMODELAMENTO PULMONAR.....	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	GERAL.....	31
3.2	ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	32
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.3	PREPARO DOS ANIMAIS.....	33
4.4	AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	34
4.5	REMOÇÃO DOS PULMÕES.....	37
4.6	HISTOLOGIA PULMONAR.....	37
4.6.1	Fixação e preparo das lâminas.....	37
4.6.2	Análise morfométrica.....	38
4.7	WESTERN BLOT.....	39
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5	RESULTADOS.....	41

5.1	AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA.....	41
5.2	HISTOLOGIA PULMONAR.....	45
5.3	WESTERN BLOT.....	47
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada pela obstrução persistente e progressiva ao fluxo aéreo das vias respiratórias (GOLD, 2011). A limitação ao fluxo aéreo pode ser associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e/ou a gases irritantes (INOUE et al., 2010a). A DPOC é constituída pela bronquite crônica e o enfisema pulmonar (GOLD, 2011). A bronquite crônica é clinicamente caracterizada com tosse produtiva e expectoração mucosa ou mucopurulenta por no mínimo três meses em dois anos consecutivos na ausência de outras causas (MANNINO, 2002). O enfisema pulmonar é caracterizado por aumento anormal dos ácinos pulmonares (unidade anatômica referente a porção pulmonar distal aos bronquíolos terminais) devido à destruição das paredes alveolares com consequente perda da capacidade do recolhimento elástico pulmonar (WEST, 2010; COSIO et al., 1978; COLEBATCH; FINUCANE, SMITH, 1973; PENMAN; O'NEILL; BEGLEY, 1970).

A DPOC destaca-se como uma das maiores causas de morbidez e mortalidade em adultos e idosos em todo o mundo sendo considerado importante problema de saúde pública (CELLI, et al., 2003; PAUWELS et., 2001; WATSON et al., 1997).

A principal causa da DPOC é o tabagismo, sendo responsável por cerca de 75% dos casos (MENEZES et al., 2005). A DPOC pode ser descrita como um conjunto de alterações patológicas, desde a inflamação crônica até a destruição do tecido pulmonar (GRONEBERG, CHUN, 2004). A exposição crônica à fumaça do cigarro induz a invasão de células inflamatórias dentro das vias aéreas, que por sua vez, liberam enorme quantidade de proteases, causando o desequilíbrio protease – antiprotease, com destruição do tecido pulmonar (AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003). Este aumento da atividade proteolítica pode ser consequência 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). A apoptose celular é também um mecanismo relacionado à destruição das estruturas pulmonares vista no enfisema (AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003; KASAHARA et al., 2000; SHAPIRO, 2000;). Estudos têm mostrado aumento no número de células apoptóticas epiteliais e endoteliais nos pulmões com enfisema (DEMEDTS et al., 2006; KASAHARA et al., 2001; SEGURA-VALDEZ et al., 2000). Além disso, o estresse oxidativo é outro fator envolvido na patogênese do enfisema, que resulta em prejuízos aos lipídeos, às proteínas e ao material genético (DNA) (DEMEDTS et al., 2006; BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003;

MACNEE, 2001; HENRICKS; NIJKAMP, 2001; REPINE; BAST; LANKHORST, 1997). Tais fatos amplificam a resposta inflamatória, conduzindo a uma lesão e um processo cicatricial. Essa inflamação que atinge desde a via aérea até o parênquima pulmonar, permite por muitas vezes que estas estruturas estejam sujeitas ao remodelamento (ALMEIDA, 2001). A inflamação aguda, crônica e o remodelamento das vias aéreas são fatores que estão associados aos mecanismos de hiper-responsividade brônquica (HRB) (MARTIN; DUGUET; EIDELMAN, 2000; BOULET et al., 1997; CHETTA et al., 1996). A fumaça do cigarro é considerada um fator primário para desencadear uma resposta contrátil exacerbada no músculo liso das vias aéreas, pois alguns produtos químicos e poluentes gerados pela fumaça afetam diretamente a contração muscular (CHIBA et., 2005). O enfisema pulmonar causa alterações nas propriedades mecânicas do pulmão e até o momento não há medicamentos específicos para o tratamento da DPOC (SUKI et al., 2005; GRONEBERG; CHUN, 2004).

O enfisema é um estado patológico de milhões de pessoas em todo o mundo. Nessas condições, pouca atenção é dada as vias aéreas e ao seu comportamento frente a um agente constrictor. Neste contexto, averiguar a responsividade das vias aéreas e sua relação com a DPOC torna-se relevante para o melhor entendimento da fisiopatologia desta doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após uma breve exposição sobre DPOC, segue informações mais detalhadas existentes na literatura sobre o tema.

2.1 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR

O enfisema pulmonar pode ser definido como um alargamento anormal e permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais, acompanhado da destruição das paredes alveolares, sem fibrose evidente e destruição da matriz extracelular (MEC), resultando na destruição da estrutura acinar e conseqüente redução da área disponível para a troca gasosa (Fig. 1) (INOUE et al., 2010b; KEMP, 2009). A perda de tecido elástico conduz a um colapso das pequenas vias aéreas, levando a limitação do fluxo de ar e o aprisionamento de gás, que é muitas vezes uma característica proeminente da doença (KEMP, 2009). A limitação do fluxo de ar é causada pelo aumento da resistência das pequenas vias aéreas de condução e pela diminuição das forças de recuo elástico do pulmão devido à destruição do parênquima pulmonar (BRUSSELLE et al., 2006).

As alterações na anatomia pulmonar decorrentes do enfisema caracterizam-no indicando a etiologia e o comportamento fisiopatológico (FUSCO et al., 2002). A classificação fisiológica utiliza medições espirométricas de acordo com a gravidade da doença, o parâmetro utilizado é o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e a relação desse volume com a capacidade vital forçada (CVF) (VEF1/CVF) (PAUWELS et al., 2001).

O enfisema pulmonar pode ser classificado como: centroacinar ou centrolobular e panacinar ou panlobular (Fig. 2). A maioria dos pacientes que têm enfisema relacionado ao tabagismo tende a ter características de ambas às formas (KELLER, 2003). O enfisema centrolobular apresenta destruição focal de bronquíolos respiratórios com alargamento da primeira à segunda ordem de bronquíolos respiratórios, com predomínio em zonas apicais e está frequentemente associado com o tabagismo (KELLER, 2003; SNIDER, 2000; KIM et al., 1991). No enfisema panacinar há destruição uniforme dos espaços aéreos respiratórios além dos bronquíolos respiratório e normalmente é encontrado em pacientes portadores de deficiência de α -1 antitripsina (KELLER, 2003; SNIDER; LUCEY; STONE, 1986). Os dois

tipos de enfisema podem ser encontrados em pacientes com DPOC. Cerca de metade dos pacientes apresentam ambas as formas e aproximadamente 25% apresentam apenas uma das formas de enfisema pulmonar (SNIDER, 2000).

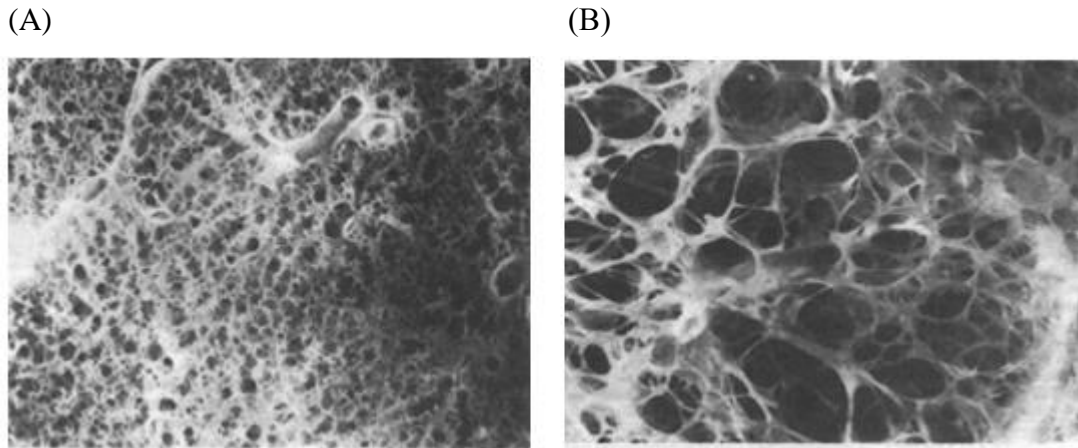


Figura 1- Aparência de cortes de um pulmão normal e enfisematoso.

A) Pulmão normal;

B) Pulmão enfisematoso.

Fonte: HEARD, 1969.

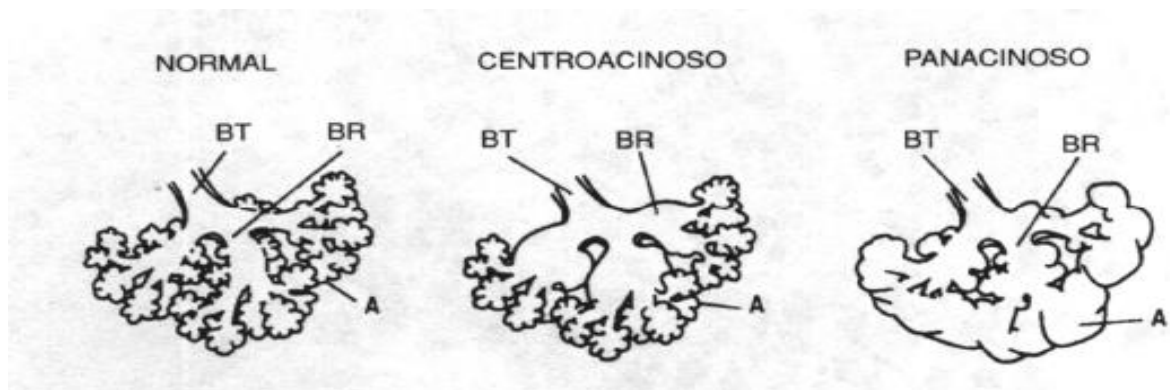


Figura 2 – Classificação do enfisema pulmonar: centroacinoso e panacinoso

Fonte: WEST, 2010.

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DPOC

A DPOC está diretamente relacionada com uma significativa taxa de morbidez, mortalidade e incapacitação permanente em todo o mundo, representando um grande ônus

econômico e social (CAZZOLA; DONNER; HANANIA, 2007; PAUWELS; RABE, 2004).

Estimativas revelam que a prevalência mundial da DPOC, em adultos acima de 40 anos de idade, é cerca de 9-10%, sendo maior em homens do que mulheres (LÜTHJE et al., 2009; HALBERT et al., 2006). O índice de morte de mulheres com DPOC vem aumentando a cada dia, refletindo a tendência mundial do aumento do tabagismo entre as mulheres (GOLD, 2011). Esta prevalência aumenta com a idade, acompanhando a perda funcional pulmonar. Estima-se que haja no mundo 210 milhões de pacientes com esse diagnóstico (BOUSQUET, 2010). A heterogeneidade da DPOC e o fato de pacientes estarem expostos aos mesmos fatores de risco e apenas uma parte deles desenvolverem a doença, estão associados com fatores como: gênero, etnia, raça e fatores genéticos (MENEZES et al., 2005).

O tabagismo é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da DPOC. Em muitos países, a poluição do ar devido à queima de biomassa (carvão, lenha, entre outros combustíveis) tem sido identificada como importante fator de risco (RABE et al., 2007).

Atualmente a DPOC é a terceira causa de morte em todo o mundo (GOLD, 2011). De acordo com o Ministério da Saúde no Brasil, a DPOC é a terceira causa de morte entre as doenças crônicas, representando, atualmente, quase 40.000 óbitos anuais. Ao contrário de diversas doenças crônicas que estão em declínio, a progressão da DPOC é alarmante, exibindo números mundialmente crescentes, tornando-se uma prioridade na saúde mundial (CAZZOLA; DONNER; HANANIA, 2007; PAUWELS et al., 2001).

2.3 PATOGÊNESE DA DPOC

A patogênese da DPOC engloba uma série de processos lesivos, que levam a alterações fisiológicas, incluindo resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e gases inalados, apoptose, destruição da MEC pelo desequilíbrio protease/antiprotease e oxidante/antioxidante.

A teoria fisiopatológica dominante que explica a destruição pulmonar é descrita desde 1960 cuja hipótese para a patogênese da DPOC é o desequilíbrio protease - antiprotease. O aumento da atividade proteolítica pode ser consequência 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). As antiproteases, ou seja, os inibidores de proteinases envolvidos na DPOC são a α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina, que inibem as leucoproteases e as metaloproteinases (TIMP1 e TIMP2). A exposição à fumaça do

cigarro potencializa a lesão pulmonar, reduzindo a atividade destas moléculas como antiprotease em aproximadamente 2000 vezes, sendo um importante fator no desenvolvimento do enfisema pulmonar (CAMELIER et al., 2008).

O entendimento da DPOC como uma doença inflamatória está bem definido. A fumaça do cigarro e a inalação de gases nocivos levam ao dano pulmonar. No tabagista as células inflamatórias como leucócitos e macrófagos migram em grande quantidade para os pulmões, sendo ativados e gerando uma reação inflamatória que, ao longo dos anos, apresentam consequências na estrutura e função pulmonar (RUFINO; COSTA, 2013). As células inflamatórias que são recrutadas na DPOC liberam substâncias como elastase, colagenases e produtos oxidantes que atuam modificando os componentes da MEC (HOGG; SENIOR, 2002). Os neutrófilos são abundantes no sangue, mas praticamente ausentes nos tecidos pulmonares em pessoas saudáveis. Em uma reação inflamatória são produzidos vários fatores quimiotáticos para estas células, que rapidamente migram para o sítio de inflamação, onde exercem função fagocitária e liberam substâncias lesivas aos tecidos, desempenhando papel central na fisiopatologia do enfisema (RUFINO; SILVA, 2006; BARNES, 2003; WAGNER; ROTH, 2000; DALLEGRI, 1997). No tecido pulmonar de fumantes há indícios de que possa ter retenção neutrofílica nos pulmões (MACNEE et al., 1989). Os macrófagos apresentam importante função no desenvolvimento da DPOC, encontrando-se em maior número no parênquima pulmonar, principalmente nos espaços alveolares. Indivíduos com enfisema apresentam um aumento cerca de 25 vezes no número de macrófagos comparado com fumantes que não apresentam enfisema (RETAMALES et al., 2001).

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 (FLOREANI et al., 2003; HELLERMANN et al., 2002; MIO et al., 1997).

Um novo conceito na patogênese do enfisema é a apoptose. Estudos propõem que a destruição alveolar presente em pacientes com enfisema pode ser causada por um processo acelerado de apoptose das células epiteliais e endoteliais induzido principalmente pelos linfócitos T CD8⁺ (MAJO; GHEZZO; COSIO, 2001; KASAHARA, et al., 2000). A apoptose endotelial e alveolar é um mecanismo importante que ajuda explicar a perda das estruturas alveolares vista no enfisema. Existe um aumento da apoptose de células endoteliais e epiteliais em pacientes com DPOC (AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003; KASAHARA et al., 2000; SHAPIRO, 2000).

O estresse oxidativo também pode ser importante em diversos aspectos patológicos da

DPOC, uma vez que pode amplificar as respostas inflamatórias, induzir a apoptose e prejudicar a função de proteção das antiproteases, acelerando a degradação da elastina no parênquima pulmonar (BARNES, 2003; TAGGART et al., 2000). O estresse oxidativo é uma condição biológica que ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua desintoxicação através de sistemas biológicos. É causado por radicais livres de oxigênio, peróxidos e peroxinitritos que agindo sobre proteínas e lipídios, bases nitrogenadas do DNA, enzimas e componentes extracelulares, causam danos no parênquima e/ou nas vias aéreas (PINTO, 2008). A fumaça contém altas concentrações de ROS e tem efeito oxidativo (MACNEE, 2001; AMADORI, 1995; PRYOR, 1993). O aumento dos níveis de ROS em vias aéreas e pulmões perturbam o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes resultando em estresse oxidativo (BOWLER, 2002). Estudos revelam um aumento dos níveis de indicadores de estresse oxidativo em condensado de ar exalado em pacientes com DPOC (KOSTIKAS et al., 2003; PAREDI; KHARITONOV; BARNES, 2002; KHARITONOV; BARNES, 2002).

A teoria da ativação imunológica veio para desvendar o porquê dos pacientes que pararam de fumar ainda desenvolverem DPOC (TAM; SIN, 2012). A fumaça de cigarro e outros gases nocivos provocam uma resposta imune que leva ao dano pulmonar. A hipótese foi de que a DPOC, devido à degradação da MEC, mais especificamente da elastina desencadearia uma produção de autoanticorpos contra as fibras elásticas e este aumento de autoanticorpo antielastina foi identificado (LEE et al., 2007).

A fumaça de cigarro e outros gases nocivos provocam uma resposta imune inata que leva ao dano pulmonar, sendo recrutadas para o local da agressão células do sistema imunológico, incluindo macrófagos e neutrófilos, e nesse processo citocinas pro - inflamatórias são liberadas, com um possível estímulo à produção de “novos antígenos”, o que explica a progressão da doença mesmo após a cessação do tabagismo (ANDRÉJAK, et al., 2013).

Existe aumento no número de linfócitos T no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC, com um grande aumento de células CD8+ e CD4+ (RETAMALES et al., 2001; MAJO; GHEZZO; COSIO, 2001; SAETTA et al., 1999; O'SHAUGHNESSY et al., 1997; FINKELSTEIN et al., 1995). Há uma correlação entre o número de células T e a quantidade de destruição alveolar (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003). Alguns autores destacam o aumento da concentração de CD8+ nos pulmões de pacientes com DPOC fumantes em relação a não fumantes (SAETTA et al., 1998; O'SHAUGHNESSY et al., 1997). Outros, também relatam maior população de células CD8+ no sangue periférico, em pacientes com DPOC. Porém, o mecanismo pelo qual as células CD8+ e, em menor extensão CD4+ acumulam-se nos pulmões ainda não é compreendido. É possível que possuam resposta imunológica e

desempenhem um papel na perpetuação do processo inflamatório (RUFINO; SILVA, 2006; JONG et al., 1997). As células dendríticas que são células imunes responsáveis pela identificação e captura do agente agressor podem ser elemento chave na patogênese da DPOC, pois ativam uma variedade de células imunes e inflamatórias podendo exercer importante papel na resposta pulmonar à fumaça do cigarro e a outros agentes inalatórios nocivos (BANCHEREAU et al., 2000).

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ENFISEMA PULMONAR

Os animais têm sido muito utilizados em modelos experimentais (SLAUSON; HAHN, 1980), permitindo a observação da evolução de doenças pulmonares. O grande conhecimento da biologia de animais experimentais possibilitou a compreensão de diversos aspectos fisiopatológicos e até mesmo de mecanismos envolvidos na gênese do enfisema pulmonar, possibilitando assim o entendimento de mecanismos celulares e moleculares envolvidos e auxiliando nas estratégias terapêuticas visando beneficiar a qualidade de vida, o tratamento e a prevenção da DPOC (GRONEBERG; CHUNG, 2004; PAIGEN, 1995).

Os modelos experimentais com camundongos para estudar a DPOC parecem ser particularmente úteis, pois permitem estudos dos mecanismos de desenvolvimento da doença (BISELLI, 2008). Existem diversos modelos experimentais para simular a DPOC, sendo os três principais: a instilação intratraqueal ou inalação (aerossol) de enzimas proteolíticas, exposição à fumaça de cigarro e linhagens de camundongos geneticamente modificados (BARTALESI et al., 2005; GUERASSIMOV et al., 2004; SHAPIRO, 2000; LAURELL; ERIKSSON, 1963).

A instilação ou inalação de protease leva a um desequilíbrio entre protease e antiprotease (LAURELL; ERIKSSON, 1963). A instilação intratraqueal de protease induz o enfisema em animais experimentais e procura mimetizar o enfisema ocorrido em humanos (GROSS et al., 1965). As proteases exercem papel essencial no desenvolvimento do enfisema pulmonar, este desequilíbrio pode ocorrer tanto por uma liberação excessiva de proteases por células inflamatórias e células residentes no pulmão, ou por uma redução na síntese ou aumento da quebra de antiproteases (LAURELL; ERIKSSON, 1963).

A maior parte dos estudos utiliza a elastase pancreática de porco (PPE) e a elastase de neutrófilos humanos (JANOFF, 1985; JANOFF et al., 1979; LIEBERMAN et al., 1976). O enfisema induzido por PPE tem baixo custo, uma vez que uma única instilação pode resultar

características compatíveis com o enfisema humano (SNIDER, 1992; SNIDER et al. 1986). O mais consistente e impressionante alargamento do espaço aéreo foi realizado pela instilação intratraqueal de PPE (VALENTINE et al, 1983). Este modelo é fácil de ser reproduzido e o desenvolvimento do enfisema é rápido, cerca de 20 dias observa-se lesão seguido por mudanças morfológicas, comprometimento da função pulmonar e remodelamento do parênquima pulmonar, o que o torna relevante principalmente para estudar as alterações provocadas nas fibras do parênquima pulmonar (MAO et al., 2002; TEPPER et al., 2000; SNIDER, LUCEY; STONE, 1986; JANOFF, 1985; JANOFF et al., 1979). Hantos et al., (2008) relataram que o tratamento com PPE em camundongos produz injúrias pulmonares equivalente ao enfisema encontrado em humanos que fumam há cerca de 5 anos. Além disso, o dano pulmonar causado pela instilação de elastase é homogeneamente distribuído, enquanto que as partículas de cigarro permanecem na árvore brônquica até que são lentamente entregue aos alvéolos (ANTUNES; ROCCO, 2011). Porém vale ressaltar que é difícil extrapolar as conclusões sobre os efeitos agudos da instilação de elastase para o aparecimento de doenças crônicas que são lentas e progressivas em seres humanos (BRUSSELLE et al., 2006).

A inalação de fumaça de cigarro parece ser o mais fiel na retratação das alterações progressivas da função pulmonar, porém não há uma padronização desse modelo de indução ao enfisema. Existem variações de laboratório para laboratório principalmente quanto ao sistema e metodologia de exposição à fumaça de cigarro e tipos de cigarros utilizados. Esse modelo requer longo e cuidadoso tempo de exposição à fumaça do cigarro (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008). Além da inalação da fumaça de cigarro, outros modelos eficazes no desenvolvimento de DPOC têm sido usados como a exposição a diferentes gases como SO₂, NO₂, material particulado e gases oxidantes (BISELLI, 2008; WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008).

Os animais geneticamente modificados são linhagens de camundongos com mutações genéticas que possuem deficiência de α -1 antitripsina e conseqüentemente enfisema pulmonar espontâneo sem estímulos externos (SHAPIRO, 2000). Existem limitações para o uso de modelos experimentais destes animais, uma vez que não são modelos espontâneos da doença e não mimetizam por inteiro o fenótipo da doença, o gene de interesse também é expresso durante o desenvolvimento de outros órgãos levando a alterações de vários sistemas, o que faz com que seja impossível separar as anormalidades restritas à patologia pulmonar (GRONEBERG; CHUNG, 2004; SHAPIRO, 2000).

2.5 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

As propriedades mecânicas do tecido pulmonar são fatores determinantes para que sua principal função seja realizada, a troca gasosa. Para que ocorra a adequada circulação dos gases pelas vias aéreas, os músculos respiratórios atuam produzindo alterações volumétricas no pulmão. As forças elásticas e dissipativas que atuam simultaneamente no órgão, como as forças presentes nas fibras elásticas e nas fibras colágenas são importantes no comportamento de toda a mecânica do sistema respiratório (FAFFE; ZIN, 2009; BATES, 2009).

A avaliação da mecânica respiratória engloba todos os aspectos pertinentes aos processos mecânicos realizados durante a respiração (MORIYA, 2003). Existe uma variedade de sinais pertencentes à mecânica pulmonar que podem ser mensuradas, as mais comumente usadas são: fluxo e pressão. O fluxo é determinado como entrada do sistema e a pressão como saída (BATES, 2009). Dessa forma, a medida da mecânica respiratória é obtida oscilando-se um fluxo conhecido nos pulmões através da traquéia, medindo-se a pressão resultante gerada na traquéia e relacionando os dois, em termos de resistência e elastância dos tecidos (MORIYA, 2003).

A técnica de oscilações forçadas permite gerar oscilações de pressão que são aplicadas ao sistema respiratório por um dispositivo externo e as oscilações resultantes de fluxo, relacionadas com as oscilações de pressão correspondentes, permitem a estimativa de impedância do sistema respiratório (MORIYA; MORAES; BATES, 2003). De forma simplista a impedância do sistema respiratório tem origem, principalmente, nas forças resistivas, elásticas e inertivas que se opõem aos movimentos inspiratórios e expiratórios e, é dada pela relação entre a perturbação de volume aplicada na traquéia e a pressão medida no mesmo local (CAMPOS, 2011). O chamado modelo de fase constante tem sido utilizado para modelar a impedância do sistema respiratório a partir de dados obtidos em baixa frequência, uma vez que tem provado ser superior aos modelos utilizados no domínio do tempo (NUCCI, COBELLI, 2001). Neste modelo de fase constante, a impedância do sistema respiratório é modelada separando o componente via aérea de outros tecidos (MORIYA, 2003). Os dados obtidos da mecânica respiratória no presente estudo foram a partir de cálculos da impedância, e são eles: resistência de via aérea (R_{aw}), resistência tecidual (G), elastância tecidual (H) e histeresividade (η).

2.6 RESPONSABILIDADE BRÔNQUICA: RECEPTOR MUSCARÍNICO

Um dos mecanismos de controle da concentração de cálcio na musculatura lisa das vias aéreas é neural e desempenhado pelo sistema nervo autônomo simpático e parassimpático, que desempenham efeitos opostos sobre o diâmetro dessas vias de condução (BAI; SANDERSON, 2006). A contração do músculo liso das vias aéreas pode ser gerada pela secreção de acetilcolina (ACh) devido a ativação das fibras parassimpáticas presentes no parênquima pulmonar (GUYTON; HALL, 1997). A broncodilatação é causada pela estimulação de receptores adrenérgicos, os receptores β_2 relaxam a musculatura lisa dos brônquios (WEST, 2010). No presente estudo foi focada a contração das vias aéreas e adiante será enfatizado os receptores colinérgicos.

A sensibilidade da via aérea aos mecanismos que regem a sua contração é chamado de responsividade. O termo responsividade das vias aéreas descreve a facilidade que as vias aéreas se estreitam quando expostas a estímulos provocativos (STERK, 1996). Compreende dois mecanismos: a hiper-reatividade e a hipersensibilidade (CHINN, 1998; STERK, 1996). A hiper-reatividade está relacionada com o aumento da broncoconstricção em resposta ao estímulo e a hipersensibilidade é relacionada com a diminuição na quantidade do estímulo necessário para provocar o nível de broncoconstricção desejado (Fig. 3). A hiper-responsividade brônquica (HRB) pode ser explicada como um aumento na facilidade e grau de estiramento das vias aéreas em resposta a estímulos broncoconstrictores podendo ser devida a hiper-reatividade e/ou a hipersensibilidade (RUBIN, et al., 2002).

Diversos mecanismos podem estar relacionados com a HRB, entre eles: contratura excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, espessura e integridade da camada epitelial, alterações mecânicas dos brônquios, alterações no conteúdo e no equilíbrio das proteínas da MEC e ainda regulação autonômica exacerbada (BENTO; HERSHENSON, 1998; STERK, 1993). Muitos estudos têm sugerido que além da inflamação o remodelamento contribui de maneira significativa para o desenvolvimento da HRB (HIZUME, 2010).

A musculatura lisa exerce papel crucial na regulação da contratilidade e tônus das vias aéreas (AMRANI, PANETTIERI, 2003). Essa musculatura apresenta um estado contrátil basal permanente que é resultado da constante estimulação colinérgica (JUDE et al., 2008; BOOTMAN et al., 2001; HOROWITZ et al., 1996; ALLEN; WALSH; 1994).

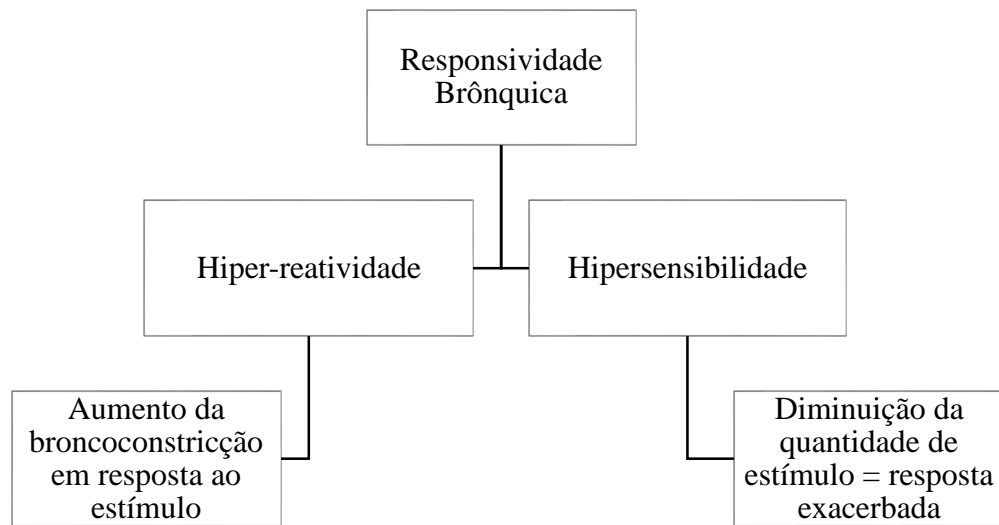


Figura 3 – Representação esquemática da responsividade brônquica.
Fonte: Da autora.

A resposta contrátil do músculo liso das vias aéreas pode ocorrer através da ativação de receptores específicos encontrados na superfície celular (SAETTA et al., 1999; PETÁK, et al., 1997). O mecanismo clássico para provocar a HRB é a estimulação de agonistas muscarínicos (CHEN, et al., 2011). Os receptores muscarínicos são do tipo serpentina que transpassam a membrana sete vezes e pertencem à família de receptores acoplados a proteína G (GOSENS; ROSCIONI; DEKKERS, 2008). Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) dos quais três exercem efeitos fisiológicos nas vias aéreas (M1, M2 e M3). A parede alveolar contém receptores M1 e no músculo liso das vias aéreas estão presentes os M2 e M3, no qual sua função primordial é atuar nos mecanismos de contração das vias aéreas (GOSENS; ROSCIONI; DEKKERS, 2008; COULSON; FRYER, 2003). Os receptores M3 estão localizados na musculatura lisa das vias aéreas, no epitélio das glândulas submucosas e em células inflamatórias, induzem intensa broncoconstrição ao interagir com a ACh. A ativação do nervo vago libera ACh que se liga aos receptores muscarínicos do tipo M3 localizados nas células musculares e causam a contração do músculo liso (ROFFEL et al., 1988). De outro modo, a ACh também interage com os receptores muscarínicos do tipo M2 localizados nos nervos colinérgicos pós-ganglionares e a ativação destes receptores tem ação inibitória sobre a liberação de ACh que diminui assim a broncoconstrição (MEURS et al., 2013; FRYER; JACOBY, 1998).

O método mais utilizado para avaliação da responsividade é o teste de

broncoprovocação, não apenas na prática clínica, mas também em pesquisas (MYERS et al., 1981). O teste de broncoprovocação se baseia no fato de que a musculatura lisa brônquica, quando exposta a substâncias colinérgicas, reage com aumento do tônus, isto é, com broncoconstrição (RUBIN et al, 2002). A medida da responsividade é realizada pela inalação de agentes farmacológicos, com efeitos contráteis sobre a musculatura de vias aéreas, e a reação é do tipo dose – dependente (RYAN et al., 1981). Os fármacos mais comumente utilizados para realização dos testes são: metacolina (MCh), carbacol (CCh) e histamina (RUBIN et al., 2002). A MCh (acetil- β -metilcolina) é um fármaco colinérgico que leva a constrição por estimulação de receptores muscarínicos M3 da musculatura lisa brônquica (PELLEGRINO et al., 1998). A MCh difere da ACh basicamente por sua ação mais prolongada e seletiva. A ação desse fármaco é mais prolongada porque o acréscimo do grupo metila aumenta sua resistência à hidrólise pelas colinesterases (BROWN; TAYLOR, 2010).

2.7 REMODELAMENTO PULMONAR

A MEC tem um papel importante na manutenção da estrutura e função das vias aéreas. As proteínas da MEC estão envolvidas na interação célula-célula, célula substrato de adesão, recebendo e emitindo sinais moleculares, controlando a arquitetura tissular, orquestrando a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celular (PARAMESWARAN et al., 2006; JOHNSON et al., 2001). A composição da MEC envolve processos dinâmicos de produção e degradação de proteínas da matriz. As fibras colágenas e elásticas, os proteoglicanos e as glicoproteínas são as principais proteínas da MEC (JAMES, 2005).

O epitélio alveolar após a lesão inicia um processo de remodelamento, porém esse mecanismo ainda não é completamente conhecido (NAKAMURA et al., 1995). O reparo tecidual tem o objetivo principal de restaurar a barreira alvéolo-capilar (THOMAS, 2007; NAKAMURA et al., 1995). O tabagismo pode piorar o mecanismo de reparo pulmonar o que mais uma vez contribui para a perpetuação da destruição pulmonar (NAKAMURA et al., 1995).

Após a lesão das células epiteliais ocorre a migração, proliferação e diferenciação das células epiteliais da matriz do septo intersticial, este é um evento dinâmico, que envolve alterações no sistema de fibras elásticas e colágeno (VOSWINCKEL, et al., 2004; BROWN; RANNELS; RANNELS, 2001; KASPER; HAROSKE, 1996; KALLENBERG et al., 1987; KAWANAMI; FERRANS; CRYSTAL, 1982). Os principais componentes da MEC que

participam do remodelamento pulmonar são as fibras elásticas e as fibras colágenas (KIELTY et al., 2002).

As fibras elásticas têm como principal componente a elastina que é uma glicoproteína estrutural, formada pela tropoelastina (MARIANI et al., 1995). O desenvolvimento da elastogênese se dá através de três estágios graduais e sucessivos: fibras oxitalânicas (formadas exclusivamente por microfibrilas e sem elastina), elaunínicas (formadas por grande quantidade de microfibrilas e pouca elastina) e fibras elásticas maduras (formadas por grande quantidade de elastina e poucas microfibrilas). Assim, a propriedade da fibra é relatada pela sua grande quantidade de elastina, sendo que as fibras oxitalânicas e elaunínicas, sem ou com pouca elastina, dariam resistência à tensão mecânica, o que representa ser um elemento capaz de sustentar as variações de distensão a que se submetem, garantindo assim sua integridade. Já as fibras elásticas maduras, as quais possuem grande quantidade de elastina, representariam o elemento responsável pela distensibilidade reversível do tecido conectivo, sendo capaz de aumentar até uma vez e meia o seu comprimento e retornarem ao seu comprimento inicial, regulando a potência das vias aéreas e o recolhimento elástico pulmonar (PANIAGUA et al., 1983). A elastina é frequentemente apontada como responsável pela elasticidade pulmonar durante a respiração em volume corrente (SUKI et al., 2005). Após um aumento da destruição da elastina, observa-se um incremento na sua síntese. No entanto, esta síntese ocorre de forma desordenada, trazendo consequências deletérias às propriedades mecânicas do pulmão, favorecendo o seu colapso (NAKAMURA et al., 1995).

As fibras colágenas têm como principal componente o colágeno, que é uma glicoproteína estrutural, com peso molecular de 290 kDa, composto pelos aminoácidos glicina (33,5%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%) formando três cadeias polipeptídicas enroladas entre si configurando uma estrutura de tripla hélice. É formado por fibrilas e microfibrilas que originam as fibras com diâmetros variados e presentes sob a forma de uma rede delicadamente trançada ou de feixes espessos (GELSE, PÖSCHL; AIGNER, 2003). As fibras colágenas encontram-se distribuídas no interstício septal e no interstício periaventricular, sendo sintetizadas por fibroblastos, miofibroblastos e células musculares. A função principal dessas fibras é manter a força de tensão, que impede a distensão exagerada do parênquima pulmonar, durante os movimentos respiratórios (FELICIO; PARRA; CAPELLOZZI, 2007; ROZIN, et al., 2005; TOZZI et al., 1994; MERCER, CRAPO, 1990). No pulmão já foram identificados mais de 20 tipos diferentes de colágenos (SUKI et al., 2005). Entre os vários tipos de colágenos, os tipos I e III são os mais abundantes e com distribuição difusa no tecido pulmonar. O colágeno tipo I é produzido pelos fibroblastos e o colágeno tipo III é produzido pelas células do músculo liso e

células reticulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). Em condições patológicas o recrutamento, a proliferação de células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos e de outras células, são capazes de sintetizar colágeno, levando a deposição da MEC e consequente remodelamento do parênquima pulmonar (VOSWINCKEL, et al., 2004; BROWN; RANNELS; RANNELS, 2001; KASPER; HAROSKE, 1996; KALLENBERG et al., 1987; KAWANAMI; FERRANS; CRYSTAL, 1982).

A integridade da matriz colágeno - elastina determina suas propriedades elásticas, de forma que a destruição do parênquima que ocorre em algumas doenças é acompanhada por alterações na composição e distribuição das fibras elásticas e de colágeno. Estas alterações estruturais interferem nas propriedades viscoelásticas do pulmão avaliadas através de medidas da G e H que são parâmetros utilizados para descrever as propriedades viscoelásticas do sistema respiratório (GOMES et al., 2000; BATES et al., 1989).

3 OBJETIVOS

Diante das exposições apresentadas nosso estudo apresentou como objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a responsividade das vias aéreas em camundongos Swiss através da avaliação da mecânica respiratória usando um modelo de enfisema induzido por PPE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos foram elaborados com o intuito de responder se a mecânica respiratória, especificamente a resistência das vias aéreas, de camundongos enfisematosos modifica-se após o desafio com MCh quando comparado a animais controle. Para isso foram propostos os seguintes objetivos:

1- Avaliar a responsividade das vias aéreas após nebulização com solução salina, MCh 50 e 100mg/mL através da mecânica respiratória avaliando os parâmetros R_{aw} , G, H e η de animais controle e induzidos ao enfisema por PPE 0,3 e 0,6U;

2- Avaliar a morfometria do tecido pulmonar de animais controle e induzidos ao enfisema por PPE 0,3 e 0,6U;

3- Quantificar as proteínas elastina e colágeno tipo III do tecido pulmonar em animais controle e induzidos ao enfisema 0,3 e 0,6U.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 80 camundongos Swiss machos (25-30g) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – MG e transferidos para o laboratório de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, no qual foram mantidos em gabinetes ventilados (*Alesco, São Paulo, Brasil*) com temperatura (cerca de 20°C) e ventilação adequadas. Os animais foram acomodados em caixa moradia de polietileno, nas medidas de 30x20x13cm, na quantidade de três animais por caixa. Durante o tempo de aclimatização e experimentação eles receberam água e ração comercial peletizada à vontade e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12h.

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 pela Comissão Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – MG (Protocolo 356/2011).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos de forma aleatória em três grupos: grupo salina (Sal, controle), grupo enfisema 0,3U e grupo enfisema 0,6U. No grupo salina foi instilado via intratraqueal o veículo da elastase num volume de 50µL e nos grupos enfisema foram instilados 0,3U ou 0,6U de elastase pancreática de porco (PPE) (*Sigma, EUA*), no mesmo volume mencionado para o grupo salina (Fig. 4).

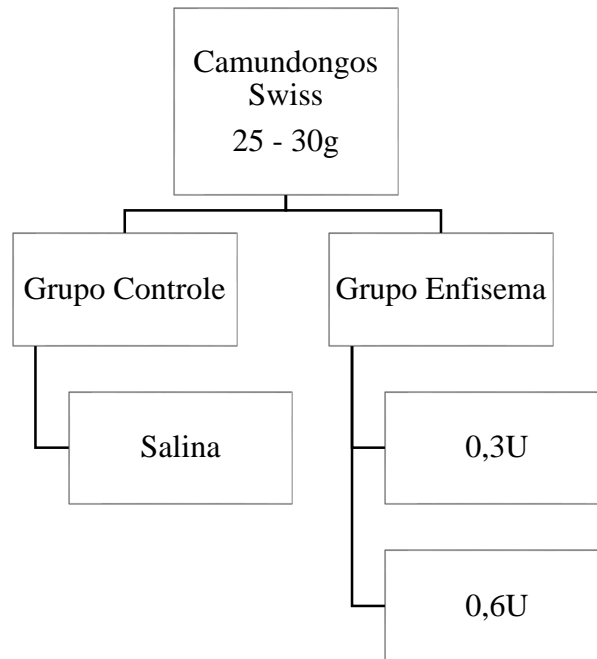


Figura 4 – Representação esquemática dos grupos experimentais.
Fonte: Da autora

4.3 PREPARO DOS ANIMAIS

Inicialmente, os camundongos foram pesados e aqueles com peso de 25 a 30g foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito a seguir. Os animais foram anestesiados com quetamina (34mg/kg) e xilazina (12mg/kg) intraperitoneal (i.p.) e submetidos à cirurgia para a abertura do óstio anterior na traquéia e realizadas as instilações com as soluções e doses mencionadas. Detalhadamente, as instilações foram feitas usando-se uma seringa (*Hamilton*) conectada a um cateter de polietileno (PE10) e este unido a uma agulha gengival na extremidade distal. A agulha foi inserida na parte anterior da traqueia e o volume contido no sistema (50µL) foi instilado. A pequena incisão foi suturada.

Os camundongos foram submetidos ao procedimento de recuperação pós-cirúrgica, no qual permaneciam em ambiente aquecido (30°C) até apresentarem movimentos ativos. Todos os animais foram transferidos da sala cirúrgica para gabinetes e mantidos durante 20 dias - necessários para se instalar o processo de enfisema. Decorrido este intervalo de tempo, todos os animais foram submetidos à avaliação da mecânica respiratória e retirada dos pulmões para a histologia pulmonar e quantificação de proteínas.

4.4 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Os grupos instilados com Sal e PPE foram novamente pesados e anestesiados com xilazina (12mg/kg) e pentobarbital sódico (68mg/kg) i.p. para instalação de uma cânula traqueal. Posteriormente, os camundongos foram colocados em uma pequena mesa aquecedora (*Heat Pad, Insight, Brasil*) sob foco cirúrgico em decúbito dorsal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueostomia para introdução de uma cânula de metal, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram mantidos anestesiados, posicionados e conectados a um ventilador mecânico (*flexiVent, SCIREQ, Canadá*) para camundongos (módulo 1) (Fig. 5). Este aparelho permite a manutenção da vida em animais sedados e curarizados e também atua na avaliação da mecânica respiratória, por permitir que perturbações de volumes pré-estabelecidos sejam aplicadas ao sistema respiratório via traqueia (SHUESSLER; BATES, 1995; BATES; ALLEN, 2006).

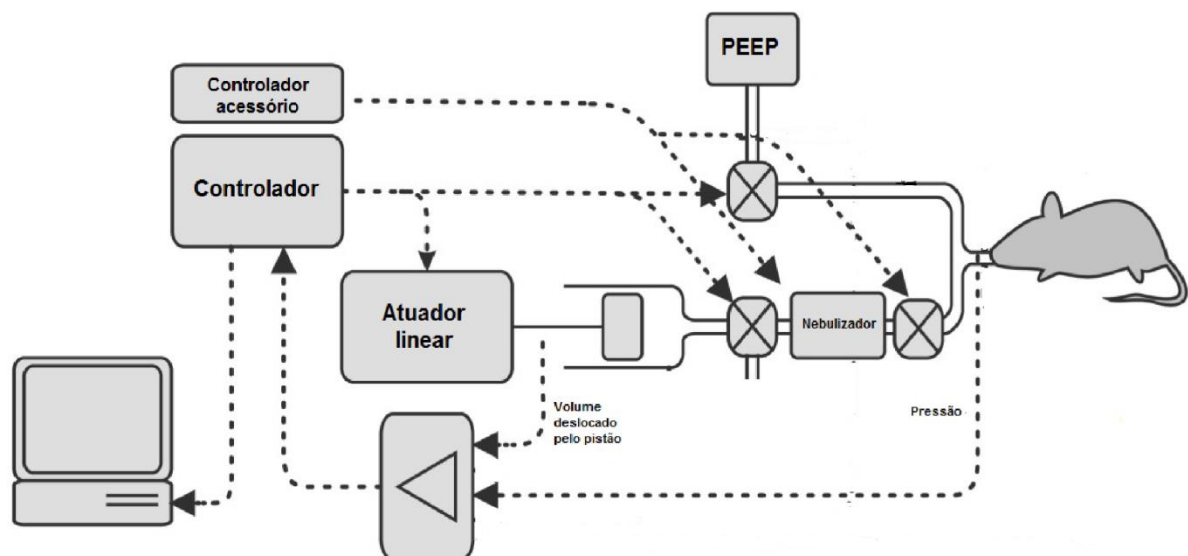


Figura 5 – Diagrama do ventilador mecânico usado para coleta dos dados de mecânica respiratória. Fonte: SHALABY et al., 2010 adaptado.

Os animais foram ventilados com parâmetros constantes: volume corrente de 10mL/kg, frequência respiratória de 200 ciclos/minuto e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 3cmH₂O conectado a uma válvula expiratória do ventilador. Posteriormente foi induzida a paralisia muscular através de uma injeção i.p. de brometo de pancurônio (0,5mL/kg).

A mecânica respiratória foi medida através da aplicação de volumes utilizando a técnica de oscilações forçadas (HANTOS, et al., 1992). O ventilador mecânico manteve-se controlado por um computador, que intercalou a ventilação mecânica com manobras (perturbações) com pressão e volumes controlados para obter medidas precisas e reprodutíveis de mecânica respiratória (Fig. 6). As perturbações utilizadas foram: Capacidade pulmonar total (TLC), que é uma perturbação de recrutamento alveolar com duração de 6 segundos e consiste na aplicação de uma rampa de volume, com pressão inicial equivalente a própria PEEP, até que se atinja a pressão de platô de 30 cmH₂O. Depois de alcançada a pressão de platô, esta é mantida até o final dos 6 segundos. A TLC é utilizada antes das nebulizações para facilitar a difusão da droga e minimizar os efeitos da heterogeneidade pulmonar causada pelo uso da MCh, que causa a variação de pressão alveolar em diferentes regiões do pulmão (BATES; SUKI, 2008); Quick-prime-3 que consiste na imposição de um fluxo de ar com amplitude variável ao longo de 3 segundos (CHEN et al., 2006).

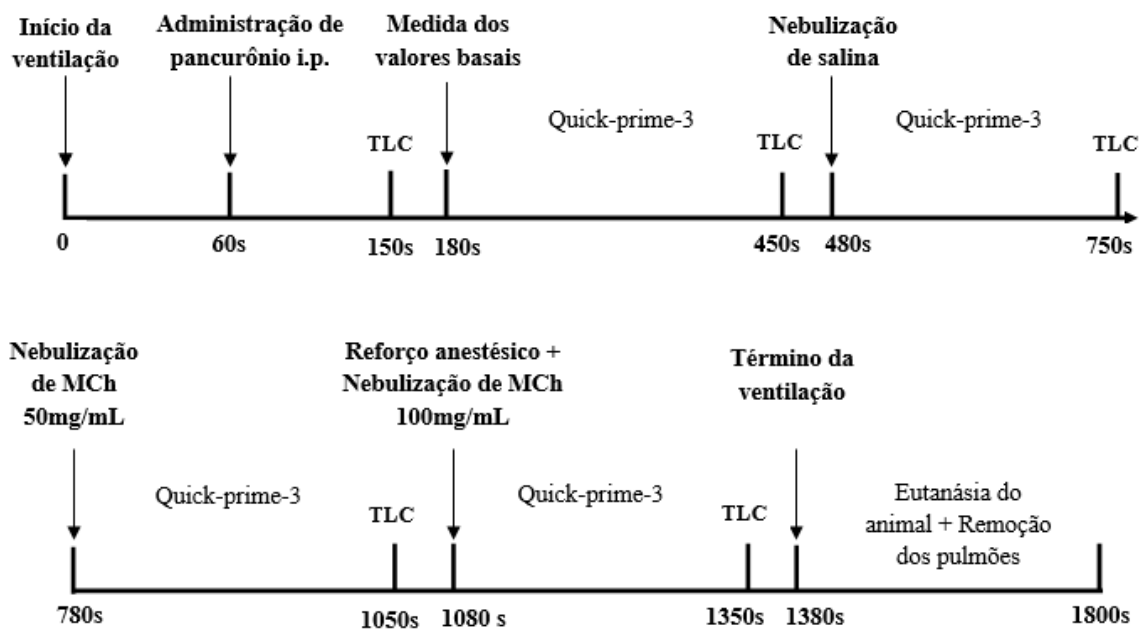


Figura 6 – Esquema temporal do protocolo de medidas mecânicas.
Fonte: Da autora

Foi calculada a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) dos animais de cada grupo. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações. Após a perturbação, os dados foram coletados. Foram coletados: a posição do pistão (V_{cyl}) e a pressão

interna do cilindro (P_{cyl}).

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

Para análise das impedâncias obtidas, utilizamos o modelo de fase constante, (HANTOS, et al., 1992).

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

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

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

Foram obtidos com o ventilador os parâmetros:

R_{aw} - resistência de via aérea nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar;

G - resistência tecidual do modelo de fase constante;

H - elastância do tecido pulmonar do modelo de fase constante; e

η - histeresividade do modelo de fase constante.

O animal foi ventilado por um intervalo de tempo de aproximadamente 2 minutos para adaptação, ajuste do sistema respiratório ao fluxo recebido e verificação de possíveis vazamentos, obstruções e correções no posicionamento. O ventilador mecânico manteve os camundongos ventilados e somente foi interrompida a ventilação em intervalos de tempos determinados para aplicar perturbações e assim obter os valores acima descritos. Todos os grupos recebera nebulização (*Aeroneb*, *Aerogen*, *Irlanda*) com salina e broncoconstrictor MCh (*acetil- β methylcholine-cloreto*, *EUA*) em concentrações crescentes de 50 e 100mg/mL para

averiguar a HRB. Primeiramente foram determinados os valores basais dos animais e logo após o registro dos valores após nebulização com salina, e posteriormente, foi realizada a nebulização de MCh. O nebulizador aerossolizou no sistema respiratório e 5 segundos após os valores da mecânica respiratória foram registrados. Os registros foram repetidos de 15 em 15 segundos até o tempo de 300 segundos. O tempo de intervalo para administração das diferentes concentrações de MCh foi de 5 minutos. Ao término do experimento a traquéia foi clampeada ao final da expiração, e os pulmões foram retirados.

Após o registro dos valores, foram realizadas análises desses dados. Foi utilizado o valor do coeficiente de determinação (COD), que é um parâmetro no qual fornece confiabilidade dos dados. Os valores obtidos com a aplicação do modelo de fase constante foram utilizados para determinar as curvas dose-resposta.

4.5 REMOÇÃO DOS PULMÕES

Imediatamente após a avaliação da mecânica pulmonar, a traquéia foi ocluída no final da expiração com linha de algodão. Os animais foram eutanasiados por exsanguinação e realizada uma secção cirúrgica da aorta e veia cava inferior em suas porções abdominais. 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, permitindo separar o conjunto monobloco (coração-pulmão) das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas visualizadas, a traquéia foi seccionada abaixo do local ocluído pelo fio de algodão e, posteriormente, separada do esôfago e o coração. Os pulmões foram então separados individualmente. O lóbulo pulmonar direito foi destinado à análise histológica e o lóbulo pulmonar esquerdo foi coletado para análise de proteínas pelo método de *Western Blot*.

4.6 HISTOLOGIA PULMONAR

4.6.1 Fixação e preparo das lâminas

Os pulmões foram mantidos em formalina 10%, durante 7 dias (pH=7,4 e 0,1M). Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina e cortes histológicos com 4 μ m de espessura foram realizados e posteriormente corados com hematoxilina-eosina.

4.6.2 Análise morfométrica

As lâminas contendo os cortes pulmonares corados com hematoxilina e eosina foram analisadas por microscopia óptica (*Nikon Corporation, Japão*) de acordo com seus aspectos quantitativos. A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) (WEIBEL, 1990).

Em um aumento de 200x, utilizando-se uma ocular, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo, acoplada ao microscópio de luz convencional (*Nikon Corporation, Japão*) (Fig. 7). Foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina e quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. 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. Os espaços aéreos foram avaliados através do diâmetro alveolar médio ou intercepto linear médio (Lm), para tal foi escolhida uma área contendo 20 campos aleatórios não coincidentes em cada lâmina e contou-se o número de intercepções alveolares com as linhas, em um aumento de 200x (DUNNILL, 1964).

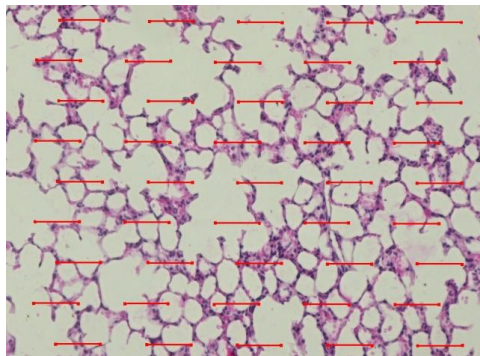


Figura 7 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.
Fonte: Da autora.

4.7 WESTERN BLOT

O pulmão esquerdo foi coletado e homogeneizado em tampão RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay Buffer), (NaCl 150mM, ácido deoxocolato 1%, Tris 0,1M, pH: 7,5, NP-40 1%), contendo inibidores de protease (20µl/mL) (*Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, EUA*).

O lisado foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos a 4°C, tendo sido o sobrenadante aliquoteado e estocado a -80°C até o uso.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo ensaio de BCA (*Pierce Biotechnology, EUA*).

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (4X, Tris 0,5M, pH: 6,8, glicerol, SDS 10%, Bromofenol Blue 1%, β – mercaptoetanol), submetidas à SDS – PAGE, em gel de poliacrilamida a 7% (Tris, 1,5M, pH: 8,8, acrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED) e gel de empilhamento 5% (Tris, 1,0M, pH:6,8, acrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED).

Cada poço foi carregado com 30µg do extrato total de proteínas. A eletroforese foi feita em tampão (1X, Tris 0,25M, glicina 1,92M, pH: 8,3, SDS 1%), os parâmetros da corrida foram: 2 horas, 100 volts, 50mA. As proteínas foram então transferidas para membrana de PVDF (*Amersham Bioscience*), previamente ativada com metanol, em tampão (Tris 0,025M, glicina 0,192M, pH: 8-8,5 e metanol 20%) e os parâmetros para a transferência foram: 2 horas, 100 volts e 250mA. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau 0,5% por 5 minutos para visualizar a eficiência da transferência.

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (*Molico, Nestlé, Brasil*) em 0,05% de Tween-20 em TBS (TTBS), sob agitação em temperatura ambiente durante uma hora.

Foram utilizados os anticorpos anti-actina (1:1000) (*Sigma, EUA*), anti-elastina (1:1000) (*LSBio*) e anti-colágeno III (1:1000) (*Abcam, EUA*), os quais ficaram em contato com a membrana durante a noite a 4°C. No dia seguinte, sucessivas lavagens foram realizadas em TBS e TTBS à temperatura ambiente e os anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários (anti-IgG de coelho, 1:2000 ou anti-IgG de camundongo, 1:1000) conjugado com peroxidase. O protocolo de quimioluminescência (*ECL, Amersham, EUA*) foi utilizado para a detecção de bandas imunorreativas em filmes radiográficos.

Para possibilitar a marcação da mesma membrana com diferentes anticorpos, as membranas foram submetidas à *stripping* com “Restore Western Blot Stripping Buffer” (*Pierce*

Biotechnology) e submetidas a novas marcações.

O programa de domínio público Image J (*NIH Image, National Institute of Health, EUA*) foi utilizado para quantificar as bandas imunorreativas nos filmes radiográficos.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da mecânica respiratória foram analisados utilizando a análise de variância – ANOVA (one-way) seguido do pós-teste de *Tukey's* para análise da variância entre os valores basais e nebulização com salina R_{aw} , G, H e η ; parâmetros histológicos e *Western Blot* de animais instilados com salina, 0,3 e 0,6U. Além disso, o mesmo teste foi aplicado para avaliar o efeito da MCh no mesmo grupo experimental. O teste two-way seguido do pós-teste de *Newmann – Keuls*, foram usados para comparar dentre os grupos o efeito da MCh. Ambos os testes foram feitos pelo programa de estatística GraphPadPrism (*versão 5.0, EUA*). Os resultados foram apresentados com média \pm desvio padrão, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Descrição dos resultados abaixo:

5.1 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os resultados basais da mecânica respiratória estão apresentados na tabela 1. Não foram identificadas diferenças estatísticas nos valores de R_{aw} nos grupos instilados com PPE 0,3U ($0,25 \pm 0,07$ cmH₂O.s/mL) e 0,6U ($0,24 \pm 0,07$ cmH₂O.s/mL) quando comparada com o grupo controle ($0,21 \pm 0,04$ cmH₂O.s/mL). G também não modifica seus valores nos grupos instilados com PPE 0,3U ($2,00 \pm 0,64$ cmH₂O/mL) e 0,6U ($2,10 \pm 0,63$ cmH₂O/mL) quando comparada ao grupo controle ($2,04 \pm 0,74$ cmH₂O/mL). Porém o valor de H nos animais instilados com PPE 0,6U ($11,36 \pm 1,44$ cmH₂O/mL) apresentou redução significativa quando comparada com o grupo controle ($15,61 \pm 2,51$ cmH₂O/mL). A η não apresentou diferença significativa entre o grupo controle ($0,13 \pm 0,02$) e os grupos tratados com PPE 0,3U ($0,13 \pm 0,03$) e 0,6U ($0,16 \pm 0,04$).

Tabela 1: Parâmetros basais da mecânica respiratória obtidos do modelo de fase constante.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Salina (n=11)	0,3U (n=11)	0,6U (n=11)
R_{aw} (cmH ₂ O.s/mL)	$0,21 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,07$
G (cmH ₂ O/mL)	$2,04 \pm 0,74$	$2,00 \pm 0,64$	$2,10 \pm 0,63$
H (cmH ₂ O/mL)	$15,61 \pm 2,51$	$15,75 \pm 1,75$	$11,36 \pm 1,44^*$
η	$0,13 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,04$

Valores representam a média \pm DP, * $p < 0,05$.

Fonte: Da autora.

As propriedades mecânicas avaliadas após nebulização com salina estão apresentadas na tabela 2. R_{aw} não altera significativamente seu valor no grupo instilado com salina ($0,27 \pm 0,05$ cmH₂O.s/mL) ou PPE na dose 0,3 ($0,31 \pm 0,04$ cmH₂O.s/mL) e 0,6U ($0,30 \pm 0,08$ cmH₂O.s/mL). G também manteve seus valores inalterados ($1,92 \pm 0,58$ cmH₂O/mL) no grupo salina e nos grupos instilados com PPE 0,3U ($2,23 \pm 0,50$ cmH₂O/mL) e 0,6U ($2,23 \pm 0,61$ cmH₂O/mL). No

entanto, H apresentou redução significativa no grupo instilado com PPE 0,6U ($11,50 \pm 1,07$ cmH₂O/mL) quando comparada com o grupo controle ($20,73 \pm 5,04$ cmH₂O/mL). A η não apresentou diferença significativa entre o grupo controle ($0,14 \pm 0,01$), PPE 0,3 ($0,15 \pm 0,03$) e 0,6U ($0,17 \pm 0,04$).

Tabela 2: Parâmetros da mecânica respiratória após nebulização com salina obtidos do modelo de fase constante.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Salina (n=11)	0,3U (n=11)	0,6U (n=11)
R_{aw} (cmH ₂ O.s/mL)	$0,27 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,08$
G (cmH ₂ O/mL)	$1,92 \pm 0,58$	$2,23 \pm 0,50$	$2,23 \pm 0,61$
H (cmH ₂ O/mL)	$16,24 \pm 2,94$	$16,49 \pm 2,00$	$11,50 \pm 1,07^*$
η	$0,14 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,04$

Valores representam a média \pm DP, * $p < 0,001$.

Fonte: Da autora.

O parâmetro R_{aw} , no grupo controle ($0,21 \pm 0,04$ cmH₂O.s/mL) e enfisema induzido por PPE 0,3 ($0,25 \pm 0,07$ cmH₂O.s/mL) e 0,6U ($0,24 \pm 0,07$ cmH₂O.s/mL) não apresentou diferença significativa dos valores basais quando comparados com os valores após nebulização com salina ($0,27 \pm 0,05$; $0,31 \pm 0,04$; $0,30 \pm 0,08$ cmH₂O.s/mL) respectivamente. Os valores basais de G no grupo controle ($2,04 \pm 0,74$ cmH₂O/mL), 0,3U ($2,00 \pm 0,64$ cmH₂O/mL) e 0,6U ($2,10 \pm 0,63$ cmH₂O/mL) também não apresentaram diferença significativa quando comparados os valores após nebulização de salina ($1,92 \pm 0,58$; $2,23 \pm 0,50$; $2,23 \pm 0,61$ cmH₂O/mL) respectivamente. H manteve seus valores basais inalterados no grupo controle ($15,61 \pm 2,51$), PPE 0,3U ($15,75 \pm 1,75$ cmH₂O/mL) e 0,6U ($11,36 \pm 1,44$ cmH₂O/mL) quando comparado com os dados após nebulização com salina ($16,24 \pm 2,94$; $16,49 \pm 2,00$; $11,50 \pm 1,07$ cmH₂O/mL). A η também conservou os mesmos padrões, não alterou seus resultados quando comparado os valores basais ($0,13 \pm 0,02$; $0,13 \pm 0,03$; $0,16 \pm 0,04$) com os valores após nebulização com salina ($0,14 \pm 0,01$; $0,15 \pm 0,03$; $0,17 \pm 0,04$) nos respectivos grupos.

O grupo instilado com salina foi nebulizado com as doses de 50 e 100mg/mL de MCh. R_{aw} aumentou significativamente seu valor após nebulização com salina de $0,27 \pm 0,05$ cmH₂O.s/mL para $0,45 \pm 0,09$ cmH₂O.s/mL quando nebulizados com MCh 50mg/mL, e os valores alteraram-se para $1,11 \pm 0,13$ cmH₂O.s/mL quando nebulizados com MCh 100mg/mL (Fig. 8). G também mostrou aumento significativo do seu valor após nebulização com salina de

1,92±0,58 cmH₂O/mL para 4,83±0,90 cmH₂O/mL quando nebulizados com MCh 50mg/mL e quando nebulizados com MCh 100mg/mL os valores foram 9,01±2,29 cmH₂O/mL (Fig. 9). H não apresentou diferença significativa nos animais nebulizados com MCh 50mg/mL, mas nos animais nebulizados com MCh 100mg/mL, o valor de 16,24±2,94 cmH₂O/mL elevou-se significativamente para 41,77±12,96 cmH₂O/mL (Fig. 10). η ampliou significativamente seu valor de 0,14±0,01 para 0,21±0,05 e 0,30±0,05 nas respectivas doses 50 e 100mg/mL (Fig. 11).

O grupo instilado com PPE 0,3U foi nebulizado com as doses 50 e 100mg/mL de MCh. R_{aw} aumentou significativamente seu valor de 0,31±0,04 cmH₂O.s/mL para 0,51±0,08 cmH₂O.s/mL quando nebulizados com MCh 50mg/mL, e os valores alteraram-se para 0,80±0,22 cmH₂O.s/mL quando nebulizados com MCh 100mg/mL (Fig. 8). G não apresentou diferença significativa nos camundongos nebulizados com MCh 50mg/mL, mas quando nebulizados com MCh 100mg/mL os valores de 2,23±0,50 cmH₂O/mL elevaram-se significativamente para 18,10±6,42 cmH₂O/mL (Fig. 9). H intensificou de modo significativo em ambas as concentrações de MCh, os valores de 16,49±2,00 cmH₂O/mL aumentaram para 27,32±11,49 cmH₂O/mL e 48,85±16,62 cmH₂O/mL nas respectivas doses (Fig. 10). η também mostrou aumento significativo de 0,15±0,03 para 0,32±0,07 quando nebulizados com MCh 50mg/mL e quando nebulizados com MCh 100mg/mL os valores foram para 0,41±0,09 (Fig. 11).

O grupo instilado com PPE 0,6U foi nebulizado com as mesmas doses de MCh. R_{aw} elevou significativamente o valor de 0,30±0,08 cmH₂O.s/mL para 0,64±0,17 cmH₂O.s/mL quando nebulizados com MCh 50mg/mL, e os valores alteraram-se para 1,04±0,23 cmH₂O.s/mL quando nebulizados com MCh 100mg/mL (Fig. 8). G apresentou crescente e significativa diferença dos valores de 2,23±0,61 cmH₂O/mL para 5,60±1,81 cmH₂O/mL quando os animais foram nebulizados com MCh 50mg/mL, e na dose de 100mg/mL os valores foram de 7,89±2,56 cmH₂O/mL (Fig. 9). H não apresentou diferença significativa quando nebulizados com MCh 50mg/mL, mas os valores iniciais de 11,50±1,07 cmH₂O/mL aumentaram significativamente para 21,39±7,55 cmH₂O/mL quando nebulizados com MCh 100mg/mL (Fig. 10). η elevou significativamente os valores de 0,17±0,04 para 0,29±0,06 e 0,45±0,11 nas respectivas doses (Fig. 11).

Comparando-se as doses nos diferentes grupos quando nebulizados com MCh 50mg/mL, nos parâmetros respiratórios foram observados que R_{aw} , G e H não apresentaram diferença significativa dentre os grupos. Já o parâmetro η aumentou significativamente nos animais instilados com PPE 0,3U (0,32 ±0,07) e 0,6U (0,29±0,06) quando comparado com o grupo controle (0,21±0,05) (Fig. 11). Na nebulização com MCh 100mg/mL, os valores de R_{aw} ,

mostraram-se significativamente menores no grupo instilado com PPE 0,3U ($0,80 \pm 0,22$ cmH₂O.s/mL) quando comparados com o grupo salina ($1,11 \pm 0,13$ cmH₂O.s/mL) (Fig. 8). G foi intensificada e significativamente diferente no grupo enfisema 0,3U ($18,10 \pm 6,42$ cmH₂O/mL) quando comparado ao grupo controle ($9,01 \pm 2,29$ cmH₂O/mL) (Fig. 9). H mostrou queda significativa no grupo instilado com PPE 0,6U ($21,39 \pm 7,55$ cmH₂O/mL) quando comparado ao grupo controle ($41,77 \pm 12,96$ cmH₂O/mL) (Fig. 10). η elevou-se significativamente no grupo 0,3U ($0,41 \pm 0,09$) e 0,6U ($0,45 \pm 0,11$) quando comparados ao grupo salina ($0,30 \pm 0,05$) (Fig. 11).

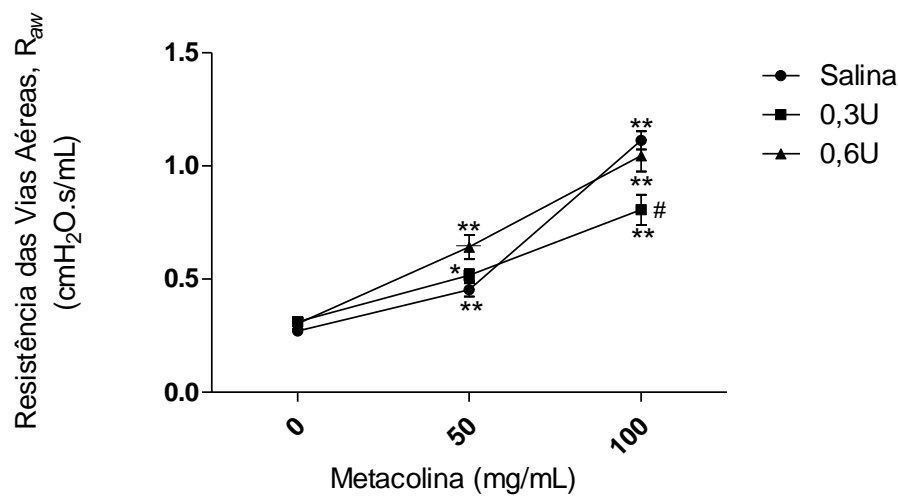


Figura 8 – Efeito na R_{aw} , resistência das vias aéreas, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina, PPE 0,3 e 0,6U. O * significa comparação estatística entre o mesmo grupo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$) e # significa comparação estatística dentre os diferentes grupos (# $p < 0,001$).

Fonte: Da autora.

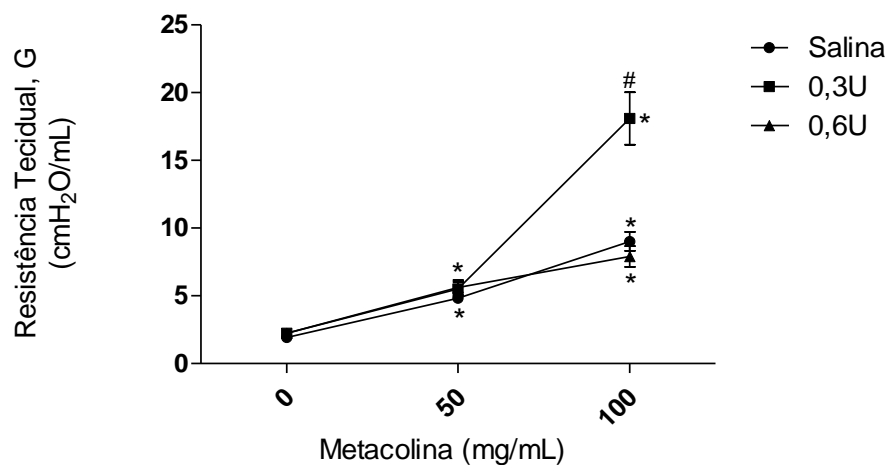


Figura 9 – Efeito na G, resistência tecidual, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina e PPE 0,3 e 0,6U. O * significa comparação estatística entre o mesmo grupo (* $p < 0,001$). # significa comparação estatística dentre os diferentes grupos (# $p < 0,001$).

Fonte: Da autora

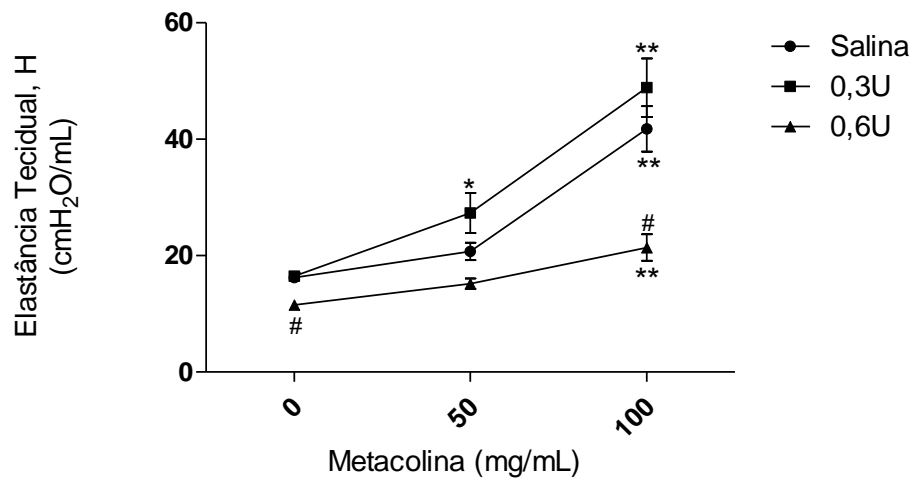


Figura 10 – Efeito na H, elastância tecidual, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina e PPE 0,3 e 0,6U. O * significa comparação estatística entre o mesmo grupo (* p<0,05; ** p<0,001). # significa comparação estatística dentre os diferentes grupos (# p< 0,001).

Fonte: Da autora.

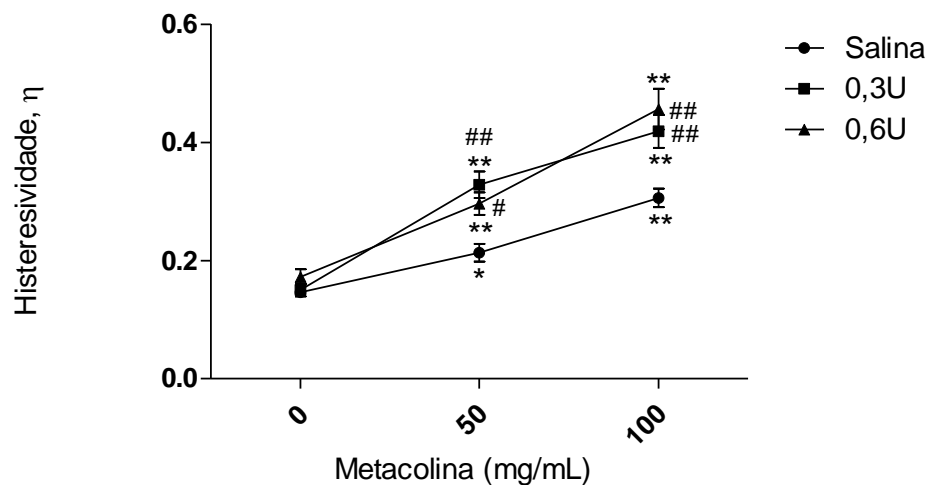


Figura 11– Efeito na η, histeresividade, após desafio com MCh 50 e 100mg/mL em camundongos instilados com salina e PPE 0,3 e 0,6U. O * significa comparação estatística entre o mesmo grupo (* p<0,05; ** p<0,001). # significa comparação estatística dentre os diferentes grupos (# p<0,05; ## p< 0,001).

Fonte: Da autora.

5.2 HISTOLOGIA PULMONAR

A análise do parênquima pulmonar por microscopia óptica evidenciou nos grupos tratados com PPE redução significativa de alveólos normais, de $86,5 \pm 0,9\%$ no grupo controle para $69,8 \pm 7,9\%$ no grupo 0,3U e $43,2 \pm 9,3\%$ no grupo 0,6U e aumento significativo de alveólos

hiperinsuflados de $2,5 \pm 0,15\%$ no grupo controle para $16,4 \pm 1,7\%$ nos animais instilados com PPE 0,3U e $19,2 \pm 1,7\%$ nos animais instilados com PPE 0,6U, com consequente aumento de alvéolos colapsados de $11,5 \pm 1\%$ para $26,4 \pm 3,2\%$ no grupo 0,6U. O Lm aumentou significativamente nos grupo 0,3U ($31,6 \pm 0,9$) e 0,6U ($31,8 \pm 2,4$) em relação ao grupo controle ($25,1 \pm 1,7$) (tabela 3). Os cortes histológicos dos pulmões que caracterizam as mudanças morfológicas estão representados na figura 12 (A, B, C).

Tabela 3. Histologia Pulmonar

Grupos	Salina	0,3U	0,6U
Normal (%)	$86,5 \pm 0,9$	$69,8 \pm 7,9^*$	$43,2 \pm 9,3^{**}$
Colapsado (%)	$11,5 \pm 1,0$	$11,2 \pm 1,4$	$26,4 \pm 3,2^*$
Hiperinsuflado (%)	$2,5 \pm 0,1$	$16,4 \pm 1,7^{**}$	$19,2 \pm 1,7^{**}$
Intercepto linear médio (Lm)	$25,1 \pm 1,7$	$31,6 \pm 0,9^*$	$31,8 \pm 2,4^*$

Valores representam a média \pm DP, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle. Todos os valores foram computados em 10 campos não coincidentes por animal (n=5).

Fonte: Da autora.

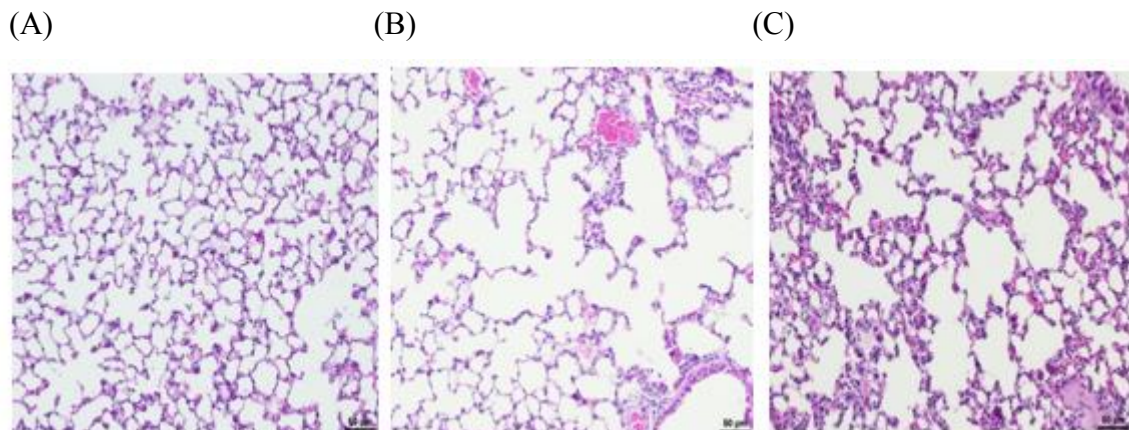


Figura 12 – Fotomicrografia representando o parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina (HE).

Magnificação original: $\times 200$. Barras = $50\mu\text{m}$.

A) Grupo controle instilado com salina;

B) Grupo enfisema induzido por PPE 0,3U;

C) Grupo enfisema induzido por PPE 0,6U.

Fonte: Da autora.

5.3 WESTERN BLOT

O padrão de expressão protéica de elastina e colágeno III foi investigado em amostras derivadas de pulmão de camundongos, os quais foram previamente instilados (20 dias antes da eutanásia) com salina ou PPE (0,3 e 0,6U). As figuras 13 e 15 mostram os resultados obtidos por *Western Blot*.

De acordo com a quantificação das bandas imunorreativas houve diminuição significativa de elastina nos animais tratados com elastase 0,6U ($0,75 \pm 0,06$) em relação aos animais que foram instilados apenas com salina ($1,00 \pm 0,09$) (Fig. 14).

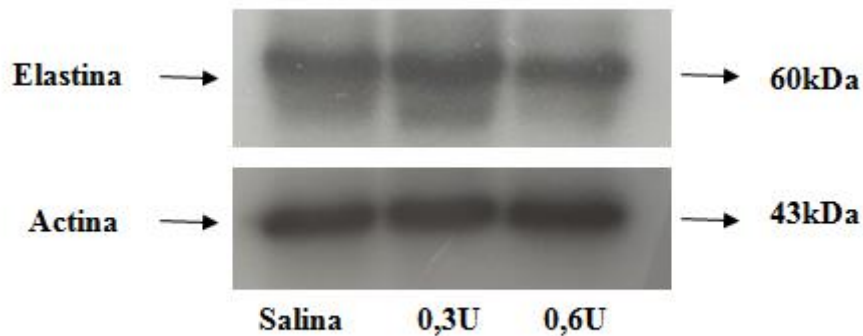


Figura 13– Perfil de expressão de elastina em tecido pulmonar. A actina foi utilizada como controle.
Fonte: Da autora.

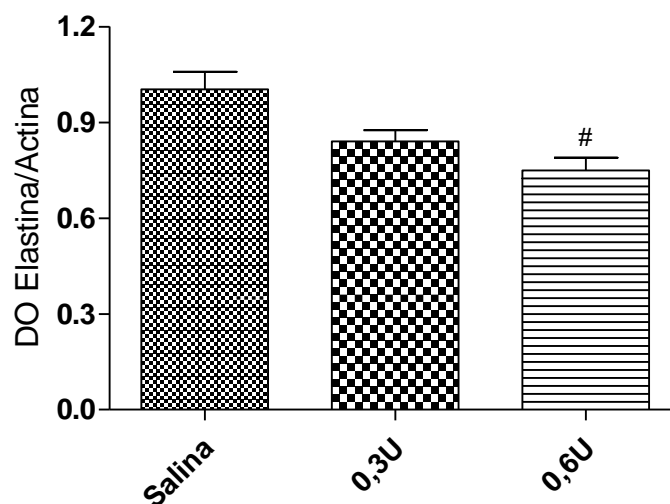


Figura 14 – Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunorreativas para elastina. A actina foi utilizada como controle. n=3 para cada grupo. # p<0,05.

Fonte: Da autora

Os dados obtidos por *Western Blot* também mostraram que houve aumento significativo na expressão de colágeno III nos animais tratados com elastase 0,3U ($0,53\pm 0,02$) e 0,6U ($0,91\pm 0,08$) quando comparado com o grupo controle ($0,10\pm 0,01$) (Fig. 16).

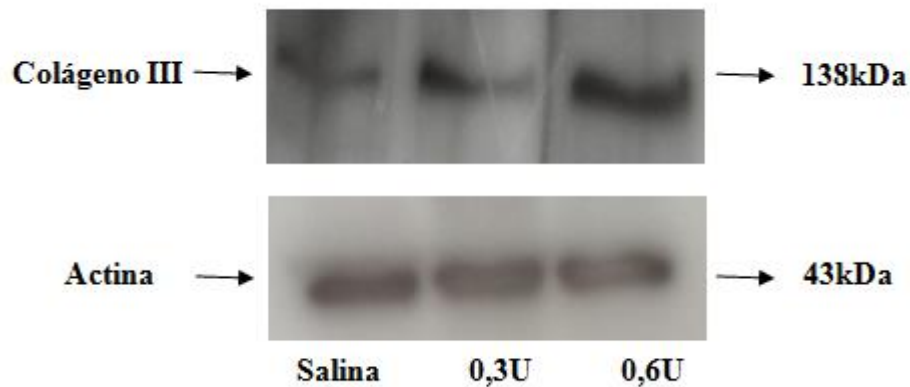


Figura 15 – Perfil de expressão de colágeno III em tecido pulmonar. A actina foi utilizada como controle.
Fonte: Da autora

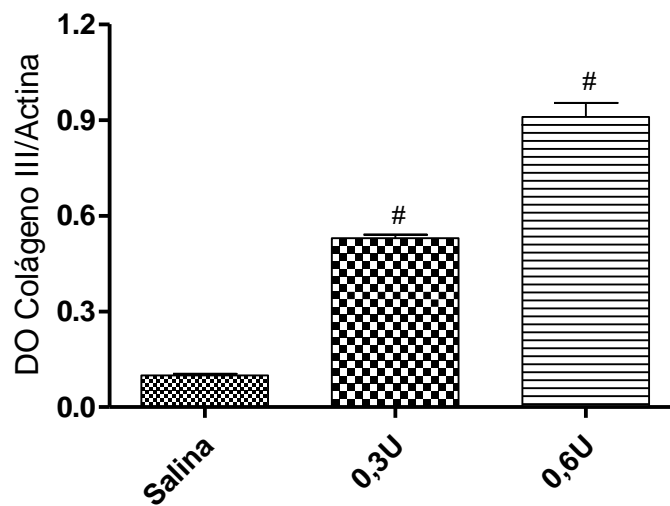


Figura 16 – Representação gráfica da densidade óptica (DO) obtida a partir das bandas imunorreativas para colágeno III. A actina foi utilizada como controle. n=3 para cada grupo. # p<0,001.
Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que, após 20 dias, a instilação de PPE acarretou alterações na mecânica respiratória. As medidas basais e após nebulização com salina mostram diminuição significativa da H nos animais com enfisema 0,6U. Após o desafio com MCh 100mg/mL, a G aumentou no grupo enfisema 0,3U; em contrapartida, a R_{aw} nos animais com enfisema 0,3U foi menor, assim como a H nos animais 0,6U. A histeresividade nos grupos enfisema 0,3 e 0,6U aumentou após o desafio com MCh em ambas concentrações (50 e 100mg/mL). Na análise morfológica, os grupos tratados com elastase aumentaram as áreas de colapso alveolar, hiperinsuflação e Lm com conseqüente redução da porcentagem de alvéolos normais. No *Western Blot*, os resultados mostram uma diminuição significativa da elastina no grupo enfisema 0,6U e uma aumento significativo do colágeno tipo III nos grupos instilados com PPE.

A experimentação animal é de importância incalculável nas pesquisas científicas contribuindo para o desenvolvimento da ciência e tecnologia (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Os animais são utilizados quando as experiências em humanos são impossíveis ou moralmente inconcebíveis (BRUSSELLE et al., 2006). O extenso conhecimento da biologia animal oferece uma enorme capacidade para explorar os sistemas biológicos sob condições fisiológicas e patológicas (PAIGEN, 1995). O modelo experimental é uma ferramenta fundamental para o estudo da fisiopatologia e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DPOC, porém tais modelos apresentam limitações, não conseguem reproduzir com exatidão a DPOC vista em humanos, pois existem diferenças na estrutura anatômica (WRIGTH; COSIO; CHURG, 2008). No sistema respiratório dos camundongos existem pequenas quantidades de glândulas submucosas, a parede torácica é diferente, o número de ramificações das vias aéreas é menor, e o tempo de vida e o desenvolvimento do enfisema nos camundongos são menores do que em humanos (HAMAKAWA et al., 2011; LÜTHJE et al., 2009; ITO et al., 2004; SLY et al., 2003).

O camundongo é uma ferramenta experimental muito utilizada, seu genoma é muito semelhante ao de humanos, cerca de 300 genes parecem ser únicos tanto para a espécie animal quanto para humanos (WATERSTON et al., 2002). O vasto conhecimento da anatomia, biologia e fisiologia além do custo relativamente baixo torna o camundongo uma excelente alternativa experimental (BRUSSELLE et al., 2006). Além disso, camundongos apresentam níveis menores de anti-proteases α -1 anti-tripsina que ratos, tendo maior predisposição ao

desenvolvimento do enfisema (IHRIG; KLEINERMAN; RYNBRANT, 1971).

O modelo experimental que mais se aproxima da DPOC em humanos é o modelo de tabagismo em cobaias. No entanto, este modelo requer meses de exposição dos animais à fumaça de cigarro e o grau de lesão tecidual obtido caracteriza um enfisema leve (CHURG; WRIGHT, 2007). Os modelos de enfisema são principalmente desenvolvidos em roedores. Atualmente os modelos mais utilizados para a indução do enfisema em animais são: modelos que utilizam proteases (papaína, PPE ou elastase neutrofílica), inalação de gases tóxicos (como fumaça de cigarro, dióxido de nitrogênio ou dióxido de enxofre) e utilização de animais modificados geneticamente, que desenvolvem espontaneamente a doença (MAHADEVA; SHAPIRO, 2002).

A instilação de substâncias proteolíticas por via traqueal ou inalatória é utilizada em modelos de animais para indução de enfisema pulmonar produzindo efeitos fisiopatológicos (SNIDER, 1992; SNIDER; LUCEY; STONE, 1986; KARLINSKI; SNIDER, 1978). A exposição pulmonar a estas enzimas provocam inflamação pulmonar aguda e sistêmica seguida de mudanças morfológicas, comprometimento da função pulmonar, e adaptações crônicas como caquexia, redução da endurance e fraqueza da musculatura respiratória que são semelhantes à doença em seres humanos (ANTUNES; ROCCO, 2011; HAMAKAWA et al., 2011; HANTOS et al., 2008; LUCEY et al., 2002; MAO et al., 2002; TEPPER et al., 2000; SNIDER, 1992; SNIDER; LUCEY; STONE, 1986; KARLINSKI; SNIDER, 1978; HAYES; KOTHY; SNIDER, 1975). As instilações de PPE reproduzem a maioria das características encontradas no enfisema causado por fumo, porém a lesão pulmonar é imediata e nesse aspecto difere do que é encontrado em humanos no qual o enfisema é uma doença crônica, progressiva e lenta (ANTUNES; ROCCO, 2011; HAMAKAWA et al., 2011; BRUSSELLE et al., 2006; ITO et al., 2004; SLY et al., 2003).

O protocolo experimental utilizado no nosso estudo foi baseado em estudos prévios. Otto-Verbene et al. (1992) utilizou a mesma linhagem de camundongos – Swiss e instilou PPE intratraqueal para indução do enfisema. Uma única administração da enzima proteolítica pode resultar rapidamente em características morfológicas e histológicas compatíveis com o enfisema panacinar (SNIDER, 1992; SNIDER; LUCEY; STONE, 1986;). Sawada et al., (2007) e Rangasamy et al., (2009), relataram em seus estudos que a severidade do enfisema induzido pela enzima está diretamente relacionada com a dose administrada. Diferentes estudos foram desenvolvidos utilizando doses distintas e tempos de administração distintos, mas o protocolo ideal é ainda desconhecido (ANTUNES; ROCCO, 2011).

A definição de enfisema está diretamente relacionada às medidas de função pulmonar,

dessa forma torna-se indispensável fazer estas medidas em modelos experimentais (MITZNER, 2007). A análise dos parâmetros da mecânica respiratória como, por exemplo: R_{aw} , G e H, têm sido utilizadas em muitos estudos para a caracterização do sistema respiratório, pois permite separar os componentes centrais e vias aéreas dos componentes de tecido periférico (PINTO, 2008). Como o enfisema pulmonar é uma doença que acomete predominantemente o parênquima pulmonar, a mensuração desses parâmetros com medidas precisas possibilita encontrar diferenças na mecânica respiratória e assim estabelecer relações fisiopatológicas. As propriedades mecânicas do pulmão são fatores determinantes para que sua função seja realizada com eficácia.

Os resultados da mecânica respiratória obtidos neste estudo mostraram que os valores considerados basais e após nebulização com salina não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle, 0,3 e 0,6U nos parâmetros R_{aw} , G e η . Os valores basais e após nebulização de salina da H apresentaram-se significativamente menores, mimetizando mudanças funcionais devido à redução expressiva do componente elástico. H pode indicar deterioração das propriedades elásticas e rigidez tecidual (HAMAKAWA et al., 2011; ITO et al., 2005). Nossos resultados são semelhantes aos de Biselli (2008), que trabalhou com camundongos C57/B16 expostos à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel relatando em seu estudo que o pulmão com destruição de parênquima e fibras elásticas apresenta redução da sua elastância, com conseqüente redução do fluxo expiratório para uma mesma condutância. Brewer et al. (2003) relataram que em ratos instilados com PPE via traqueal, houve semelhante diminuição de H quatro semanas após a instilação quando comparados com o grupo controle que recebeu solução salina, como observado no presente estudo.

A exposição à fumaça do cigarro é considerada um fator primário para desencadear resposta contrátil exacerbada no músculo liso das vias aéreas, pois os produtos químicos e poluentes gerados pela fumaça afetam diretamente a contratilidade (CHIBA et al., 2005). Vários são os mecanismos da HRB, os quais estão associados com a inflamação aguda e crônica e com o remodelamento das vias aéreas principalmente com o aumento da massa muscular das vias aéreas (MARTIN; DUGUET; EIDELMAN, 2000; BOULET et al., 1997; CHETTA et al., 1996). Alguns estudos relatam que na via aérea pode haver espessamento epitelial, formação de folículos linfóides e deposição de colágeno, que leva a redução do diâmetro interno e sua capacidade de distensão. Uma maior tendência à HRB pode ser devido à perda dos fatores que se opõem ao encurtamento do músculo liso (FREDBERG, 2001). Além do que a destruição da arquitetura pulmonar pode alterar a disposição normal das vias aéreas. Esses fatores podem contribuir para o aumento da resistência das vias aéreas. (BARNES, 2003).

A contração do músculo liso pode ocorrer através do acoplamento farmacomecânico. Esse mecanismo não envolve a alteração do potencial de membrana, podendo ocorrer através da ativação de um receptor de membrana em resposta a agentes farmacológicos agonista. A MCh, ACh e o CCh são exemplos clássicos desses agonistas no músculo liso das vias aéreas (SANDERSON; BERGNER, 2002). Na asma e DPOC esse tônus pode estar aumentado devido à elevação da expressão, sinalização molecular e quantidade exagerada de ACh neuronal, esses fatores são os mediadores essenciais para que ocorra a contração da musculatura lisa das vias aéreas (KOLAHIAN; REINOUD, 2012; GOSENS; ROSCIONI; DEKKERS, 2008). Sly et al. (1995) estudaram o papel do receptor muscarínico em cachorros e relataram que diferentes receptores podem estar envolvidos na constrição das vias aéreas e do parênquima pulmonar após a inalação de MCh. Os receptores M3 estão localizados no músculo liso das vias respiratórias e são os principais receptores ativados quando expostos a MCh, respondendo com constrição das vias aéreas, esses receptores podem ser facilmente ativados via intravenoso e aerossol (PETÁK et al., 1997).

Estudos anteriores demonstraram que animais expostos à fumaça do cigarro apresentam hiper-responsividade à MCh (XU et al., 1993). Inversamente nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da R_{aw} nos animais com enfisema induzido por PPE 0,3U, quando comparado com o grupo controle após o desafio com MCh 100mg/mL. O resultado do presente estudo sugere que a capacidade de resposta a MCh é atenuada no enfisema induzido por PPE, pois a distorção do parênquima pulmonar causado pelas áreas colapsadas e hiperinsufladas pode ocasionar perda da difusão do fármaco no sistema respiratório (BATES et al., 1994). A heterogeneidade pulmonar no enfisema pode levar a regiões que são mais ou menos sensíveis à MCh (NAGASE; MORETTO; LUDWING, 1994). A ação da MCh depende da barreira de difusão e as alterações no transporte difusivo deste agonista contribuem para alterações na responsividade brônquica. As paredes das vias aéreas podem desempenhar um importante papel na responsividade especialmente quando na doença pulmonar existe a presença do remodelamento. (BATES et al., 2012). Qualquer mudança no músculo liso das vias aéreas, no epitélio, na mucosa e no parênquima pulmonar pode alterar o processo de responsividade brônquica (LANÇAS et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2005). Além disso, a redução da massa muscular que foi encontrada em camundongos induzidos ao enfisema por uma única aspiração pela orofaringe de elastase (20U/100g) no estudo de Fermoselle et al. (2011) pode auxiliar na explicação deste achado, pois os músculos não poderiam reproduzir uma força consistente para uma broncoconstrição eficaz.

O fato do nosso resultado não ter apresentado nível significante na atenuação da R_{aw} no

grupo enfisema induzido por PPE 0,6U sugere que devido ao maior dano na estrutura alveolar por elevadas áreas de colapso e hiperinsuflação, ocorreu o aumento da heterogeneidade pulmonar que conseqüentemente levou a deteriorização dos receptores e contribuiu para dificuldade de difusão da droga.

A G é determinante das perdas energéticas geradas por atrito entre os constituintes do tecido pulmonar durante os movimentos da respiração. Em qualquer variação de volume o tecido pulmonar é deformado (BATES, 2009). No enfisema essas deformações atuam no parênquima pulmonar, deformando estruturas e causando prejuízo na ventilação. Nossos resultados mostraram que no grupo enfisema induzido por PPE 0,3U o parâmetro G aumentou após o desafio com MCh 100mg/mL quando comparado ao grupo controle. Este achado é compatível com os resultados de Lutchen et al. (1996), confirmando que a falta de homogeneidade do fluxo de ar devido à constrição heterogênea das vias aéreas periféricas pode contribuir para um aumento da G. A elevação de G pode ser explicada com base nas mudanças das propriedades intrínsecas do tecido, podendo ser atribuído ao aumento da heterogeneidade pulmonar (LUTCHEN et al. 1996; BATES et al., 1994; FREDBERG et al., 1993; HANTOS et al., 1992). 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 é composta por macromoléculas que são 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). A organização e a interação entre colágeno e elastina constituem importantes fatores que influenciam no comportamento mecânico pulmonar (YUAN; INGENITO; SUKI, 1997; MIJAILOVICH et al., 1994). Estudos anteriores sugerem que o conteúdo destas fibras influenciam diretamente a rigidez e viscosidade do parênquima pulmonar (FAFFE et al., 2006; FAFFE et al., 2002).

Peták et al. (1997), estudaram em ratos os efeitos da administração de MCh via intravenosa e aerossol, através de medidas de mecânica oscilatória e de acordo com o autor a inalação de concentrações crescentes de MCh causam elevações significativas dos parâmetros respiratórios. Os resultados destes animais revelaram que o padrão de alteração mecânica nas vias aéreas e no parênquima pulmonar depende do local de ação da MCh e está relacionado a sua forma de administração. A infusão intravenosa induziu somente broncoconstrição, enquanto que o aerossol foi capaz de induzir constrição de via aérea e de tecidos, causando conseqüentemente alterações na G. Este fenômeno, de acordo com os autores está diretamente relacionado à presença e atividade diferencial dos receptores muscarínicos M1 – localizados nas paredes alveolares. Os receptores M1, envolvidos nas respostas do parênquima são

alcançados sem obstáculos pela via inalatória. O parâmetro G, após aerossolização de MCh é influenciado pela falta de homogeneidade do tecido pulmonar.

A H reflete o caráter elástico do tecido pulmonar, os animais instilados com PPE 0,6U apresentaram diminuição da H após desafio com MCh 100mg/mL, sugerindo que as alterações intrínsecas do músculo liso e a perda da retração elástica do parênquima pulmonar, podem interferir diretamente na responsividade (RUBIN et al., 2002). Ito et al. (2005), demonstraram assim como em nosso estudo, que após 21 dias de instilação de PPE houve diminuição da elastância do tecido e aumento do intercepto linear médio. De acordo com Hogg (2004), a destruição alveolar identificada no enfisema é responsável pela redução da força de retração elástica e conseqüentemente do fluxo expiratório, resultando em um quadro progressivo de hiperinsuflação pulmonar. Segundo Fusco et al. (2002), esta perda de recuo elástico é determinada pelas fibras do parênquima pulmonar.

Outra característica importante diz respeito à razão $\eta = G/H$, também conhecida como histeresividade (FEITOSA, 2012). A histeresividade é a relação da energia dissipada a cada ciclo respiratório, com a energia acumulada (LUDWIG; DALLAIRE, 1994). Segundo Rocco et al. (2003), a modificação da rede das fibras de colágeno e de elastina pode ser o principal determinante para o aumento da histeresividade. No presente estudo os dados relacionados à histeresividade mostraram aumento significativo em ambos os grupos instilados com PPE após o desafio com MCh 50 e 100mg/mL, mostrando que a perda acumulada de energia é possivelmente devido às alterações da configuração pulmonar. A característica com maior repercussão de interpretação desse parâmetro do ponto de vista fisiológico, diz respeito ao aumento de η durante broncoconstrição (KACZKA et al., 1997). Isso tem demonstrado que η sempre cresce à medida que o pulmão se torna mecanicamente heterogêneo. Dessa forma, a histeresividade pode ser usada como um indicativo dessas heterogeneidades (BATES, 2009).

As características estruturais pulmonares do modelo murino de enfisema podem evidenciar a heterogeneidade e para isso utilizou-se no presente estudo a técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”) proposta por Weibel (1990). Os nossos resultados mostraram na análise morfológica que ambos os grupos tratados com PPE reduziram a porcentagem de alvéolos normais, aumentaram as áreas de hiperinsuflação e o Lm, e aumentou o colapso alveolar no grupo enfisema induzido por PPE 0,6U. A PPE causa alterações estruturais pulmonares, incluindo alargamento do espaço aéreo, destruição alveolar e simultâneo aumento do Lm (ANTUNES; ROCCO, 2011). O Lm é utilizado e considerado uma característica importante para determinar a gravidade da destruição tecidual (FUSCO et al., 2002; JOHANSON; PIERCE, 1972).

O pulmão é um órgão que constantemente é submetido a forças e suas propriedades mecânicas estão diretamente ligadas à composição do tecido conectivo que forma o parênquima pulmonar. Nessa composição o colágeno, a elastina e os proteoglicanos são macromoléculas com papel determinante nessas propriedades (SUKI et al., 2005).

Atualmente, o enfisema é caracterizado pela destruição da MEC presente nos septos alveolares que resulta no alargamento do espaço aéreo e redução na área de troca alvéolo-capilar (INOUE et al., 2010b). O desequilíbrio de protease-antiprotease induz lesão por sua ação proteolítica sobre diversas proteínas do tecido conectivo; alguns estudos apontam a elastina como principal alvo de destruição no enfisema, mas alterações fisiopatológicas também podem resultar de anormalidades na matriz de colágeno (ITO et al., 2005; LANG et al., 1994). A elastina é uma proteína hidrofóbica que se agrupa a filamentos e lâminas por ligações cruzadas sendo frequentemente apontada como responsável pela elasticidade pulmonar durante a respiração em volume corrente (SUKI et al., 2005). O presente estudo mostrou diminuição significativa da elastina nos animais instilados com PPE 0,6U. Esses resultados coincidem com o que diz Konov et al. (2001), que mostraram a deformação da rede de elastina depois de uma única instilação de PPE. Estudos bioquímicos do pulmão também mostram que após o tratamento com elastase há diminuição acentuada da elastina pulmonar nas primeiras 24 horas (IP; KLEINERMAN; SORENSEN, 1980; KUHN et al., 1976). Sabe-se que a perda do recolhimento elástico e a evidência histológica de danos das fibras elásticas implicam necessariamente em degradação de elastina como um fator chave na patogênese do enfisema (BARNES, 2004).

Lucey et al. (1998) em seu estudo com hamsters tratados com PPE, identificaram a presença de enfisema e diminuição do conteúdo de elastina no pulmão, porém os valores retornaram aos níveis normais 30 dias após a instilação. Este estudo caracterizou que até 30 dias após a instilação a expressão do mRNA da elastina está reduzida, ocasionando enfisema generalizado e grave. Snider et al. (1986) relataram que o conteúdo de elastina após a injúria pulmonar atinge níveis normais por volta dos 30 a 40 dias após a lesão. Mercer et al. (1992) também relataram em estudos morfométricos e ultraestruturais do tecido pulmonar que ocorre diminuição das fibras elásticas após uma semana de tratamento com elastase e que entre 4 a 12 semanas os níveis estão normais indicando reparação do tecido. No presente estudo, esses achados podem indicar que o tempo avaliado (20 dias) pode ter sido insuficiente para apresentar aumento nos níveis de elastina, sugerindo que a reparação tecidual da MEC ainda não ocorreu. Valentine et al. (1983) também relataram que após a administração intratraqueal de elastase, a expressão do gene da elastina induziu a síntese causando aumento nos níveis de elastina

pulmonar, cerca de 30% a mais no grupo controle após oito semanas da instilação. Outros estudos ultraestruturais detalhados do pulmão revelam a fragmentação de elastina e deposição abundante de colágeno em pulmões enfisematosos após instilação de elastase (TUDER; FLOOK; VOELKEL, 1995).

A presença de colágeno na MEC é essencial para a integridade estrutural e para a capacidade funcional pulmonar. O colágeno é encontrado em vias aéreas, vasos, pleura, membrana basal e na parede alveolar. Qualquer mudança na parede alveolar é possivelmente devido à mudança na composição de colágeno do tecido (LANG et al., 1994). O metabolismo do colágeno altera-se após lesão induzida pela PPE nos pulmões (SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003; GORDON; SNIDER, 2000). Em condições normais, as fibras colágenas são as principais responsáveis por manter a estrutura do parênquima pulmonar mesmo em volumes aumentados. Em contrapartida em condições patológicas como no enfisema pulmonar, está demonstrado que após a destruição, ocorrem nova síntese e deposição de colágeno, que são mais frágeis e apresentam menor estabilidade mecânica (SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003). A estabilidade do colágeno no pulmão normal requer equilíbrio entre síntese e degradação desta proteína. Em condições patológicas, como no enfisema, ocorre um desequilíbrio neste sistema que resulta em aumento da quantidade de colágeno no tecido da parede alveolar, embora ainda não seja esclarecido se é devido ao aumento da síntese ou à diminuição da degradação ou ambos (LANG et al., 1994). Em estudos prévios, modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por proteases observaram uma inicial perda, seguida posteriormente de um aumento dos níveis de colágeno (KUHN et al., 1976). Hamakawa et al. (2011) relataram que após o tratamento com elastase, a quantidade de colágeno do tipo I exibiu um pico no segundo dia após instilação, mas essas alterações não ocorreram com o colágeno do tipo III. O colágeno do tipo III diminuiu no segundo dia após instilação e posteriormente aumentou e retornou os mesmos valores do grupo controle no 21º dia.

O presente estudo apresentou aumento significativo do colágeno tipo III em ambos os grupos induzidos ao enfisema por PPE. Vlahovic et al. (1999) estudaram septos alveolares de tecido de humanos com enfisema pulmonar e identificaram o remodelamento na MEC com aumento de fibras elásticas e colágenas. Este achado também foi observado em modelos de enfisema em roedores (KONONOV et al., 2001). Ito et al. (2005) também encontraram aumento de colágeno no pulmão de animais expostos à PPE através da quantificação de hidroxiprolina no tecido pulmonar. Estes autores sugerem que o remodelamento de colágeno dentro dos pulmões é iniciado após a lesão elastolítica.

A progressão do enfisema não é apenas devido à degradação de elastina, mas também

ao conjunto de fatores que levam ao remodelamento do colágeno, culminando em fibrose das vias aéreas pequenas e disfunção pulmonar (LUCEY et al., 1998). Hoffman et al. (2010) demonstraram em ratos adultos que a qualidade da MEC influencia na capacidade de regeneração do pulmão. Assim, a degradação da elastina e a deposição de colágeno durante o remodelamento podem contribuir na progressão da doença e no comportamento funcional do pulmão (SUKI; LUTCHEN; INGENITO, 2003; WRIGHT; CHURG, 1995).

O presente estudo sugere que o grau de destruição do tecido pulmonar e o remodelamento apresentado pelo parênquima pulmonar após a indução do enfisema por PPE pode ter influência direta nas medidas da mecânica respiratória. Finlay et al. (1996) relataram que a ultraestrutura do colágeno no pulmão de indivíduos com enfisema revela fibras espessas e desorganizadas após o remodelamento. Brewer et al. (2003) sugerem que as paredes alveolares de ratos tratados com PPE sofrem remodelamento, e que as paredes alveolares e as fibras colágenas são provavelmente mais frágeis no enfisema como consequência do processo de degradação e remodelamento. Assim, o colágeno do parênquima corresponde a um importante componente da complacência pulmonar (SNIDER; SHERTER, 1977). Outros estudos têm relatado 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 fisiopatológicas (LAURENT, 1991).

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível reproduzir o enfisema pulmonar promovendo lesão, destruição alveolar e remodelamento tecidual utilizando o modelo de instilação intratraqueal de PPE 0,3 e 0,6U e concluiu-se que:

1- A medida da mecânica respiratória em camundongos induzidos ao enfisema por PPE foi capaz de detectar alterações fisiológicas na elastância tecidual do modelo de fase constante que foram posteriormente confirmadas pela morfometria. O modelo de enfisema induzido por PPE 0,3U promoveu atenuação da responsividade das vias aéreas após o uso de MCh 100 mg/mL, sugerindo que a relação entre as áreas em colapso e/ou hiperinsufladas aumentadas e a perda da integridade do epitélio pulmonar aumentam a heterogeneidade dos pulmões.

2- Ambos os grupos enfisema induzido por PPE apresentaram alterações morfológicas semelhantes ao encontradas no enfisema humano.

3- O conteúdo proteico de elastina foi reduzido no grupo enfisema induzido por PPE 0,6U e, inversamente, a quantidade de colágeno tipo III aumentou no parênquima pulmonar dos animais que receberam ambas as doses de PPE, indicando o processo de destruição e remodelamento dos componentes da MEC compatível com o enfisema pulmonar humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, B. G.; WALSH, M. P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **TIBS**, v. 19, p. 362-368, 1994.

ALMEIDA, A. P. B. Inflammation and chronic obstructive pulmonary disease. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 7, p. 57-76, 2001.

AMADORI, A. et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. **Nature Med**, v.1, n. 12 , p.1279-1283, 1995.

AMRANI, Y.; PANETTIERI, R. A. Airway smooth muscle: contraction and beyond. **The International Journal of Biochemistry & Biology**, v. 35, p. 272-276, 2003.

ANDRÉJAK, C. et al. Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of nontuberculous mycobacteriosis. **Thorax**. v. 68, n. 3, p. 256-262, 2013.

ANTUNES, M. A.; ROCCO, P. R. M. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. **An Acad Bras Cienc**. v. 83, n. 4, 2011.

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.

BAI, Y.; SANDERSON, M. J. Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca²⁺ oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP₃ receptor. **Respiratory Research**, v. 7, n. 1, p. 34-54, 2006.

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

BARNES, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 4, p. 515-548, 2004.

BARNES, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Rev Med**, v. 54, p. 113-129, 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.

BARTALESI, B. et al. Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. **Eur Respir J**, v. 25, p. 15-22, 2005.

BATES, J. H. T. et al. Airway responsiveness depends on the diffusion rate of methacholine across the airway wall. **J Appl Physiol**, v. 112, p. 1670-1677, 2012.

BATES, J. T. **Lung mechanics: An inverse modeling approach**. Cambridge: Cambridge, University Press, 2009. Cap. 1, p. 1-14.

BATES, J. H. T.; SUKI, B. Assessment of peripheral lung mechanics. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 163, p. 54-63, 2008.

BATES, J. H. T.; ALLEN, G.B. The estimation of lung mechanics parameters in the presence of pathology: a theoretical analysis. **Ann of Biom Eng**, v. 34, n. 3, p. 384-392, 2006.

BATES, J. H. T. et al. Temporal dynamics of pulmonary response to intravenous histamine in dogs: effects of dose and lung volume. **J Appl Physiol**, n. 76, p. 616-626, 1994.

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

BENTO, A. M.; HERSHENSON, M. B. Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. **Allergy Asthma Proc**, v. 19, p. 353-358, 1998.

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, 88f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BOOTMAN, M. D. et al. Calcium signalling-an overview. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 12, p. 3-10, 2001.

BOULET, L. P. et al. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. **Chest**, v. 112, p. 45-52, 1997.

BOUSQUET, J. et al. Prioritized research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. **Eur Respir**, v. 36, n. 5, p. 995–1001, 2010.

BOWLER, R.P.; CRAPO, J.D. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, p. S38–S43, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não Transmissíveis**, 2011-2022. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31877. Acesso em: 15 jul 2013.

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.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. S. In: BRUTON, L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010. Cap. 7, p. 165-181.

BROWN, L.M.; RANNELS, S.R.; RANNELS, D.E. Implications of post-pneumectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and disease. **Respir Res**, v. 2, p. 340-247, 2001.

BRUSSELLE, G.G. et al. Murine models of COPD. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, p. 155-165, 2006.

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

CAMPOS, R. **Efeitos da N-acetilcisteína na função pulmonary e renal em ratos com sepse sob ventilação mecânica invasiva**. 2011, 94f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CAZZOLA, M.; DONNER, C.F.; HANANIA, N.A.; One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Respiratory Medicine**, v. 101, p. 1049-1065, 2007.

CELLI, B.R. et al. Population impact of different definitions of airway obstruction. **Eur Respir J**, v. 22, p. 268-273, 2003.

CHEN, Y. et al. Involvement of endogenous hydrogen sulfide in cigarette smoke-induced changes in airway responsiveness and inflammation of rat lung. **Citokine**, v. 53, p. 334-341, 2011.

CHEN, B. et al. Tidal breathing pattern differentially antagonizes bronchoconstriction in C57BL/6J vs. A/J mice. **J Appl Physiol**, v. 101, p. 249-255, 2006.

CHETTA, A. et al. Bronchial responsiveness to distilled water and methacholine and its relationship to inflammation and remodeling of the airways in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, p. 910-917, 1996.

CHIBA, Y. et al. Effect of cigarette smoke exposure in vivo on bronchial smooth muscle contractility in vitro in rats. **Amer Jour of Resp Cell and Mol Bio**, v. 33 p. 574-581, 2005.

CHINN, S. Methodology of bronchial responsiveness. **Thorax**, v. 53, p. 984-988, 1998.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Ver Ciênc Farm Básica Apl**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

CHURG, A.; WRIGHT, J. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. **Contrib Microbiol**, v. 14, p. 113-125, 2007.

COLEBATCH, H.J.; FINUCANE, K.E.; SMITH, M.M. Pulmonary conductance and elastic recoil relationships in asthma and emphysema. **J Appl Physiol**, v. 34, n. 2, p. 143-153, 1973.

COSIO, M. et al. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. **N Engl J Med**, v. 298, n. 23, p. 1277-1281, 1978.

COULSON, F. R.; FRYER, A. D. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. **Pharmacol Ther**, v. 98, n. 1, p. 59 – 69, 2003.

DALLEGRI, F. O. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflamm Res**, v. 46, n. 10, p. 382-391, 1997.

DEMEDTS, I.K. et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. **Respir Research**, v. 7, p. 53-59, 2006.

DUNNILL, M. S. Evaluation of a Simple Method of Sampling the Lung for Quantitative Histological Analysis. **Thorax**, v. 19, p. 443-448, 1964.

FAFFE, D. S.; ZIN, W. A. Lung parenchymal mechanics in health and disease. *Physiol. Rev.* v. 89, p. 759-775, 2009.

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

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.

FEITOSA, E. K. **Efeito do 1,8 – cineol nos parâmetros de contratilidade do músculo liso traqueal e de mecânica do sistema respiratório de ratos expostos a fumaça do cigarro.** 2012, 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

FELICIO, C.H.C.; PARRA, E.R.; CAPELLOZZI, V.L. Idiopathic and collagen vascular disease nonspecific interstitial pneumonia: clinical significance of remodeling process. **Lung**, v. 1, p. 39-46, 2007.

FERMOSELLE, C.; SANCHEZ, F. BARREIRO, E. Reduction of muscle mass mediated by myostatin in an experimental model of pulmonary emphysema. **Arch Bronconeumol**. v. 47, n. 12, p. 590-598, 2011.

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.

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.

FREDBERG, J. J. Airway obstruction in asthma: does the response to a deep inspiration matter? **Respir Res**, v. 2, p. 273-275, 2001.

FREDBERG, J. J. et al. Tissue resistance and the contractile state of the lung parenchyma. **J. Appl. Physiol**, v. 74, p. 1387–1397, 1993.

FRYER, A. D.; JACOBY, D. B. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, p. 154-60, 1998.

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

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.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev**. v. 55, n. 12, p. 1531-1546, 2003.

GOLD 2011 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Executive Summary: global strategy the diagnosis, management and prevention of COPD. Disponível em: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf. Acesso: 15 jul 2013.

GORDON, L.; SNIDER, M. D. 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.

GOSENS, R.; ROSCIONI, S. S.; DEKKERS, B. G. J.; et al. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 385-397, 2008.

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

GROSS, P. et al. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Arch Environ Health**, v. 11, p. 50–58, 1965.

GOMES, R. F. M. et al. Comparative respiratory system mechanics in rodents. **J Appl Physiol**, v. 89, p. 908-916, 2000.

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. 974-980, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997.

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

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.

HANTOS, Z. et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **J Appl Physiol**, v. 72, p. 168-178, 1992.

HAMAKAWA, H. et al. Structure-function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 45, p. 517-524, 2011.

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.

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.

HEARD, B. E. **Pathology of chronic bronchitis and emphysema**. London: Churchill, p. 65-66, 1969.

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

HIZUME, D. C. **Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a inflamação, responsividade e remodelamento pulmonares em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica**. 2010, 84f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

HOFFMAN, A. M. et al. Matrix modulation of compensatory lung regrowth and progenitor cell proliferation in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 298, p. L158- L168, 2010.

HOGG, J. Peripheral lung remodelling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**. v. 24, p. 893-894, 2004.

HOGG, J. C.; SENIOR, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease part 2: pathology and biochemistry of emphysema. **Thorax**, v. 57, n. 9, p. 830-834, 2002.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 967- 992, 1996.

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

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.

_____. Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: Effects of ambient existing particulate matters. **Int Immunopharmacol**, v. 10, p. 1380-1389, 2010b.

IP, M. P C.; KLEINERMAN, J.; SORENSEN, J. The effect of elastase on pulmonary elastin and collagen: comparison of intravenous and intratracheal exposure. **Exp. Lung Res**, v. 1, p. 181-189, 1980.

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

ITO, S. et al. Tissue heterogeneity in the mouse lung: effects of elastase treatment. **J Appl Physiol**, v. 97, p. 204–212, 2004.

JAMES, A. Airway remodeling in asthma. **Curr Opin Pulm Med**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2005.

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

JANOFF A, et al. Lung injury induced by leukocytic proteases. **Am J Pathol**, v. 97, p. 111–136, 1979.

JOHANSON JR., W. G.; PIERCE, A.K. Effects of elastase, collagenase, and papain on structure and function of rat lungs in vitro. **J Clin Invest**, v. 51, p. 288-293, 1972.

JOHNSON, P. R. et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, n. 3, p. 474-477, 2001

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.

JUDE, J. A. et al. Calcium signaling in airway smooth muscle. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, p. 15-22. 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KACZKA, D.W. et al. Partitioning airway and lung tissue resistances in humans: effects to bronchoconstriction. **J Appl Physiol**, v. 82, p. 1531-1541, 1997.

KALLENBERG, C.G. et al. The TH. Expression of class II major histocompatibility complex antigens on alveolar epithelium in interstitial lung disease: relevance to pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. **J Clin Pathol**, v. 40, p. 725- 733, 1987.

KARLINSKY, J.B.; SNIDER, G.L. Animal models of emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 117, p. 1109-1113, 1978.

KASAHARA, Y. 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.

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

KASPER, M.; HAROSKE, G. Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. **Histol Histopathol**, v. 11, p. 463-483, 1996.

KAWANAMI, O.; FERRANS, V. J.; CRYSTAL, R. G. Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. **Lab Invest**, v. 46, p. 39-53, 1982.

KELLER, C. A. Pathophysiology and classification of emphysema. **Chest Surg Clin N Am**, v. 13, p. 589-613, 2003.

KEMP, S. V.; POLKEY, M. I.; SHAH, P. L. The epidemiology, etiology, clinical features, and natural history of emphysema. **Thorac Surg Clin**, v. 19, p. 149-158, 2009.

KHARITONOV, S.A.; BARNES, P.J. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. **Biomarkers**, v. 7, p. 1-32, 2002.

KIELTY, C. M. et al. Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. **J Muscle Res Cell Motil**. v. 23, p. 581-596, 2002.

KIM, W. K. et al. Centrilobular and panlobular in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. **Am Rev Resp Dis**, v. 144, p. 1385-1390, 1991.

KOLAHIAN, S.; REINOUD, G. Cholinergic Regulation of Airway Inflammation and Remodelling. **J Allergy**, v. 1, p. 9, 2012.

KONOV, S. et al. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, p. 1920-1926, 2001.

KOSTIKAS, K. et al. Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. **Chest**, v. 124, p. 1373-1380, 2003.

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

LANÇAS, T. et al. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. **J Appl Physiol**, v. 100, n. 5, p. 1610-1616, 2006.

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 γ -globulin pattern of serum α -antitrypsin deficiency. **J Clin Lab Invest**, v. 15, p. 132-40, 1963.

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

LEE, S. H. et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. **Nat Med**, v. 13, n. 5, p. 567-569, 2007.

LIEBERMAN, J. Elastase collagenase emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. **Chest**; 70: 62-7; 1976.

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

LUCEY, E. C. et al. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters: results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, p. 555-564, 1998.

LUDWIG, M. S.; DALLAIRE, M. J. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. **J Appl Physiol**, v. 77, n. 4, p. 2029-2035, 1994.

LUTCHEN, K. R. et al. Airway inhomogeneities contribute to apparent lung tissue mechanics during constriction. **J. Appl. Physio**, v. 80, p. 1841-1849, 1996.

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

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.

MAGALHÃES, S. M. et al. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 35, n. 5, p. 602-611, 2005.

MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S.D. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. **Thorax**, v. 57, p. 908-914, 2002.

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. A. COPD: Epidemiology, Prevalence, Morbidity, Mortality, and disease heterogeneity. **Chest**, v. 121, p. 121-126, 2002.

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.

MARIANI, T. J. et al., Increased elastin production in experimental granulomatous lung disease. *Am. J. Pathol.* v. 147, p. 988-1000, 1995.

MARTIN, J. G.; DUGUET, A.; EIDELMAN, D. H. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. ***Eur Resp J***, v. 16, p. 349-354, 2000.

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.

MERCER, R. R.; CRAPO, J.D. Structural changes in elastic fibers after pancreatic elastase administration in hamsters. ***J. Appl. Physiol.*** v. 72, p. 1473-1479, 1992.

MERCER, R. R.; CRAPO, J.D. Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs. ***J Appl Physiol***, v. 69, p. 756-765, 1990.

MEURS, H. et al. A new perspective on muscarinic receptor antagonism in obstructive airways diseases. ***Curr Op Pharmacol***, v. 13, p. 316-323, 2013.

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.

MITZNER, W. Counterpoint: Lung Impedance measurements are not more useful than simpler measurements of lung function in animal of pulmonary diseases. ***J Appl Physiol.*** v. 103, n. 5, p. 1901-1903, 2007.

MORIYA, H. T. Contribuições não-lineares e aproximação no domínio do tempo do modelo de fase constant na mecânica respiratória em camundongos. 2003, 112f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MORIYA, H. T.; MORAES, J. C. T. B.; BATES, J. H. T. Nonlinear and frequency - dependent mechanical behavior of the mouse respiratory system. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 31, p. 318-326, 2003.

MYERS, J. R. et al. Clinical applicability of a methacholine inhalation challenge. ***JAMA***, v. 246, p. 225-229, 1981.

- NAGASE, T., MORETTO, A., LUDWIG, M. S. Airway and tissue behavior during induced constriction in rats: intravenous vs. aerosol administration. **J. Appl. Physiol**, v. 76, p. 830–838, 1994.
- NAKAMURA, Y. et al. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 151, p. 1497-1503, 1995.
- NUCCI, G.; COBELLI, C. Mathematical models of respiratory mechanics. In: Carson, E.; COBELLI, C. (Ed.) **Modelling methodology for physiology and medicine**. London: Academic Press, 2001. P. 279-304.
- 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.
- OTTO-VERBENE, C. J. M. et al. Protective effect of pulmonary surfactant on elastase-induced emphysema in mice. **Eur Respir J**, v. 5, p. 1223-1230, 1992.
- PAIGEN, K. A miracle enough: the power of mice. **Nat Med**, v. 1, p. 215–220, 1995.
- PANIAGUA, R. et al. Elastic fibres of the human ductus deferens. **J Anat**, v. 137, n. 3, p. 467-476, 1983.
- PARAMESWARAN, K. et al. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. **Cell Biochem Biophys**, v. 44, n.1, p. 139-146, 2006.
- PAREDI, P.; KHARITONOV, S. S.; BARNES, P. J. Analysis of expired air for oxidation products. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, p. S31-S37, 2002.
- PAUWELS, P. R. A.; RABE, K. F. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **The Lancet**, v. 364, p. 613–620, 2004.
- 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. 1256-1276, 2001.

PELLEGRINO, R. et al. Assessing the effect of deep inhalation on airway caliber: a novel approach to lung function in bronchial asthma and COPD. **Eur Respir J**, v. 12, p. 1219-1227, 1998.

PENMAN, R. W.; O'NEILL, R. P.; BEGLEY, L. The progress of chronic airway obstruction in relation to measurements of airway resistance and lung elastic recoil. **Am Rev Respir Dis**, v. 101, n. 4, p. 536-544, 1970.

PETÁK, F. et al. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **J Appl Physiol**, v. 82, p. 1479-1487, 1997.

PINTO, T. S. **Avaliação de diferentes métodos para o estudo da mecânica respiratória em um modelo murino de enfisema pulmonar**. 2008, 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PRYOR, W. A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. **Ann N Y Acad Sci**, v. 686, p. 12–27, 1993.

RABE, K. F. et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, n. 6, p. 532-555, 2007.

RANGASAMY, T. et al Cigarette smoke induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 296, p. L888–L900, 2009.

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. 339-340, 2001.

ROCCO, P. R. et al. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 168, p. 677–684, 2003.

ROFFEL, A. F. et al. Muscarinic M2 receptors in bovine tracheal smooth muscle: discrepancies between binding and function. **Eur J Pharmacol**, v. 153, p. 73-82, 1988.

- ROZIN, G. F. et al. Collagen and elastic system in the remodelling process of major types of idiopathic interstitial pneumonias (IIP). **Histopathology**, v. 46, p. 413-124, 2005.
- RUBIN, A. S. et al. Hiperresponsividade brônquica. **J Pneumol**, v. 28, p. S101-121, 2002.
- RUFINO, R.; COSTA, C. H. Etiopatogenia da DPOC. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 5, p. 9-14, 2013
- RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 241-248, 2006.
- RYAN, G. et al. Standardization of inhalation provocation tests: two techniques of aerosol generation and inhalation compared. **Am Rev Respir Dis**, v. 123, p. 195-199, 1981.
- SAETTA, M. et al. CD8+vê cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, p. 711-717, 1999.
- 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. 822-826, 1998.
- SANDERSON, J. M.; BERGNER, A. Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. **J. Gen. Physiol.** v. 119, p. 187-198, 2002.
- SAWADA, M. et al. The Fas/Fasligand pathway does not mediate the apoptosis in elastase induced emphysema in mice. **Exp Lung Res**, v. 33, p. 277-288, 2007.
- SHALABY, K. H. et al. Combined forced oscillation and forced expiration measurements in mice for the assessment of airway hyperresponsiveness. **Respiratory Research**, v. 11, p. 82, 2010.
- 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.
- SHAPIRO, S. D. 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.
- SHUESSLER, T. F.; BATES, J. H. T. A computer-controlled research ventilator for a small animals: design and evaluation. **IEE Trans Biomed Eng**, v. 42, p. 860-866, 1995.

SLAUSON, D. O.; HAHN, E. F. Criteria for development of animal models of diseases of respiratory system: The comparative approach in respiratory disease model development. **Am J Pathol**, v. 101, p. S103-S122, 1980.

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

SLY, P. D. et al. Pirenzepine blunts the pulmonary parenchymal response to inhaled methacholine. **Pulm. Pharmacol**, v. 8, p. 123-129, 1995.

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. 244-246, 2000.

SNIDER, G. L. Emphysema: the first two centuries and beyond. A historical overview, with suggestions for future research. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, p. 1615-1622, 1992.

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.; 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.

STERK, P. J. Bronchial hyperresponsiveness: definition and terminology. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 7, p. 7-9, 1996.

STERK, P. J. Bronchial hyperresponsiveness today. **Resp Med**, v. 87, p. 27-29, 1993.

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.

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.

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.

TAM, A.; SIN, D. Pathobiologic Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Med Clin N Am**, v. 96, n. 4, p. 681–698, 2012.

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.

THOMAS, A. Wynn common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 524-529, 2007.

TOZZI, C. A. et al. Excess collagen in hypertensive pulmonary arteries decreases vascular distensibility. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 149, p. 1317-1326, 1994.

TUDER, R. M.; FLOOK, B. E.; VOELKEL, N. F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. **J Clin Invest**, v. 95, n. 4, p. 1798–807, 1995.

VALENTINE, R. et al. Morphological and biochemical features of elastase-induced emphysema in strain A/J mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 68, p. 451–461, 1983.

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.

VOSWINCKEL, R. et al. Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. **Eur Respir J**, v. 24, p. 524-532, 2004.

XU, L. J. et al. Airway hyperresponsiveness in cigarette smoke-exposed rats. **Lung**, v. 171, p. 95–107, 1993.

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.

WATERSTON, R. H. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, p. 520–62, 2002.

WATSON, P. B. et al. Evaluation of a self-management plan for chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Resp J**, v. 10, n. 6, p. 1267-1271, 1997.

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

WEST, J. B. **Fisiologia Respiratória**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. 232p.

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.

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.

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.