

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

SILVIANE FERNANDES DA SILVA FIGUEIRÔA

**DIMORFISMO SEXUAL NO MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA
PULMONAR INDUZIDO POR PAPAÍNA EM CAMUNDONGOS**

**Rio de Janeiro
Agosto de 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



SILVIANE FERNANDES DA SILVA FIGUEIRÔA

**DIMORFISMO SEXUAL NO MODELO EXPERIMENTAL DE
ENFISEMA PULMONAR INDUZIDO POR PAPAÍNA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

DIMORFISMO SEXUAL NO MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR INDUZIDO POR PAPAÍNA EM CAMUNDONGOS

SILVIANE FERNANDES DA SILVA FIGUEIRÔA

ORIENTADOR: WALTER ARAUJO ZIN.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

APROVADA POR:

Prof^a. VIVIAN MARY BARRAL DOOD RUMJANEK
Prof^a Titular – UFRJ

Prof^a. VÂNIA MARIA CORRÊA DA COSTA
Prof^a Adjunta - UFRJ

Prof^o. MARCELO EINICKER LAMAS
Prof^o Adjunto - UFRJ

Prof^a. DENISE PIRES DE CARVALHO
Prof^a Associada – UFRJ - Revisora

Prof^a. JENNIFER LOWE

Prof^a Adjunta – UFRJ - Suplente externa

Figueirôa, Silviane Fernandes da Silva

Dimorfismo sexual no modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína em camundongos / Silviane Fernandes da Silva Figueirôa. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2009.

xvi, 143 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Walter Araujo Zin.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), 2009.

Referências bibliográficas: f. 106-126.

1. ENFISEMA PULMONAR - INDUZIDO QUIMICAMENTE. 2. ENFISEMA PULMONAR - FISIOPATOLOGIA. 3. PAPAÍNA - EFEITOS DE DROGAS. 4. PAPAÍNA - ADMINISTRAÇÃO E DOSAGEM. 5. CARACTERES SEXUAIS. 6. PULMÃO - ANATOMIA E HISTOLOGIA. 7. ESTRESSE OXIDATIVO - EFEITOS DE DROGAS. 8. MECÂNICA RESPIRATÓRIA - EFEITOS DE DROGAS. 9. PESO CORPORAL. 10. MODELOS ANIMAIS. 11. ANIMAIS. 12. MASCULINO. 13. FEMININO. 14. ADULTO. 15. FISIOLOGIA – TESE. I. ZIN, WALTER ARAUJO. II. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, IBCCF, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. III. TÍTULO.

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisa da UFRJ (CEPG-UFRJ), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Carlos Alberto Caetano Azeredo,
grande mestre e amigo,
dedico esta dissertação em agradecimento
ao seu incentivo e reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao sair da casa dos meus pais em Juiz de Fora- MG em busca do sonho de ingressar no Mestrado desta renomada universidade, tinha consciência dos desafios que enfrentaria. A possibilidade de ampliar o meu conhecimento e de contribuir para o avanço das pesquisas em prol da saúde humana, motivaram-me.

Ao longo desta trajetória, muitas pessoas contribuíram diretamente para este trabalho, ou indiretamente ajudaram-me a acreditar que seria possível.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e da perseverança.

Agradeço à minha família: Meu pai Luiz Gonzaga, pelo incentivo, minha mãe Olímpia pela esperança e palavras de encorajamento, meus irmãos Carlos Eduardo e Luiz Henrique pela confiança e pelo companheirismo.

Ao meu esposo, Felipe Figueirôa, pelo amor e compreensão e toda a sua família pelo apoio e carinho, sem vocês não teria sido possível!

Ao Professor Walter Araujo Zin, a quem muito admiro, agradeço a oportunidade de estar concluindo este trabalho.

À Professora Débora Souza Faffe, pela sua grande contribuição nos momentos mais importantes.

À Professora Denise Carvalho pela paciência e dedicação na revisão desta dissertação de mestrado.

Ao Professor Samuel Valença e aos alunos Akinori, Alan e Frank pela importante colaboração..

Aos Professores Marcelo Lamas, Vânia Corrêa e Vivian Rumjanek por terem aceitado participar desta fase final como membros da banca examinadora.

A Doutora Flávia Coelho pelos ensaios realizados com a papaína no Laboratório de proteases.

Um agradecimento muito especial à competente aluna de doutorado Flávia Mazzoli pela dedicação, organização e disciplina com que conduziu ao meu lado este trabalho. Obrigada pela amizade e pelos conselhos. Você já sabe o caminho, o seu sucesso é certo!

Às integrantes deste grupo de pesquisa: Renatinha e Julyana pela participação inicial neste projeto.

Um grande beijo à todos os meus amigos do LFR: Giovanna e João, pessoas de grande coração, obrigada pelas conversas amigas e pelo carinho nos momentos difíceis.

À Clarissa, ao Douglas Riva e ao Douglas Fonseca pelos ensinamentos, aprendi muito com a determinação e a coragem de vocês.

Às Doutoradas Viviane Cagido, Halina Cidrini, Flávia Brandão e Lílian Nagatto pelo exemplo de disciplina e perseverança.

Às *Cats* Mariana Ávila, Aline, Mariana Machado, Natália e Gabriela pela alegria e jovialidade no dia-a-dia do laboratório.

À todas essas pessoas incríveis que estiveram ao meu lado ao longo desses 3 anos e meio, o meu muito obrigada, especialmente por terem contribuído não somente para a conclusão desta etapa, mas para a pessoa que sou hoje.

“ Os obstáculos jamais terão o tamanho dos nossos sonhos”.

RESUMO

FIGUEIRÔA, Silviane Fernandes da Silva. **Dimorfismo sexual no modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína em camundongos.** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Introdução: Características típicas da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) podem ser induzidas pela administração exógena de proteases, como a papaína. Apesar da vasta descrição dos aspectos celulares e moleculares envolvidos, muito ainda precisa ser explorado em relação ao comportamento funcional dos animais nesses modelos. O presente trabalho objetiva estudar as alterações da mecânica pulmonar, da histologia e o estresse oxidativo decorrentes da exposição à papaína.

Materiais e Métodos: Trinta camundongos BALB/c machos e fêmeas (20-25 g) adultos jovens foram aleatoriamente divididos em quatro grupos. Realizou-se uma instilação intratraqueal semanal, durante 2 semanas, de 50 μ L de NaCl a 0,9 % grupos salina macho (SALM) e salina fêmea (SALF), ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L grupos papaína macho (PAPM) e papaína fêmea (PAPF). Os animais foram pesados semanalmente e duas semanas após a última instilação, os animais foram sedados, anestesiados e paralisados. Os parâmetros da mecânica pulmonar [pressões resistiva (ΔP_1), viscoelástica (ΔP_2) e total (ΔP_{tot}), elastância estática (Est) e componente elástico da viscoelasticidade (ΔE)] foram aferidos pelo método de oclusão ao final da inspiração. Os pulmões foram preparados para histologia e foram realizados ensaios bioquímicos para a avaliação do estresse oxidativo.

Conclusões: A exposição pulmonar à papaína provocou alterações funcionais mais acentuadas em machos, com aumento dos componentes elástico, resistivo e viscoelástico da mecânica pulmonar. Enquanto que as fêmeas apresentaram apenas aumento de componente elástico e resistivo. Houve aumento de celularidade no parênquima pulmonar, caracterizado por influxo de células polimorfonucleares. A redução do número de fibras colágenas e elásticas corroboram o perfil de lesão grave desenvolvido nos modelos de protease, no período de 14 dias pós-estímulo. Foi observado aumento da capacidade residual funcional (CRF) e do diâmetro alveolar médio (L_m) em ambos os gêneros. Em relação à variação do peso corporal, os animais lesados apresentaram menor ganho de peso corporal ao longo das semanas. Foi observada depleção da enzima antioxidante catalase no pulmão. Isto sugere um mecanismo de defesa pulmonar contra as ERO. As fêmeas apresentaram adicionalmente, maior TBARS e menor relação GSH-GSSG quando comparadas aos machos lesados. Os resultados do grupo PAPM são compatíveis com lesões pulmonares mais graves e já estabelecidas.

Palavras –chave: Enfisema Pulmonar, Papaína, Modelo Experimental; Camundongo; Mecânica Pulmonar; Elastância; Histologia; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

FIGUEIRÔA, Silviane Fernandes da Silva. **Sexual Dimorphism in Papain Induced-Pulmonary Emphysema Experimental Model in Mice.** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) typical features may be induced by exogenous administration proteases such as papain. Despite the extensive description of the cellular and molecular aspects involved, much remains to be explored in relation to the functional performance of animals in these models. Our aims are to study the changes in lung mechanics, histology and oxidative stress in papain exposed female and male mice.

Materials and methods: Thirty Balb/c male and female (20-25 g) were randomly divided into four groups. The animals received 50 μL of saline (groups SALF and SALM), or 0.2 U/ μL of papain, diluted in 50 μL of saline (groups PAPM and PAPF) intratracheal, once a week, for 2 weeks. The animals were weighed once a week and two weeks after the last intratracheal instillation, the animals were sedated, anesthetized and paralyzed. The parameters of lung mechanics [resistive (ΔP_1), viscoelastic (ΔP_2) and total pressures (ΔP_{tot}), static elastance (Est) and elastic component of viscoelasticity (ΔE)] were measured by the method of occlusion at the end of inspiration. The lungs were prepared for histology and biochemical tests were performed for evaluation of oxidative stress.

Conclusions: Papain exposure caused pulmonary functional changes more pronounced in males, with an increase of elastic, resistive and viscoelastic components of pulmonary mechanics, while females showed only an increase in elastic and resistive components. Increased cellularity of lung parenchyma was characterized by influx of polymorphonuclear cells. The reduction of collagen fibers and elastic supports the profile of serious injury protease models within 14 days post-stimulus. Increase of functional residual capacity (FRC) and mean alveolar diameter (L_m) were observed in both genders. Male and female mice exposed to papain had lower body weight gain. Changes of antioxidant enzymes were observed, suggesting a mechanism for pulmonary defense against ROS. The results of PAPM group are consistent with more severe lung injuries and already established.

Keywords: Pulmonary emphysema, Papain, Lung Mechanics; elastance; Histology; Oxidative Stress.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
AGÊNCIAS FINANCIADORAS	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELA	xiii
ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	2
1.1.1 DPOC	2
1.1.2 Enfisema pulmonar	5
1.2 PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENFISEMA	8
PULMONAR.....	
1.2.1 Inflamação pulmonar	8
1.2.2 Hipótese protease anti-protease	11
1.2. 3 Estresse oxidativo	13
1.2.3.1 Radicais livres	14
1.2.3.2 Peroxidação lipídica	17
1.2.3.3 Sistemas de defesa antioxidantes	18
1.2.3.4 Catalase	20
1.2.3.5 Glutathiona Peroxidase	20
1.2.4 Mecanismo de lesão – reparo	21

1.3.MATRIZ EXTRACELULAR ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	23
1.3.1 Proteínas estruturais fibrosas	26
1.3.1.1 Fibras colágenas	26
1.3.1.2 Fibras elásticas	27
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA INDUZIDO POR PAPAÍNA.....	29
1.5 MECÂNICA RESPIRATÓRIA	33
1.5.1 Noções Básicas	33
1.5.2 Estudo da Mecânica Respiratória	37
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVO.....	50
3.1 Objetivos específicos	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Animais utilizados	52
4.2 Caracterização dos Grupos Experimentais	52
4.3 Protocolo experimental	53
4.4 Método de oclusão ao final da inspiração	58
4.5 Órgão analisado	61
4.6 Estudo Histopatológico, Morfometria e Celularidade	61
4.6.1 Microscopia óptica	61
4.6.1.1 Fixação e Preparo das Lâminas	61
4.6.1.2 Análise Histopatológica, Morfometria e Celularidade	62
4.7 Determinação da Capacidade Residual Funcional (CRF)	64
4.8 Ensaio Bioquímicos de Estresse e Dano Oxidativo	64
4.8.1 Dosagem de proteínas	65
4.8.2 Medidas da Peroxidação Lipídica	66

4.8.3 Marcadores de Estresse Oxidativo	
4.8.3.1 Catalase	66
4.8.3.2 Razão GSH/ GSSG.....	67
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5. RESULTADOS.....	69
5.1 Mecânica Respiratória	70
5.2 Análise Histopatológica.....	77
5.2.1 Análise qualitativa.....	77
5.2.2 Análise quantitativa	80
5.3 Ensaios Bioquímicos de Estresse e Dano Oxidativo.....	87
6. DISCUSSÃO.....	91
7. CONCLUSÕES	103
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	104
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da via aérea no pulmão normal e na DPOC.....	2
Figura 2. Exemplo de traçados espirométricos e cálculo de VEF1, CVF e relação VEF1/CVF.....	3
Figura 3 Estrutura alveolar no pulmão normal e no enfisema pulmonar.....	5
Figura 4. Anatomia pulmonar normal e nas 3 formas de enfisema pulmonar.....	7
Figura 5. Processo Inflamatório na DPOC.....	11
Figura 6. Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	
Figura 7. Modelo linear uni-compartimental.....	39
Figura 8. Esquema do método de oclusão ao final da inspiração.....	40
Figura 9. Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório.....	42
Figura 10. Esquema do protocolo experimental.....	53
Figura 11. Montagem Experimental.....	57
Figura 12. Método de Oclusão ao Final da Inspiração.....	59
Figura 13 Fórmulas utilizadas na análise da mecânica pulmonar.....	60
Figura 14. Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	63
Figura 15: Variação da relação de massa corporal relativa a inicial temporalmente	72
Figura 16. Elastância estática (Est) em camundongos machos e fêmeas.....	73
Figura 17. Componente viscoelástico da elastância.....	74
Figura 18. Variação da pressão pulmonar resistiva.....	75
Figura 19. Variação da pressão pulmonar viscoelástica/inomogênea	76
Figura 20. Fotomicrografias (200X) representativas de parênquima.....	78

Figura 21. Fotomicrografias (400X) representativas de parênquima pulmonar.....	79
Figura 22. Capacidade residual funcional (CRF).....	82
Figura 23. Número de células polimorfonucleares, mononucleares e totais	83
Figura 24: Correlação entre celularidade total e elastância estática (Est).....	84
Figura 25: Percentual de fibras colágenas em relação à área de tecido pulmonar.....	85
Figura 26: Percentual de fibras do sistema elástico em relação à área de tecido.....	86
Figura 27: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	88
Figura 28: Atividade da catalase no pulmão.....	89
Figura 29: O comportamento da relação GSH/ GSSG no pulmão.....	90

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Fluxo e volume nos animais dos grupos salina e papaína.....	73
Tabela 2. Diâmetro alveolar médio (Lm).....	84

ABREVIATURAS

ΔE – componente elástico da viscoelasticidade

ΔP – variação de pressão

ΔP_1 – variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

ΔP_2 – variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

ΔP_{tot} – variação de pressão total pulmonar

ΔV – variação de volume gasoso mobilizado

BAL – lavado broncoalveolar

CEUA – comissão de ética na utilização de animais

E – elastância

Edyn – elastância dinâmica do pulmão

ELISA – ensaio de imunoabsorbância da enzima ligada

EMSA – ensaio de mudança de mobilidade eletroforética

Est – elastância estática do pulmão

Est,L – componente elástico do pulmão

Est,w – componente elástico da parede torácica

HE – hematoxilina e eosina

IL – interleucina

i.p. – intraperitoneal

i.t. – intratraqueal

IUPAC – união internacional de química pura e aplicada

LPA – lesão pulmonar aguda

MN – células mononucleares

MP - Metaloprotease

NF- κ B – fator nuclear kappa B

P – pressão

PEEP – pressão positiva ao final da expiração

PEF – pico de fluxo expiratório

Pel – pressão de retração elástica do pulmão

PGE₂ – prostaglandina E 2

Pi – pressão pulmonar no ponto de inflexão

PL – pressão transpulmonar

Pmáx – pressão máxima ou de pico inspiratório

PMN – células polimorfonucleares

Pres – pressão resistiva

Ptr – pressão traqueal

R – resistência do sistema respiratório

Raw – resistência de vias aéreas

Req – resistência do equipamento

Rinit,L – resistência intrínseca do pulmão

Rinit,w – resistência intrínseca da parede torácica

Rinit,rs – resistência intrínseca do sistema respiratório

Rtis – resistência tecidual

Rtot – resistência pulmonar total

Rrs – resistência do sistema respiratório

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

T_I – tempo inspiratório

V' – fluxo aéreo

V_T – volume corrente

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

1.1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada por limitação do fluxo aéreo, não totalmente reversível, inflamação de pequenas vias aéreas e destruição do parênquima pulmonar (Voelkel, 2002). A síndrome clínica da DPOC inclui manifestações extrapulmonares, como anemia, osteoporose, redução da massa corporal e do trefismo muscular (Cote e cols, 2007; Sabir, 2007, Filkelstrein, 1995). Constitui uma doença respiratória progressiva caracterizada por dispnéia, tosse e aumento da secreção pulmonar (Tuder, 2003a).

Apesar das similares alterações funcionais, os sinais e sintomas clínicos da DPOC manifestam-se como diferentes afecções: bronquite crônica, enfisema pulmonar e bronquiolite obliterante são as três formas morfológicas da DPOC (Figura 1). Ademais, estas três doenças podem se apresentar associadas no mesmo paciente (Jeffery, 2001).

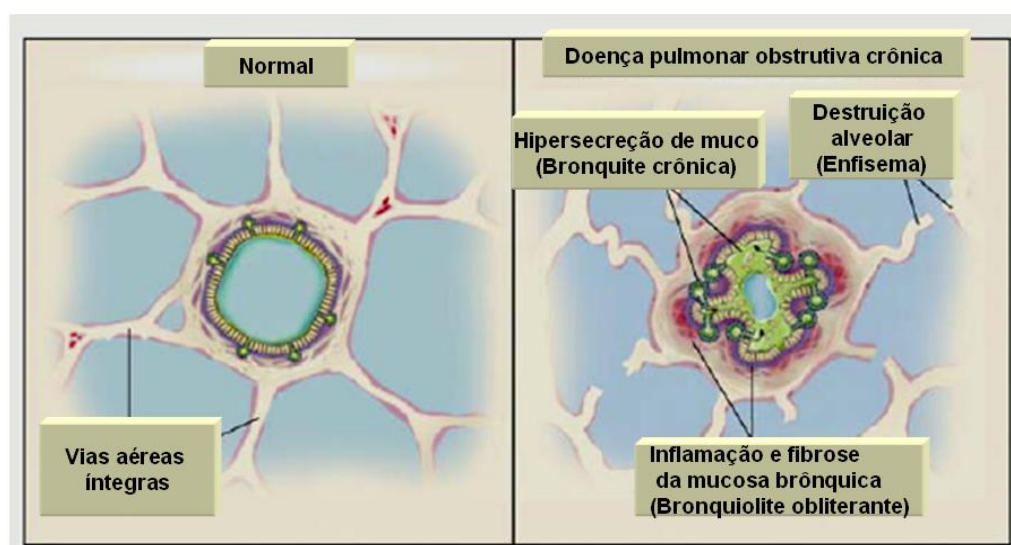


Figura 1: Ilustração da via aérea no pulmão normal e na DPOC. Adaptado de (Snider e cols., 1985).

A DPOC é a 5ª causa de morte no mundo, com estimativa de se tornar a 3ª causa até 2020. No Brasil, a prevalência desta doença cresceu cerca de 3,4 vezes nos últimos 20 anos (Pauwels e cols., 2001). Dentre os pacientes com DPOC, 20% apresentam enfisema, ao passo que 80% tem bronquite crônica ou uma combinação de enfisema e bronquite crônica (Barnes, 2000).

Em seres humanos, além da observação dos sinais clínicos da doença, a DPOC é diagnosticada pela espirometria pulmonar, que evidencia o comprometimento da função pulmonar por meio dos valores de volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF₁), capacidade vital forçada (CVF), e a relação destes (Figura 2).

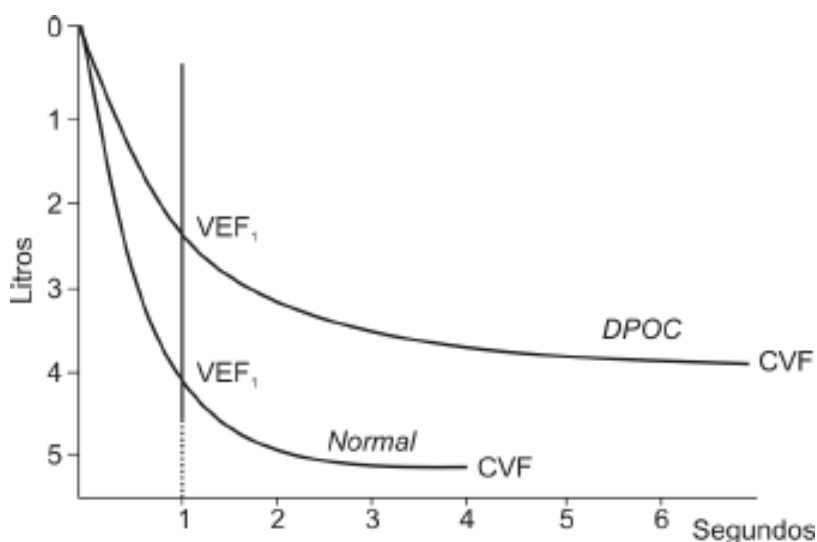


Figura 2: Exemplo de traçados espirométricos em indivíduos normais e pacientes com DPOC. Estão representados no gráfico, o volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF₁) e a capacidade vital forçada (CVF). Adaptado de (GOLD, 2004).

Pacientes com DPOC tipicamente apresentam diminuição de VEF1 e da relação VEF1/CVF e o grau de anormalidade espirométrica geralmente reflete a gravidade da DPOC (Hoog, 2004).

Classificação da DPOC conforme a gravidade (GOLD, 2004)

Estádio 0: Em risco - Tosse crônica e expectoração; a função pulmonar é ainda normal.

Estádio I: DPOC leve - Leve limitação do fluxo aéreo (VEF1/CVF < 70%, mas VEF1 > 80% do previsto), podendo ser acompanhada de tosse crônica e expectoração.

Estádio II: DPOC Moderada - Agravamento da limitação do fluxo aéreo (VEF1 < 80% e > 30% do previsto) e, progressão dos sintomas, com dispnéia tipicamente desenvolvida ao esforço.

- Exacerbação dos sintomas, que tem um impacto sobre a qualidade de vida e o prognóstico do paciente, especialmente notada em pacientes com VEF1 < 50% do previsto.

Estádio III: DPOC Grave - Grave limitação do fluxo aéreo (VEF1 < 30% do previsto) ou presença de insuficiência respiratória.

1.1. 2 Enfisema pulmonar

O enfisema é definido como uma dilatação anormal dos espaços aéreos, acompanhada por destruição das paredes alveolares (Snider, 1985; Shapiro, 2002).

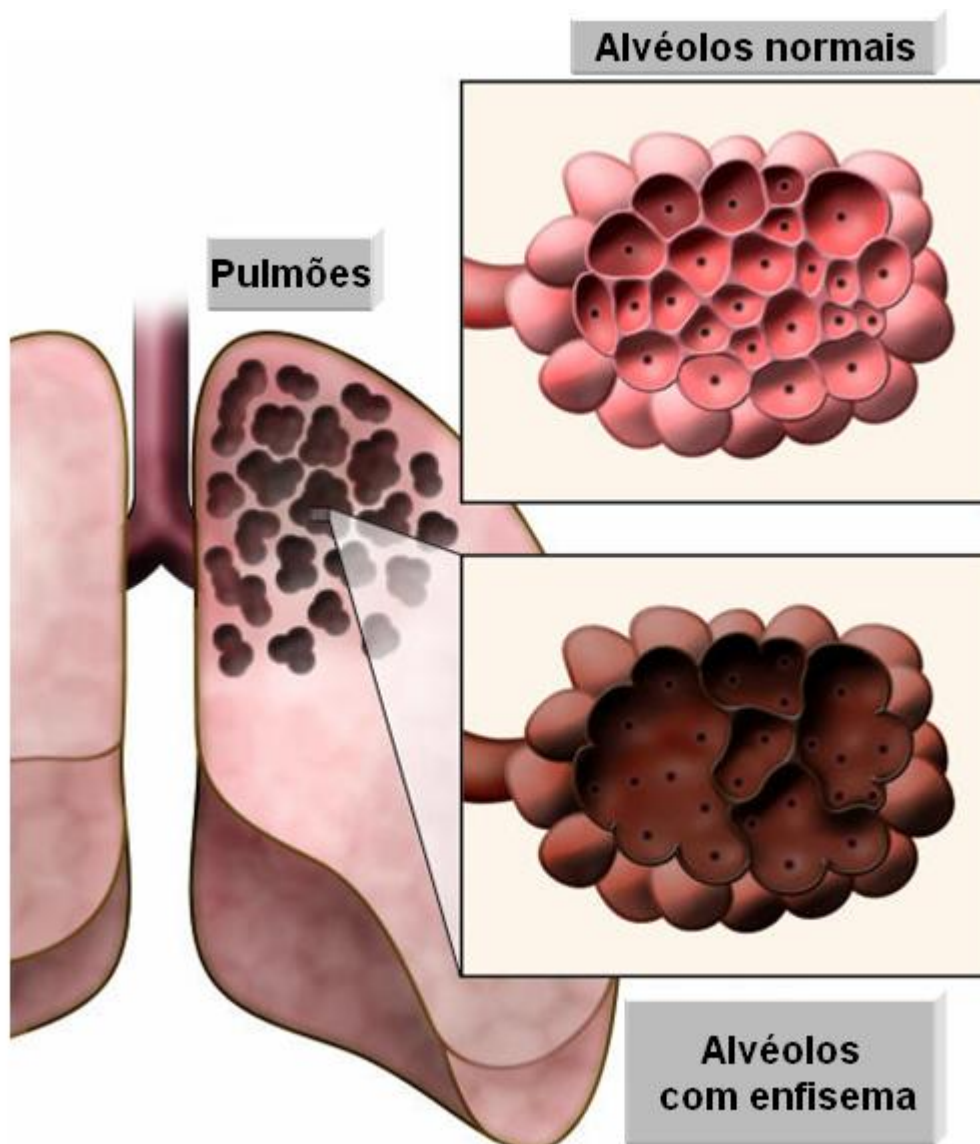


Figura 3: Estrutura alveolar no pulmão normal e no enfisema pulmonar. Adaptado de (Voelkel, 2008).

A destruição alveolar característica do enfisema se inicia nos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, levando ao dano da parede alveolar e perda de unidades alveolares, não associado à fibrose pulmonar significativa (Berg e cols., 2003; Celli e cols., 2007; Pauwels, 2004; Aoshiba e cols., 2003; Snider e cols., 1985; Vlahovic e cols., 1999).

Tal destruição reduz a força de retração elástica e, conseqüentemente, do fluxo aéreo expiratório, ocasionando um quadro progressivo de hiperinsuflação pulmonar (Hoog e cols, 2004)

Os tipos de enfisema podem ser definidos de acordo com o acometimento da anatomia dos ácinos pulmonares, etiologia e comportamento fisiopatológico, conforme descrito a seguir (Kim e cols., 1991):

- O enfisema paraseptal é o enfisema cicatricial decorrente de processos inflamatórios, como tuberculose e pneumonia. Não tem como característica principal a limitação do fluxo aéreo.
- O panacinar caracteriza-se por comprometido do ácino, com alargamento difuso, habitualmente estendendo-se desde a região hilar até a periferia dos pulmões. Esse enfisema é encontrado nos pacientes portadores da deficiência de alfa-1-antitripsina e é o padrão verificado na reprodução experimental por meio de enzimas proteolíticas, como neste trabalho, onde foi utilizada a papaína.
- O centrolobular está associado, na maioria das vezes, ao tabagismo e compromete preferencialmente os lobos superiores. Estudos mostram que pacientes tabagistas podem apresentar tanto o tipo centro-lobular como o panacinar, com graus variáveis de acometimento em um mesmo pulmão.

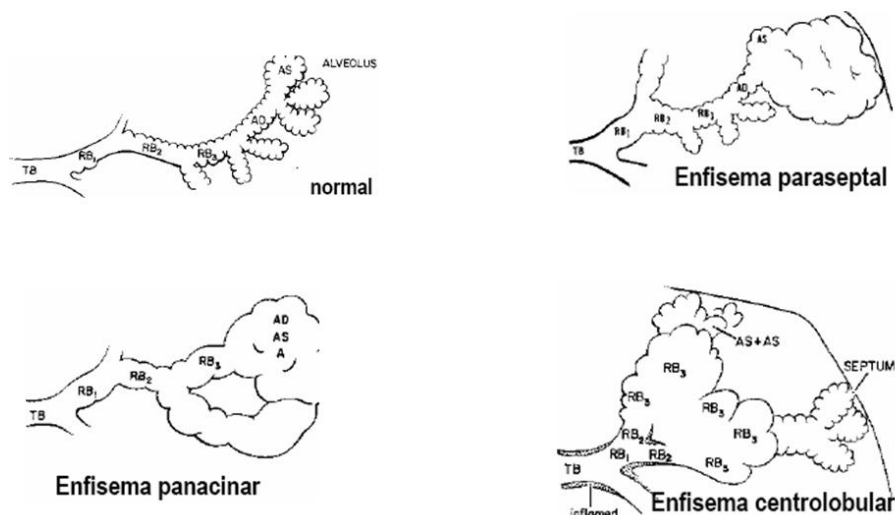


Figura 4: Anatomia pulmonar normal e nas 3 formas de enfisema pulmonar. Adaptado de (Kim e cols., 1991).

O tabagismo constitui o maior fator de risco para o desenvolvimento do enfisema, estando presente em 80% a 90% dos casos. A deficiência de alfa-1-antitripsina, na forma homozigota, é responsável por apenas 1% dos casos (Fletcher e Peto, 1977).

A fisiopatologia do enfisema não é completamente conhecida. A hipótese mais aceita a respeito do seu desenvolvimento é a presença de um desequilíbrio entre a atividade de proteases e anti-proteases no tecido pulmonar, resultando em degradação da elastina (Janoffi, 1985). Quatro mecanismos são apontados como principais na patogenia do enfisema (Suki e cols., 2003; Yoshida e Tuder, 2007; Barnes, 2006):

- 1- Inalação de partículas nocivas, tais como aquelas contidas na fumaça do cigarro, levam à inflamação crônica, resultando em aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos CD8+.

- 2- Desequilíbrio entre o balanço proteolítico e anti-proteolítico, resultando em um aumento da atividade proteolítica, destruição do parênquima pulmonar e desenvolvimento do enfisema.
- 3- Estresse oxidativo, que ocorre quando espécies reativas de oxigênio são produzidas em excesso no mecanismo de defesa antioxidante.
- 4- Alteração no mecanismo de reparo tecidual.

Joss e cols, (2002) e Hoog, (2004), sugerem, ainda, que o prejuízo nutricional, a suscetibilidade genética e a instabilidade do surfactante podem ser mecanismos causais na DPOC.

1.2 PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENFISEMA PULMONAR.

1.2.1 - Inflamação pulmonar

Patologicamente, o enfisema pulmonar caracteriza-se por inflamação difusa do parênquima pulmonar e das vias aéreas (Saetta e cols., 2002; Hautamaki e cols., 1997). A inflamação crônica na DPOC está associada ao aumento na expressão gênica e de proteínas no lavado broncoalveolar de diferentes quimiocinas e mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α , IL1- β , IL-8, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12, IL-18, (Churg e cols., 2008). Muitos dos genes que originam agentes pró-inflamatórios são regulados pelo fator de transcrição nuclear (NF)- κ B. De fato, o NF- κ B encontra-se ativado nos pulmões e em células inflamatórias (particularmente macrófagos alveolares) de indivíduos com DPOC (Barnes, 2006; Di Stefano e cols., 2002).

A limitação progressiva de fluxo aéreo tem sido associada à resposta inflamatória anormal dos pulmões a agentes nocivos, como poluentes aéreos (Jeffery e cols., 2001; Cosio, 2001).

Em contraste com a inflamação presente na asma, um predomínio de linfócitos CD8+ é característico de biópsias brônquicas, de pequenas vias aéreas e de parênquima pulmonar, de pacientes com DPOC (Hogg e cols., 2004; Saetta e cols., 1998). Além disso, a inflamação na DPOC não responde ao tratamento com corticosteróide, o que poderia ser potencialmente explicado pelo efeito do medicamento em aumentar a sobrevivência de neutrófilos, por meio da inibição de apoptose (Keatings e cols., 1997; Cox e cols., 1995).

Pacientes com DPOC apresentam aumento do número de macrófagos e neutrófilos, tanto em tecido pulmonar e de vias aéreas, quanto no lavado broncoalveolar ou escarro (Keatings e cols., 1997; Retamales e cols., 2001), sendo descrita uma correlação positiva entre o número de macrófagos e neutrófilos nas vias aéreas e a gravidade da doença (Keatings e cols., 1997; Di Stefano e cols., 1998). Essas células liberam mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio em resposta a irritantes (Keatings e cols., 1997), bem como uma variedade de enzimas elastolíticas, incluindo elastase neutrofílica, MMP-2, -8, -9, -12, catepsina G, K, L e S, e proteinase-3, que contribuem para a destruição do parênquima pulmonar (Barnes e cols., 2003). Achados experimentais recentes reforçam a correlação entre destruição de fibras elásticas, células e mediadores inflamatórios, e distensão alveolar (Churg e cols., 2007). Ademais, fragmentos de elastina liberados durante a degradação das fibras elásticas recrutam mais células inflamatórias para o

parênquima pulmonar, aumentando a inflamação e a destruição do tecido pulmonar (Houghron, 2006).

Em modelos experimentais como o nosso, de enfisema pulmonar induzido por papaína, o processo inflamatório é caracterizado por um forte influxo de células polimorfonucleares, com aumento do número de neutrófilos (Hayes e cols., 1975; Parra e cols., 1980; Bowden, 1984).

Alguns outros estudos demonstram a presença de neutrófilos em áreas de destruição de tecido em pacientes com enfisema, e o aumento do número destas células é reproduzido nos modelos experimentais com instilação de proteases, observando-se uma correlação entre o número de neutrófilos e o grau de lesão pulmonar (Damiano e cols., 1986; Eidelman e cols., 1990; Filkelstein e cols., 1995). Pastor e cols., (2006), descrevem o aumento do número de macrófagos nos três primeiros dias após instilação de papaína em ratos Wistar, e um decréscimo progressivo deste número após 10 e 60 dias.

A presença de variabilidade substancial na celularidade total também é descrita em indivíduos com graus de doença II e III, uma vez que a DPOC é reconhecida como uma condição heterogênea, onde vários fatores intrínsecos e extrínsecos (*e.g.*, história de tabagismo, tabagismo atual, poluentes ambientais, predisposição genética, diferentes tratamentos) podem influenciar a infiltração de células inflamatórias na mucosa brônquica (Churg e cols., 2002).

O papel fisiopatológico específico de cada tipo celular envolvido no enfisema ainda necessita ser determinado (Yoshida e Turner, 2007). É descrito, porém, que a mobilização de células inflamatórias para o pulmão proporciona a liberação de mediadores potencialmente destrutivos, incluindo

proteases e citocinas, as quais diretamente contribuem para destruição e remodelamento tecidual (Rahman e Kilty, 2006; Segundo Yang e cols, 2006). Adicionalmente, o estresse oxidativo gerado ativa o fator de transcrição nuclear (NF- κ B) e o ativador da proteína -1 (AP-1), desencadeando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e tornando este processo ainda mais dinâmico/cíclico (Figura 5)

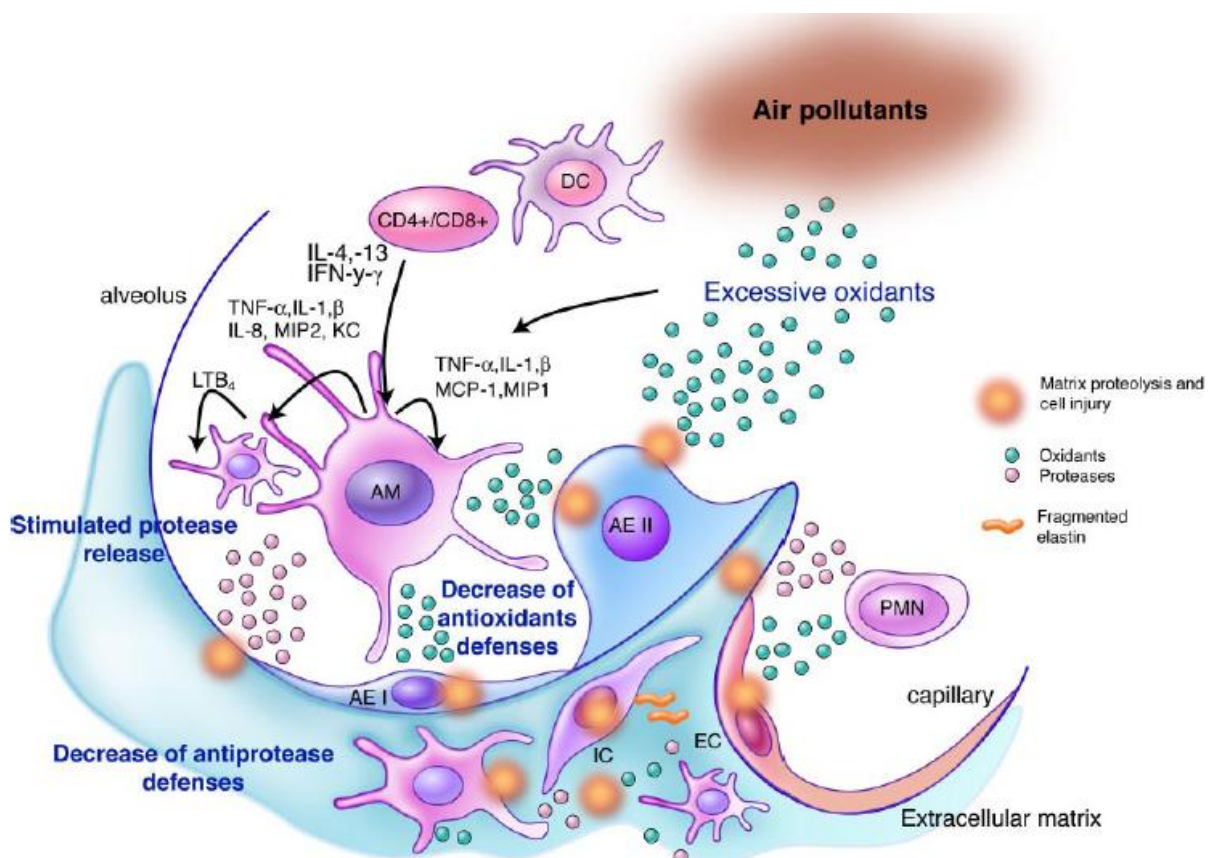


Figura 5: Recrutamento celular e processo inflamatório na DPOC.

1.2.2 Hipótese protease-antiprotease

A teoria clássica sobre o mecanismo de destruição tecidual do enfisema se baseia no desequilíbrio entre proteases e antiproteases (Barnes, 2000). Várias enzimas proteolíticas, como elastase neutrofílica e diferentes

metaloproteases de matriz (MMP), juntamente com enzimas antiproteolíticas, como α 1-antitripsina e inibidores teciduais de metaloproteases de matriz (TIMP), são responsáveis pela manutenção e reparo da matriz extracelular pulmonar normal, regulando a deposição e destruição de fibras elásticas e colágenas. A hipótese de desequilíbrio protease-antiprotease foi formulada a partir da observação de que indivíduos com deficiência de α 1-antitripsina, potente inibidor endógeno da elastase neutrofílica, desenvolviam enfisema precocemente, particularmente quando fumantes (Laurell e Ericksson, 1963). Esses achados levaram ao uso de diferentes proteases no desenvolvimento de modelos experimentais de enfisema, dentre eles o modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína, confirmando a importância deste mecanismo na fisiopatologia da doença.

Shapiro e cols., (2003), demonstraram a redução no desenvolvimento de enfisema em camundongos *knock out* para elastase neutrofílica, submetidos à exposição crônica à fumaça de cigarro.

Em seres humanos a destruição alveolar secundária ao desequilíbrio entre proteases e antiproteases está estreitamente relacionada à inflamação pulmonar desencadeada pela exposição a gases nocivos, dentre eles a fumaça de cigarro. Esta provoca uma cadeia de resposta inflamatória com participação de macrófagos alveolares e influxo de neutrófilos no parênquima pulmonar, levando à grande liberação de proteases, que, por sua vez, sobrepuja as defesas antiproteolíticas do trato respiratório inferior, com conseqüente destruição do parênquima pulmonar (Gross e cols., 1965; Laurell e cols., 1963). O neutrófilo e a elastase neutrofílica são peças fundamentais na hipótese

protease-antiprotease, participando como fatores principais no enfisema (Janoffi, 1985).

No entanto, a participação exata das MMPs, assim como da elastase neutrofílica, na patogênese do enfisema não foi completamente estabelecida. Resultados prévios demonstram que a inibição de MMP reduz o influxo de neutrófilos e macrófagos (Pemberton e cols., 2006; Shapiro e cols., 2003), enquanto a elastase neutrofílica é capaz de ativar MMPs e degradar inibidores de metaloproteases, sugerindo uma cooperação entre elastase neutrofílica e MMPs no sentido de aumentar a atividade proteolítica de ambas (Shapiro e cols., 2003).

Os modelos experimentais de enfisema induzido por proteases, como a papaína, fundamentam-se na teoria do desequilíbrio protease-antiprotease para o desenvolvimento do enfisema em animais.

1.2.3 Estresse oxidativo

Outro importante mecanismo na patogênese da DPOC é representado pelo estresse oxidativo. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a ação dos agentes oxidantes e antioxidantes, com predomínio dos oxidantes, com conseqüente dano, tanto aos lipídeos, quanto ao DNA. Em termos gerais, o estado de estresse oxidativo orgânico parece variar com a concentração de oxigênio, o tipo de tecido analisado, dieta e a idade do indivíduo, ingestão de fármacos, exposição a condições ambientais impróprias, tais como radiação ultravioleta, poluição, umidade relativa, temperatura ambiente e estresse emocional.

Esta situação de estresse oxidativo traduz-se na incapacidade de impedir ou reparar as repercussões das espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre as estruturas celulares, e já foi descrito que ocorre em todos os seres biológicos, mesmo em situações de funcionalidade basal, isto é, em repouso (Mota e cols., 2004). Um incremento do estresse oxidativo pode dever-se não só ao aumento na produção de radicais livres e ERO, mas, também, a redução da capacidade antioxidante ou, ainda, à conjugação destes dois fatores.

O aumento dos níveis de ERO nas vias aéreas e tecido pulmonar após exposição à papaína pode originar-se diretamente da lesão ocasionada no parênquima pulmonar ou indiretamente, a partir da liberação de ERO por macrófagos e neutrófilos, que infiltram os pulmões. Além disso, macrófagos e neutrófilos oriundos de quadros de DPOC apresentam maior liberação de ERO (Bridges e cols., 1985; Hoidal e cols., 1981; Ludwig e Hoidal., 1982; Macnee, 2005a). Evidências de lesão oxidante são descritas em modelos animais de exposição a proteases, com aumento compensatório da expressão de catalase em macrófagos (Mccusker e Hoidal, 1990), aumento de produtos de peroxidação lipídica e marcadores de dano oxidativo ao DNA em vias aéreas e células epiteliais alveolares (Aoshiba e cols., 2003), bem como depleção de substâncias antioxidantes, como a glutatona e o ácido ascórbico (Cavarra e cols., 2001a).

1.2.3.1 Radicais livres

Radicalis livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital externo e que se formam quando uma ligação covalente é quebrada. Devido à presença de tais elétrons não pareados, os

radicais são altamente reativos e podem interagir com importantes componentes celulares, como a membrana celular ou o DNA nuclear ou mitocondrial, levando ao dano da função celular ou até mesmo à morte da célula (Ciencewicky e cols., 2008).

Entretanto, além desta potencial ação nefasta sobre a integridade e funcionalidade celular, os radicais livres e outras substâncias com eles relacionadas também respondem pela regulação de importantes mecanismos fisiológicos, tais como: sinalização celular, regulação da expressão de alguns genes, mediação de reações inflamatórias e potencialização de mecanismos de defesa orgânica, uma vez que fazem parte do arsenal de armas letais leucocitárias (Pryor, 1986; Droge e cols., 1994; Hii e Ferrante, 2007).

Os radicais livres podem ser encontrados em grande quantidade na natureza relacionados aos átomos de oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, carbono, enxofre, sendo classificados em função do átomo portador dos elétrons desemparelhados (Vasconcelos e cols., 2007). Todavia, os radicais livres de oxigênio: radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e hidroperoxila (HO_2) são os que possuem maior relevância biológica, não só devido à sua elevada toxicidade, mas, também, pelo fato de serem os mais prevalentes nos organismos vivos que utilizam o oxigênio como comburente. Há, contudo, outras moléculas altamente reativas e potencialmente tóxicas para o organismo, as quais, por não conterem nenhum elétron desemparelhado nos seus orbitais, não se enquadram na definição de radical livre. Apesar de não serem verdadeiros radicais, estas moléculas, que incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO), são potenciais geradoras de radicais livres, e, por esta razão, as suas repercussões orgânicas, fisiológicas

ou tóxicas devem ser igualmente consideradas (Shan e cols., 1989; Halliwell, 1991; Lee e cols., 2004). Logo, ao invés da denominação “radicais livres”, passou-se a utilizar “espécies reativas”, para englobar, além dos radicais, estas moléculas. Como em sua maioria tais espécies são derivadas do metabolismo do O_2 , normalmente se utiliza o termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO) (Ferreira e Matsubara, 1997).

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem freqüentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado (Vasconcelos e cols., 2007). Cabe recordar que reações de redução implicam em ganho de elétrons, e as de oxidação em perda. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular (O_2), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido (O_2^-), considerado instável por possuir número ímpar de elétrons na última camada.

ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos. As fontes geradoras são: cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, retículo endoplasmático e nicotinamida-adenina nucleotídeo (NADH/NADPH) oxidase associada à membrana. Durante esses processos biológicos são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, uma vez que participa da reação que produz a OH^- , é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, mostrando-se

altamente tóxico para as células. A reatividade das ERO é neutralizada com a entrada de quatro elétrons no processo de redução do O_2 .

1.2.3.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente L^\bullet (radical alquila), LO^\bullet (alcoxila) e LOO^\bullet (peroxila), levando à destruição dos lipídeos insaturados. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana mostra-se um dos mais atingidos, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído). Todas essas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e a exacerbação da toxicidade de xenobióticos. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, descritas a seguir. A etapa de iniciação, como já descrito, compreende o ataque de uma espécie reativa (geralmente OH^\bullet), que subtrai um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, normalmente, de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono. Este radical é comumente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o radical de carbono do dieno conjugado reage com O_2 (que é uma molécula hidrofóbica e, portanto, se concentra no interior das membranas) e forma o radical peroxila. Este

radical peroxila é capaz de subtrair hidrogênio de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo radical de carbono sofre novo rearranjo, reage com O_2 e forma outro radical peroxila e assim, sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. O radical peroxila combina-se, então, com o hidrogênio subtraído, gerando o lipídeo hidroperóxido (LOOH) que, ao sofrer quebra, forma aldeídos, como malonaldeído, entre outros. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcóxila através da reação de Fenton. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação, instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ou pela reação de dois radicais lipídicos, formando produtos sem radicais.

Nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos atuam significativamente na reação em cascata a partir do ácido aracônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (Halliwell e Gutteridge, 1990). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (Ross e Moldeus, 1991, Vasconcelos e cols., 2007).

1.2.3.3 Sistemas de defesa antioxidante

Devido ao elevado potencial de toxicidade do oxigênio e à sua grande utilização pelos organismos aeróbios, torna-se necessário que estes estejam suficientemente munidos de uma diversidade de sistemas antioxidantes para proteger as suas células dos efeitos nocivos das ERO (Evans, 2000; Banerjee e cols., 2003; Lambertucci e cols., 2007).

Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações relativas à dos potenciais substratos

oxidáveis, retarda significativamente, ou inibe, a oxidação desses substratos pelas ERO (Halliwell, 1991; Sies, 1997; Droge, 2002). Estas substâncias possuem a capacidade de fornecer elétrons/átomos de hidrogênio às ERO sem se transformarem em moléculas instáveis. Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos e não enzimáticos (Garcia e cols., 1999) e podem ser classificados em função da sua localização orgânica (antioxidantes intracelulares e extracelulares) e da sua origem, seja da dieta (antioxidantes exógenos), ou da síntese endógena (antioxidantes endógenos).

No interior da célula a eliminação dos compostos reativos, constitui um pré requisito para a sobrevivência celular, sendo normalmente efetuada por: 1) sistemas enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GR) e 2) sistemas não-enzimáticos, tais como glutathione reduzida (GSH), coenzima Q (CoQ), ácido úrico, vitamina E (alfa-tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonóides, carotenóides, proteínas de transporte de metais de transição, transferrina e ceruloplasmina (Beckman e Ames, 1998; Sen, 2001). Destes, os agentes que apresentam um papel mais preponderante dentro dos sistemas intracelulares de defesa antioxidante são a SOD, a CAT e a GPx (Lee e cols, 2004; Moreno e cols., 2005; Foronjy e cols., 2006). Em situações de produção exagerada de ERO, cada uma destas enzimas possui a capacidade de catalisar reações que conduzem à produção de espécies menos reativas (Ferreira e cols., 2006).

1.2.3.4 Catalase (CAT)

A CAT é uma enzima presente na maioria dos organismos aeróbios e é responsável pela conversão do H_2O_2 intracelular em água e oxigênio, estando a maior parte da atividade desta enzima localizada nos peroxissomas. Na maioria dos animais, a CAT está presente em praticamente todos os órgãos, particularmente concentrada no fígado e nos eritrócitos. As mitocôndrias e o retículo endoplasmático contêm, também, alguma atividade da CAT, embora muito reduzida. Encéfalo, coração e músculos esqueléticos contêm pequenas quantidades desta enzima (Halliwell, 1991; Ferreira e cols., 2006).

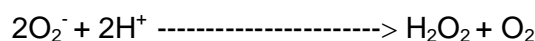
1.2.3.5 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx é considerada a enzima mais importante para a oxidação do H_2O_2 a água. A GPx dos mamíferos tem maior afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT, e, assim, em concentrações baixas de H_2O_2 , a GPx apresenta um papel muito mais ativo na sua remoção celular.

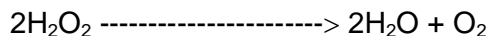
Apresenta-se sob quatro formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; a GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos na membrana e lipoproteínas (Bast e cols., 1991). O seu correto funcionamento depende da presença de selênio (nutriente antioxidante) na sua constituição e da disponibilidade de H_2O_2 e de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doador de elétrons, formando glutathione oxidada (GSSH) e água (Figura 6). Este funcionamento atribui à GPx um papel importante na

proteção celular das membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos contra as ERO (Halliwell, 1991; Ferreira e cols., 2006).

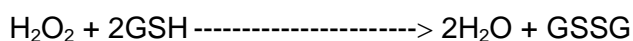
O sistema redox GSH é crucial na manutenção intracelular da homeostase GSH/ GSSG, que é crítica para processos celulares fisiológicos normais, e que representam um dos mais importantes sistemas de defesa nas células pulmonares. A exposição de células epiteliais in vitro a oxidantes como H₂O₂ e hiperóxia está relacionada a depleção de GSH, associado ao aumento de GSSG, seguido por um gradativo aumento compensatório de GSH (Rahman e cols., 1996; e Shi e cols., 1994).



SOD



CAT



GPx

Figura 6. Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes (SOD- superóxido dismutase; CAT- catalase e GPx- glutathiona peroxidase, GSH e GSSG- formas reduzida e oxidada da glutathiona).

1.2.4 Mecanismo de lesão-reparo

Inúmeras evidências confirmam que a resposta inflamatória a agentes nocivos, acompanhada por liberação de vários mediadores, incluindo proteases, oxidantes e peptídeos tóxicos, culmina em destruição do tecido pulmonar (Churg e cols., 2002). No entanto, em presença de lesão, o pulmão, como vários outros tecidos, é capaz de iniciar mecanismos de reparo.

Processos de reparo parecem estar ativos mesmo no pulmão normal, com renovação diária de cerca de 5% das fibras colágenas. A manutenção da estrutura tecidual normal requer um equilíbrio entre quantidade de colágeno sintetizado e degradado, consistente com um mecanismo de reparo ativo no tecido pulmonar normal (Rennard e cols., 2006). Dessa forma, a destruição tecidual que caracteriza o enfisema representa um desequilíbrio entre os processos de destruição e reparo teciduais, de forma análoga ao desequilíbrio protease-antiprotease, sendo a parede alveolar incapaz de regenerar sua matriz (Churg e cols., 2008).

Vários mecanismos foram propostos para explicar essa “falência de manutenção/reparo pulmonar”, como: aumento de apoptose celular (Imai e cols., 2001; Majo e cols., 2001; Tuder e cols., 2003b; Yokohori e cols., 2004); redução de proliferação e quimiotaxia celular (Carnevali e cols., 1998; Rennard e cols., 2007); depressão da produção e atividade de lisil oxidase, uma enzima crucial para a configuração final das fibras elásticas e colágenas (Laurent e cols., 1983); e aumento da expressão de marcadores associados ao envelhecimento (Nyunoya e cols., 2006; Tsuji e cols., 2006).

Evidências em modelos animais sugerem, ainda, que a falência de reparo representa um processo dependente do tempo e dose de exposição ao agente agressor (Churg e cols., 2008).

A enzima proteolítica papaína, utilizada neste trabalho, promove um dano direto e extenso ao parênquima pulmonar. Esses efeitos podem resultar, também, de alterações de vias bioquímicas, afetando diferentes funções de reparo, como quimiotaxia e proliferação celular, bem como produção e remodelamento da matriz extracelular (Rennard e cols., 2006). Além disso, as

fibras elásticas representam o componente de matriz mais dificilmente reparado. A incapacidade das células pulmonares em restaurar as fibras elásticas degradadas exacerba o processo da doença, levando ao comprometimento permanente da função pulmonar e degeneração tecidual progressiva (Johanson e cols., 1973)

1.3 MATRIZ EXTRACELULAR, ESTRUTURA E FUNÇÃO NO ENFISEMA

Em mamíferos, os pulmões são órgãos cuja função primária é captar o oxigênio para o organismo e dele eliminar o excesso de dióxido de carbono. Para realizar as trocas gasosas em seres humanos, o pulmão apresenta uma área em torno de 70 a 100 m² distribuída por aproximadamente 300 milhões de alvéolos (D'Angelo e cols., 1989).

Os tecidos conectivos dos pulmões são compostos de células e da matriz extracelular (MEC), que inclui uma variedade de macromoléculas biológicas e água (Suki e cols., 2003). A matriz extracelular consiste em macromoléculas fisicamente associadas: as proteínas estruturais fibrosas (fibras colágenas e elásticas) e a matriz intersticial composta de glicoproteínas embebidas em um gel de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Yuan e cols., 1997).

No pulmão normal, as células da própria matriz, mais precisamente o fibroblasto, são encarregadas de secretar suas proteínas. Essas proteínas encontram-se organizadas em uma rede de espaços que circundam as células, ocupando um volume significativo no tecido. A MEC não representa um material inerte, com a função apenas estrutural, mas fornece informações

sobre migração, ligação, diferenciação e organização das células, modulando uma série de processos (Raghow, 1994; Chen e cols., 2001; Cotran e cols., 1999; Parks e cols., 2001). As macromoléculas mais importantes na determinação de processos mecânicos da MEC são: colágeno, elastina e proteoglicanos (Suki e cols., 2005; Pelosi e cols., 2007).

Embora a contribuição exata de cada um desses elementos permaneça desconhecida, o comportamento mecânico da matriz colágeno-elastina-proteoglicanos provavelmente representa a principal porção de dissipação de energia tecidual durante a respiração (Al Jamal e cols., 2001; Fredberg e cols., 1989; Mijailovich e cols., 1994; Stamenovic e Yager., 1988; Fung e cols., 1993).

A principal função das glicoproteínas é a capacidade de se ligar simultaneamente a componentes da MEC e proteínas integrantes da membrana celular (Snider e cols 1985.; Cotran e cols.,1999).

As propriedades elásticas do colágeno e fibras elásticas diferem, em grande medida. O colágeno, elemento mais abundante, admite apenas alongamento mínimo, mostrando grande resistência à tração. Inversamente, as fibras elásticas são altamente distensíveis, apresentando menor resistência à tração (Hoppin e cols., 1986; Mijailovich e cols., 1993; Weibel, 1986). No parênquima pulmonar, a elastina oferece elasticidade, especialmente em níveis mais baixos de estresse, enquanto as fibras colágenas se encontram dispostas de forma mais solta e ondulada, sendo progressivamente recrutadas com o aumento do estresse, conferindo suporte contra a ruptura do tecido (Garcia e cols.,1999; Maksym e Bates, 1997). A organização e a interação entre essas fibras e não só o número absoluto destas, constituem importantes fatores que influenciam o comportamento mecânico (Mijailovich e cols., 1994; Yuan e cols.,

1997). Estudos prévios sugerem que os conteúdos de colágeno e elastina influenciam diretamente a rigidez e viscosidade do parênquima pulmonar (Faffe e cols., 2002; Faffe e cols., 2006; Fust e cols., 2004; Mercer e Crapo, 1990).

Embora a maioria dos estudos aponte a elastina como principal alvo de destruição no enfisema, as alterações fisiopatológicas também podem resultar de anormalidades na matriz de colágeno (Ito e cols., 2005). As fibras colágenas, mais rígidas, protegem o pulmão contra ruptura em grandes volumes. Assim, a presença de destruição alveolar no enfisema implica em comprometimento da rede de colágeno (Suki e cols., 2003)

A destruição alveolar presente no enfisema engloba não só a morte de células epiteliais alveolares, mas principalmente a destruição da matriz extracelular (MEC) que compõe a estrutura do parênquima pulmonar. O pulmão enfisematoso apresenta perda de paredes alveolares com conseqüente destruição de partes do leito capilar, com prejuízo da função pulmonar e conseqüentemente das trocas gasosas (Heard, 1969)

A destruição da matriz pulmonar presente no enfisema, com degradação das fibras que compõem o parênquima e conseqüente desarranjo da rede de interdependência alveolar, contribui para a limitação de fluxo aéreo, reduzindo o recolhimento elástico pulmonar, bem como a sustentação das vias aéreas. Ademais, a inflamação de pequenas vias aéreas também contribui para as alterações funcionais observadas no enfisema.

O processo inflamatório provoca aumento de espessura da parede das vias aéreas, juntamente com indução de fibrose e hipertrofia da camada muscular lisa, resultando em estreitamento e instabilidade da luz dos espaços

aéreos; o aumento do número de células inflamatórias correlaciona-se com o comprometimento do parênquima pulmonar (Saetta e cols., 2002).

Em um movimento cíclico de distensão e recolhimento, a microestrutura do parênquima pulmonar atua como um suporte de tensão (Lai-Fook e cols., 1977), a pressão transpulmonar (força de distensão do pulmão) é transmitida através do parênquima, distendendo todas as estruturas intrapulmonares (Mead e cols., 1957; Segundo Lai-Fook e cols., 1977). Fibras dispostas em rede podem exibir propriedades viscoelásticas e histeréticas (Brown e cols., 1994; Bull e cols., 1957; Sasaki e cols., 1993), porém, com a evolução da doença e a hiperinsuflação pulmonar resultante, estas propriedades tornam-se ineficientes e o pulmão torna-se menos complacente, ou seja, mais rígido.

1.3.1 Proteínas estruturais fibrosas

1.3.1.1 Fibras colágenas

As fibras colágenas são as mais freqüentes do tecido conjuntivo e têm como função promover um arcabouço extracelular, sendo constituídas de uma escleroproteína denominada colágeno. O colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano (Abergel e cols, 1985). Tais fibras são os principais constituintes da MEC, desempenhando funções importantes na homeostase e respostas celulares em condições de lesão do parênquima pulmonar (Goldstein, 1991)

Foram isolados ao menos 6 tipos de fibras colágenas:

- I, II, III, do tipo fibrilares ou intersticiais, são as principais;
- IV, V e VI, não fibrilares ou amorfas.

Segundo Suki e cols, (2005), o colágeno tipo I é uma das principais proteínas do interstício pulmonar, importante no desenvolvimento e nas reações fibróticas.

O turnover do colágeno, é um processo cíclico necessário para a manutenção da arquitetura normal do pulmão. Em presença de agressões leves, a produção de colágeno é limitada e capaz de restaurar a arquitetura pulmonar.

Por outro lado, lesões graves podem resultar em cicatriz generalizada, com consequente destruição da arquitetura e função pulmonares, indicando que o processo biomecânico implicado na sua síntese reage muito rapidamente à agressão (Chesnutt e cols., 1997; Armstrong e cols., 1999; Rocco e cols., 2001). A substituição de colágeno tipo III por tipo I, mais rígido, pode responder por distúrbios nas trocas gasosas e alterações fisiológicas em estágios tardios de fibrose (Entzian e cols., 1990).

Modelos experimentais de enfisema pulmonar induzido por proteases descrevem uma inicial perda de colágeno e elastina. Posteriormente, com a normalização dos níveis de glicosaminoglicanos e elastina, ocorre um aumento dos níveis do colágeno (Kuhn e cols, 1976).

1.3.1.2 Fibras elásticas

As fibras elásticas são encontradas associadas às fibrilas de colágeno e têm a função de fornecer elasticidade ao tecido. Apresentam, como componente principal, a elastina, uma escleroproteína mais resistente que o colágeno, e a microfibrila elástica, formada por glicoproteína especializada.

Estas fibras cedem facilmente às trações, porém retornam à sua forma original tão logo cessem as forças deformantes (Gerli e cols., 1990).

As propriedades das fibras elásticas dependem de seu componente amorfo. Nos processos de reparação pulmonar, após a destruição de fibras maduras do sistema elástico, ocorre gradual substituição por fibras mais imaturas, pobres em elastina e, portanto, menos extensíveis (Starcher, 2000). A renovação da elastina faz-se necessária para o crescimento tecidual e remodelamento.

Esse processo, porém, é muito lento e requer enzimas específicas para iniciar sua degradação. Dessa forma, sob condições normais, ocorre pouco remodelamento de fibras elásticas na vida adulta (Montes, 1992).

Após uma agressão, as fibras elásticas, assim como as fibras colágenas, se reorganizam durante o processo de remodelamento da MEC. Além disso, esse processo pode ser parcialmente responsável pela perda da arquitetura normal das paredes alveolares, pois a destruição intensa do sistema elástico leva à reativação da síntese de elastina, porém de forma desorganizada, com prejuízo às propriedades mecânicas do pulmão (Negri e cols., 2000). Estudos realizados por Johanson e cols, (1973), e Kuhn e cols, (1976), relataram a destruição e a anormal reparação das fibras elásticas dos pulmões de animais expostos a enzimas proteolíticas, nos modelos experimentais de enfisema pulmonar, com significativa redução destas no período de quinze dias pós-exposição.

1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA INDUZIDO POR PAPAÍNA

Apesar da vasta descrição dos aspectos celulares e moleculares envolvidos, pouco foi explorado em relação ao comportamento funcional dos animais nesses modelos. Em camundongos, as características da DPOC humana podem ser modeladas pela administração de proteases, agentes químicos, partículas e exposição à fumaça de cigarro.

A reprodução da doença em animais visa elucidar dúvidas com relação a fisiopatologia e viabilizar formas de tratamento, desta forma, vários modelos experimentais têm sido usados para o estudo do enfisema pulmonar. Muitas espécies foram utilizadas, incluindo roedores, cães, cobaias, macacos e ovelhas (Mahadeva e Shapiro, 2002; Shapiro, 2000; Wright e Churg., 1990; Wendel, e cols., 2000; Dhami e cols., 2000). No entanto, os camundongos oferecem maior vantagem para investigação das vias patogênicas da doença, devido aos avanços na engenharia genética, grande quantidade de informações sobre o genoma de camundongos e abundância de anticorpos específicos disponíveis (Lopes e cols., 2009).

Embora inúmeras espécies sejam utilizadas em diferentes protocolos de modelos animais, Borzone e cols.,(2007), ressaltam as diferenças entre duas espécies no desenvolvimento do enfisema induzido por protease. Em seu estudo, tanto hamsters quanto ratos, desenvolveram as características do enfisema e apresentaram inflamação e aumento do diâmetro alveolar médio após receberem instilações de proteases, sendo estas alterações significativamente maiores em hamsters.

O modelo ideal de DPOC permitiria reproduzir todas as diferentes lesões anatômicas associadas à doença, ou seja, a bronquite crônica, a bronquiólite obliterante e o enfisema pulmonar em um curto período de tempo. No entanto, os modelos disponíveis reproduzem principalmente os quadros de enfisema pulmonar, dada à vasta lesão ocasionada no parênquima pulmonar. Desta forma, a instilação pulmonar de proteases com atividade “elastolítica”, como a papaína, tem sido extensamente usada em animais de laboratório, e os resultados das modificações causadas na morfologia e fisiologia pulmonar são similares ao enfisema humano panlobular/panacinar (Pushpakom e cols., 1970; Hayes e cols., 1975). O modelo de enfisema pulmonar induzido pela instilação de papaína é amplamente descrito, e o desenvolvimento da doença ocorre rapidamente, estabelecendo-se a forma grave da doença após a instilação da protease, pois o camundongo é descrito como um animal suscetível ao desenvolvimento do enfisema (Lopes e cols., 2009).

A papaína é uma enzima proteolítica proveniente do látex das folhas e frutos do mamão verde adulto, *Carica papaya*, cultivado nos países tropicais. A extração do látex do mamão se dá por incisões no fruto, havendo a liberação de um exsudato fluido límpido, aquoso, sensível ao oxigênio e ao calor. Na forma industrializada, esse látex, depois de seco, pulverizado e peneirado é acondicionado adequadamente em frascos de polietileno e comercializado, devendo ser mantido ao abrigo da luz (Gross e cols., 1964; Takaro e White, 1973).

A indução do enfisema pela instilação pulmonar de papaína baseia-se na teoria de um desequilíbrio gerado por ela, na produção de substâncias agressoras e protetoras do ácido pulmonar (Janoffi, 1985). Gross e cols.;

(1964) foram os primeiros a conseguir reproduzir um modelo experimental de enfisema induzido por papaína em ratos. Foram realizadas instilações de papaína intratraquealmente e os resultados foram similares ao do enfisema humano.

Após, muitos outros modelos foram testados, como os de Takaro e White (1973) também com instilações traqueais de papaína em cães, e Haddad e cols.,(1979) pela nebulização de solução contendo papaína. Nestes estudos foram vistas alterações na mecânica ventilatória coerentes com o enfisema em humanos: aumento da capacidade residual funcional, do volume pulmonar total, alterações na complacência, e redução da pressão de retração elástica.

Adicionalmente, Churg e cols., (2008), e Pemberton e cols., (2006), descreveram proteção de 67 e 72% contra o desenvolvimento de enfisema após administração de antiproteases, ressaltando a importância do desequilíbrio protease-antiprotease no desenvolvimento da doença.

Estudos de Snider e cols, (1986 e 1992) descrevem que a administração traqueal de proteases inicialmente leva à desorganização da matriz extracelular, resultando em arquitetura anormal das vias aéreas e alargamento do espaço aéreo. Segundo Kuhn e Starcher, (1980) a indução da lesão elastolítica é seguida por uma resposta inflamatória, que ocasiona a perda de colágeno e elastina, aumentando o diâmetro alveolar médio, dentre outras alterações funcionais.

Estas alterações foram confirmadas por Fló e cols., (2005) e Fusco e cols., (2001) que demonstraram adicionalmente, maior diâmetro alveolar médio e capacidade residual funcional nos animais que foram ventilados mecânicamente ou que fizeram atividade física após a instilação de papaína.

Pastor e cols., (2006), demonstram, ainda, o aumento do número de fenestrações nas unidades alveolares e do diâmetro alveolar médio em ratos Wistar que receberam papaína, e redução do número de macrófagos ao longo de três, dez e sessenta dias de exposição.

A DPOC será até 2020 a 5ª causa de incapacidade no mundo (Michaud e cols., 2001; Sullivan e cols., 2000) e há 20 anos é observado um aumento progressivo do acometimento de mulheres pela doença, principalmente com o avançar da idade. Alguns estudos atribuem este fato ao aumento das taxas do tabagismo feminino, embora a prevalência continue a ser inferior a dos homens (Mannino e cols., 2002). Mulheres, em comparação com homens, apresentam um rápido declínio da função pulmonar com o avançar da idade e este declínio se inicia entre 45 e 50 anos, período que corresponde a peri- e pós-menopausa, ou seja, a idade parece ser um fator determinante nas alterações da função pulmonar para mulheres (Fletcher e Peto, 1977). Em mulheres, a exposição ao fumo está relacionada à maior hiperreatividade brônquica e inflamação quando comparada aos homens (O'Byrne e cols., 1984). Dransfield e cols., (2007); Gan e cols., (2006) e Martinez e cols., (2006), ressaltam as diferenças entre os gêneros no desenvolvimento do enfisema e Sverzellatti e cols., (2009), descrevem que o gênero influencia a relação entre enfisema e características clínicas.

Dada à complexidade da fisiopatologia do enfisema pulmonar, existe grande interesse na compreensão dos mecanismos envolvidos nesta doença, o que tem sido realizado por meio de modelos experimentais utilizando animais de ambos os gêneros.

1.5 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

1.5.1 Noções básicas

A respiração representa um processo cíclico, envolvendo trabalho mecânico dos músculos respiratórios para a movimentação do sistema respiratório. Dois componentes constituem o sistema respiratório: o pulmão e a parede torácica. Como parede torácica subentende-se todas as estruturas em movimento durante o ciclo respiratório à exceção dos pulmões. A pressão motriz, gerada pela contração muscular durante a inspiração, precisa vencer forças de oposição, tais como: a) forças elásticas dos tecidos pulmonares e parede torácica; b) forças resistivas resultantes do fluxo de gás pelas vias aéreas e movimentação das moléculas constituintes do tecido pulmonar e dos tecidos da parede torácica (D'Angelo, 1994); c) forças viscoelásticas dos tecidos pulmonares e da parede torácica; d) forças plastoelásticas responsáveis pela histerese (Hildebrandt, 1970); e) forças inerciais (dependem da massa dos tecidos e dos gases) (Mead, 1961); f) forças gravitacionais (incluídas nas forças elásticas) (Milic-Emili, 1977); e g) forças de distorção da parede torácica. Contudo, durante a respiração basal, considera-se as forças inerciais e de distorção da parede como desprezíveis (Rodarte e Rehder, 1986).

A elasticidade é uma propriedade da matéria que permite ao corpo retornar à sua forma original após ter sido deformado por uma força sobre ele aplicada. Um corpo perfeitamente elástico como uma mola, obedecerá à lei de Hooke, ou seja, a variação de comprimento é diretamente proporcional à força aplicada, até que seu limite elástico seja atingido. Em visão tridimensional, teríamos volume proporcional à pressão. O tecido pulmonar e a parede torácica

possuem propriedades elásticas e obedecem à lei de Hooke, de modo que quanto maior a pressão motriz, maior o volume de gás inspirado. A tangente da curva volume-pressão ou a relação entre a variação de volume gasoso mobilizado (ΔV) e a pressão motriz necessária para manter o sistema respiratório insuflado é conhecida como complacência do sistema respiratório (C_{rs}). Logo, $C_{rs} = \Delta V/P_{el,rs}$, onde $P_{el,rs}$ corresponde à pressão elástica do sistema respiratório.

Cabe ressaltar que, ao invés de complacência, utiliza-se freqüentemente a variável elastância, que corresponde ao inverso da complacência ($E_{rs} = 1/C_{rs}$), ou seja, representa a relação entre a variação de pressão e o volume mobilizado resultante. O cálculo da elastância do sistema respiratório apresenta vantagens, já que as elastâncias do pulmão (E_L) e da parede torácica (E_w) são adicionadas diretamente: $E_{rs} = E_L + E_w$, enquanto se somam os inversos das complacências: $1/C_{rs} = 1/C_L + 1/C_w$.

Dois fatores respondem pelo comportamento elástico do pulmão. Um deles é representado pelos componentes elásticos do tecido pulmonar (fibras elásticas e colágenas). Acredita-se que o comportamento elástico do pulmão não dependa do simples alongamento das fibras de tecido conjuntivo, mas, principalmente, do seu arranjo geométrico. Todas as estruturas pulmonares encontram-se interligadas pela trama de tecido conjuntivo pulmonar, de forma que, quando há insuflação, todos esses componentes se dilatam. Esse fenômeno chama-se “interdependência” e contribui para manter todos os espaços aéreos abertos.

Além das propriedades elásticas dos tecidos pulmonares, os pulmões ainda apresentam um importante fator a contribuir para as suas características

elásticas: a tensão superficial exercida pelas moléculas recobrimo a zona de troca gasosa. Existe tensão superficial na interface ar-líquido porque as moléculas do líquido são atraídas com maior intensidade para o interior do próprio líquido do que para a fase gasosa acima deste. A tensão superficial tem a propriedade importante de gerar pressão no interior de uma bolha. A relação entre a tensão superficial na parede e a pressão desenvolvida dentro da bolha de sabão é dada pela Lei de Laplace. Essa lei afirma que, para cada superfície da bolha, a pressão (P) é proporcional ao dobro da tensão (T) desenvolvida pelo raio (r), ou, para ambas as superfícies, $P = 4T/r$. Entretanto, quando somente uma interface está envolvida, como em um alvéolo esférico revestido por líquido na sua face interna, o numerador apresenta o número 2 em lugar de 4. Considerando-se dois alvéolos de diferentes tamanhos conectados através de uma via aérea comum, e com tensão superficial semelhante, pode-se depreender, com base na Lei de Laplace, que a pressão no alvéolo menor seria maior do que no alvéolo maior. Desta forma, os alvéolos menores esvaziar-se-iam nos maiores, resultando em alvéolos colapsados e ductos alveolares hiperinsuflados. Contudo, isso não ocorre nos pulmões normais, pois a tensão superficial do surfactante, líquido de composição protéica e, principalmente, fosfolipídica secretado pelos pneumócitos tipo II, é consideravelmente menor do que a da solução salina que recobre as mucosas pulmonares. Dessa forma, há um equilíbrio entre os alvéolos maiores e menores, com mesma pressão mantida em seus interiores.

Durante a movimentação do sistema respiratório, quando ocorre fluxo de gás, um elemento adicional ao elástico precisa ser vencido pela pressão motriz: a resistência. A resistência do sistema respiratório (R_{rs}) pode ser calculada

dividindo-se a pressão resistiva do sistema respiratório ($P_{res,rs}$) por fluxo aéreo. $P_{res,rs}$ representa a pressão necessária para vencer seus componentes resistivos. Semelhantemente à complacência, e pelas mesmas razões, a resistência do sistema respiratório se subdivide em seus componentes pulmonar e de parede.

A resistência pulmonar pode ser subdividida em dois subcomponentes: a resistência das vias aéreas (R_{aw}), que depende do fluxo de ar no interior dos pulmões, e a resistência tecidual (R_{tis}), determinada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade (isto é, atrito) pertinente à movimentação do pulmão. A resistência das vias aéreas pode ser influenciada pela geometria da árvore traqueobrônquica, pelo volume pulmonar, pela complacência das vias aéreas, pela densidade e viscosidade do gás inspirado e pela musculatura lisa dos brônquios. A resistência tecidual depende da velocidade do deslocamento, o que é importante tanto durante a inspiração como na expiração. A resistência da parede torácica também sofre influência das perdas energéticas geradas pela viscosidade pertinente à movimentação das moléculas que constituem os tecidos da parede torácica.

Além dos componentes elásticos e resistivos, o sistema respiratório apresenta, também, propriedades viscoelásticas, tanto no tecido pulmonar quanto na parede torácica. A viscoelasticidade foi descrita a partir do comportamento de fios de seda. Esse tipo de material obedece à lei da proporcionalidade entre a força aplicada e o alongamento resultante (Lei de Hooke), porém apenas por um curto período de tempo após a aplicação da força. Quando se mantém a carga por um tempo prolongado, o alongamento

passa a aumentar continuamente. Este fenômeno está presente em vários tecidos animais (Dorrington, 1980).

Substâncias viscoelásticas, quando mantidas sob deformação constante, apresentam queda da tensão, chamada de relaxamento de tensão (“*stress relaxation*”), ou simplesmente, relaxamento, quando o corpo é estirado. Por outro lado, sob tensão constante, o corpo tende a se deformar continuamente com o decorrer do tempo, fenômeno chamado “*creep*”. Ressalte-se que esta deformação não é irreversível, mas sim reproduzível, podendo ser repetida, desde que seja precedida por um período de tempo onde o material permaneça em condições de repouso, a fim de apagar a memória do evento anterior. A viscoelasticidade permite o intercâmbio de energia (pressão) entre o componente elástico e o resistivo. Por exemplo, durante uma pausa inspiratória, a energia potencial (pressão) acumulada no componente elástico pode ser dissipada sob a forma de calor pelo componente resistivo.

1.5.2 Estudo da Mecânica Respiratória

Na tentativa de compreender a complexidade do sistema respiratório e seus componentes (pulmão e parede torácica), além dos diversos mecanismos envolvidos durante a respiração, foram utilizados modelos matemáticos relativamente simples, que se aproximam da realidade. Para tanto, faz-se necessária a interpretação fisiológica de variáveis mensuráveis como fluxo, volume e pressão na abertura das vias aéreas.

O modelo mais simples utiliza 2 elementos, uma resistência (representada por um tubo) e uma elastância (representada por um balão)

(Figura 7). Esse modelo baseia-se na assertiva de que as propriedades mecânicas do sistema respiratório independem do volume pulmonar e do fluxo, e que os fatores inerciais são desprezíveis. Considerando-se o sistema respiratório normal, esse modelo pode ser utilizado, e tornou-se tão popular que geralmente refere-se à equação a ele associada como "equação de movimento do sistema respiratório". Essa equação é dada por:

$$P(t) = E.V(t) + R.V'(t)$$

onde, em qualquer instante t , E e R representam, respectivamente, a elastância e a resistência do sistema respiratório e P significa a pressão motriz capaz de produzir volume (V) e fluxo aéreo (V'). Entretanto, apesar do modelo de compartimento único continuar sendo amplamente utilizado, não é possível empregá-lo com precisão para o estudo da mecânica em presença de doenças pulmonares, sendo necessário um modelo de dois ou mais compartimentos, que apresentem diferentes constantes de tempo para descrever o comportamento mecânico do sistema respiratório. Além disso, essa equação de movimento não explica o decaimento lento da pressão traqueal observado após oclusão das vias aéreas ao final da inspiração (Bates e cols., 1985a; 1985b; Don e Robson, 1965), a dependência de frequência de R e E na faixa de 0-2 Hz (Barnes e cols., 2000; Bates e cols., 1988; Brusasco e cols., 1989; Hantos e cols., 1986; 1987), bem como a presença de histerese na curva volume-pressão quase-estática em pulmões isolados (Similowski e Bates, 1991).

Passa-se, então, ao estudo da mecânica respiratória utilizando-se modelos bicompartimentais que consideram a heterogeneidade de distribuição de gás nos pulmões (Mead, 1961) e a viscoelasticidade dos tecidos (Mount, 1955).

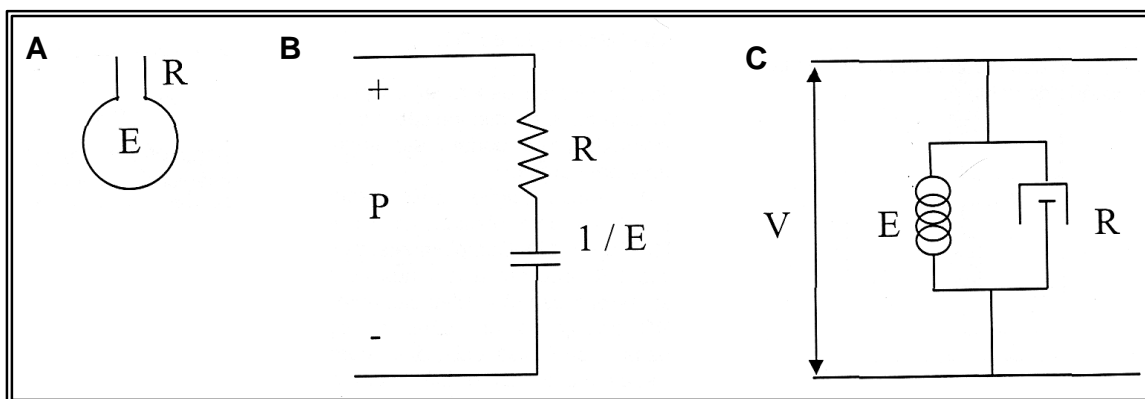


Figura 7- Modelo linear uni-compartimental. Representação anatômica (A), elétrica (B) e reológica (corpo de Voigt, C). R, resistência do sistema respiratório; E, elastância do sistema respiratório; V, variações de volume; P, pressão (Bates, 1985)

Na década de 60 foram descritos os primeiros modelos biocompartimentais para estudo da mecânica respiratória, associando a natureza multicompartmental do sistema respiratório a heterogeneidade da distribuição de gás nos pulmões (Otis e cols., 1956; Mead, 1969) ou à viscoelasticidade dos tecidos (Mount, 1955).

Em 1985, Bates e cols. representaram o modelo, originalmente proposto por Mount, na forma de um modelo físico composto por elementos elásticos representados por molas e por elementos resistivos expressos por amortecedores (Bates e cols., 1985b). Os autores realizaram uma análise teórica do comportamento não homogêneo do sistema respiratório submetido à ventilação mecânica com fluxo inspiratório constante, seguida por oclusão súbita das vias aéreas. Imediatamente após a oclusão, ocorre uma queda rápida da pressão traqueal (ΔP_1), indo do seu valor máximo (P_{max}) até um ponto de inflexão (P_i), seguida por uma queda lenta (ΔP_2) até atingir um platô, que corresponde à pressão de retração elástica do sistema respiratório (P_{el}), como mostrado na Figura 8.

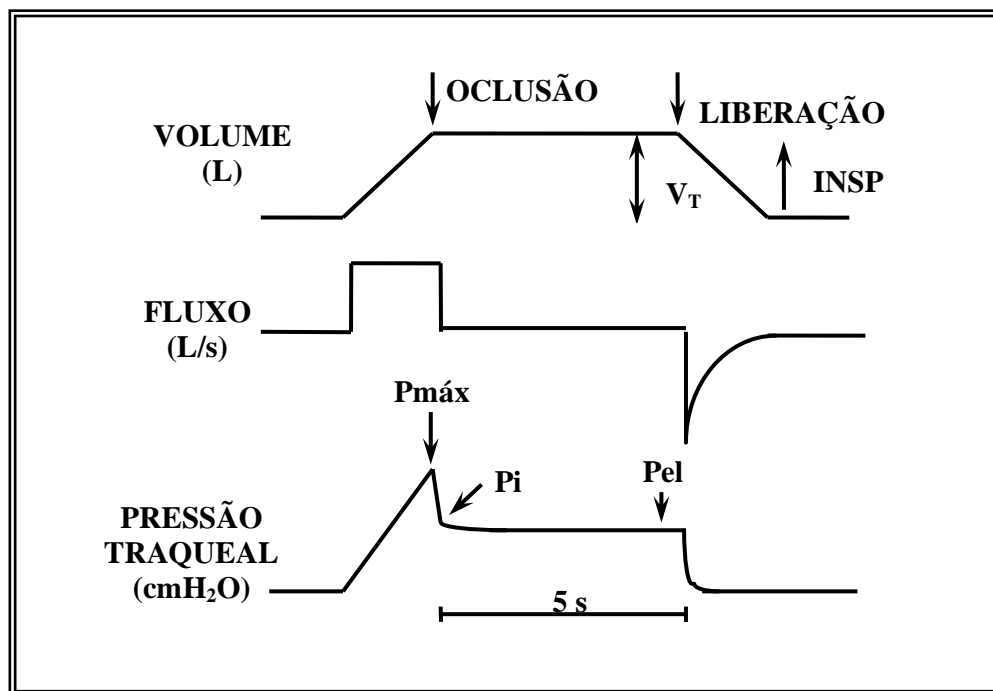


Figura 8 – Esquema do método de oclusão ao final da inspiração. Registros de volume, fluxo aéreo e pressão traqueal em função do tempo. O platô da pressão traqueal ocorreu após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas ao término da inspiração, atinge-se o valor máximo de pressão ($P_{máx}$), seguido de uma queda rápida na pressão transpulmonar até ser atingido um ponto de inflexão (P_i). Essa primeira queda de pressão (ΔP_1) corresponde à pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão. Em seguida ocorre uma queda lenta da pressão (ΔP_2) correspondente à pressão gasta para vencer os componentes viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão, até se chegar a um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar (P_{el}). INSP, inspiração; V_T , volume corrente.

O modelo de Bates e cols.,(1988) é constituído por dois submodelos, pulmão e parede torácica, apresentando um arranjo em paralelo, uma vez que são submetidos à mesma variação de volume (Figura 9). A subunidade pulmonar consiste de um amortecedor, representando a resistência das vias aéreas ($R_{nit,L}$) em paralelo com um corpo de Kelvin, que consiste de uma mola representando a elastância estática (Est,L) em paralelo com um corpo de Maxwell, caracterizado por uma mola, componente elástico (E_2,L), e um amortecedor, componente resistivo (R_2,L), dispostos em série. E_2, L, R_2,L e a

constante de tempo correspondente ($\tau_{2,L} = R_{2,L}/E_{2,L}$) estimam as propriedades viscoelásticas do pulmão. Já a subunidade da parede torácica é representada por uma resistência ($R_{in,w}$) e pelo corpo de Kelvin, caracterizado pela elastância estática da parede torácica ($E_{st,w}$) e pelos parâmetros que correspondem a viscoelasticidade ($E_{2,w}$, $R_{2,w}$ e $\tau_{2,w}$). (Bates e cols., 1988)

Quando se alonga esse modelo (afastamento das duas barras horizontais), a uma velocidade constante (v), a carga da mola E_2 aumenta com o tempo (T_i) e a velocidade do amortecedor R_2 se aproxima da velocidade de alongamento (v); assim, a força exercida pela mola E_2 aproxima-se de $R_2.v$. Se for realizada uma interrupção de fluxo, o movimento relativo das duas barras horizontais cessa. Com isso, o comprimento da mola E_2 diminui gradualmente até atingir seu comprimento de equilíbrio. Logo, nesse modelo, o decaimento pressórico lento (ΔP_2), observado após a interrupção do fluxo, é interpretado como equivalente ao relaxamento da mola E_2 , resultando em dissipação calórica de energia no amortecedor R_2 .

A queda de pressão que ocorre imediatamente após a oclusão das vias aéreas, durante a insuflação pulmonar com fluxo constante, fornece a variação de pressão do sistema respiratório que seria obtida na ausência de desigualdades da constante de tempo e “stress relaxation”, ou seja, o componente viscoso ou homogêneo do sistema respiratório. A queda mais lenta da pressão, que ocorre subsequente até ser atingindo o platô, reflete a pressão dissipada em decorrência da viscoelasticidade e/ou heterogeneidade do sistema, as quais determinam, respectivamente, o “stress relaxation” e o “pendelluft” (Bates e cols., 1985a; 1988).

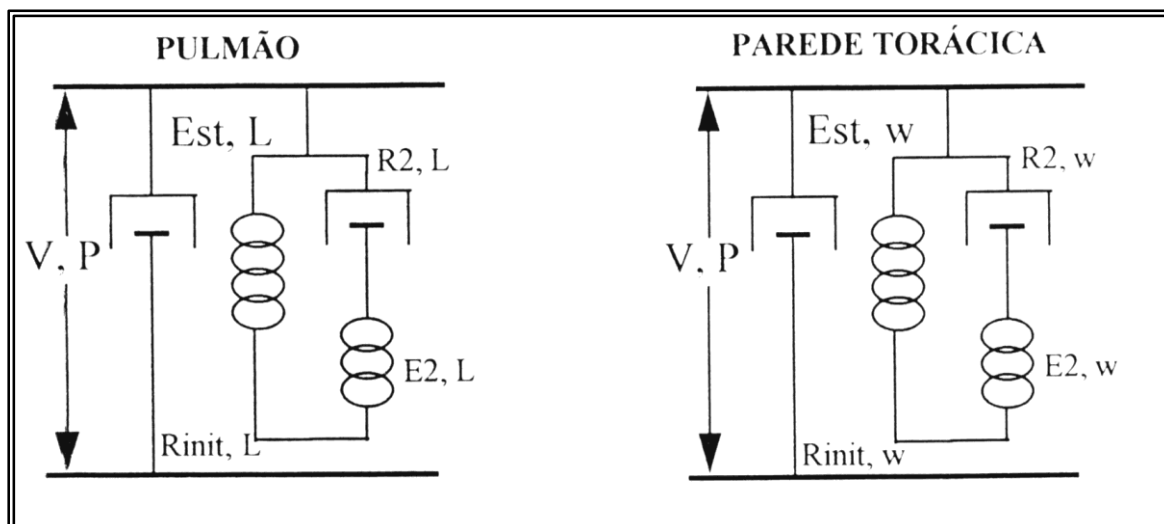


Figura 9 - Modelo de molas e amortecedores para interpretação da mecânica do sistema respiratório com a técnica de interrupção do fluxo, proposto por Bates e cols., (1985). Pulmão e parede torácica apresentam um componente resistivo ($R_{init,L}$ e $R_{init,w}$, respectivamente) em paralelo com um corpo de Kelvin; este é composto por componente elástico (Est,L e Est,w , respectivamente), representando a elastância estática dos dois compartimentos, em paralelo com um corpo de Maxwell, conjunto de amortecedor e mola em série ($R_{2,L} - E_{2,L}$, e $R_{2,w} - E_{2,w}$, respectivamente), os quais representam o comportamento viscoelástico. A distância entre as duas barras horizontais é análoga ao volume pulmonar (V) e a tensão entre elas é análoga à pressão na abertura das vias aéreas (P).

Relaxamento de estresse pulmonar é a capacidade do pulmão de se adaptar a uma insuflação mantida, apresentando redução da pressão em função do tempo. Quando permanece sob um comprimento constante (volume), o pulmão pode alterar sua tensão com o tempo, logo, o gradiente de pressão diminui progressivamente. O relaxamento de estresse ocorre após alterações súbitas do comprimento. Nesse caso, o tempo necessário para o estiramento é menor do que a constante de tempo ($\tau_2 = R_2.C_2$). O relaxamento de estresse depende do realinhamento da matriz extracelular e de perdas de energia nos tecidos pulmonares e na interface ar-líquido (Hori e Hildebrandt, 1971). Já o *pendelluft* é a transferência de um pequeno volume de gás dos compartimentos pulmonares de maior pressão para os compartimentos de

menor pressão, representando o reajuste estático das diferenças regionais de volume pulmonar resultantes de desigualdades de constante de tempo (Bates e cols., 1985a; Otis e cols., 1956).

Vários fatores contribuem para o *stress relaxation* no pulmão, como o fenômeno de abertura e fechamento das vias aéreas e espaços alveolares, e as perdas de energia nos tecidos e na interface ar-líquido. As fibras de colágeno e elastina, isoladamente, apresentam pouca adaptação ao estiramento, mas o arranjo da matriz fibroelástica apresenta contribuição significativa para este fenômeno. Alguns autores ressaltam o papel da interface ar-líquido como o principal determinante do *stress relaxation* no pulmão (Horie e Hildebrandt, 1971).

O comportamento não homogêneo da parede torácica não está completamente esclarecido. A parede torácica pode se comportar como um sistema de dois compartimentos, um de baixa complacência, representando pela caixa torácica e outro de complacência mais elevada, o abdômen (Peslin e cols., 1975). Além disso, a pressão intrapleural não é uniforme em toda a cavidade torácica, sendo afetada pela contração do diafragma e pela movimentação do abdômen (D'Angelo e cols., 1974). As propriedades mecânicas do sistema respiratório podem sofrer influência da parede abdominal (Zin e cols., 1989), ajudando a explicar a queda não homogênea da pressão pleural após a oclusão das vias aéreas. A abertura extensa da parede abdominal leva ao aumento de elastância e resistência, provavelmente secundário à redistribuição de volumes gasosos no pulmão (Zin e cols., 1989).

O primeiro estudo em animais realizado de acordo com o proposto por Bates e cols. (Bates e cols., 1985b), com subdivisão do sistema em seus

componentes pulmonar e de parede, foi realizado por Saldiva e cols., (1987). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram a contribuição significativa da parede torácica para as desigualdades do sistema respiratório (Auler e cols., 1987; D'Angelo e cols., 1994; Macedo-Netto e cols., 1998; Moreira e cols., 1997; Rocco e cols., 1999; Zin e cols., 1989), comprovando que elas podem ser atribuídas aos componentes pulmonar e de parede.

O método de oclusão das vias aéreas após insuflação com fluxo constante não é capaz de determinar a contribuição relativa do *pendelluft* (desigualdades de constantes de tempo) e do *stress relaxation* (componente viscoelástico) para o desenvolvimento da queda lenta observada na pressão traqueal (Bates e cols., 1985a; 1988; Kochi e cols., 1988b). No entanto, vários autores acreditam ser maior a contribuição representada provavelmente pelo *stress relaxation* (Bates e cols., 1988; Kochi e cols., 1988a; Similowski e cols., 1991).

No final dos anos 80, foi demonstrada, por meio do método de oclusão ao final da inspiração, a dependência das resistências pulmonares, de parede e do sistema em relação ao fluxo e volume (Kochi e cols., 1988a e 1988b). Em condições de isovolume, as resistências intrínsecas pulmonares ($R_{int,L}$), da parede ($R_{int,w}$) e do sistema respiratório ($R_{int,rs}$) aumentam linearmente com o aumento do fluxo, enquanto a pressão necessária para vencer a viscoelasticidade e/ou inomogeneidade e o *pendelluft* ($\Delta P_{2,L}$, $\Delta P_{2,w}$ e $\Delta P_{2,rs}$) aumenta progressivamente, mas a variação deste crescimento decai, chegando a zero (Similowski e cols., 1989). Em outras palavras, se fosse possível calcular uma resistência utilizando-se esses valores de pressão e fluxo no momento da oclusão, ela cairia com a elevação do fluxo. Na situação de

isofluxo, aumentando-se o volume, $R_{init,L}$, $R_{init,w}$ e $R_{init,rs}$ decrescem, enquanto que $\Delta P_{2,L}$, $\Delta P_{2,w}$ e $\Delta P_{2,rs}$ aumentam de modo similar àquele obtido em situação de isovolume (D'Angelo e cols., 1989; Kochi e cols., 1988a e 1988b; Similowski e cols, 1989).

Em 1988, o modelo de oclusão ao final da inspiração foi validado por estudos utilizando-se cápsulas posicionadas em pontos diferentes da superfície pleural (Bates e cols., 1988). Ao medir diretamente a pressão alveolar, comprovou-se ser esta homogênea em todo o pulmão, apresentando pico de pressão coincidente com o ponto de inflexão (P_i) observado na curva de pressão traqueal. Logo, a pressão alveolar mostra comportamento semelhante ao encontrado na segunda fase da pressão traqueal, a de queda lenta. Tal observação indica que a variação de pressão responsável pela queda lenta (ΔP_2) ocorre em consequência a um fenômeno nas vias aéreas bem distais, alvéolo e tecido pulmonar.

Logo, ΔP_2 é uma manifestação do comportamento tecidual de adaptação ao estresse (Bates e cols., 1988; Saldiva e cols., 1992).

Apesar de haver diversas técnicas para analisar a mecânica do sistema respiratório, nos últimos anos o método da oclusão ao final da inspiração vem sendo bastante utilizado, tanto em animais, quanto em seres humanos anestesiados (Auler e cols., 1987; Bates e cols., 1985b; D'Angelo e cols., 1994; 1989; Macedo-Neto e cols., 1998; Rocco e cols., 1999; Saldiva e cols., 1987). Esse método foi empregado no presente trabalho, por fornecer informações individualizadas sobre o componente pulmonar e permitir a análise de suas propriedades elástica, viscosa e viscoelástica.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A DPOC é uma importante causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo. As projeções da Organização Mundial da Saúde alertam que em 2030, a DPOC causará 10 milhões de mortes, significando mais óbitos do que a síndrome da imunodeficiência adquirida, tuberculose, acidentes automobilísticos, suicídio e homicídios combinados (Pauwels e cols., 2001).

Apesar da vasta descrição dos aspectos celulares e moleculares envolvidos, a patogenia da DPOC permanece não completamente esclarecida e pouco tem sido explorado em relação ao comportamento funcional dos animais nesses modelos.

O fumo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do enfisema pulmonar, porém apenas 20% dos fumantes desenvolvem a doença, o que torna o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na gênese do enfisema fundamental.

A descoberta de que humanos com deficiência de α 1- antitripsina encontram-se mais susceptíveis ao enfisema (Laurell e cols., 1963), gerou a hipótese protease-antiprotease, que até os dias de hoje, é a teoria mais aceita no desenvolvimento do enfisema. Desde então, modelos animais de ambos os gêneros são utilizados em estudos que buscam a maior compreensão da fisiopatologia e o desenvolvimento de terapias celulares envolvendo esta afecção.

Em seres humanos, as diferenças no desenvolvimento da doença em ambos os sexos é sugerida por estudos epidemiológicos (Martinez e cols., 2006; Gan e cols., 2006; Dansfield e cols., 2007), o que torna esta investigação relevante em animais de diferentes gêneros.

A patogênese do enfisema, hoje largamente obtida em modelos animais sugere que o influxo neutrofílico agudo no pulmão, seguido de acumulação subaguda de outras células inflamatórias do sistema imune (e talvez células residentes) liberam proteases elastolíticas em excesso no microambiente local, causando destruição da matriz extracelular do pulmão. No modelo induzido por papaína, a destruição ocorre pela ação direta da protease, associada ao estresse oxidativo e processo inflamatório gerados. O ineficaz reparo alveolar e de fibras elásticas, colágenas e talvez de outros componentes da matriz extracelular, resulta em alargamento do espaço aéreo e hiperinsuflação pulmonar definido como enfisema pulmonar.

O presente trabalho estuda a evolução temporal das propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares, bem como a histologia e o processo inflamatório por meio de ensaios bioquímicos de estresse e dano oxidativos do pulmão em um modelo murino de exposição à papaína.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO

Estabelecer um modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína, com alteração funcional, que possa ser utilizado em estudos da fisiopatologia e de terapias celulares na DPOC, avaliando um possível dimorfismo sexual na gênese da doença.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da instilação intratraqueal de papaína em camundongos machos e fêmeas sobre:

- a variação do peso dos animais ao longo do protocolo experimental;
- as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inhomogêneas do pulmão pelo método de oclusão ao final da inspiração;
- a celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar;
- o conteúdo de fibras colágenas e do sistema elástico;
- o diâmetro alveolar médio e a capacidade residual funcional;
- o processo inflamatório e o estresse oxidativo ocasionados após a exposição à papaína.

MATERIAIS E MÉTODOS

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais Utilizados

Trinta camundongos BALB/c, machos e fêmeas, oriundos do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas, com 6 semanas, pesando 20 ± 5 g (média \pm erro padrão), foram aleatoriamente alocados em quatro grupos para experimentos de medida da mecânica respiratória e estudo histopatológico. Cabe salientar que foram desconsiderados deste n total (n= 30) os animais que morreram durante o protocolo (2 animais grupo PAPM, 2 animais do grupo PAPF e 1 animal SALF).

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 (*U.S. Department of Health and Humane Services*, 1985) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Centro de Ciências da Saúde, UFRJ.

4.2 - Caracterização dos Grupos Experimentais

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

- GRUPO SALINA FÊMEA (SALF) n = 6 – os camundongos receberam 50 μ l de salina (0,9% NaCl), instilados via intratraqueal 1 vez por semana por duas semanas.
- GRUPO SALINA MACHO (SALM) n = 6 – os camundongos receberam 50 μ l de salina (0,9% NaCl), instilados via intratraqueal 1 vez por semana por duas semanas.

- GRUPO PAPAÍNA FÊMEA (PAPF) n = 9 - os camundongos receberam 50 μ l de solução (0,9% NaCl) contendo 10 U de papaína na concentração de 0,2 U/ μ L , 1 vez por semana durante duas semanas, via intratraqueal.
- GRUPO PAPAÍNA MACHO (PAPM) n=9 - os camundongos receberam 50 μ l de solução (0,9% NaCl) contendo 10 U de papaína na concentração de 0,2 U/ μ L, 1 vez por semana durante duas semanas, via intratraqueal.

4.3 - Protocolo Experimental

Para a realização de cada instilação traqueal, os animais foram sedados pela inalação de sevoflurano, pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e realizada a abertura de óstio anterior na traquéia, a devida solução foi administrada intratraquealmente por seringa de insulina. A papaína (Becton Dickinson – USP 225310) foi previamente ativada em tampão fosfato de sódio 0.1M contendo EDTA 10mM, Nacl 0,4 e 5 mM DTT (ditiotreitól) por 10 minutos a 40°C.



Figura 10: Esquema do protocolo experimental que iniciou-se em D0 com a 1ª instilação. Após 1 semana (D7) ocorreu a 2ª instilação, seguida de um período de espera que compreende o 14º dia (D 14) e o 21º dia (D 21), onde a coleta dos dados ocorreu.

Realizou-se uma instilação intratraqueal semanal, durante 2 semanas. Os animais foram pesados semanalmente. Duas semanas após a última instilação, foi realizada a coleta e análise dos dados (Figura 10).

Após o período de espera, os animais foram sedados com diazepam (1 mg, i.p.), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg, i.p.).

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

Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio (através de administração intra-peritoneal) na dose de 0,1 mg/kg. Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideu, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente (V_T) de 0,2 mL.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos a incisão cirúrgica da pele e subcutâneo, na linha média do abdome justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão medial foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica até a fúrcula esternal, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão do plano muscular abdominal foi

estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, é possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Justo antes da perfuração do diafragma, a cânula traqueal foi conectada ao transdutor de pressão.

Após a seção do diafragma, a pressão se eleva e representa a pressão de retração elástica do pulmão. Tal valor pressórico foi aplicado ao sistema como pressão positiva ao final da expiração (PEEP), que foi, em média, de 2 cmH₂O, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar e atelectasias (Rodrigues e cols., 1993, Saldiva e cols, 1992).

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

O ventilador foi ajustado previamente para gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração durante as medidas. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume corrente ($V_T = 0,2$ mL) e fluxo ($V' = 1$ mL/s) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Kochi e cols., 1988a, 1988b; Similowski e cols., 1989).

O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj, (1983), para medida de fluxo aéreo (V'), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O pneumotacógrafo é constituído por uma cânula metálica com duas saídas laterais conectadas a um transdutor diferencial de pressão,

Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo, sendo o volume corrente obtido por integração do sinal de fluxo. Pela outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal (P_{tr}) (Figura 11).

Uma vez que não houve modificações abruptas no diâmetro do nosso circuito, os erros de medida da resistência ao fluxo foram provavelmente evitados (Loring e cols., 1979). O espaço morto do equipamento é de 0,3 mL. Todos os sinais foram condicionados e amplificados em polígrafo Beckman tipo R (Beckman, Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados através de filtros Bessel de 8 polos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos (12 bits) de analógico para digital (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em um computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, QC, Canadá) (Figura 10).

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

Os parâmetros da mecânica respiratória foram determinados 2 semanas após a instilação intratraqueal de Salina (grupo SAL) e de Papaína (grupo PAP), sendo obtidos por meio do registro de 10 ciclos respiratórios pelo método da oclusão ao final da inspiração (descrito a seguir), em 6-9 animais.

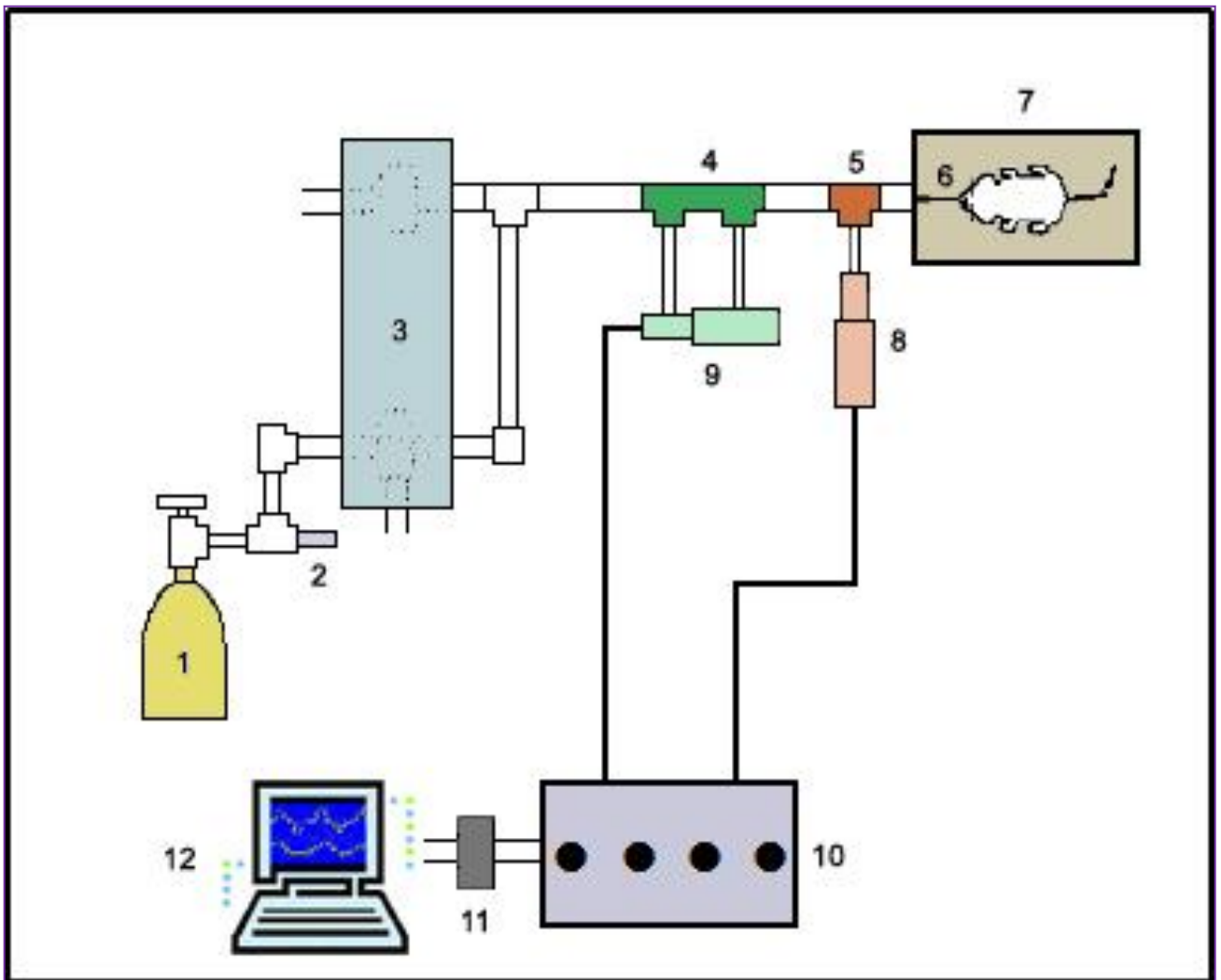


Figura 11: Montagem Experimental constituindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante e duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça "T" para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor de pressão traqueal.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10 - Polígrafo de oito canais com amplificação dos sinais de V' e P_{tr} .
- 11 - Filtros.
- 12 - Conversor analógico-digital de 12 bits e Microcomputador.

4.4 - Método de Oclusão ao Final da Inspiração

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates e cols, 1985a), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inhomogêneo do sistema respiratório.

No animal com o tórax aberto, a P_{tr} é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ($P_{i,L}$) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ($P_{el,L}$). A diferença de pressão que caracteriza a queda rápida inicial ($\Delta P_{1,L}$), representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{max,L}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ($P_{i,L}$), corresponde ao componente viscoso pulmonar.

A segunda variação de pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do P_i ao platô ($P_{el,rs}$), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inhomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar. A soma de $\Delta P_{1,L}$ e $\Delta P_{2,L}$ fornece a variação total de pressão no pulmão ($\Delta P_{tot,L}$) (Figura 12).

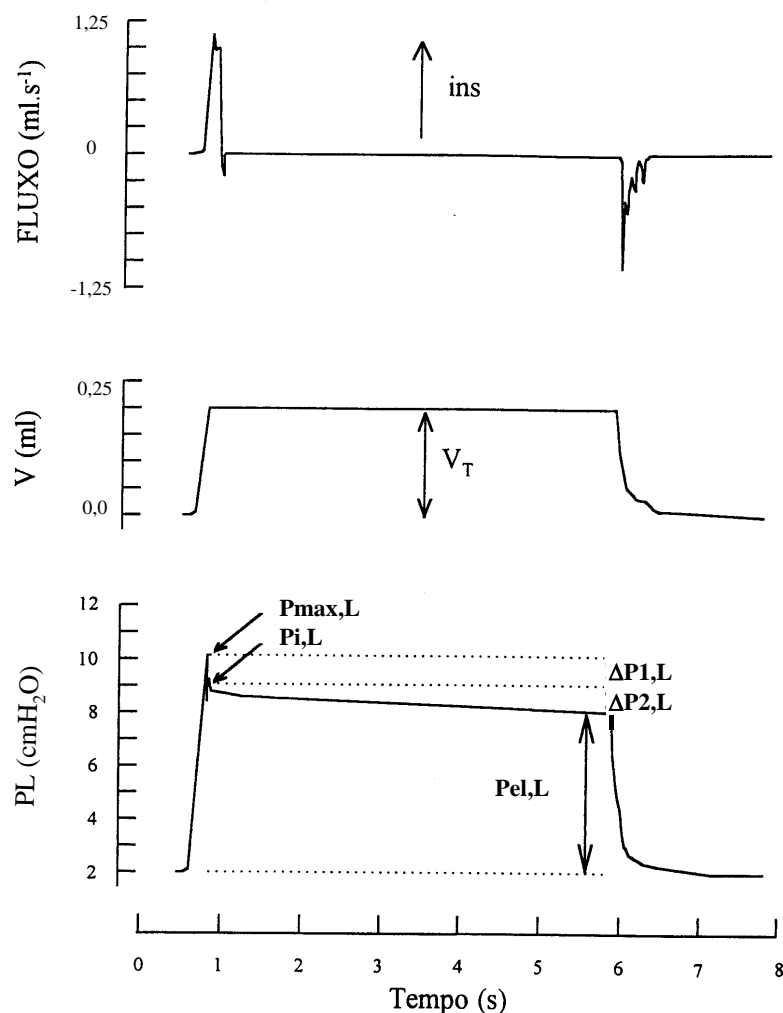


Figura 12: Método de Oclusão ao Final da Inspiração. Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s, e o platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s.

A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da inspiração (PEEP) de 2 cmH₂O. $P_{\max,L}$ = pressão máxima pulmonar alcançada e $P_{i,L}$ = pressão no ponto de inflexão pulmonar.

As elastâncias estática (Est,L) e dinâmica ($Edyn,L$) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se $P_{el,L}$ e $P_{i,L}$, respectivamente, pelo volume corrente. $\Delta E,L$ é a diferença entre $Edyn,L$ e Est,L .

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será

responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de $P_{i,L}$ e $P_{el,L}$. Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e cols., (1988a e 1988b).

$$\begin{aligned} \Delta P_1 &= P_{\max} - P_i \\ \Delta P_2 &= P_i - P_{el} \\ \Delta P_{\text{tot}} &= \Delta P_1 + \Delta P_2 \\ E_{\text{st}} &= P_{el} / V_T \\ E_{\text{dyn}} &= P_i / V_T \\ \Delta E &= E_{\text{dyn}} - E_{\text{st}} \\ T_i &= V_T / V' \end{aligned}$$

Figura 13: Fórmulas utilizadas na análise da mecânica pulmonar. Onde:
 $\Delta P_{1,L}$ = pressão necessária para vencer o componente viscoso pulmonar
 $\Delta P_{2,L}$ = pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar
 $\Delta P_{\text{tot},L}$ = variação total de pressão pulmonar
 $P_{\max,L}$ = pressão pulmonar máxima
 $P_{i,L}$ = pressão pulmonar no ponto de inflexão
 $P_{el,L}$ = pressão de retração elástica pulmonar
 $E_{\text{st},L}$ = elastância estática do pulmão
 $E_{\text{dyn},L}$ = elastância dinâmica do pulmão
 $\Delta E,L$ = componente elástica da viscoelasticidade pulmonar
 V_T = volume corrente
 T_i = tempo inspiratório

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de fluxos de ar ao sistema com concomitante registro das variações de pressão (ΔP).

Uma vez que $R = \Delta P / V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A Req, constante até fluxos de 26 mL/s, foi de 0,08 cmH₂O/mL/s.

A variação de pressão determinada pelo equipamento ($\Delta P_{eq} = Req.V'$) foi subtraída de $\Delta P_{tot,L}$, e $\Delta P_{1,L}$, de forma que os resultados refletem propriedades mecânicas intrínsecas.

Os animais foram sacrificados após a realização da medida da mecânica respiratória.

4.5 - Órgão Analisado

A traquéia foi ocluída ao término da expiração relaxada (capacidade residual funcional) e os pulmões removidos e colocados em uma solução tamponada (tampão fosfato Millonig) de formaldeído a 10% para posterior análise histopatológica.

4.6 – Estudo Histopatológico, Morfometria e Celularidade

4.6.1 – Microscopia Óptica

4.6.1.1 Fixação e Preparo das Lâminas

Os pulmões ocluídos ao final da expiração, foram perfundidos com solução salina e, posteriormente, foram colocados em solução tamponada de formol por 24 horas.

Após a fixação, o material foi emblocado em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 3 μ m de espessura. As lâminas com os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina.

4.6.1.2 Análise Histológica, Morfometria e Celularidade

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram analisadas por microscopia óptica (microscópio Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos.

Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100 e 400x.

A análise quantitativa foi realizada pela técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”), utilizando uma ocular, acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 14).

Em um aumento de 1000x foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina para quantificação da celularidade total e do número de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) no tecido pulmonar. Nesse aumento, a área total do retículo de referência corresponde a $10.000 \mu\text{m}^2$. Dessa forma, pontos que caíam sobre tecido pulmonar foram computados, determinando-se a área ocupada por tecido em μm^2 . Computou-se, então, o número total de células, bem como o número de PMN e MN presentes no campo, sendo o valor final expresso por “número de células/ μm^2 de tecido pulmonar”. Para determinação do diâmetro alveolar médio (Lm) foram contados o número de interceptos alveolares, em 20 campos aleatórios, em cada lâmina, em um aumento de 200x, sendo: $Lm = \Sigma$ do comprimento dos segmentos de reta ($1250 \mu\text{m}$)/ n° de interceptos.

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras colágenas e sistema elástico. *Colágeno*: Os tecidos

foram corados em solução de Picrosirius (Montes e cols., 1992). *Fibras do sistema elástico*: foi utilizado o método de resorcina-fucsina de Weigert modificado com oxidação (ORF), sendo as fibras elásticas foram identificadas como fibras negras. Em cada animal foram analisados 10 campos randomicamente selecionados. A área de parênquima pulmonar ocupada por fibras colágenas e elásticas foi quantificada pela técnica de contagem de pontos em imagens capturadas aleatoriamente em 10 campos não-coincidentes (400x). A quantificação foi realizada em imagens de alta definição (2024 x 1536 pixels) utilizando-se o programa Image Pro Plus 4.5.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USD). Os resultados foram expressos em percentual de densidade de superfície/campo.

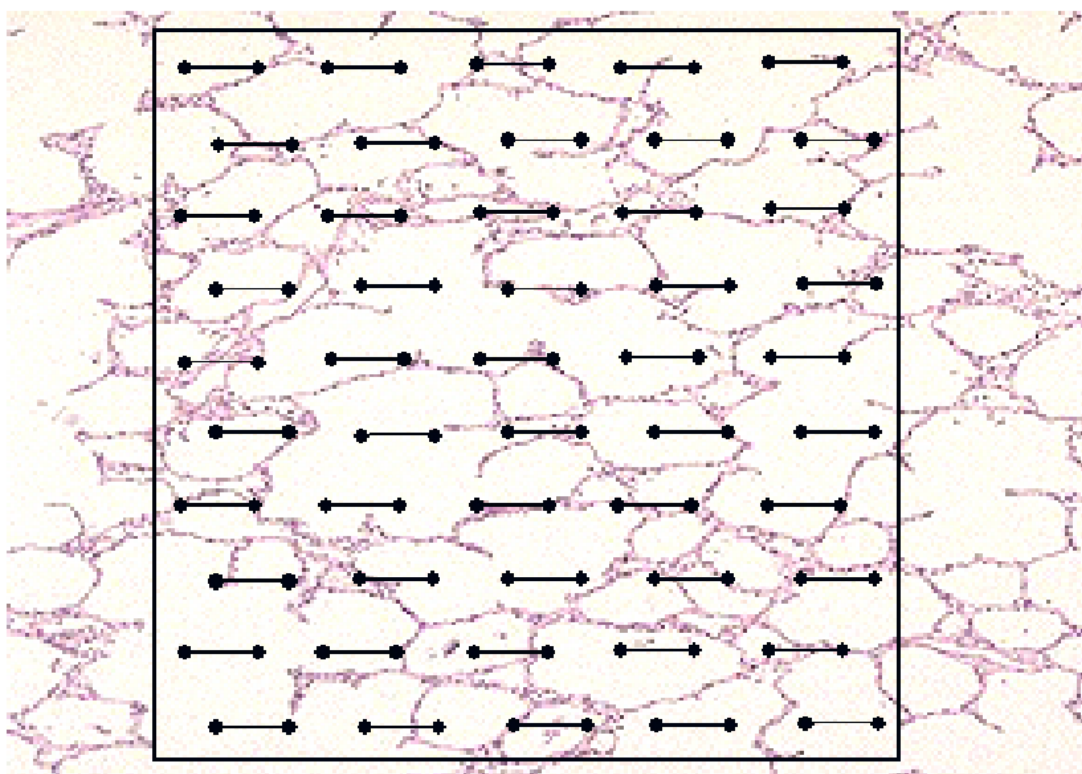


Figura 14 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

4.7 Determinação da Capacidade Residual Funcional (CRF)

As variáveis mecânicas pulmonares variam dependendo do volume pulmonar total. Para medida da CRF, os pulmões foram pesados em balança de precisão (peso inicial) (Precision – PR 1000, com capacidade de 1 kg e precisão de 1 cg, Dourado, SP, Brasil). A seguir, um *becker* de 500 mL, contendo solução salina (NaCl a 0,9%) previamente aquecida a 37°C e uma peça metálica suspensa sobre uma haste, foi posicionado acima da balança. Esta foi ajustada a zero e os pulmões foram submersos no *becker* presos à peça metálica e a um peso adicional para que afundem completamente. Ocorreu, então, deslocamento de volume e o conjunto foi novamente pesado (peso final). O peso em gramas indicado na balança correspondeu ao volume do órgão em mililitros, assumindo que a densidade da salina seja semelhante à dos tecidos e igual a 1,0. O volume deslocado (ou peso final) menos o peso inicial dos pulmões é igual ao volume de ar contido nos pulmões, ou seja, a CRF (CRF = volume deslocado – peso inicial).

4.8 Ensaios bioquímicos de estresse e dano oxidativo

As análises de estresse oxidativo no pulmão foram realizadas no Laboratório de Reparo Tecidual, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Para análise do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes sofrido pelos diferentes tecidos foram realizados ensaios bioquímicos que medem a atividade das enzimas antioxidantes ou de marcadores de estresse e dano oxidativo.

Os seguintes parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados: atividade da enzima antioxidante catalase (CAT), razão glutatona reduzida/glutaciona oxidada (GSH/GSSG) e a peroxidação lipídica pelo método de estudo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Para essas análises, os brônquios principais direito e esquerdo foram ocluídos com fio de algodão e os pulmões separados. O pulmão direito foi removido e mantido a -70°C por uma semana. Em seguida, foi homogeneizado (homogeneizador modelo NT 136, Novatécnica, São Paulo, Brasil) com solução tampão (fosfato de potássio 100 mM + EDTA 5 mM, solução final 1000 mL) e centrifugado (centrífuga modelo 243M, FANEM, São Paulo, Brasil) a 7000 g durante dez minutos. Ao final, foi medida a quantidade de proteína em cada amostra.

4.8.1 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a determinação de proteínas totais em uma amostra. Tal método consiste na interação entre o corante G-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína e o corante estabiliza a forma aniônica do mesmo, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons em azul, de acordo com a concentração da proteína. G-250 ligado à proteína tem sua absorvância alterada de 465 nm para 595 nm. Em uma placa de 96 poços, prepara-se a curva padrão com albumina (1 mg/mL) em triplicata e, em seguida, o poço teste (200 μL de reagente Bradford e

amostra). A leitura da placa foi realizada com leitor de ELISA (Modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) no comprimento de onda de 595 nm.

4.8.2 Medida da peroxidação lipídica

O dano oxidativo foi mensurado pelo método de estudo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Draper e Hadley, 1990). O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios de membrana oxidados gerando um subproduto da lipoperoxidação (malondialdeído, MDA). MDA reage com TBA, gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Alíquotas do homogeneizado pulmonar dos grupos salina e papaína foram desproteinizadas com 800 µL de 10% de ácido tricloroacético e centrifugadas a 1000 g por dez minutos. O sobrenadante (500 µL) foi misturado com 500 µL de TBARS 0,67%. A mistura foi aquecida por trinta minutos em água fervente e, então, resfriada em temperatura ambiente por cinco minutos. A fase orgânica, contendo o cromógeno rosa foi extraída com 750 µL de n-butanol e absorvância de 532 nm mensurada usando o espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro, Amersham-Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Os valores de TBARS (nMol/mg proteína) foram expressos com base em uma curva padrão de MDA.

4.8.3 Marcadores de Estresse Oxidativo

4.8.3.1 Catalase (CAT)

A análise bioquímica que avalia a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT), produzida por células e organelas, foi mensurada em resposta

à quantidade de peróxido de hidrogênio (Aebi, 1984). O consumo de H_2O_2 gera diferença de cor medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm. Assim, misturou-se 60 μ L do homogeneizado pulmonar dos quatro grupos experimentais com tampão fosfato e peróxido de hidrogênio. 1,6 μ L/mL. Os valores de CAT foram corrigidos pelo valor de proteína de cada amostra (U catalase/mg proteína).

4.8.3.2 Razão GSH/ GSSG

A razão GSH/GSSG é considerada um marcador de estresse oxidativo. Esse ensaio é baseado na reação da GSH ou GSSG com 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) que produz o 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) (Rahman, 2006). Para determinar GSSG, amostras de homogeneizados de pulmão foram tratadas previamente com 2-vinilpiridina, que reage covalentemente com GSH (mas não com GSSG). O excesso de 2-vinilpiridina é neutralizado com trietanolamina. A taxa de formação de TNB, mensurada espectrofotometricamente, é proporcional à concentração de GSH ou GSSG na amostra. A concentração de uma amostra conhecida é determinada pelo cálculo de uma regressão linear gerada a partir de uma curva padrão de GSH ou GSSG.

Alíquotas de homogeneizado de pulmão foram tratadas com ácido sulfossalicílico na proporção de 1:1, e centrifugadas a 900 g por dez minutos. Os ensaios foram realizados separadamente e utilizaram 200 μ l do sobrenadante para leitura da GSH e 200 μ l para leitura de GSSG. Em seguida, as amostras para a GSSG foram incubadas por 60 min com 4 μ l de 2-vinilpiridina e em seguida tratadas com 65 μ l de trietanolamina, a fim de ajustar

o pH entre 6,0-7,0. Após o preparo das amostras, as leituras foram realizadas adicionando-se 1.400 µl tampão fosfato de potássio (KPE), 200 µl de amostra, 120 µl de glutathione redutase (GR) e 120 µl de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH). A mistura foi homogeneizada e a absorbância mensurada em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 Pro UV/Visible Spectrophotometer, Amersham – Biosciences, Inglaterra) a 412 nm, em um tempo de 120 s, com intervalos de 30 s.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicado o teste da mediana de Levene, para verificar a homogeneidade de variâncias. Como todos os dados satisfizeram a esse, a análise de variância de dupla entrada foi empregada (two-way ANOVA), seguida de teste de Tukey para comparações múltiplas. Para comparação de valores percentuais utilizou-se transformada arcoseno. A correlação entre os achados funcionais e histológicos foi realizada pelo teste de Spearman. Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%. A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SigmaStat 3.11 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 MECÂNICA RESPIRATÓRIA

Os valores de volume e fluxo utilizados durante o experimento são mostrados na tabela 1 e não variaram significativamente entre os grupos estudados.

Tabela 1: Fluxo e volume nos animais dos grupos salina e papaína

	Fluxo (mL/s)	Volume (mL)
SALM	1,00 ± 0,001	0,20 ± 0,002
SALF	1,00 ± 0,004	0,20 ± 0,002
PAPM	1,00 ± 0,001	0,20 ± 0,002
PAPF	1,00 ± 0,000	0,20 ± 0,001

Os valores representam média ± EPM de 6-9 animais por grupo (10 determinações/animal). Camundongos machos e fêmeas foram expostos a 50 µL de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou 50 µL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/µL (grupos PAPM e PAPF, respectivamente).

A evolução da massa corporal semanal relativa a massa inicial de camundongos machos e fêmeas que receberam salina (SALM e SALF) e papaína (PAPM e PAPF), está ilustrada na figura 15. Os animais que receberam papaína não apresentaram ganho de massa corporal em relação a inicial, quando comparados aos seus controles, que ganharam massa ao longo das semanas, demonstrando que a exposição à papaína influenciou no ganho de massa tanto em machos quanto em fêmeas.

Os parâmetros da mecânica pulmonar obtidos nos grupos SALM, SALF, PAPM, PAPF estão representados nas figuras 16 a 19.

A exposição à papaína provocou aumento estatisticamente significativo da elastância estática pulmonar nos grupos que receberam papaína, em relação aos seus controles (Figura 16). Somente o grupo PAPM apresentou

aumento significativo no componente viscoelástico da elastância quando comparado ao seu controle (Figura 17). A exposição à papaína também provocou aumento de $\Delta P1$ nos grupos PAPM e PAPF, enquanto $\Delta P2$, obteve aumento apenas no grupo PAPM (Figuras 18 e 19).

Os dados de mecânica pulmonar de cada animal, separadamente, são apresentados no anexo A.

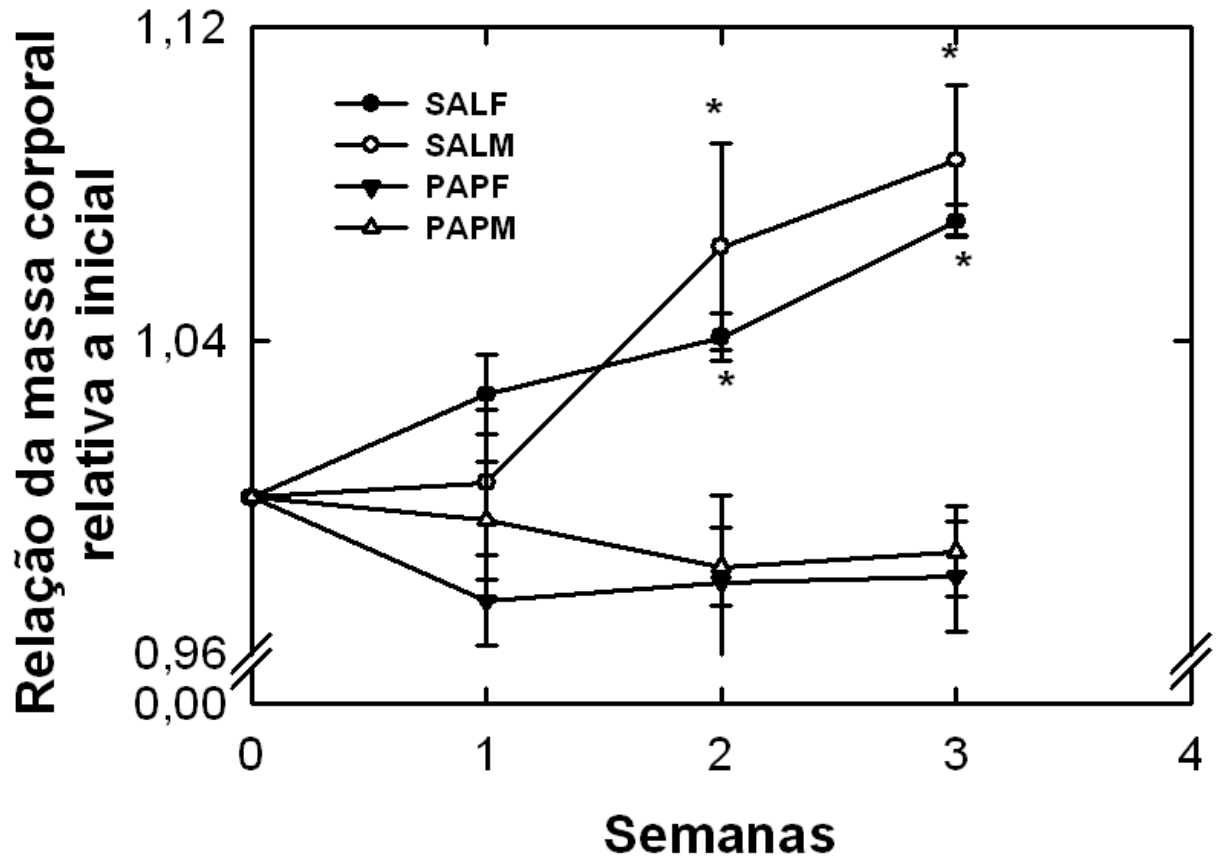


Figura 15: Evolução da massa corporal temporalmente. Os pontos representam a média \pm EPM da massa corporal semanal relativa a massa inicial de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAP). *Relação da massa corporal semanal relativa a inicial significativamente diferente da apresentada pelo seu controle ($p < 0,05$).

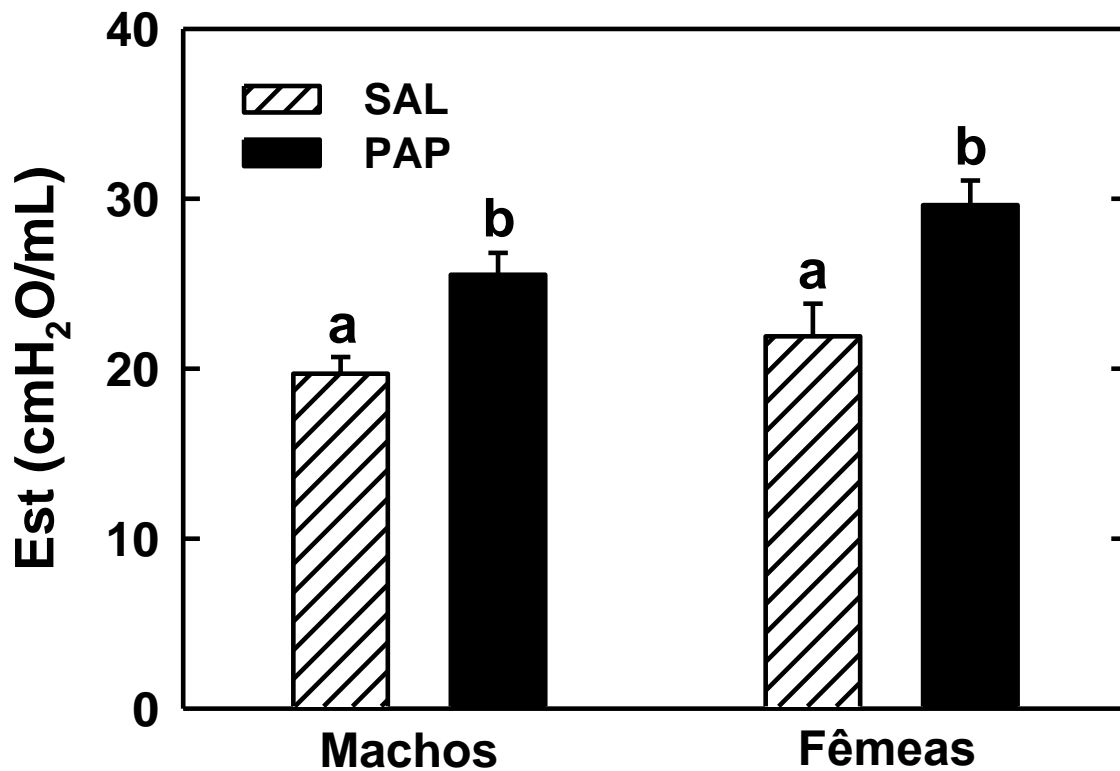


Figura 16: Elastância estática (Est) em camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 6-9 animais/grupo (10 determinações/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

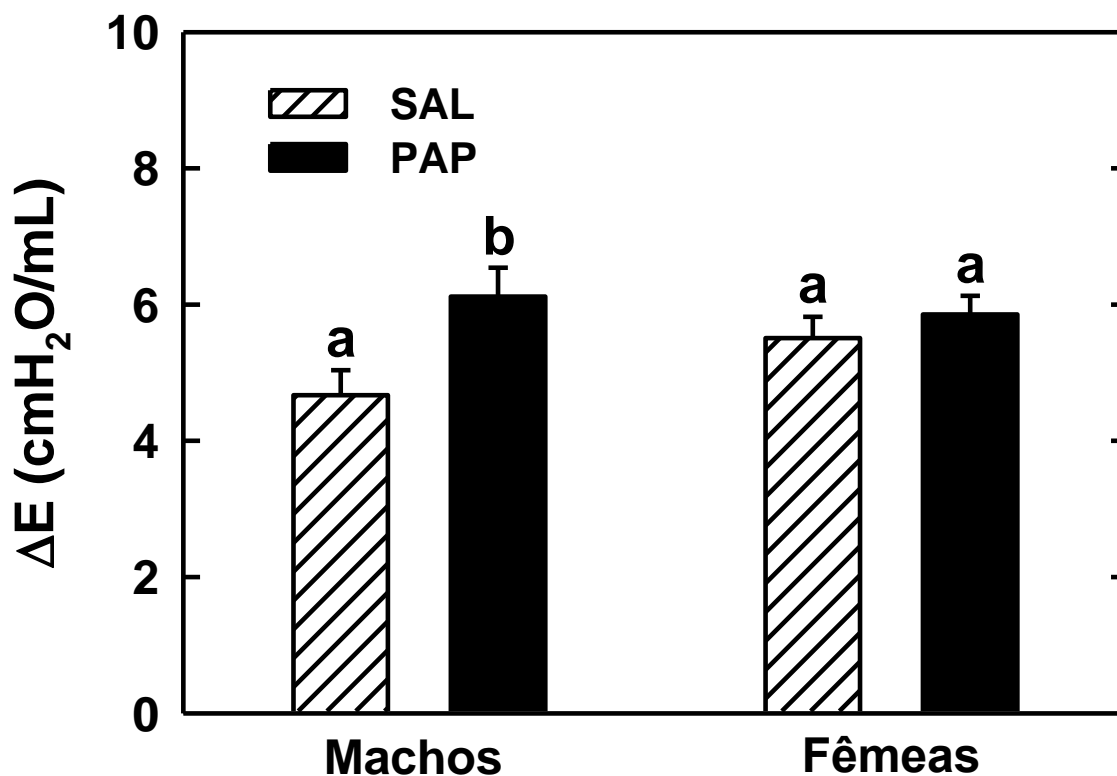


Figura 17: Componente viscoelástico da elastância (ΔE) em camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μL de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μL (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 6-9 animais/grupo (10 determinações/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

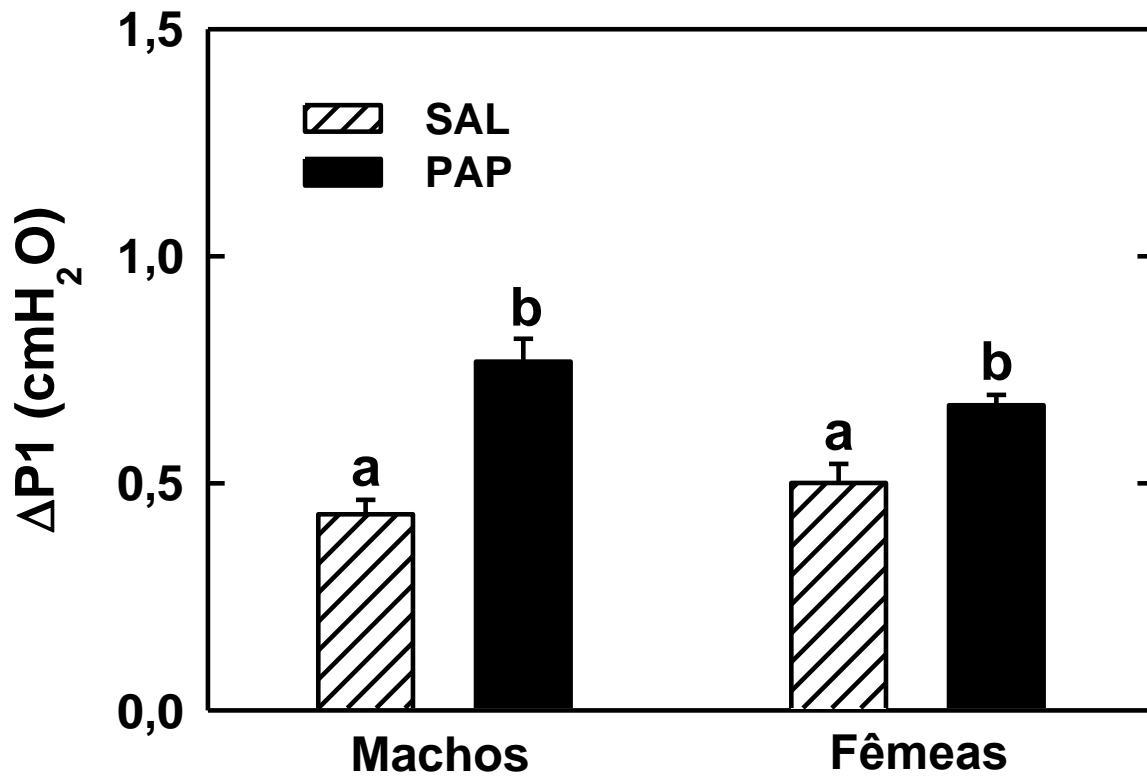


Figura 18: Variação da pressão pulmonar resistiva ($\Delta P1$), em camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μL de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μL (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 6-9 animais/grupo (10 determinações/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

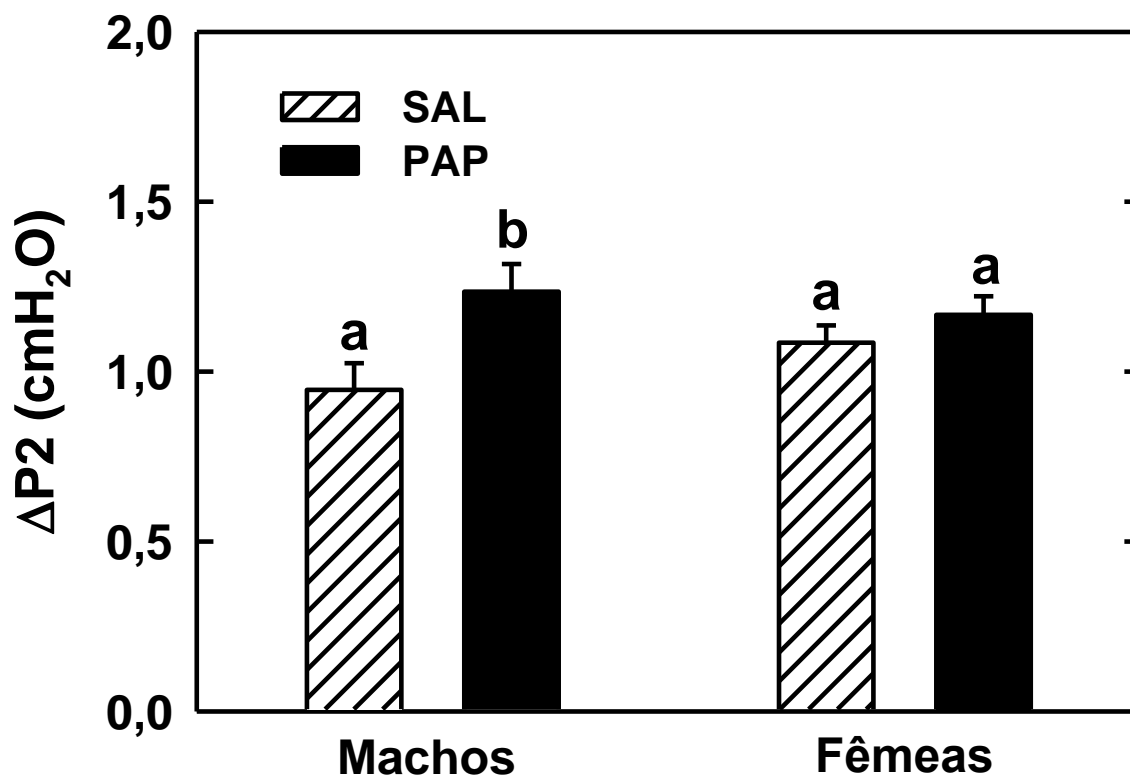


Figura 19: Variação da pressão pulmonar viscoelástica/inomogênea (ΔP_2), em camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μL de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μL (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 6-9 animais/grupo (10 determinações/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

5.2.1 Análise qualitativa

Na análise histopatológica qualitativa foi observado aumento dos espaços aéreos, com destruição de septo alveolar nos grupos expostos à papaína, sendo estas alterações mais evidentes no grupo PAPM. Observou-se, também, aumento de celularidade no septo alveolar, sugerindo presença de inflamação pulmonar (Figura 20).

Na figura 21 observamos o rompimento e a irregularidade das fibras elásticas no parênquima pulmonar dos animais que receberam instilações de papaína (PAPM e PAPF). Lâminas coradas com orceína.

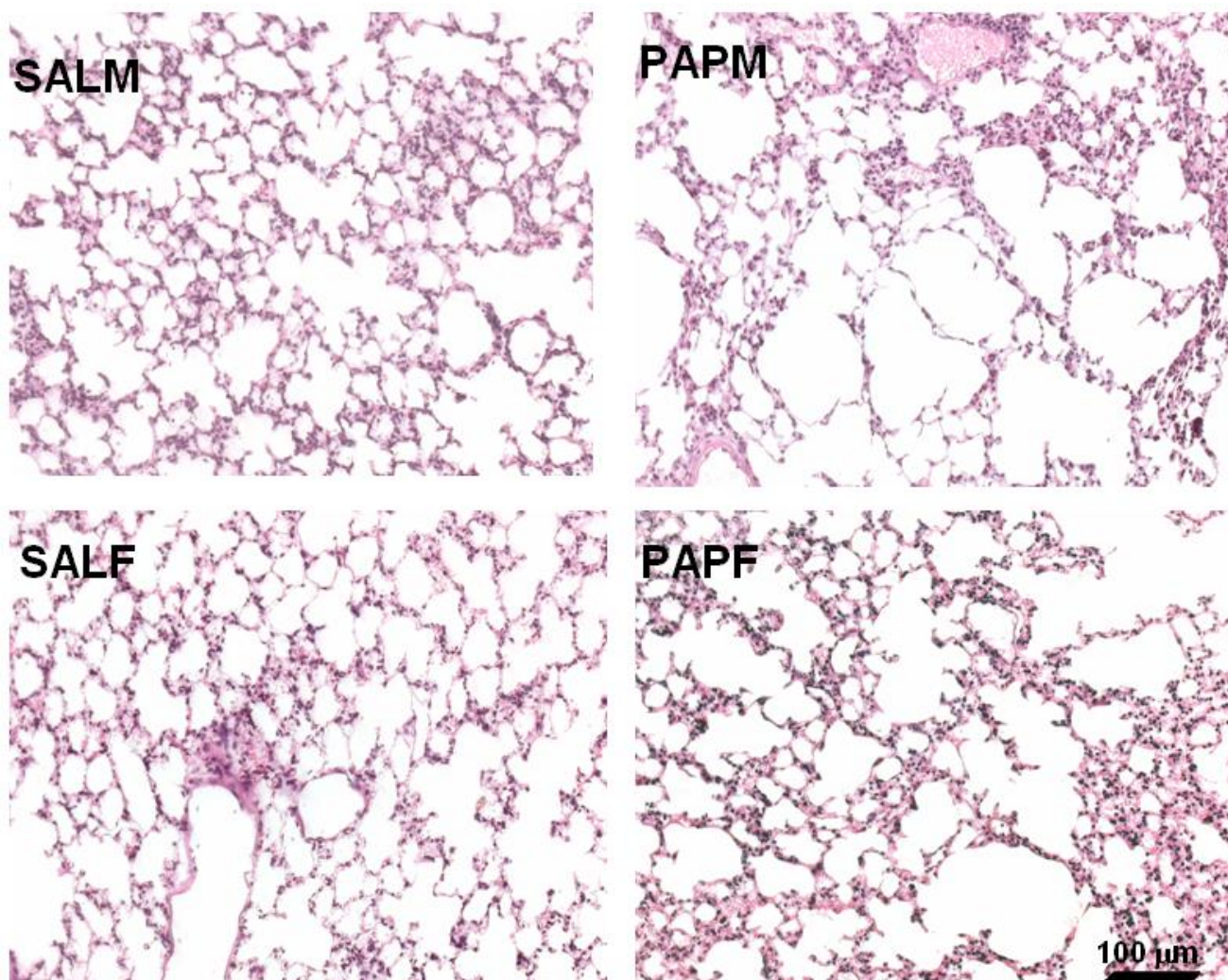


Figura 20: Fotomicrografias (200X) representativas de parênquima pulmonar (H-E) de camundongos machos e fêmeas (n= 6-9) expostos a 50 µL de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou 50 µL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/µL (grupos PAPM e PAFP, respectivamente).

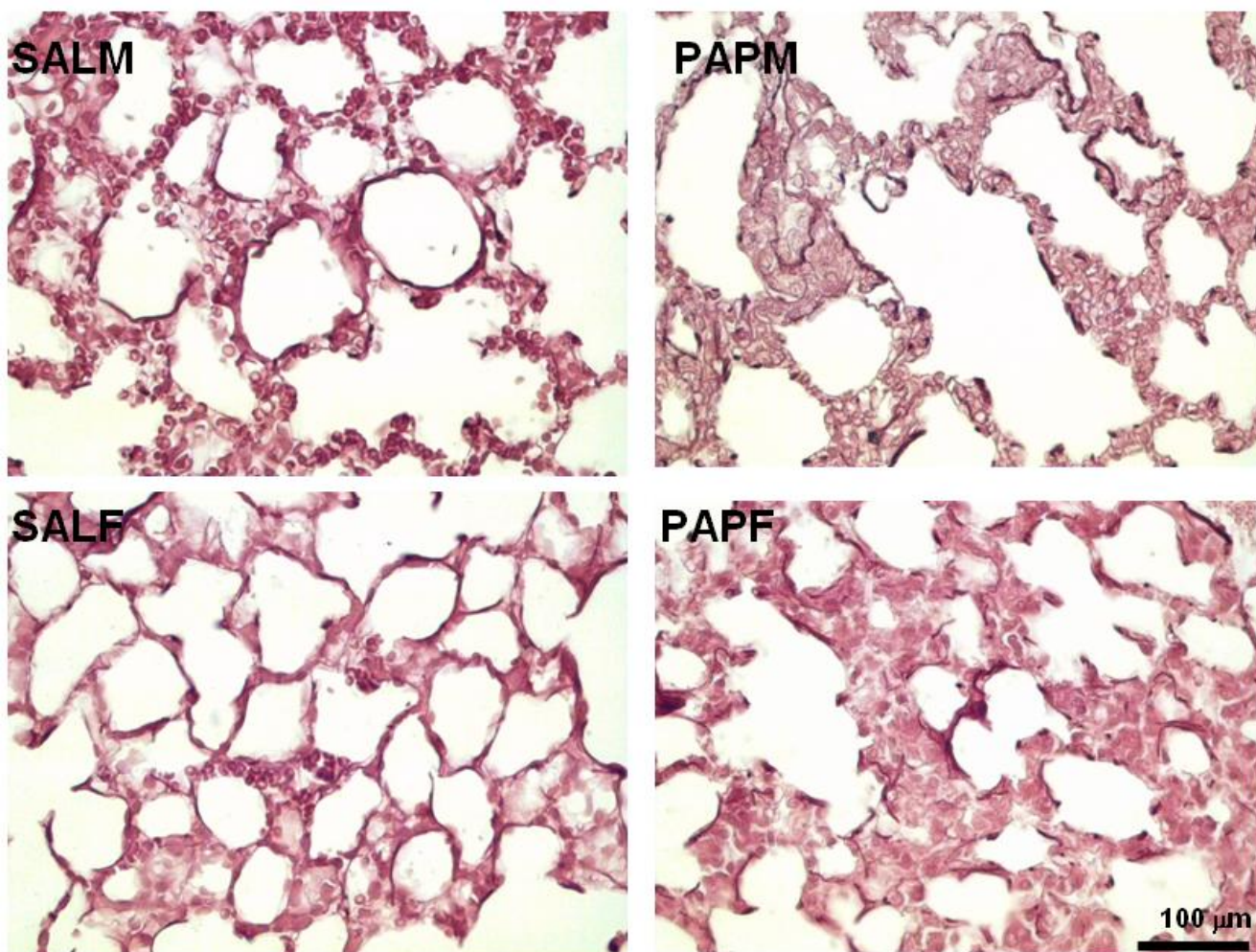


Figura 21: Fotomicrografias (400X) representativas de parênquima pulmonar coradas com orceína para identificação de fibras do sistema elástico em camundongos machos e fêmeas ($n = 6-9$) expostos a $50 \mu\text{L}$ de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou $50 \mu\text{L}$ de solução fisiológica contendo papaína na concentração de $0,2 \text{ U}/\mu\text{L}$ (grupos PAPM e PAPF, respectivamente).

5.2.2 Análise quantitativa

A exposição à papaína provocou aumento do diâmetro alveolar médio (Lm), atingindo significância estatística nos grupos (PAPM e PAPF) comparados aos seus controles, indicando redução de área disponível para troca gasosa (Tabela 2).

Foi observado maior aumento na capacidade residual funcional (CRF) no grupo PAPM quando comparado ao grupo PAPF (Figura 22)

Os valores obtidos na quantificação de celularidade total e diferencial no parênquima pulmonar dos grupos estudados são apresentados na figura 23. Foi observado aumento no número total de células, representado por aumento do número de células polimorfonucleares e diminuição das mononucleares nos grupos PAPM e PAPF, quando comparados aos seus controles.

A Figura 24 ilustra a correlação entre as celularidade total e a Elastância (Est). O aumento da celularidade se correlaciona diretamente com o aumento da Elastância.

Na análise do conteúdo de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar foi observada redução significativa do número destas em resposta a exposição à papaína em ambos os gêneros (Figuras 25 e 26).

Tabela 2 : Diâmetro alveolar médio (Lm)

GRUPOS	<i>Lm</i> (μm)
SALM	39,41 \pm 0,74
PAPM	58,77 \pm 0,60*
SALF	37,61 \pm 0,78
PAPF	47,27 \pm 0,66*

Os valores representam média \pm EPM de 6-9 animais por grupo (20 determinações/animal). Os camundongos machos e fêmeas foram expostos a 50 μL de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou 50 μL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μL (grupos PAPM e PAPF, respectivamente). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. *Valores significativamente diferentes de SALM e SALF, respectivamente ($p < 0,05$).

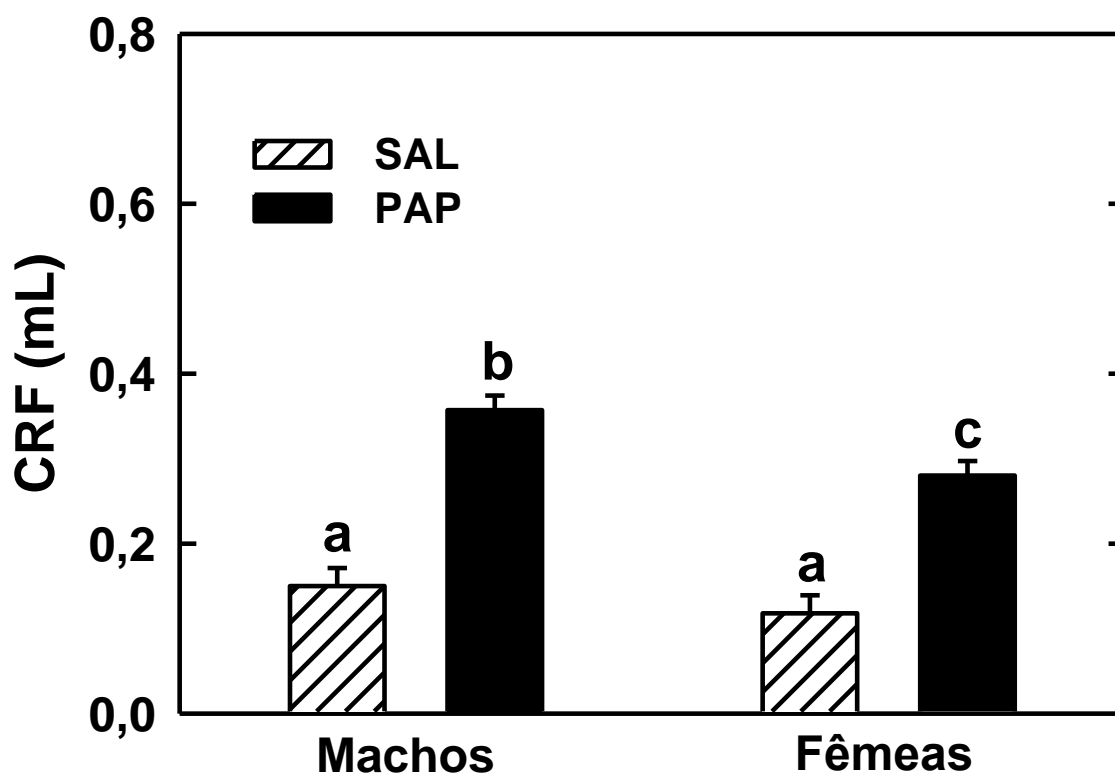


Figura 22: Capacidade residual funcional (CRF) de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μL de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou 50 μL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μL (grupos PAPM e PAPF, respectivamente). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 6-9 animais/grupo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

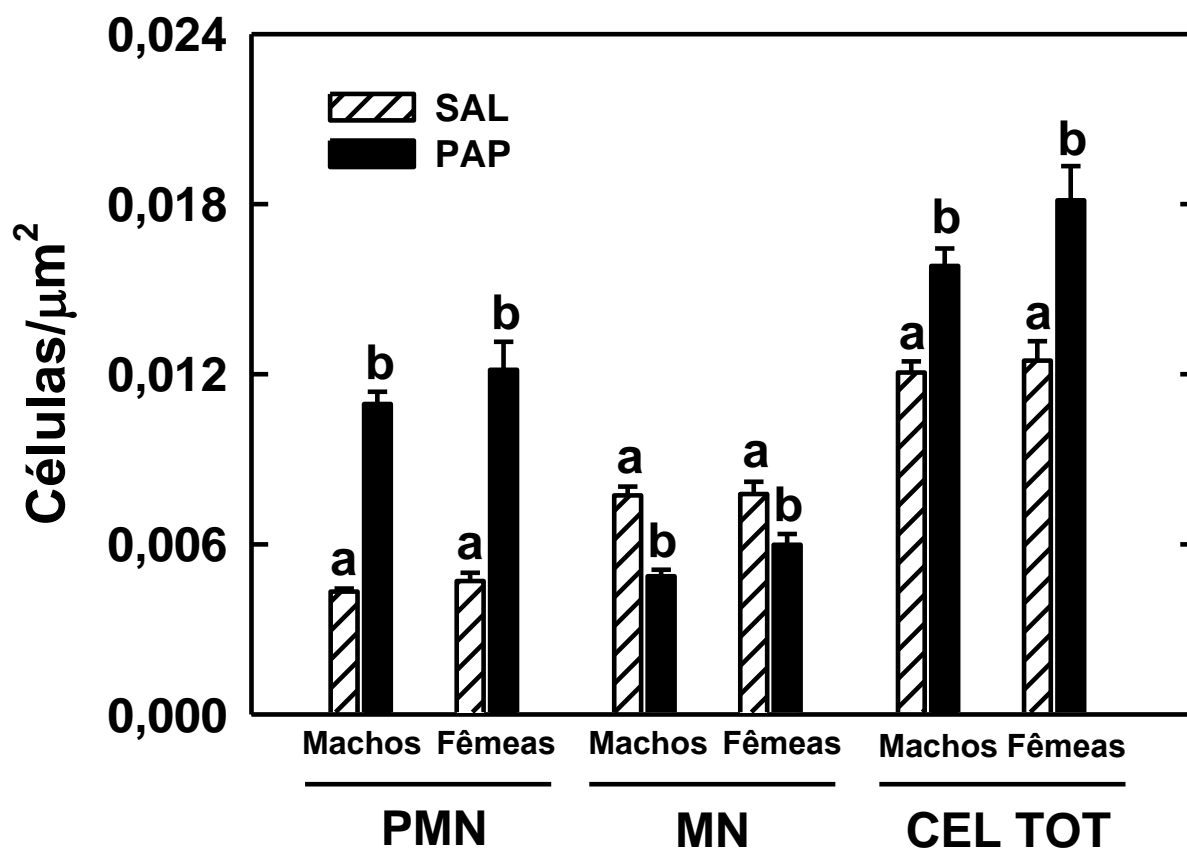
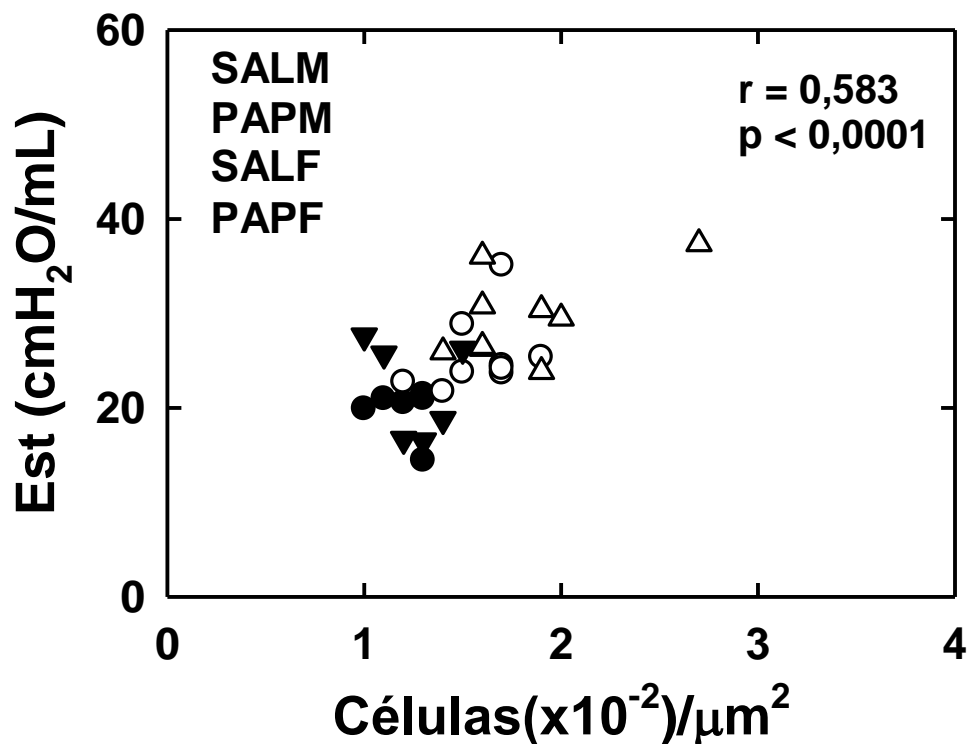


Figura 23: Número de células polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN) e totais (Cel tot) por área de tecido pulmonar de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μL de NaCl a 0,9 % (SAL) ou 50 μL de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/μL (PAP). Valores são média + EPM de 6-9 animais por grupo (10 campos/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).



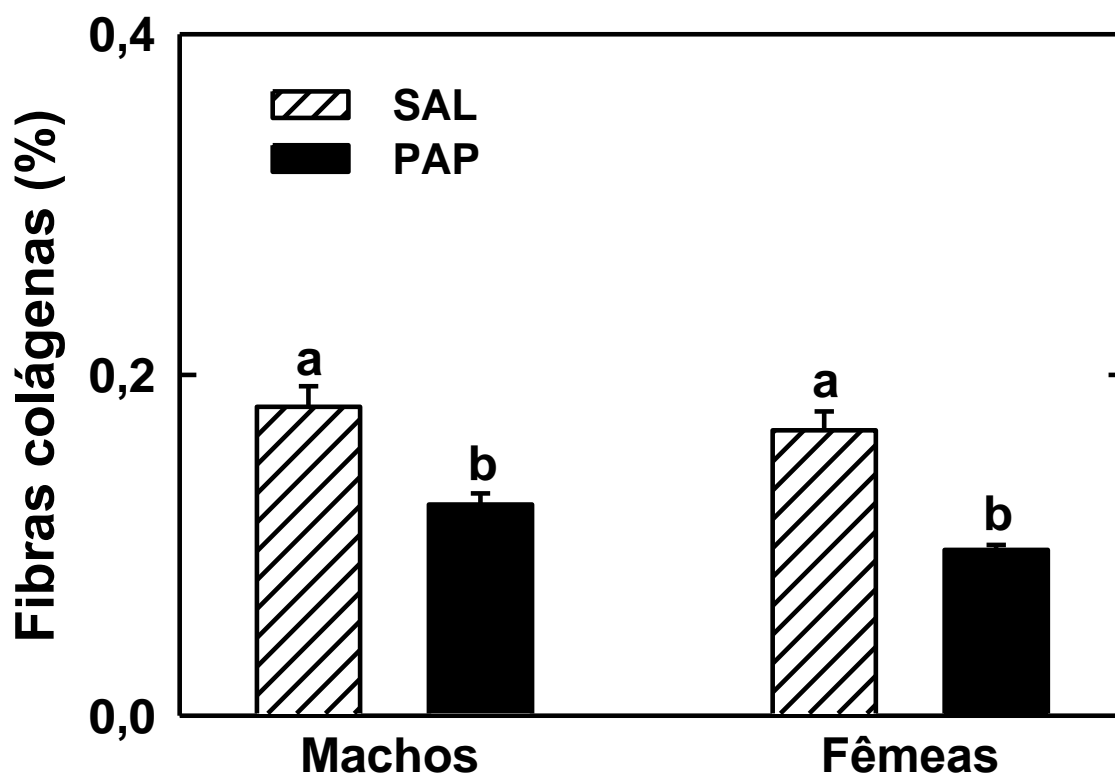


Figura 25: Percentual de fibras colágenas em relação à área de tecido pulmonar (densidade de superfície/campo) de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAPM e PAPF, respectivamente). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 5-9 animais/grupo (10 campos/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

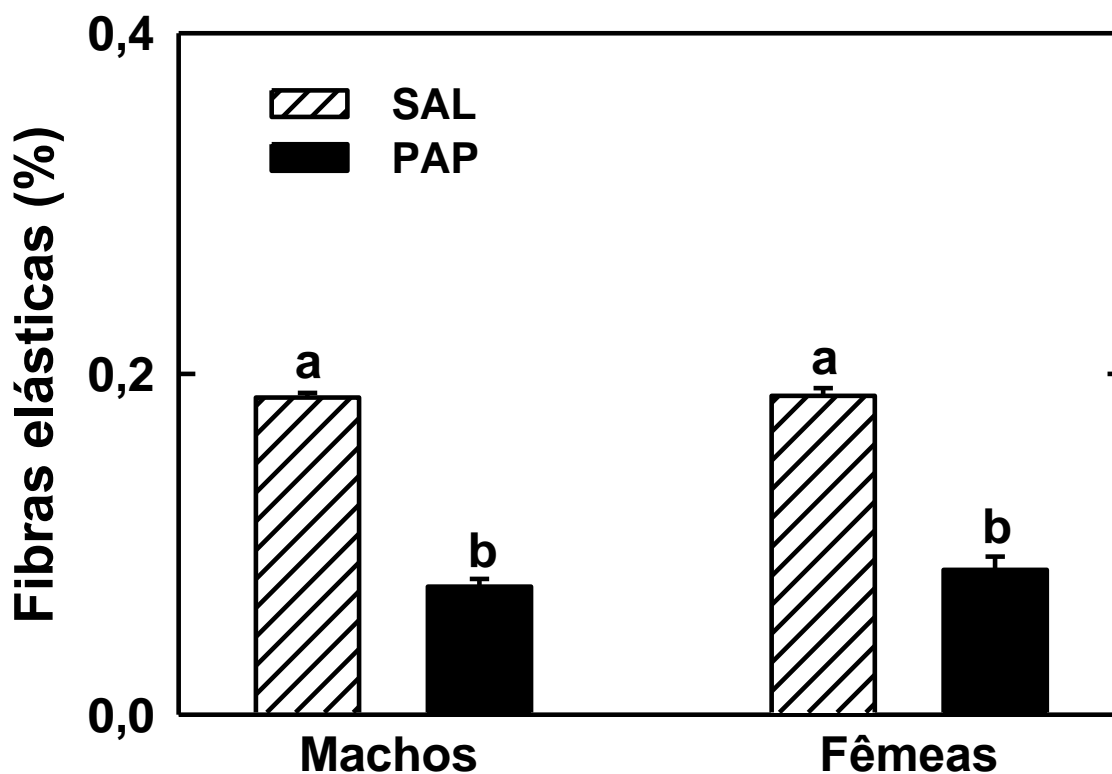


Figura 26: Percentual de fibras do sistema elástico em relação à área de tecido pulmonar (densidade de superfície/campo) de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SALM e SALF, respectivamente) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAPM e PAPF, respectivamente). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 6-9 animais/grupo (10 campos/animal). Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE E DANO OXIDATIVO

Visando avaliar o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes sofrido pelos tecidos após exposição à papaína, foram realizados ensaios bioquímicos que medem a atividade das enzimas antioxidantes ou de marcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica.

A Figura 27 representa a peroxidação lipídica em resposta a exposição à papaína. Observa-se um aumento significativo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produto final da peroxidação lipídica, no grupo PAPF em relação ao SALF, enquanto os machos não apresentaram diferença significativa.

A Figura 28 apresenta a quantidade de catalase (CAT) no pulmão. Houve depleção da catalase nos grupos que receberam papaína (PAPM e PAPF), e esta foi significativamente maior no grupo PAPM.

A Figura 29 ilustra o comportamento da Relação GSH/GSSG no pulmão. A relação se reduz significativamente no grupo PAPF em relação ao seu controle.

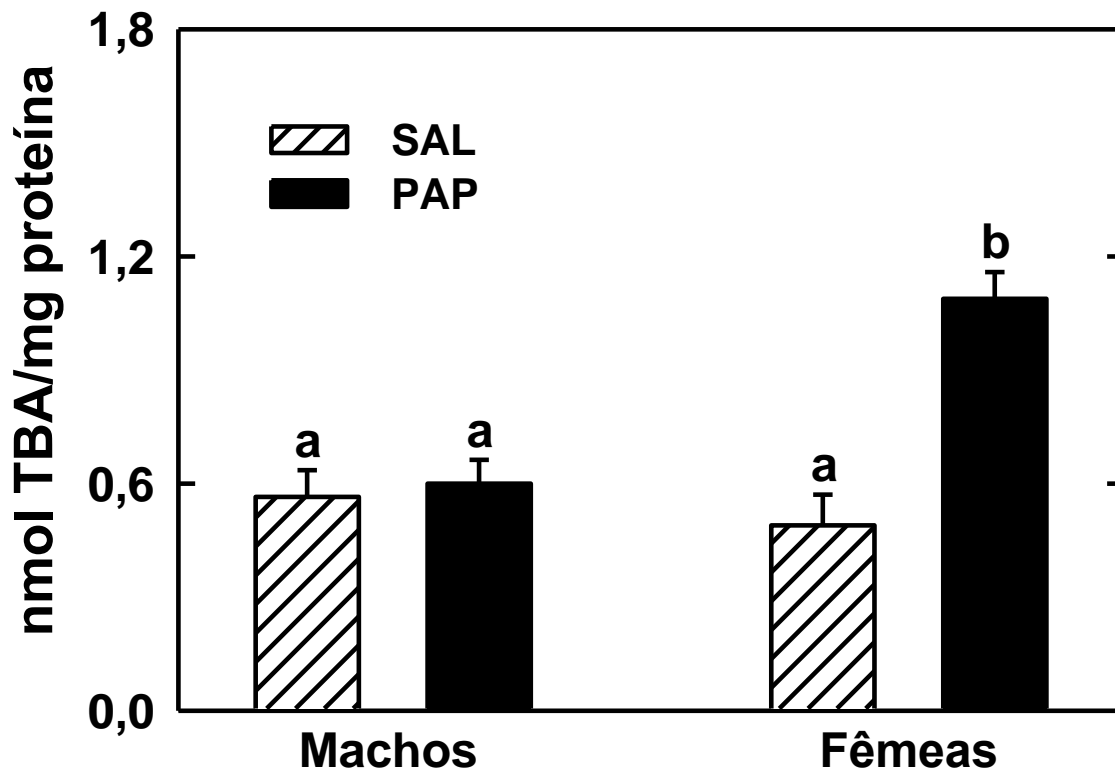


Figura 27: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) no pulmão de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 3-5 animais/grupo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

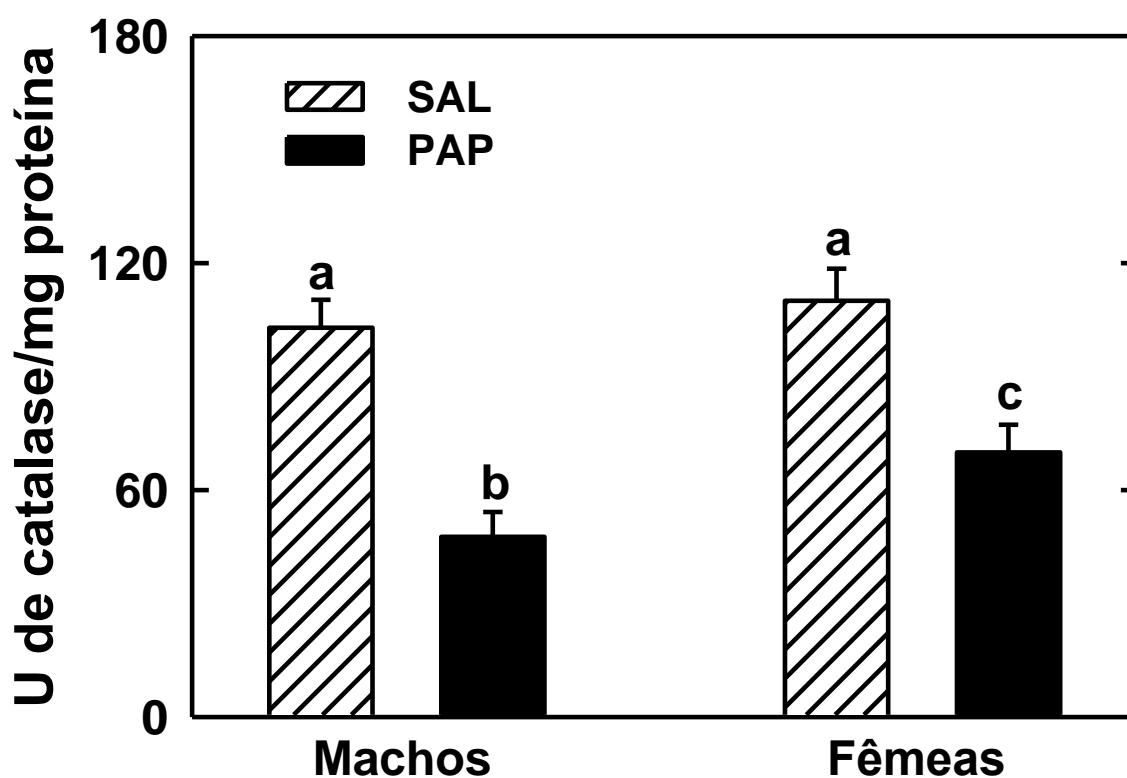


Figura 28: Atividade da catalase no pulmão de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 3-5 animais/grupo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

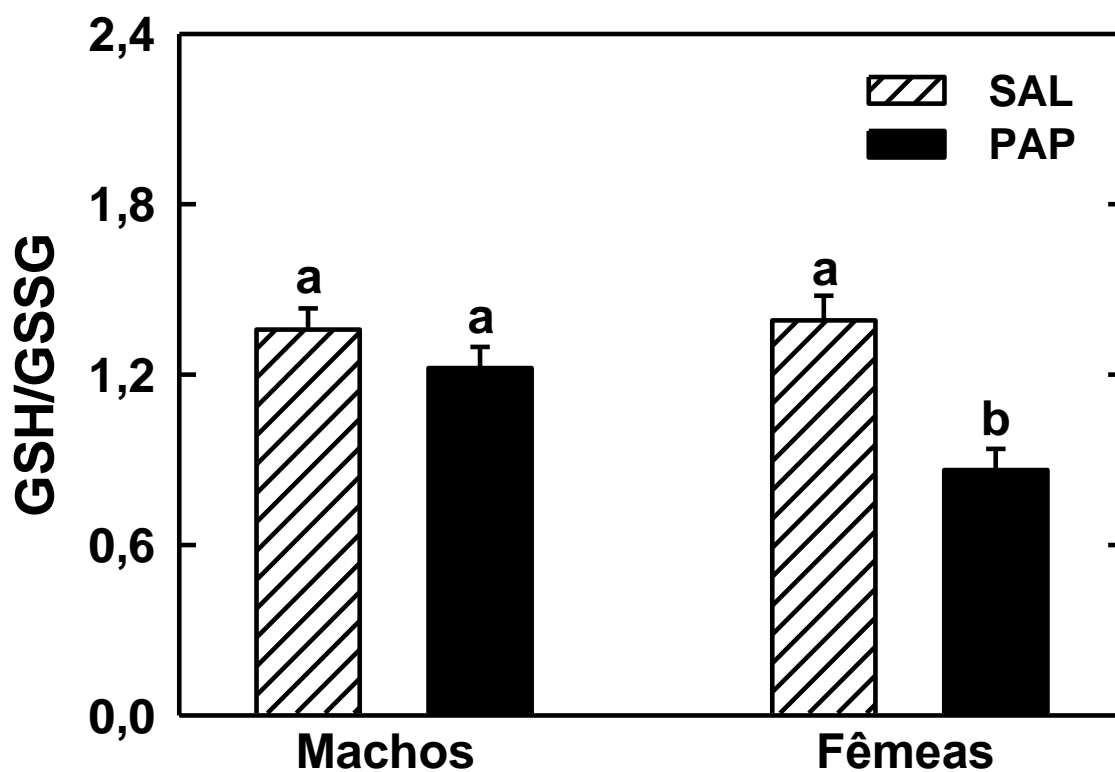


Figura 29: O comportamento da relação GSH/ GSSG no pulmão de camundongos machos e fêmeas expostos a 50 μ L de NaCl a 0,9 % (grupos SAL) ou 50 μ L de solução fisiológica contendo papaína na concentração de 0,2 U/ μ L (grupos PAP). Os animais foram analisados 2 semanas após a última instilação. Os valores são média + EPM de 3-4 animais/grupo. Letras diferentes representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O modelo de enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de papaína utilizado neste estudo induziu alterações estruturais, inflamatórias e estresse oxidativo, compatíveis com o observado no enfisema, incluindo aumento de espaços aéreos, influxo de células polimorfonucleares no parênquima pulmonar e redução do número de fibras colágenas e do sistema elástico. Alterações mais acentuadas da mecânica pulmonar foram observadas em machos, com aumento dos componentes elástico, resistivo e viscoelástico da mecânica pulmonar. Enquanto que as fêmeas apresentaram apenas aumento de componente elástico e resistivo.

Diversos modelos têm sido utilizados com o objetivo de melhor esclarecer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DPOC. A exposição à papaína foi utilizada neste estudo por ser descrita na literatura como uma forma rápida e eficaz para a reprodução do enfisema pulmonar (Snider e cols., 1986; Hayes e cols., 1975; Takaro e White, 1973). Este modelo nos possibilitou explorar aspectos relevantes, ainda pouco descritos, sobre o comportamento funcional dos animais.

Os modelos experimentais auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais e possibilitam o estudo de estruturas e órgãos de difícil acesso em seres humanos. A possibilidade de controlar as variáveis ambientais, sociais e patológicas em animais de experimentação também justificou, no nosso experimento, a escolha de pequenos animais. Diversas espécies de camundongo e rato dentre outros animais, como cães (Haddad e cols., 1979), têm sido utilizadas nos modelos experimentais de enfisema pulmonar, e os camundongos não necessitam de um período muito longo para se encontrarem

em condições de uso, após seu nascimento. Adicionalmente, apresentam vantagens para a investigação de vias patogênicas da doença, devido aos avanços na engenharia genética e a abundância de anticorpos disponíveis (Vlahovic e cols.,1999). Estudo recente (Lopes e cols., 2009) descreve o desenvolvimento de alterações funcionais, compatíveis com o enfisema panacinar em camundongos BALB/c, espécie também utilizada em nosso estudo. Após a instilação de papaína, os animais apresentaram aumento do diâmetro alveolar médio e da expressão tecidual de 8-isoprostano, sinalizando a presença de estresse oxidativo.

Nosso desenho experimental foi proposto com base em trabalhos prévios (Fló e cols., 2005; Fusco e cols., 2001; Borzone e cols., 2007 e Lopes e cols., 2009) que mostram alterações funcionais características do enfisema pulmonar, após a instilação dessa mesma dose de papaína. A forma de administração da papaína e o protocolo experimental variaram entre os estudos e, embora alguns tenham utilizado a nebulização ou a instilação nasal de papaína, Gross e cols., (1965) já haviam demonstrado a eficiência e precisão da instilação intratraqueal no desenvolvimento deste modelo, apesar desta forma de administração ser mais trabalhosa. Adicionalmente, este último trabalho demonstrou características do enfisema panacinar em ratos após 3 semanas da administração da papaína em dose única. Por utilizarmos camundongos, o volume máximo a ser instilado não poder ultrapassar 50ul, então optamos por administrar a papaína em duas doses, sendo uma por semana. Após o período de duas semanas, analisamos os dados.

Apesar do modelo experimental empregado refletir as principais alterações observadas em pacientes enfisematosos, o modelo experimental por

instilação de proteases apresenta limitações pelo fato da lesão pulmonar ser causada por instilações súbitas, diferentemente da exposição contínua a baixos níveis de inflamação que acredita-se estar presente na lesão pulmonar consequente ao tabagismo (Dawkins e Sockley, 2001). Desta forma, as instilações intratraqueais de papaína nas vias aéreas podem não refletir os processos enzimáticos que resultam da ação direta de células inflamatórias em resposta ao ato prolongado de fumar (Liou e Campbell, 1996). No entanto, como assinalado por Dawkins e Stockey, (2001), os modelos experimentais de enfisema induzido por instilação de protease nas vias respiratórias são extremamente úteis no estudo da doença após a sua instilação, como foi o nosso objetivo neste estudo.

Embora inúmeras informações estejam disponíveis na literatura acerca das alterações estruturais secundárias à exposição à papaína, poucos estudos abordam o comportamento funcional do pulmão nesses modelos. Tal escassez deve-se provavelmente à maior dificuldade de realização de medidas funcionais em camundongos. Mensurar parâmetros da função pulmonar em animais tão pequenos quanto estes representa um desafio. Entretanto, está comprovado que, com o equipamento adequado, como foi o caso, as medidas são fiéis e fornecem informações importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas doenças pulmonares (Bates, 1988).

Há várias técnicas desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, porém o método de oclusão das vias aéreas ao final da inspiração difundiu-se por apresentar a vantagem de individualizar variações de pressões em seus componentes resistivos, elásticos e viscoelásticos e/ou inhomôgeneos

(Bates, 1985b). Avanços importantes ocorreram clínica e experimentalmente a partir desse conhecimento.

No presente estudo, observamos aumento dos componentes elástico (Est) e resistivo ($\Delta P1$) nos camundongos machos e fêmeas que receberam papaína (grupos PAPM e PAPF), e viscoelásticos (ΔE e $\Delta P2$) em machos (grupo PAPM); estes últimos resultados são relativos à periferia do pulmão (Figuras 16,18,17 e 19 respectivamente).

Na fase inicial da doença, possivelmente encontraríamos a redução da elastância, como consequência da perda de recolhimento elástico determinado pelas fibras do parênquima pulmonar, como o apresentado por Fusco e cols., (2001). No entanto, no modelo de enfisema induzido por papaína em camundongos, dada a vasta destruição do parênquima pulmonar e progressiva limitação ao fluxo aéreo, com retenção progressiva de volume nos pulmões, observamos o aumento da Est, indicando um pulmão mais rígido e menos complacente. O trabalho supracitado administrou a mesma dose por instilação única em ratos Wistar, e analisou os dados 40 dias após a instilação da papaína, o que não corresponde ao nosso protocolo. Adicionalmente, Borzone e cols, (2007), chamaram a atenção para as diferenças entre as espécies, em modelos animais, quando comparou os efeitos da papaína entre hamsters e ratos. Ambos desenvolveram características do enfisema pulmonar, entretanto, hamsters apresentaram, comparativamente, maior diâmetro alveolar médio, fragmentação do septo alveolar e processo inflamatório que os ratos. Segundo Ihrig, 1971, os ratos são menos suscetíveis ao desenvolvimento da doença por apresentarem maiores níveis da anti-protease α -1 anti-tripsina. Os camundongos apresentam apenas 60% dos níveis encontrados em ratos,

sugerindo uma maior predisposição ao desenvolvimento da doença. Estudos em modelos de enfisema pela exposição à fumaça de cigarro relacionaram a gravidade do enfisema desenvolvido aos níveis de anti-protease presentes (Guerassimov e cols., 2004, Takubo e cols., 2002).

$\Delta P1$ reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais (Similowski, 1989) e o seu aumento é coerente com o modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica desenvolvido e amplamente descrito (Cosio, 2001). $\Delta P2$ está relacionada ao relaxamento por tensão (*stress relaxation*) do tecido pulmonar, juntamente com contribuição do *pendelluft* (Bates, 1988; D'angelo, 1989; Saldiva e cols., 1992). O aumento de ΔE e $\Delta P2$ (Figuras 14 e 16) obtido nos machos que receberam papaína (grupo PAPM) demonstra maior heterogeneidade do parênquima destes animais (Bates e cols., 1985; 1988). O aumento da pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inomogêneo ($\Delta P2$), e o componente viscoelástico da elastância (ΔE) verificado nesse grupo, sugerem uma lesão mais grave e com a presença de áreas inomogêneas na periferia, quando comparado ao grupo das fêmeas (PAPF)

Em estudos prévios, Dransfield e cols., (2007); Gan e cols., (2006) e Martinez e cols., (2006), ressaltam as diferenças entre os gêneros no desenvolvimento do enfisema. Sverzellatti e cols., (2009), descrevem que o gênero influencia a relação entre enfisema e características clínicas, sendo o enfisema no sexo masculino predominante na periferia pulmonar, com maior acometimento de vias aéreas distais, corroborando os resultados de ΔE e $\Delta P2$ encontrados nos animais machos em nosso estudo.

Alterações da mecânica pulmonar foram acompanhadas por aumento da capacidade residual funcional (CRF) (Figura 22), diâmetro alveolar médio (Tabela 2) e redução na quantidade total de fibras colágenas e do sistema elástico do parênquima pulmonar (Figura 25 e 26) em machos e fêmeas. A destruição e desorganização das fibras da matriz é uma característica central do enfisema, o que está coerente com a redução dessas fibras no parênquima após a instilação da enzima proteolítica (Figura 21) (Johanson e cols.1973; Kuhn e cols., 1976). Tal redução do número de fibras e a destruição de componentes estruturais do parênquima pulmonar ocasionam limitação ao fluxo aéreo. Progressivamente, o aumento do volume retido nos pulmões (CRF) é acompanhado de alargamento dos espaços alveolares, e redução da área efetiva para as trocas gasosas (Figura 20), o que caracteriza o enfisema grave proposto por este modelo (Snider e cols., 1986).

Em relação à variação da massa corporal, os animais de ambos os gêneros expostos à papaína apresentaram menor ganho de massa corporal em relação a inicial, quando comparados aos seus controles (Figura 15), achado este que se coaduna com as manifestações extrapulmonares do enfisema, como o consumo muscular observado em pacientes com DPOC grave (Yoshida e Tuder, 2007).

Além de alterações na mecânica pulmonar, a inflamação crônica representa componente central na fisiopatologia do enfisema, sendo igualmente bem documentada a resposta inflamatória induzida por exposição a proteases com participação central de neutrófilos, linfócitos T e macrófagos (Hayes e cols., 1975; Parra e cols., 1980; Bowden, 1984). O processo inflamatório, caracterizado por aumento do número de células

polimorfonucleares e de celularidade total, foi significativamente maior nos animais que receberam papaína quando comparados aos seus controles (Figura 23). Ambos os gêneros apresentaram comportamento semelhante. Entretanto, no presente estudo, observamos redução no número de células mononucleares nos animais expostos à papaína. Apesar da aparente contradição com a descrição da literatura (Keatings e cols., 1997; Retamales e cols., 2001; Di Stefano e cols., 1998) comportamento semelhante foi observado em estudo sobre a exposição temporal de papaína em ratos Wistar, com um aumento do número de células mononucleares nos 3 primeiros dias após a instilação de papaína, seguida de uma redução deste número a partir do 10^o até 60^o dia após a exposição, período que compreende os 14 dias do nosso estudo (Pastor e cols., 2006).

Independente de eventuais particularidades nos principais tipos celulares envolvidos no processo inflamatório, a presença de inflamação tem sido diretamente relacionada ao grau de destruição alveolar e gravidade da doença, tanto clínica (Saetta e cols., 1998) quanto experimentalmente (Churg e cols., 2007). Dados prévios de nosso grupo demonstram, em outros modelos de inflamação, uma correlação positiva entre o aumento de células inflamatórias no parênquima pulmonar e aumento de Est (Laks e cols., 2008). A Figura 24 ilustra esta correlação, sugerindo que o recrutamento de células inflamatórias para o parênquima pulmonar, ocasiona o espessamento do septo alveolar e conseqüentemente o aumento da elastância pulmonar.

O estresse oxidativo também tem sido sugerido como forte contribuinte na patogênese e progressão da DPOC em diferentes espécies (Saetta e cols., 2002; Hautamaki e cols., 1997; Macne, 2001; Pryor e Stone, 1993).

Como resultado do estresse oxidativo, o organismo tenta reduzir o dano utilizando-se do sistema de defesa antioxidante. Foram medidas, neste estudo, a atividade de enzimas envolvidas na cadeia do estresse oxidativo: catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), avaliada através da relação glutathiona reduzida/ glutathiona oxidada (GSH/ GSSG), bem como a peroxidação lipídica, avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras de tecido pulmonar de camundongos instilados com salina e papaína (Figuras 27, 28 e 29).

Sabe-se que a peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação) é um indicativo de que a condição de estresse oxidativo está estabelecida (Jayaraj e cols., 2006; Weng e cols., 2007). Os processos de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais, pois seus produtos atuam significativamente na reação em cadeia a partir do ácido aracônico e, portanto, na resposta inflamatória (Halliwell, 1990). A lipoperoxidação é uma cascata de eventos e cada evento da reação, a partir do radical lipídico, gera um subproduto que pode ser dosado para quantificar o dano oxidativo. O TBARS está no início dessa cascata de eventos.

Já foi mencionado que a variação na atividade de enzimas antioxidantes indica o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Pryor, 1986). Houve, de fato, a diminuição de CAT nos grupos que receberam instilação de papaína (PAPM e PAPF) (Figura 28), indicando a condição de estresse oxidativo nestes grupos lesados, depletando a enzima do sistema antioxidante, CAT. O grupo PAPM, diferentemente do PAPF, não apresentou aumento de TBARS (Figura 27) e não obteve diferença significativa na relação GSH/GSSG (Figura 29), entretanto, apresentou consumo da enzima CAT, caracterizando a presença do estresse oxidativo.

A razão GSH/GSSG é considerada um marcador de estresse oxidativo e da atividade da (GPx). O sistema redox GSH é crucial na manutenção intracelular da homeostase GSH/GSSG, que é crítico para os processos fisiológicos celulares normais e representa um dos mais importantes sistemas de defesa antioxidantes nas células pulmonares (Meister e Anderson, 1983). Este sistema usa o GSH como substrato na detoxificação de peróxidos tais como H_2O_2 e peróxidos lipídicos, e através da glutathione peroxidase, gera GSSG que tem importante ação protetora antioxidante contra radicais livres e outros oxidantes, estando relacionada à resposta inflamatória (Deneke e Fanburg, 1989; Droge e cols., 1994). A redução da relação GSH/GSSG ocorrida no grupo PAPF, sugere uma maior ação da glutathione peroxidase em uma possível tentativa de combate ao dano oxidativo no pulmão das fêmeas que receberam papaína e corrobora a descrição da literatura para exposições agudas a proteases e a fumaça de cigarro (Li e cols., 1994; Rahman e cols., 1996) (Figura 29).

Vários autores (MacNee, 2000; Langley- Evans e cols., 1996) relatam que mulheres fumantes ativas apresentam deficiência relativa de estrogênio quando comparadas a não fumantes. O cigarro induz isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2 do citocromo P450, que alteram o metabolismo do estrógeno. A terapia de reposição hormonal no período da pós-menopausa está associado à melhora da função pulmonar, redução da obstrução do fluxo aéreo e hiperreatividade brônquica, sugerindo que mulheres com idade até 50 anos, aproximadamente, são protegidas pela ação hormonal normal.

Esta pode ser uma explicação viável para os nossos resultados, uma vez que analisamos parâmetros da mecânica pulmonar, histologia e o estresse oxidativo em camundongos adultos jovens, e embora os animais do grupo PAPF apresentem lesões compatíveis com o enfisema pulmonar, estas manifestações são mecanicamente mais pronunciadas nos animais do grupo de machos (PAPM), com maior comprometimento da periferia pulmonar. Por terem apresentado um aumento de TBARS e uma redução da relação GSH/GSSG quando comparadas aos animais machos (PAPM), e adicionando-se o comportamento da mecânica pulmonar, as fêmeas (PAPF) parecem apresentar diferenças no mecanismo de lesão, como previamente descrito em trabalhos com humanos (Sverzellatti e cols., 2009), manifestando uma forma menos extensa da doença e com evolução mais lenta quando comparada ao sexo masculino.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína utilizado neste estudo manifestou-se diferentemente em machos e fêmeas. A exposição à papaína provocou alterações funcionais mais acentuadas em machos, com aumento dos componentes elástico, resistivo e viscoelástico da mecânica pulmonar. Por outro lado, as fêmeas apresentaram apenas aumento dos componentes elástico e resistivo.

Apesar das diferenças funcionais, o aumento de celularidade no parênquima pulmonar, caracterizado por influxo de células polimorfonucleares, foi semelhante entre machos e fêmeas. A capacidade residual funcional e o diâmetro alveolar médio apresentaram-se aumentados, e os animais apresentaram menor ganho de massa corporal em ambos os grupos lesados, indicando lesão do parênquima pulmonar. A redução do número de fibras colágenas e elásticas corroboram o perfil de lesão grave desenvolvido nos modelos de protease, no período de 14 dias pós-estímulo.

Foi observado, como nos parâmetros de mecânica pulmonar, dimorfismo sexual nas enzimas antioxidantes no pulmão. Isto sugere um mecanismo de defesa pulmonar contra as ERO diferente entre machos e fêmeas. Os resultados do grupo PAPM são compatíveis com lesões pulmonares mais graves e já estabelecidas, quando comparados às fêmeas .

PERSPECTIVAS FUTURAS

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar temporalmente os efeitos da exposição à papaína em camundongos de ambos os gêneros.

- Avaliar os efeitos de doses maiores de papaína em fêmeas.

- Avaliar a ação de terapias celulares e antioxidantes no modelo estabelecido.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABERGEL, R. PL; PIZURRO, D.; MEEKER, C. A. Biomechanical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. **J. Invest. Dermatol**, 84: 384,1985.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzimology** 105:121-126, 1984.

AL JAMAL, R.; ROUGHLEY, P.J.; LUDWIG, M.S. Effect of glycosaminoglycan degradation on lung tissue viscoelasticity. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 280: L306-L315, 2001.

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

ARMSTRONG L.; THICKETT D.R.; MANSELL J. PL; LONESCU M.; HOYLE E.; BILLINGHURST R. C.; POOLE A. R.; MLLAR A. B. Changes in collagen turnover in early respiratory distress. **Am J Respir Crit Care Med** 160:1910-5, 1999.

AULER-JR., J.O.; ZIN, W.A.; CALDEIRA, M.P.; CARDOSO, W.V.; SALDIVA, P.H. Pre- and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. **Chest** 92: 984-990, 1987.

BANERJEE, A.; MANDAL, A.; CHANDRA, D.; CHAKRABORTI. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molec Cell Biochem.** 253(1-2): 307-312, 2003.

BARNES, P.J. Chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med** 343: 269-280, 2000.

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

BARNES, P.J. Emerging targets for COPD THERAPY. **Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy** 4: 675-683, 2005.

BARNES, P.J. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. **Chest** 129: 151=155, 2006

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M.; DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J Med** 91: 2-13, 1991.

BATES, J.H.T.; DECRAMER, M.; CHARTRAND, D.; ZIN, W.A.; BÖDDENER, A.; MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **J. Appl. Physiol.**, 59: 732-737, 1985a.

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

BATES, J.H.T.; LUDWIG, M.S.; SLY, P.D.; BROWN, K.; MARTIN, J.G.; FREDBERG, J.J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J. Appl. Physiol.** 65: 408-414, 1988.

BECKMAN, K.; AMES, B. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev.** 78(2): 547-581, 1998.

BERG, S.; WEDZICHA, J.A. COPD exacerbation: definitions and classifications. **Eur. Respir. J.** 21, S41: 46S-53S, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254, 1976.

BORZONE G.; LIBERONA L., OLMOS P.; SAÉZ C.; MENESES M.; REYES T.; MORENO R.; LISBOA C.; Models emphysema pulmonary hamster and rats. **Am J Physiol.** Regulatory Integrative Comp. Physiol. 293:1342-1349, 2007.

BOWDEN D.H. The alveolar macrophage. **Environ. Health Perspect** 55, 327-341, 1984.

BOWLER, R.P.; BARNES, P.J.; CRAPO, J.D. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **COPD** 1: 255-277, 2004.

BREWER, K.K.; SAKAI, H.; ALENCAR, A.M.; MAJUMDAR, A.; AROLD, S.P.; LUTCHEN, K.R.; INGENITO, E.P.; SUKI, B. Lung and alveolar wall elastic and hysteretic behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. **J Appl Physiol** 95: 1926-1936, 2003.

BRIDGES, R.B.; FU, M.C.; REHM, S.R. Increased neutrophil myeloperoxidase activity associated with cigarette smoking. **Eur. J. Respir. Dis.** 67: 84-93, 1985.

BROWN, R.E.; BUTLER, J.P.; ROGERS, R.A.; LEITH, D.E. Mechanical connections between elastin and collagen. **Connect Tissue Res** 30: 295-308, 1994.

BRUSASCO, V.; WARNER, D.O.; BECK, K.C.; RODOARTE, J.R.; REHDER, K. Partitioning of pulmonary resistance in dogs: effect of tidal volume and frequency. **J. Appl. Physiol.** 66: 1190-1196, 1989.

BULL HB. Protein structure and elasticity. In: **Tissue Elasticity.** Washington, D.C. **Am Physiol Soc.**, p.33-42, 1957.

CARDOSO, W.V.; SEKHON, H.S.; HYDE, D.M.; THURLBECK, W.M. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. **Am. Rev. Respir. Dis.** 147: 975-981, 1993.

CARNEVALI, S.; NAKAMURA, Y.; MIO, T.; LIU, X.; TAKIGAWA, K.; ROMBERGER, D.J.; SPURZEM, J.R.; RENNARD, S.I. Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 274: L591-L598, 1998.

CASTRO, P.; LEGORA-MACHADO, A.; CARDILO-REIS, L.; VALENÇA, S.S.; PORTO, L.C.; WALKER, C.; ZUANY-AMORIN, C.; KOATZ, V.L. Inhibition of interleukin-1 β reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. **Eur J Pharmacol.** 498 (1-3):279-286, 2004.

CAVARRA, E.; BARTALESI, B.; LUCATTELLI, M.; FINESCHI, S.; LUNGHI, B.; GAMBELLI, F.; ORTIZ, L.A.; MARTORANA, P.A.; LUNGARELLA, G. Effect of cigarette smoke in mice with different levels of α 1-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 164: 886-890, 2001.

CAVARRA, E.; LUCATTELLI, M.; GAMBELLI, F.; BARTALESI, B.; FINESCHI, S.; SZARKA, A.; GIANNERINI, F.; MARTORANA, P.A.; LUNGARELLA, G. Humam SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new vivo model of pulmonary oxidative stress. **Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.** 281: L412-L417, 2001.

CELLI, B.R.; BARNES, P.J. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. Respir. J.** 29: 1224-1238, 2007.

CIENCEWICKI, J.; TREVEDI, S.; KLEEBERGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **J Allergy Clin Immunol.** 122(3): 456-468, 2008.

CHANG, H.K. & MORTOLA, J.P. Fluid dynamics factors in tracheal pressure measurement. **J. Appl. Physiol.** 51: 218-225, 1981.

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

CHESNUTT A. N.; MATTHAY M. A.; TIBAYAN F. A.; CLARK J. G. Early detection of type III procollagen peptide in lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. **Am J Resp Crit Care Med.** 156: 840-5, 1997

CHURG, A.; WANG, R.D.; XIE, C.; WRIGHT, J.L. α 1-antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 168: 199-207, 2002.

CHURG, A.; WANG, R.D.; TAI, H.; WANG, X.; XIE, C.; WRIGHT, J.L. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 170: 492-498, 2004.

CHURG, A.; WANG, R.; WANG, X.; ONNERVIK, P.O.; THIM, K.; WRIGHT, J.L. An MMP-9/-12 inhibitor prevents smoke-induced emphysema and small airway remodeling in guinea pigs. **Thorax** 62: 706-713, 2007.

CHURG, A.; COSIO, M.; WRIGHT, J.L. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. **Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.** 294: L612-L631, 2008.

CORRÊA, F.C.F.; CIMINELLI, P.B.; FALCÃO, H.; ALCÂNTARA, B.J.C.; CONTADOR, R.; MEDEIROS, A.S.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Respiratory mechanics and lung histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. **J. Appl. Physiol.** 91: 803-810, 2001.

COSIO, M.G. Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. Respir J.** 18: 41-49, 2001.

COTE, C.; ZILBERBERG, M. D., MODY, S.H.; DORDELLY, L. J.; and CELLI, B. Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD. **Eur. Resp. J.** 29: 923-929, 2007.

COTRAN R. S.; KUMAR V.; COLLINS T.; ROBBINS S. L. Pathology basis of disease. 6ª edição. **Philadelphia: W.B. Saunders:** 89-112, 1999.

COX G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. **J Immunol** 154: 4719-4725, 1995.

D'ANGELO, E.; CALDERINI, E.; TORRI, G.; ROBATTO, F.M.; BONO, D.; MILIC-EMILI, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J. Appl. Physiol.** 67: 2556-2564, 1989.

D'ANGELO, E.; PRANDI, E.; TAVOLA, M.; CALDERINI, E.; MILIC-EMILI, J. Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralyzed humans. **J. Appl. Physiol.** 77: 883-887, 1994.

D'ANGELO, E.; SANT'AMBROGIO, G.; AGOSTONI, E. Effect of diaphragm activity or paralysis on distribution of pleural pressure. **J. Appl. Physiol.** 37: 311-315, 1974.

DAMIANO, V.V.; TSANG, A.; KUCICH, U.; ABRAMS, W.R.; ROSENBLUM, J.; KIMBEL, P.; FALLAHNEJAD, M.; WEINBAUM, G. Immunolocalization of elastases in human emphysematous lungs. **J. Clin. Invest.** 78: 482-493, 1986.

DRANSFIELD M.T.; WASHKO G.R.; FOREMAN M.G.; ESTEPAR R. S. H.; REILY J.; BAILEY W.C. Gender differences in the severity of CT emphysema in COPD. **Chest.** 132: 464-470, 2007.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology** 186:421-431, 1990.

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

DEMEDTS, I.K.; MOREL-MONTERO, A.; LEBECQUE, S.; PACHECO, Y.; CATALCO, D.; JOOS, G.F.; PAUWELS, R.A.; BRUSSELLE, G.G. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from COPD patients. **Thorax** 61: 1960-2015, 2006.

DENEKE SM, FANBURG BL. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**; 257: L163±L173, 1989.

DHAMI, R.; GILKS, B.; XIE, C.; ZAY, K.; WRIGHT, J.; CHURG, A. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by α 1-antitrypsin. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 22: 244-252, 2000.

DI STEFANO A.; CARAMORI G.; OATES T.; CAPELLI A.; LUSUARDI M.; GNEMMI I.; IOLI F.; CHUNG D. F.; DONNER C. F.; BARNES PL J. Increased expression of nuclear factor κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. **Eur Respir J** 20:556-563, 2002

DI STEFANO A.; CAPELLI A.; LUSSUARDI A., BALBO P.; VECCHIO C.; MAESTRELLI P.; MAPP C. E.; FABBRI L. M.; DONNER C. F.; SAETTA M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. **Am J Respir Crit Care Med.** 158: 1277-1285, 1998.

DON, H.F.; ROBSON, J.G. The mechanics of the respiratory system during anesthesia. **Anesthesiology** 26: 168-178, 1965.

DORRINGTON, K.L. The theory of viscoelasticity in biomaterials. In: **The mechanical properties of biological materials** (XXXIV Symposium of the Society for Experimental biology). Cambridge: Cambridge University Press, , p.289-314, 1980.

DROGE W, SCHULZE-OSTHOFF K, MIHM S,. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. **FASEB J** 8: 1131±1138, 1994.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 82: 47-95, 2002.

EIDELMAN, D.; SAETTA, M.P.; GHEZZO, H.; WANG, N.S.; HOIDAL, J.R.; KING, M. COSIO, M.G. Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to alveolar destruction. Functional implications. **Am. Rev. Respir. Dis.** 141: 1547-1552, 1990.

ENTZIAN P.; HUCKSTADT A.; KREIPE H.; BARTH J. Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. **Am Rev Respir Dis**, 142: 1079-82, 1990.

EVANS, W. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **Am J Clin Nutr**. 72: 647S-657S, 2000.

EZZATI, M.; LOPEZ, A.D. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. **Lancet**. 362: (9387) 847-852, 2003.

FAFFE, D.S.; D'ALESSANDRO, E.S.; XISTO, D.G.; ANTUNES, M.A.; ROMERO, P.V.; NEGRI, E.M.; RODRIGUES, N.R.D.; CAPELOZZI, V.L.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Mouse strain dependence of lung tissue mechanics: role of specific extracellular matrix composition. **Respir Physiol Neurobiol** 152: 186-196, 2006.

FAFFE, D.S.; ZIN, W.A. What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude? **Respir Physiol Neurobiol** 144: 59-70, 2004.

FAFFE, D.S.; ROCCO, P.R.; NEGRI, E.M.; ZIN, W.A. Comparison of rat and mouse pulmonary tissue mechanical properties and histology. **J Appl Physiol** 92: 230-234, 2002.

FLETCHER, C. and PETO, R. The natural history of chronic airflow obstruction. **Br. Med. J.** 1:1645-1648. 1977.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** 43(1): 61-68, 1997.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J.A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do trino físico. **Rev Port Cien Desp** 7(2): 257-275, 2006.

FIKELSTEIN, R.; FRASER, R.S.; GHEZZO, H.; COSIO, M.G. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** 152: 166-1672, 1995.

FINLAY, G.A.; ODRISCOLL, L.R.; RUSSEL, K.J.; DARCY, E.M.; MASTERSON, J.B.; FITZGERALD, M.X.; OCONNOR, C.M. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** 156: 240-247, 1997.

FREDBERG, J.J.; STAMENOVIC, D. On the imperfect elasticity of lung tissue. **J Appl Physiol** 67: 2408-2419, 1989.

FLÓ.C.; LOPES, F. D. T. Q. S.; KASAHARA, I. D., SILVA D. C.A.; JESUS, C. C. R.; RIVERO, D. H. R. F. ; SALDIVA P. H. N. ; MARTINS M. A.; JACOB FILHO W. Effects of exercise training on papain- induced pulmonary emphysema in Wistar rats. **J Appl Physiol** 100:281-286, 2005.

FORONJY, R.F.; MIROCHNITCHENKO, O.; PROPOKENKO, O.; LEMAITRE, V.; JIA, Y.; INOUYE, M.; OKADA, Y.; DARMIENTO, J.M. Seroxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 173: 623-631, 2006.

FUNG, Y.C. **Biomechanics**. New York: Springer-Verlag, 1993.

FUSCO, L.B; PÊGO-FERNANDES, P.M.; XAVIER, M. A.; PAZETTI, R.; RIVERO, D. H. R. F.; CAPELOZZI, V.L.; JATENE, F.B. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. **J. Pneumol**. 2001.

FUST, A.; BATES, J.H.T.; LUDWIG, M.S. Mechanical properties of mouse distal lung: in vivo versus in vitro comparison. **Respir Physiol Neurobiol** 143: 77-86, 2004.

GAO, S.; CHEN, K.; ZHAO, Y.; RICH, C.B.; CHEN, L.; LI, S.J.; TOSELLI, P.; STONE, P.; LI, W. Transcriptional and postranscriptional inhibition of lysil oxidase expression by cigarette smoke condensate in cultured rat fetal lung fibroblasts. **Toxicol. Sci**. 87: 197-203, 2005.

GAN, W. Q.; MAN SF P., POSTMA. D.S.; CAMP, P.; SIN. D.D. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. **Respiratory research**. 7:52, 2006.

GARCIA, C.S.N.B.; ROCCO, P.R.M.; FACCHINETTI, L.D.; LASSANCE, R.M.; CARUSO, P.; DEHEINZELIN, D.; MORALES, M.M.; ROMERO, P.V.; GOLDFARB, A. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Can J Appl Physiol**. 24(3): 249-266, 1999.

GERLI R.; IBA L.; FRUSCHELLI C. A fibrillar elastic apparatus around lymph capillaries. **Anat Embryol (Berl)**. 181: 281-6, 1990.

GOLD - GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary D. <http://www.goldcopd.com,2004>.

GOLDSTEIN R. H. Control of type I collagen formation in the lung. **Am J Physiol**. 5:L29-40, 1991.

GROSS P.; BAJAK M. A.; TOLKER E.; KASCHAK M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. **J Occuped Med**. 6:481-3, 1964.

GROSS, P.; PFITZER, E.A.; TOKER, A. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Arch Environ Health** 11: 50-58, 1965.

GRUMELLI, S.; CORRY, D.B.; SONG, L.Z.; SONG, L.; GREEN, L.; HUH, J.; HACKENN, J.; ESPADA, R.; BAG, R.; LEWIS, D.E.; KHERADMAND, F. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. **PLoS. Med.** 1: e8, 2004.

GUERASSIMOV, A.; HOSHINO, Y.; TAKUBO, Y.; TURCOTTE, A.; YAMAMOTO, M.; GHEZZO, H.; TRIATAFILLOPOULOS, A.; WHITTAKER, K.; HOIDAL, J.R.; COSIO, M.G. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** 170: 974-980, 2004.

HADDAD A.G., PIMMEL R. L.; SCAPEROTH D.D.; BROMBERG P. A. Forced oscillatory respiratory parameters following papain exposure in dogs. **J Appl Physiol.** 46:61-6, 1979.

HALBERT, R.J.; NATOLI, J.L; GANO, A.; BADAMGARAV, E.; BUIST, A.S.; MANNINO, D.M. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. **Eur. Respir. J.** 28: 523-532, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** 186: 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med** 91(suppl 3C): 14S-22S, 1991.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; GALGOCZY, G.; CSENDES, T. Forced oscillatory impedance of the respiratory system at low frequencies. **J. Appl. Physiol.** 60: 123-132, 1986.

HANTOS, Z.; DAROCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S. Low frequency respiratory mechanical impedance in the rat. **J. Appl. Physiol.** 63: 36-43, 1987.

HARBER, P.; TASHKIN, D.P.; SIMOMONS, M.; CRAWFORD, L.; HNIZDO, E.; CONNET, J. Effect of occupation exposures on decline of lung function in early chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 176: 994-1000, 2007.

HAUTAMAKI, R.; KOBAYASHI, D.; SENIOR, R.; SHAPIRO, S. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Science** 277: 2002-2004, 1997.

HAYES, J.A., KORTHY A. and SNIDER G. L. The pathology of the elastase induced panacinar emphysema in hamsters. **J. Pathol.** 117, 1-14, 1975.

HEARD, B. E. Pathology of Chronic Bronchitis and Emphysema. **London:** Churchill, 1969.

HIL, C.S.; FERRANTE, A. Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid. **Arch Immunol Ther Exp.** 55(2): 99-110, 2007.

HILDEBRANDT, J. Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. **J. Appl. Physiol.** 28: 365-372, 1970.

HOFFMANN, P.R.; DECATHELINEAU, A.M.; OGDEN, C.A.; LEVERRIER, Y.; BRATTON, D.L.; DALEKE, D.L.; RIDLEY, A.J.; FADOCK, V.A.; HENSON, P.M. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. **J. Cell. Bio.** 155: 649-659, 2001.

HOOG J. C; CHU F.; UTOKAPARCH S.; WOODS R.; ELLIOTT W. M; BUZATU L; CHERNIACK R. M; ROGERS R. M; SCIURBA F. C; COXSON H. O; PARE P. D. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med.** 350: 1645-2653, 2004.

HOOG J.C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet.** 364:709-721, 2004.

HOUGHTRON, A.M. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. **J Clin Invest.** 116:753-759, 2006.

HOIDAL, J.R.; FOX, R.B.; LEMARBE, P.A.; PERRI, R.; REPINE, J.E. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. **Am. Rev. Respir. Dis.** 123: 85-89, 1981.

HOPPIN, J.R.; F.G.; STOTHERT, J.C.; GREAVES, I.A.; LAI, Y-L, HILDEBRANDT, J. Lung recoil: elastic and rheological properties. In: Handbook of Physiology. The Respiratory System. Mechanics of Breathing. Bethesda, MD: **Am. Physiol. Soc.**, sect. 3, vol. III, pt. 1, chapt. 13, p. 195-215, 1986.

HORI, T. & HILDEBRANDT, J. Dynamic compliance, limit cycles, and static equilibrium of excised cat lung. **J. Appl. Physiol.** 31: 423-430, 1971.

IIZUKA, T.; ISHII, Y.; ITOH, K.; KIWAMOTO, T.; KIMURA, T.; MATSUNO, .; MORISHIMA, Y.; HEGAB, A.E.; HOMMA, S.; NOMURA, A.; SAKAMOTO, T.; SHIMURA, M.; YOSHIDA, A.; YAMAMOTO, M.; SEKIZAWA, K. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. **Genes Cells** 10: 1113-1125, 2005.

IMAI, K.; DALAL, S.S.; CHEN, E.S.; DOWNEY, R.; SCHULMAN L.L.; GINSBURG, M.; DARMIENTO, J. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 163: 786-791, 2001.

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

ITO, K.; ITO, M.; ELLIOTT, W.M.; COSIO, B.; CARAMORI, G.; KON, O.M.; BARCZYK, A.; HAYASHI, S.; ADCOCK, I.M.; HOGG, J.CO.; BARNES, P.J. Decreased histone deacetylase active in chronic obstructive pulmonary disease. **N. Engl. J. Med.** 352: 1967-1976, 2005.

JAYARAJ, R.; ANAND, T.; LAKSHMANA RAO, P.V. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. **Toxicology** 220: 136-146, 2006.

JANOFFI A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. **Am Rev Respir Dis** 132:417-433,1985

JEFFERY P. K. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. **Am J Respir Crit Care Med** 164: S28-S-38, 2001

JOHANSON W. G., REYNOLDS R. C., SCOTT T. C. AND PIERCE A. K. Connective tissue damage in emphysema in rats. **Am. Rev. Respir. Dis.** 107, 589-595, 1973.

JOSS L.; PARE, P. D.; and SANDFORD, A. J. Genetic risk factors. Chronic obstructive lung diseases. **B. C. Decker. London**, United Kingdom. 53-64, 2002.

KEATINGS VM, JATAKANON A, WORSDELL YM, BARNES PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. **Am J Respir Crit Care Med.**155:542–548, 1997.

KIM, W. D; EIDELMAN D. H; IZQUIERDO J.L; GHEZZO G. H; SAETTA M.P; COSIO M.G. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers: two distinct morphologic and functional entities. **Am Rev Respir Dis.** 132: 182-185, 1991.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.** 64: 441-450, 1988a.

KOCHI, T.; OKUBO, S.; ZIN, W.A.; MILIC-EMILI, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J. Appl. Physiol.** 64: 2636-2646, 1988b.

KUHN C, YU S.; CHARAPLYVY M.; LINDER H. E.; SENIOR R. M. The Dincuction Of Emphysema With Elastase. Ii. Change In Conective Tissue. **Lab Invest.** 34:372-380, 1976.

KUHN C.; STARCHER B. C. The Effect Of lathyrogens On The Evolution Of Elastase-Induced Emphysema. **Am Rev Respir Dis.** 122:453-460, 1980.

LAI-FOOK SJ. Lung parenchyma described as a prestressed compressible. **J Biomechanics** 10: 357-365, 1977.

LANGLEY-EVANS S. C.; PHILLIPS G. J.; JACKSON A.A.; Sulhur dioxide: a potent glutathione depheting agent. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol** 114:89-98, 1996.

LAKS D, DE OLIVEIRA RC, DE ANDRÉ PA, MACCHIONE M, LEMOS M, FAFFE D, SALDIVA PH, ZIN WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. **Inhal Toxicol.** 20(11):1037-1042, 2008.

LAURELL, C.B.; ERICKSSON, S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. **Scand J. Clin. Invest.** 15: 132-140, 1963.

LAURENT, P.; JANOFF, A.; KAGAN, H.M. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. **Am. Rev. Respir. Dis.** 127: 189-192, 1983.

LAMBERTUCCI, R.; LEVEDA-PIRES, A.; ROSSONI, L; PITHON-CURI, T. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and RNAm levels in soleus muscle from young and aged rats. **Mech Aging Develop.** 128(3): 267-275, 2007.

LEE, J. KOO, N. MIN, D.B. Reative oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Compre Rev Food Sci Food Safety.** 3: 21-33, 2004.

LOPES F. D. T. Q. S.; PINTO, S. T. ; ARANTES- COSTA F.M. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. **Environmental Research.** 109: 544-551, 2009

LÓPEZ-AGUILAR, J.; ROMERO, P.V. Effect of elastase pretreatment on rat lung strip induced constriction. **Respir Physiol.** 113: 239-246, 1998.

LI XY, DONALDSON K, RAHMAN I, MACNEE W. An investigation of the role of glutathione in the increased permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. **Am Rev Respir Crit Care Med;** 149: 1518± 1525, 1994.

LIOU T. G. and CAMPBELL E. J. Quantum proteolyss resulting from release of single granules by human neutrophilis: a novel, nonoxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. **J Immunol** 157: 2624-2631, 1996.

LIU, M.; WANG, L.; LI, E.; ENHORNING, G. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs. **Clin. Exp. Allergy** 26: 270-275, 1996.

LIU, S.; ZHOU, Y.; WANG, X.; WANG, D.; LU, J.; ZHENG, J.; ZHONG, N.; RAN, P. Biomass fuels are the probable risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in rural South China. **Thorax** 62: 889-897, 2007.

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

LUDWIG, P.W.; HOIDAL, J.R. Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. **Am. Rev. Respir. Dis.** 126: 977-980, 1982.

MACEDO-NETO, A.; SANTOS, L.V.; MENEZES, S.L.; PAIVA, D.S.S.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats. **Chest** 113: 1667-1672, 1998.

MACNEE, W. Oxidants/Antioxidants and COPD. **Chest** 117: 303S-317S, 2000.

MACNEE W. Oxidantes stress and lung inflammation in airways disease. **Eur J Pharmacol.** 429:195-207, 2001.

MACNEE, W. Oxidants and COPD. **Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy** 4: 627-641, 2005 a.

MACNEE, W. Pulmonary a systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc. Am. Thorac Soc.** 2: 50-60, 2005 b.

MAHADEVA R.; SHAPIRO S.D. Chronic obstructive pulmonary disease. 3: experimental animal models of pulmonary emphysema. **Torax.** 57:908-914, 2002.

MAKSYM, G.N.; BATES, J.H.T. A distributed nonlinear model of lung tissue elasticity. **J Appl Physiol** 82: 32-41, 1997.

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

MANNINO D. M., HOMA D. M., AKINBAMI L. J., FORD E. S., REDD S. C. Chornic obstructive pulmonary disease surveillance- **United States. MMWR/ Surveill Summ** 51:1-16, 2002

MARTINEZ F.J.; FORSTER G.; CURTIS, J.L. Neet Research Group: predictors of mortality in patients with emphysema and severe airflow obstruction. **Am J Resp Crit Care Med.** 173: 1326-1334, 2006.

MARTIN, R.L.; SHAPIRO, S.D.; TONG, S.E.; VAN WART, H. Macrophage metalloelastase inhibitors. In: New drugs for asthma, allergy, and COPD, edited by HANSEL, T.T.; BARNES, P.J. Basel Karger: **Prog Respir. Res.** 31: 177-180, 2001.

MCCUSKER, K.; HOIDAL, J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke exposed hamsters. **Am. Rev. Respir. Dis.** 141: 678-682, 1990.

MEAD, J.; WHITTENBERGER, L.; RADFORD, E.P.; JR. Surface tension as a factor in pulmonary volume-pressure hysteresis. **J Appl Physiol** 10: 191-196, 1957.

MEAD, J. Mechanical properties of lungs. **Physiol. Rev.** 41: 281-330, 1961.

MEAD, J. Contribution of compliance of airways to frequency-dependent behavior of lungs. **J. Appl. Physiol.** 26: 670-673, 1969.

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

MEISTER A, ANDERSON ME. Glutathione. **Ann Rev Biochem** 52: 711±760, 1983.

MICHAUD C. M.; MURRAY C. J.; BLOOM B. R.; Burden of disease – implications for future research. **JAMA** 285: 535-539, 2001

MIJAILOVICH, S.M.; STAMENOVIC, D.; FREDBERG, J.J.; Toward a kinetic theory of connective tissue micromechanics. **J Appl Physiol** 74: 665-681, 1993.

MIJAILOVICH, S.M.; STAMENOVIC, D.; BROWN, R.; LEITH, D.E.; FREDBERG, J.J. Dynamic moduli of rabbit lung tissue and pigeon ligamentum propatagiale undergoing uniaxial cyclic loading. **J Appl Physiol** 76: 773-782, 1994.

MILIC-EMILI, J. Ventilation. In: **Regional differences in the lung**. New York, N.Y., Academy Press Inc. Editado por WEST, J.B.; cap. 4, p. 167-199, 1977.

MONTES G. S. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibers in tissues. **J Braz Assoc Adv Sci.** 44: 224-33, 1992.

MOREIRA, L.M.; GOBBI, C.; FEIJÓ, M.; ROCCO, P.R.M.; ZIN, W.A. Mechanical and morphometry after pneumoperitoneum in normal rats. **Eur. Respir. J.**, 10: 1321-1326, 1997.

MOTA, M.P., FIGUEIREDO, P, DUARTE, J.A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Rev Port Cienc Desp.** 4(1): 81-110, 2004.

MORENO, I.M.; PICHARDO, S.; JOS, A.; GOMEZ-AMORES, L.; MATE, A.; VAZQUEZ, C.M.; CAMEAN, A.M. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicol** 45: 395-402, 2005.

MORTOLA, J.P.; NOWORAJ, J.A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J. Appl. Physiol.** 55: 250-253, 1983.

MOUNT, L.E. The ventilation flow - resistance and compliance of rat lungs. **J. Appl. Physiol.** 127:157-167, 1955.

NEGRI E. M.; MONTES G. S.; SALDIVA P. H. N.; CAPELOZZI V. L. Architectural remodelling in acute and chronic interstitial lung disease: fibrosis or fibroelastosis? **Histopathology** 37: 393-401, 2000.

NYUNOYA, T.; MONICK, M.M.; KLINGELHUTZ, A.; YAROVINSKY, T.O.; CAGLEY, J.R.; HUNNINGHAKE, G.W. Cigarette smoke induces cellular senescence. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 35: 681-688, 2006.

OTIS, A.B.; MCKERROW, C.B.; BARTLETT, R.A.; MEAD, J.; MCILROY, M.B.; SELVERSTONE, N.J. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. **J. Appl. Physiol.** 8: 427-443, 1956.

O'BYRNE P.M.; WALTERS E. H.; GOLD B.D. Neutrophil depletion inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure in dogs. **Am Rev Resp Dis** 130:214-219, 1984.

PASTOR L. M.; SANCHEZ-GASCON J.C.; GIRONA C.M.; BERNAL-MANAS E.; MORALES E.; BELTRAN-FRUTOS; CANTERAS M. Morphogenesis of rat experimental pulmonary emphysema induced by intratracheally administered papain: changes in elastic fibres. **Histol Histopathol** 21: 1309-1319, 2006.

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

PAUWELS, R.A.; BUIST, A S.; MA, P.; JENKINS, C.R.; HURD, S.S. Global strategy for the diagnosis, management, prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, Blood Institute and world health. Organization global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. **Respir. Care.** 163:1256-1276, 2001.

PAUWELS, R.A.; RABE, K.F. Burden and clinical features pulmonary disease (COPD). **Lancet.** 364: 613-620, 2004.

PARRA S.C., GADDY R. AND TAKARO T. Early ultrastructural changes in papain induced experimental emphysema. **Lab invest.** 42, 277-289. 1980.

PELOSI P; ROCCO P. R. M.; NEGRINI D.; PASSI A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. **An Acad Bras Cien.**;79: 285-297, 2007.

PEMBERTON, P.A.; KOBAYASHI, D.; WILK, B.J.; HENSTRAND, J.M.; SHAPIRO, S.D.; BARR, P.J. Inhaled recombinant alpha 1-antitrypsin

ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. **COPD** 3: 101-108, 2006.

PESLIN, R.; PAPON, J.; DUVIVER, C.; RICHALET, J. Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. **J. Appl. Physiol.** 39: 523-534, 1975.

POWERS, S.R.; MANNAL, R.; NECLERIO, M.; ENGLISH, M.; MARR, C.; LEATHER, R.; UEDA, H.; WILLIAMS, G.; CUSTEAD, W.; DUTTON, R. physiologic consequences of positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation. **Ann. Surg.** 178: 265-271, 1973.

PRYOR, W. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Ann Rev Physiol.** 48: 657-667, 1986.

PRYOR, W.A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogenperoxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. **Ann. Ny. Acad. Sci.** 686: 12-27, 1993.

PUSHPAKOM K; HOOG J. C; WOOLCOCK A. J; ANGUS A. E; MACKLEM P. T; THURLBECK W. M. Experimental papain-induced emphysema in dogs. **Am Rev Respir Dis.** 102: 778-789, 1970.

RAGHOW R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. **FASEB J**; 8: 823- 31, 1994.

RAHMAN I, LI XY, DONALDSON K, HARRISON DJ, MACNEEW. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. **Am J Physiol**; 269: L285±292, 1995.

RAHMAN I, LAWSON MF, SMITH CAD, HARRISON DJ, MACNEE W. Induction of c-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. **FEBS Lett**; 396: 21±25, 1996.

RAHMAN I.; KILTY K. Antioxidantes therapeutic targets in COPD. **Curr Drug Targets.** 7: 707-720, 2006.

RENNARD, S.I.; TOGO, S.; HOLZ, O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. **Proc. Am. Thorac. Soc.** 3: 703-708, 2006.

RENNARD, S.I.; FOGARTY, C.; KELSEN, S.; LONG, W.; RAMSDELL, J.; ALLISON, J.; MAHLER, D.; SAADEH, C.; SILER, T.; SNELL, P. The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 175: 926-934, 2007.

RETAMALES, I., ELLIOTT, W.M.; MESHI, B.; COXSON, H.O.; PARE, P.D.; SCIURBA, F.C.; ROGERS, R.M.; HAYASHI, S.; HOGG, J.C. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 164: 469-473, 2001.

ROCCO, P.R.M.; FONSECA, S.M.S.; PINTO, A.P.; MEDEIROS, A.S.; ZIN, W.A. Effects of prosthetic reconstruction of the abdominal wall on respiratory mechanics in rats. **Respir. Physiol.** 115: 35-43, 1999.

ROCCO, P.R.M.; NEGRI, E.M.; KURTZ, P.M.; VASCONCELLOS, F.P.; SILVA, G.H.; CAPELOZZI, V.L.; ROMERO, P.V.; ZIN, W.A. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med** 164: 1067-1071, 2001.

RODARTE, J.R. & REHDER, K. Dynamics of respiration. In: **The respiratory system. Mechanics of breathing.** Editado por MACKLEN, P.T.; MEAD, J.; The American Physiological Society, Bethesda; vol. 3, cap. 10, p. 131-144, 1986.

RODRIGUES, A.C.M.; MOREIRA, L.F.P.; SOUZA, C.L.; PETTERSEN, P.C.D.; SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A. Effects of thoracotomy on respiratory system, lung, and chest wall mechanics. **Chest** 104: 1882-1886, 1993.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo- Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation.** 1th ed. Boca Raton, CRC Press 151-70, 1991.

SABIR, R. Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respr. Crit. Care Med.** 175: 1259-1265. 2007.

SAETTA M., DI STEFANO A., TURATO G., FACCHINI F.M., CORBINO L., MAPP C. E., MAESTRELLI P., CIACCIA A., FABBRI L.M., CD T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Am Rev Respir Crit Care Med** 157: 822-826, 1998.

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

SALDIVA, P.H.; CARDOSO, W.V.; CALDEIRA, M.P.; ZIN, W.A. Mechanics in rats by end-inflation occlusion and single-breath methods. **J. Appl. Physiol.** 63:1711-1718, 1987.

SALDIVA, P.H.; ZIN, W.A.; SANTOS, R.L.; EIDELMAN, D.H.; MILIC-EMILI, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. **J. Appl. Physiol.** 72: 302-306, 1992.

SASAKI, N.; NAKAYAMA, Y.; YOSHIKAWA, M.; ENYO, A. Stress relaxation function of bone and bone collagen. **J Biomech** 26: 1369-1376, 1993.

SEN, C.K. Antioxidants in exercise nutrition. **Sports Med.** 31(13): 891-908, 2001.

SHAN, X.Q.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.** 47(1): 61-71, 1989.

SHAPIRO SD. Animal models for COPD. **Chest**.117:223–7S, 2000.

SHAPIRO SD: Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. **Biochem Soc Trans**. 30:98-102. 2002.

SHAPIRO, S.D.; GOLDSTEIN, N.M.; HOUGHTON, A.M.; KOBAYASHI, D.K.; KELLY, D.; BELAAOUAJ, A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Am. J. Pathol**. 163: 2329-2335, 2003.

SHI MM, KUGELMAN A, IWAMOTO T, TIAN L, FORMAN HJ. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces c-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. **J Biol Chem**; 269: 26512± 26517, 1994.

SIES, H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**. 82: 291-295, 1997.

SLY, P.D.; COLLINS, R.A.; THAMRIN, C.; TURNER, D.J.; HANTOS, Z. Volume dependence of airway and tissue impedances in mice. **J Appl Physiol** 94: 1460-1466, 2003.

SINGH, A.; RANGASAMY, T.; THIMMULAPPA, R.K.; LEE, H.; OSBURN, W.O.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; KENSLER, T.W.; YAMAMOTO, M.; BISWL, S. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol**. 35: 639-650, 2006.

SNIDER, G.L.; KLEINERMAN, J.L.; THURLBECK, W.M.; BENGALI, Z.H. The Definition of Emphysema: Report of a National-Heart-Lung-And-Blood-Institute, Division of Lung Diseases Workshop. **Am. Rev. Respir. Dis**. 132: 182-185, 1985.

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

SNIDER G. L. Emphysema: The first two centuries- and beyond: A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. **Am Rev Resp Dis**. 146: 1615-1622, 1992.

SIMILOWSKI, T.; BATES, J.H. Two-compartment modeling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? **Eur. Respir. J**. 4: 353-358, 1991.

SIMILOWSKI, T; LEVY, P.; CORBEIL, C.; ALBALA, M.; PARIENTE, R.; DERENNE, J.P. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. **J. Appl. Physiol**. 67: 2219-2229, 1989.

STAMENOVIC, D.; YAGER, D. Elastic properties of air- and liquid-filled lung parenchyma. **J Appl Physiol** 65: 2565-2570, 1988.

STANG, P.; LYDICK, E.; SILBERMAN, C.; KEMPEL, A.; KEATING, E.T. The prevalence of COPD: using smoking rates to estimate disease frequency in the general population. **Chest**. 117, suppl 2: 354s-359s, 2000.

STARCHER B. C. Lung elastin and matrix. **Chest**.117:229S-34, 2000.

STONE, P.J.; LUCEY, E.C.; CALORE, J.D.; MCMAHON, M.P.; SNIDER, G.L.; FRANZBLAU, C. Defenses of the hamster lung against human neutrophil and porcine pancreatic elastase. **Respiration** 54: 1-15, 1988.

SUKI, B.; ANDRADE, J.S.; COUGHLIN, M.L.; STAMENOVIC, D.; STANLEY, H.E.; SUJEER, M.; ZAPPERI, S. Mathematical modeling of the first inflation of degassed lungs. **Ann. Biomed. Eng.** 26: 608-617, 1998.

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** 168: 516-521, 2003.

SUKI B.; ITO S.; STAMENOVIC D.; LUTHEN K.R.; INGENITO E. P. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. **J Appl Physiol**. 98:1892-1899, 2005.

SULLIAN S. D.; RAMSEY S. D.; LEE T. A.. The economic burden of COPD. **Chest** 1117:55-9s, 2000.

SVERZELLATI, N.; CALABRÓ E.; RANDI, G.; VECCHIA C.; MARCHIANO A.; KUHNIGK J.M.; ZOMPATORI M.; SPAGNOLO P.; PASTORINO U. Sex differences in emphysema phenotype in smokers without airflow obstruction. **Eur Respir J** 33:1320-1328, 2009.

TAKARO, T.; WHITE S. M.; Emphysema. **Am Rev Respir Dis**. 108: 334-7, 1973.

TAKUBO Y, GUERASSIMOV A, GHEZZO H, TRIANTAFILLOPOULOS A, BATES JHT, HOIDAL JR, COSIO MG. α 1-Antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice. **Am J Respir Crit Care Med** 166: 1596–1603, 2002.

TANAKA, R.; AL-JAMAL, R.; LUDWIG, M.S. Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics. **J. Appl. Physiol**. 91: 2314-2321, 2001.

TSUJI, T.; AOSHIBA, K.; NAGAI, A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**. 174: 886-893, 2006.

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

TUDER, R.M.; PETRACHE, I.; ELIAS, J.A.; VOELKEL, N.F.; HENSON, P.M. Apoptosis and emphysema: the missing link. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 28: 551-554, 2003b.

VAN DER VART, H.; KOETER, G.H.; POTSMAN, D.S.; KAUFFMAN, H.F.; TEN HACKEN, N.H. First study of infliximab treatment in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med.** 172: 465-469, 1999.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova.** 30(5): 1323-1338, 2007.

VLAHOVIC, G.; RUSSEL, M.L.; MERCER, R.R.; CRAPO, J.D.; Cellular and connective tissue changes in alveolar septal wall in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med.** 160: 2086-2092, 1999.

VOELKEL, N.F. Historical overview of emphysema. **Chronic obstructive lung diseases.** B. C. Decker London, United Kingdom. 1-6, 2002.

VOELKEL, N.F. Molecular pathogenesis of emphysema. **J Clin. Invest.** 118: 394-402, 2008.

WENG, D.; LU, Y.; WEI, Y.; LIU, Y.; SHEN, P. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. **Toxicology** 232: 15-23, 2007.

WENDEL D. P; TAYLOR D.G.; ALBERTINE K. H.; Impaired distal airway development in mice lacking elastin. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 23:320-6, 2000.

WEIBEL, E.R. Functional morphology of lung parenchyma. In: Handbook of Physiology. The Respiratory System. Mechanics of Breathing. Bethesda, MD: **Am. Physiol. Soc.**, sect. 3, vol. III, chapt. 2, p. 47-91, 1986.

WRIGHT, J.L.; CHURG, A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. **Am. Rev. Respir. Dis.** 142: 1422-1428, 1990.

WRIGHT, J.L.; FARMER, S.; CHURG, A. A synthetic serine elastase inhibitor reduces cigarette smoke induced emphysema in guinea pigs. **Am J Respir Crit Care Med.** 166: 954-960, 2002.

WRIGHT, J.L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animals models of human lung disease. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.** 295: L1-L15, 2008.

YANG S. R.; CHIDA A. S.; BAUTER M. R.; SAHFIQ N.; SEWERYNIAK K.; MAGGIRWAR S. B.; KILTY I.; RAHMAN I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- kappaB and posttranslation modifications of histone deacetylase in macrophages. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 291: L46-L57, 2006.

YOKOHORI, N.; AOSHIBA, K.; NAGAI, A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. **Chest** 125: 626-632, 2004.

YOSHIDA, T.; TUDER, R.M. Pathobiology of cigarette smoke-induce chronic obstructive pulmonary disease. **Physiol. Rev.** 87: 1047-1082, 2007.

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

ZIN, W.A.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.R.; SAKAE, R.S.; CARVALHO, A.L.; SALDIVA, P.H. Effects of abdominal opening on respiratory system mechanics in ventilated rats. **J. Appl. Physiol.** 66: 2496-2501, 1989.

ANEXOS

ANEXO A – Parâmetros da mecânica pulmonar em cada animal dos grupos SALM, SALF, PAPM, PAPF.

SALM	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
SALM1	1,0020	0,2006	20,9814	26,9485	5,9671	0,5469	1,1950	1,7419
SALM2	1,0049	0,1965	20,9620	24,2025	3,2405	0,3247	0,6363	0,9610
SALM3	0,9926	0,2047	19,8905	24,0531	4,1626	0,3608	0,8511	1,2118
SALM4	1,0095	0,2084	21,4212	26,9972	5,5760	0,4813	1,1614	1,6428
SALM5	1,0074	0,2102	20,5578	25,1550	4,5972	0,4817	0,9663	1,4480
SALM6	1,0066	0,1945	14,4321	18,9003	4,4682	0,3947	0,8689	1,2636
Média	1,0038	0,2025	19,7075	24,3761	4,6686	0,4317	0,9465	1,3782
DP	0,0055	0,0058	2,4055	2,7146	0,8991	0,0775	0,1914	0,2652
EPM	0,0023	0,0024	0,9821	1,1082	0,3671	0,0317	0,0781	0,1083
n	6	6	6	6	6	6	6	6
DP/Média	0,55%	2,86%	12,21%	11,14%	19,26%	17,96%	20,22%	19,24%

SALF	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
SALF1	1,0023	0,1917	18,7737	25,1374	6,3637	0,5565	1,2199	1,7764
SALF2	1,0050	0,1951	26,2115	32,1747	5,9632	0,5675	1,1641	1,7316
SALF3	1,0031	0,1949	25,6980	32,0065	6,3085	0,5560	1,2297	1,7857
SALF4	1,0022	0,1924	27,6111	32,9240	5,3129	0,6082	1,0213	1,6294
SALF5	1,0040	0,2154	16,5106	21,0024	4,4918	0,3433	0,9670	1,3102
SALF6	1,0002	0,1989	16,6673	21,2375	4,5702	0,3713	0,9087	1,2800
Média	1,0028	0,1981	21,9120	27,4137	5,5017	0,5005	1,0851	1,5856
DP	0,0015	0,0081	4,6874	5,1406	0,7670	0,1030	0,1255	0,2117
EPM	00,0006	0,0033	1,9136	2,0986	0,3131	0,0421	0,0512	0,0864
n	6	6	6	6	6	6	6	6
DP/Média	0,15%	4,08%	21,39%	18,75%	13,94%	20,59%	11,56%	13,35%

PAPM	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
PAPM1	1,0057	0,2058	28,8187	35,5203	6,7016	0,5935	1,3785	1,9720
PAPM2	1,0102	0,2107	23,7679	29,8776	6,1097	0,6059	1,2874	1,8933
PAPM3	1,0066	0,2035	24,4870	30,2066	5,7197	0,7084	1,1631	1,8715
PAPM4	0,9987	0,1941	25,3409	30,7090	5,3682	0,8917	1,0417	1,9334
PAPM5	0,9975	0,2101	21,7270	26,7076	4,9807	0,8646	1,0452	1,9099
PAPM6	1,0046	0,1959	35,0846	44,5446	9,4600	0,9999	1,8543	2,8542
PAPM7	1,0087	0,1997	22,7216	28,1427	5,4210	0,7113	1,0824	1,7937
PAPM8	1,0042	0,1954	23,6669	29,5812	5,9143	0,9458	1,1547	2,1005
PAPM9	1,0100	0,2064	24,1601	29,5464	5,3864	0,5895	1,1125	1,7020

Média	1,0051	0,2024	25,5305	31,6485	6,1180	0,7678	1,2355	2,0034
DP	0,0043	0,0060	3,8591	5,0858	1,2731	0,1511	0,2427	0,3184
EPM	0,0014	0,0020	1,2864	1,6953	0,4244	0,0504	0,0809	0,1061
n	9	9	9	9	9	9	9	9
DP/Média	0,43%	2,96%	15,12%	16,07%	20,81%	19,68%	19,64%	15,89%

PAPF	Fluxo	Volume	Est	Edyn	ΔE	ΔP1	ΔP2	ΔPtot
PAPF1	1,0038	0,1922	26,2929	31,6379	5,3450	0,6688	1,0260	1,6948
PAPF2	0,9974	0,2045	30,7728	37,3016	6,5288	0,6408	1,3344	1,9752
PAPF3	1,0108	0,2016	23,8422	29,2339	5,3917	0,6428	1,0869	1,7297
PAPF4	1,0060	0,1945	26,4936	31,9531	5,4595	0,6035	1,0618	1,6653
PAPF5	1,0068	0,1969	29,4904	34,9420	5,4516	0,7309	1,0734	1,8043
PAPF6	1,0064	0,1953	36,0466	43,1664	7,1198	0,7956	1,3900	2,1856
PAPF7	1,0182	0,1998	37,3721	42,5540	5,1818	0,6850	1,0353	1,7203
PAPF8	0,9967	0,2098	30,3952	35,3491	4,9539	0,5568	1,0334	1,5902
PAPF9	1,0027	0,2012	25,9256	33,1888	7,2632	0,7221	1,4610	2,1831
Média	1,0054	0,1995	29,6257	35,4807	5,8550	0,6718	1,1669	1,8387
DP	0,0062	0,0052	4,3617	4,5242	0,8230	0,0677	0,1652	0,2101
EPM	0,0021	0,0017	1,4539	1,5081	0,2743	0,0226	0,0551	0,0700
n	9	9	9	9	9	9	9	9
DP/Média	0,62%	2,60%	14,72%	12,75%	14,06%	10,07%	14,15%	11,42%

ANEXO B: CELULARIDADE TOTAL E DIFERENCIAL EM CADA ANIMAL DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM, PAPF. .

SALM	PMN	MN	TOTAL	TECIDO	PMN/μm^2	MN/μm^2	TOTAL/μm^2
SALM1	16	29,6	45,6	36,4	4,55E-03	8,44E-03	1,30E-02
SALM2	17,8	28,4	46,2	41,2	4,29E-03	7,03E-03	1,13E-02
SALM3	15,2	26,1	41,3	40,3	3,83E-03	6,61E-03	1,04E-02
SALM4	18,4	37,5	55,9	45	4,24E-03	8,58E-03	1,28E-02
SALM5	16,5	27,7	40,18	38,5	4,44E-03	7,30E-03	1,17E-02
SALM6	19,2	34,1	53,3	41,2	4,67E-03	8,39E-03	1,31E-02
Média	17,18	30,57	47,08	40,43	4,33E-03	7,72E-03	1,21E-02
DP	1,40	3,97	5,78	2,65	2,67E-04	7,72E-04	9,74E-04
EPM	0,57	1,62	2,36	1,08	1,09E-04	3,15E-04	3,97E-04
n	6	6	6	6	6	6	6
DP/Média	8,14%	12,97%	12,28%	6,55%	6,16%	10,00%	8,07%
SALF	PMN	MN	TOTAL	TECIDO	PMN/μm^2	MN/μm^2	TOTAL/μm^2
SALF1	15,7	28,5	44,2	32,7	4,87E-03	8,82E-03	1,37E-02
SALF2	17,3	29,2	46,5	31,7	5,55E-03	9,38E-03	1,49E-02
SALF3	14,8	27	41,8	38,6	3,88E-03	7,04E-03	1,09E-02
SALF4	14,3	23,7	38	37,5	3,90E-03	6,27E-03	1,02E-02
SALF5	20,6	28,9	49,5	37,3	5,60E-03	7,84E-03	1,34E-02
SALF6	16,5	27,7	40,18	38,5	4,44E-03	7,30E-03	1,17E-02
Média	16,53	27,50	43,36	36,05	4,71E-03	7,78E-03	1,25E-02
DP	2,07	1,85	3,86	2,78	7,01E-04	1,05E-03	1,67E-03
EPM	0,85	0,76	1,58	1,13	2,86E-04	4,31E-04	6,81E-04
n	6	6	6	6	6	6	6
DP/Média	12,55%	6,73%	8,91%	7,71%	14,90%	13,57%	13,36%
PAPM	PMN	MN	TOTAL	TECIDO	PMN/μm^2	MN/μm^2	TOTAL/μm^2
PAPM1	39,9	19,4	59,3	39,5	1,02E-02	4,99E-03	1,52E-02
PAPM2	33,2	13,7	46,9	34,2	1,03E-02	4,29E-03	1,46E-02
PAPM3	33,6	15,1	48,7	29,7	1,17E-02	5,43E-03	1,72E-02
PAPM4	35,6	14,9	50,5	29,1	1,34E-02	5,66E-03	1,90E-02
PAPM5	32,8	16,1	48,9	34,5	9,67E-03	4,78E-03	1,44E-02
PAPM6	32,4	17,6	50	32	1,08E-02	5,83E-03	1,66E-02
PAPM7	31,9	12,3	44,2	36,9	8,78E-03	3,42E-03	1,22E-02
PAPM8	32,5	13,7	46,2	28,8	1,17E-02	4,92E-03	1,66E-02
PAPM9	32,6	11,7	44,3	28,5	1,21E-02	4,52E-03	1,66E-02
Média	33,83	14,94	48,78	32,58	1,09E-02	4,87E-03	1,58E-02
DP	2,37	2,33	4,30	3,72	1,32E-03	7,03E-04	1,85E-03
EPM	0,79	0,78	1,43	1,24	4,39E-04	2,34E-04	6,17E-04
n	9	9	9	9	9	9	9
DP/Média	7,00%	15,59%	8,81%	11,42%	12,03%	14,43%	11,70%
PAPF	PMN	MN	TOTAL	TECIDO	PMN/μm^2	MN/μm^2	TOTAL/μm^2
PAPF1	30,2	17,3	47,5	29,6	1,03E-02	6,04E-03	1,64E-02
PAPF2	29,4	13,2	42,6	26,9	1,12E-02	5,17E-03	1,64E-02
PAPF3	30,5	18	48,5	26,1	1,21E-02	7,14E-03	1,93E-02
PAPF4	27,5	16,7	44,2	28,2	1,03E-02	6,07E-03	1,63E-02

PAPF5	32,9	19,2	52,1	26,4	1,27E-02	7,47E-03	2,02E-02
PAPF6	29,3	11,1	40,4	26,3	1,12E-02	4,35E-03	1,55E-02
PAPF7	63,6	20,3	83,9	30,6	2,01E-02	6,71E-03	2,69E-02
PAPF8	30,5	17,4	43,54545	26	1,18E-02	6,79E-03	1,86E-02
PAPF9	26,3	11,2	37,5	27,9	9,50E-03	4,10E-03	1,36E-02
Média	33,36	16,04	48,92	27,56	1,22E-02	5,98E-03	1,81E-02
DP	10,84	3,19	13,04	1,56	2,98E-03	1,14E-03	3,63E-03
EPM	3,61	1,06	4,35	0,52	9,95E-04	3,78E-04	1,21E-03
n	9	9	9	9	9	9	9
DP/Média	32,50%	19,90%	26,65%	5,66%	24,55%	18,97%	20,02%

ANEXO C: PESO CORPORAL POR SEMANA DOS ANIMAIS DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM E PAPP.

SALF NOME	PESO/ SEMANA			
	0	1	2	3
SALF1	22	22,7	23,24	23,5
SALF2	20,7	20,75	21,6	22
SALF3	21,4	22	22,56	23
SALF4	18	17,9	18,8	19
SALF5	20	21,43	20,7	21,5
SALF6	21,53	22,17	21,78	23,4
MEAN	20,6050	21,1583	21,4467	22,0667
SD	1,3288	1,5793	1,4232	1,5510
SEM	0,5425	0,6448	0,5810	0,6332
n	6	6	6	6
SD/MEAN	6,45%	7,46%	6,64%	7,03%
SALM1	23,3	21,8	23,46	24,08
SALM2	20,7	22,5	24,7	24,45
SALM3	21,3	21,14	23,3	23,4
SALM4	22,14	22,4	22,84	23,63
SALM5	20,4	20,7	21,39	21,74
SALM6	20,6	20,2	20,8	22,05
MEAN	21,4067	21,4567	22,7483	23,2250
SD	1,0245	0,8513	1,3083	1,0010
SEM	0,4182	0,3475	0,5341	0,4087
n	6	6	6	6
SD/MEAN	4,79%	3,97%	5,75%	4,31%
PAPF1	22,8	22,6	21,5	22,9
PAPF2	22,6	22	20,5	21,17
PAPF3	24,2	23	23,3	22,69
PAPF4	21,8	20,25	20,74	20,61
PAPF5	20,8	20,4	20,9	20,66
PAPF6	22,8	21	20,6	21,5
PAPF7	25,41	25,6	27,1	26
PAPF8	23,06	22,4	22	22,4
PAPF9	19,27	20	21,43	20,48
MEAN	22,5267	21,9167	22,0078	22,0456
SD	1,6888	1,6680	1,9800	1,6467
SEM	0,5629	0,5560	0,6600	0,5489
n	9	9	9	9
SD/MEAN	7,50%	7,61%	9,00%	7,47%

PAPM1	22,2	24,15	21	22,2
PAPM2	20,8	20,4	20,9	20,66
PAPM3	21,2	20,2	20,5	21
PAPM4	19,9	20	20,13	20,68
PAPM5	22,1	22,53	23,06	23
PAPM6	20,7	20,9	20,04	20
PAPM7	21,8	20,25	20,74	20,6
PAPM8	24,2	23	23,3	22,69
PAPM9	22,84	23,1	22,51	22
MEAN	21,7489	21,6144	21,3533	21,4256
SD	1,2133	1,4850	1,1877	1,0025
SEM	0,4044	0,4950	0,3959	0,3342
n	9	9	9	9
SD/MEAN	5,58%	6,87%	5,56%	4,68%

ANEXO D : CAPACIDADE RESIDUAL FUNCIONAL DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM E PAPF.

	CRF	CRF FINAL
SALM1	0.28-0.38	0.10
SALM2	0.24-0.35	0.11
SALM3	0.27-0.42	0.15
SALM4	0.19-0.40	0.21
SALM5	0.25-0.41	0.16
SALM6	0.28-0.45	0.17

	CRF	CRF FINAL
SALF1	0.21-0.32	0.11
SALF2	0.20-0.30	0.10
SALF3	0.24-0.34	0.10
SALF4	0.20-0.40	0.20
SALF5	0.22-0.35	0.13
SALF6	0.23-0.29	0,07

	CRF	CRF FINAL
PAPM1	0.21-0.59	0.48
PAPM2	0.28-0.54	0.26
PAPM3	0.25-0.63	0.38
PAPM4	0.23-0.56	0.33
PAPM5	0.22-0.55	0.33
PAPM6	0.19-0.60	0.41
PAPM7	0.24-0.48	0.24
PAPM8	0.22-0.63	0.41
PAPM9	0.19-0.56	0.37

	CRF	CRF FINAL
PAPF1	0.23-0.49	0.26
PAPF2	0.23-0.55	0.32
PAPF3	0.25-0.50	0.25
PAPF4	0.25-0.49	0.24
PAPF5	0.26-0.55	0.29
PAPF6	0.18-0.49	0.31
PAPF7	0.23-0.53	0.30
PAPF8	0.26-0.53	0.27
PAPF9	0.22-0.50	0.28

ANEXO E: PERCENTUAL DE FIBRAS COLÁGENAS DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM, PAPF

Grupos	pontos	Vv colágeno					
SALF1	3	19%					
SALF2	3,1	19%					
SALF3	2,5	16%					
SALF4	2	13%					
SALF5	2,8	18%					
SALM1	3,6	23%					
SALM2	3,1	19%					
SALM3	2,7	17%					
SALM4	2,8	18%					
SALM5	2,3	14%					
PAPM1	2	13%					
PAPM2	2,2	14%					
PAPM3	2,3	14%					
PAPM4	1,9	12%					
PAPM5	2	13%					
PAPM6	1,5	9%					
PAPF1	1,6	10%					
PAPF2	1,7	11%					
PAPF3	1,5	9%					
PAPF4	1,4	9%					
PAPF5	1,3	8%					
PAPF6	1,8	11%					
PAPF7	1,6	10%					
PAPF8	1,5	9%					
PAPF9	1,6	10%					
			Média	SD	menor	maior	CV
			17%	2,77%	13,98%	19,52%	16,56%
			Média	SD	menor	maior	CV
			18%	3,03%	15,10%	21,15%	16,72%
			Média	SD	menor	maior	CV
			12%	1,74%	10,65%	14,14%	14,05%
			Média	SD	menor	maior	CV
			10%	0,94%	8,78%	10,67%	9,70%

ANEXO F: PERCENTUAL DE FIBRAS ELÁSTICAS DOS GRUPOS SALM, SALF, PAMP E PAPP.

GRUPOS

SALM

	SALM1	SALM2	SALM3	SALM4	SALM5	SALM6
	16	17	21	13	19	17
	17	16	14	15	14	15
	17	15	15	15	19	16
	18	12	13	14	16	13
	13	12	18	16	16	20
	15	12	12	14	16	19
	14	22	17	17	17	11
	15	18	14	15	17	14
	16	13	18	19	15	12
	14	16	17	16	18	13
Vv fibra elástica	18%	18%	19%	18%	20%	18%

PAPM

	PAPM1	PAPM2	PAPM3	PAPM4	PAPM5	PAPM6	PAPM7	PAPM8	PAPM9
	7	9	5	8	8	6	7	9	7
	6	9	6	5	6	5	5	8	5
	8	9	10	8	5	4	3	6	3
	8	12	7	6	6	8	6	5	4
	6	8	10	2	5	3	7	7	7
	6	7	6	3	6	4	5	3	6
	9	8	8	4	5	8	5	4	5
	6	9	5	9	5	8	3	5	5
	7	10	7	7	4	7	6	6	6
Vv fibra elástica	8%	11%	8%	7%	7%	7%	6%	7%	6%

SALF

	SALF1	SALF2	SALF3	SALF4	SALF5	SALF6
	20	19	18	16	12	16
	19	15	15	16	13	13
	13	17	15	10	18	13
	18	18	14	15	17	14
	19	15	15	18	14	17
	13	16	11	17	13	19
	12	18	19	18	20	20
	18	17	13	14	18	18
	17	14	12	13	15	18
	18	13	10	12	16	19
Vv fibra elástica	20%	19%	17%	18%	19%	20%

PAPF									
	PAPF1	PAPF2	PAPF3	PAPF4	PAPF5	PAPF6	PAPF7	PAPF8	PAPF9
	15	6	7	6	6	8	9	10	10
	17	4	8	3	4	7	5	8	11
	10	7	11	6	5	5	3	7	8
	9	6	6	6	4	8	4	5	9
	12	6	7	10	10	2	6	4	7
	11	8	6	5	6	4	10	3	4
	10	4	4	8	4	9	5	6	5
	10	5	6	5	3	10	8	7	3
	15	7	7	10	3	11	7	3	2
	13	10	13	12	4	9	10	2	8
Vv fibra elástica	15%	8%	9%	8%	6%	9%	8%	7%	8%

ANEXO G: DIÂMETRO ALVEOLAR MÉDIO (*Lm*) DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM E PAFP.

SALM	<i>Lm</i>
SALM1	40,36
SALM2	41,42
SALM3	38,22
SALM4	41,06
SALM5	36,08
SALM6	39,32
Média	39,41
DP	1,8339
EPM	0,7487
n	6
DP/Média	4,65%
SALF	<i>Lm</i>
SALF1	35,57
SALF2	38,00
SALF3	37,78
SALF4	36,76
SALF5	41,45
SALF6	36,11
Média	37,6117
DP	1,9175
EPM	0,7828
n	6
DP/Média	5,10%
PAPM	<i>Lm</i>
PAPM1	59,31
PAPM2	61,80
PAPM3	58,50
PAPM4	54,83
PAPM5	58,93
PAPM6	59,31
PAPM7	57,65
PAPM8	60,33
PAPM9	58,35
Média	58,7789
DP	1,8028
EPM	0,6009
n	9
DP/Média	3,07%

PAPF	<i>Lm</i>
PAPF1	40,39
PAPF2	45,90
PAPF3	45,50
PAPF4	44,20
PAPF5	46,38
PAPF6	40,92
PAPF7	46,81
PAPF8	47,41
PAPF9	48,32
Média	47,2789
DP	1,9819
EPM	0,6606
n	9
DP/Média	4,19%

ANEXO H: CATALASE NO PULMÃO DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM, PAPP.

Amostras (TECIDO - 60 µL)	mg proteína	tempo 0	tempo 60	T0 - T60	Item 3	Item 5	U de catalase/mg de proteína
SAL F1	0,029	0,260	0,228	0,032	0,076	0,020	134,6
SALF2	0,046	0,238	0,203	0,035	0,083	0,020	91,1
SALF3	0,036	0,264	0,232	0,032	0,076	0,020	104,4
SALM3	0,030	0,286	0,259	0,027	0,064	0,018	117,0
SALM6	0,026	0,312	0,284	0,028	0,066	0,021	121,4
SALM7	0,033	0,367	0,341	0,026	0,061	0,023	83,1
SALM8	0,035	0,315	0,290	0,025	0,059	0,019	90,2
PAPF1	0,032	0,421	0,291	0,130	0,307	0,129	74,5
PAPF2	0,030	0,405	0,383	0,022	0,052	0,021	81,2
PAPF3	0,053	0,300	0,290	0,010	0,024	0,007	63,3
PAPF4	0,050	0,332	0,306	0,026	0,061	0,020	60,7
PAPM1	0,060	0,425	0,392	0,033	0,078	0,033	39,4
PAPM2	0,052	0,416	0,379	0,037	0,087	0,036	46,6
PAPM5	0,039	0,438	0,303	0,135	0,319	0,140	59,3
PAPM6	0,065	0,351	0,322	0,029	0,068	0,024	44,0
PAPM7	0,044	0,463	0,425	0,038	0,090	0,042	48,7

Média 110,0 SD 22,3 Vm 87,7 VM 132,3 CV 20,26%

Média 102,9 SD 19,1 Vm 83,8 VM 122,0 CV 18,57%

Média SD Vm VM CV

Média 47,6 SD 7,4 Vm 40,2 VM 55,0 CV 15,49%

ANEXO J: RELAÇÃO GSH/ GSSG NO PULMÃO DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPF, PAPM.

Grupos	GSH	GSSG	GSH/GSSG					
SALF1	28,38	19,70	1,44					
SALF2	25,29	17,89	1,41	Média	SD	Menor	Maior	CV
SALF3	24,28	18,40	1,32	1,39	0,06	1,33	1,45	4,56%
SALM1	54,38	35,04	1,55					
SALM3	51,65	44,35	1,16					
SALM5	40,40	35,13	1,15	Média	SD	Menor	Maior	CV
SALM6	40,04	25,56	1,57	1,36	0,23	1,13	1,59	17,09%
PAPF1	31,29	35,25	0,89					
PAPF2	27,13	28,52	0,95					
PAPF3	17,15	21,05	0,81	Média	SD	Menor	Maior	CV
PAPF4	37,03	46,19	0,80	0,86	0,07	0,79	0,93	8,06%
PAPM1	32,09	25,05	1,28					
PAPM2	26,07	23,62	1,10					
PAPM3	39,90	28,56	1,40	Média	SD	Menor	Maior	CV
PAPM4	18,40	16,58	1,11	1,22	0,14	1,08	1,37	11,63%

ANEXO I: TBARS NO PULMÃO DOS GRUPOS SALM, SALF, PAPM, PAPF

TMP	ABS	FC=TMP/Abs	FC médio
0	0,000	0,00	3,44
0,02	0,004	5,00	
0,1	0,009	11,11	
0,5	1,065	0,47	
1	1,670	0,60	

Grupos Tecido	ABS	FCm X Abs. amostra	mg proteína na amostra	nMol de MDA/mg de proteína					
SALF1	0,032	0,11	0,19	0,58					
SALF2	0,034	0,12	0,31	0,38					
SALF3	0,036	0,12	0,24	0,51	Média	Desvio	Range	Range	CV (20%)
SALM2	0,043	0,15	0,30	0,50	0,49	0,10	0,39	0,59	20,51%
SALM5	0,056	0,19	0,42	0,46					
SALM7	0,043	0,15	0,22	0,68	Média	Desvio	Range	Range	CV (20%)
SALM8	0,043	0,15	0,23	0,63	0,56	0,10	0,46	0,67	18,53%
PAPF1	0,060	0,21	0,21	0,97					
PAPF2	0,075	0,26	0,20	1,27					
PAPF3	0,087	0,30	0,35	0,85					
PAPF5	0,077	0,26	0,21	1,26	1,09	0,21	0,88	1,30	19,37%
PAPM1	0,064	0,22	0,40	0,55					
PAPM2	0,049	0,17	0,34	0,49					
PAPM4	0,036	0,12	0,17	0,71					
PAPM6	0,064	0,22	0,43	0,51	Média	Desvio	Range	Range	CV (20%)
PAPM7	0,063	0,22	0,30	0,73	0,60	0,11	0,48	0,71	19,16%

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)