

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS

DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES GRAUS DE ENFISEMA
PULMONAR INDUZIDO POR ELASTASE EM CAMUNDONGOS

CRISTIANA PALMA KUHL

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS

DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES GRAUS DE ENFISEMA
PULMONAR INDUZIDO POR ELASTASE EM CAMUNDONGOS

CRISTIANA PALMA KUHL

Orientador: Amarilio Vieira de Macedo Neto
Coorientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
UFRGS, como requisito para obtenção do título
de Mestre.

Porto Alegre

2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Kuhl, Cristiana Palma
Desenvolvimento de Diferentes Graus de Enfisema
Pulmonar Induzido por Elastase em Camundongos /
Cristiana Palma Kuhl. -- 2013.
82 f.

Orientador: Amarílio Vieira de Macedo Neto.
Coorientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Enfisema pulmonar. 2. Mecânica respiratória. 3.
Elastase pancreática. 4. Fibras colágenas. I. Macedo
Neto, Amarílio Vieira de , orient. II. Rocco,
Patricia Rieken Macedo, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

No término de mais uma etapa da minha formação profissional, preciso agradecer diversas pessoas que tornaram esse momento possível.

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Amarilio Vieira de Macedo Neto por acreditar que uma fisioterapeuta poderia se tornar uma pesquisadora e sempre me incentivar a buscar esse objetivo. Agradeço-lhe também, professor, por todas as horas dedicadas ao meu trabalho, mesmo quando o tempo era curto.

A minha coorientadora Prof.^a Patricia Rieken de Macedo Rocco por abraçar esse trabalho da aluna do Sul, me apresentar a um grupo extremamente eficiente e a um esquema de trabalho muito organizado. Aproveito aqui e estendo o agradecimento ao pessoal do Laboratório de Investigação Pulmonar da UFRJ que muito bem me acolheu e me ajudou!

A minha “sub” coorientadora, Prof.^a Elizabeth Obino Cirne-Lima que tão gentilmente me acolheu em seu Laboratório e inicialmente me introduziu no mundo das células tronco. Não tenho palavras para agradecer o que seguiu a partir daí. Muito obrigada por toda ajuda e apoio. Estendo ao pessoal do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, meu eterno agradecimento por todas as horas de discussão de artigos, discussão de rotinas, discussão de assuntos aleatórios, ouvidos emprestados, cafezinhos,... Foram momentos que não esquecerei jamais.

A minha amiga, Alessandra Magrisso por fazer tudo e mais um pouco para me ajudar, até sentir dor nos dedos de tanto suturar camundongos. Agradeço

também a Claudia Laurino que, até de longe, me ajudou em tudo que podia. Clau, meu eterno obrigada!

As maravilhosas veterinárias da Unidade de Experimentação Animal, Tuane Garcez e Fabíola Meyer, muito obrigada de quem sabe que sem vocês nada disso seria possível.

Ao Prof. Ricardo Savaris, muito obrigada pelo auxílio “informático”. Apreendi muito!

Gostaria também de agradecer a Prof.^a Nadine Clausell que, em um primeiro momento, me incentivou a pesquisa. Desculpa professora, por mais que goste do coração, o pulmão me físgou!

Ao meu amor, Ivan Sereno Montenegro, para ti não existem palavras suficientes para agradecer. Teu apoio, parceira e companheirismo me permitiram ir mais longe. Te amo!

Aos meus irmãos, valeu a força e desculpem qualquer coisa!

Aos meus pais, meu maior obrigado. Sem o incentivo de vocês nada disso seria possível. Obrigada por acreditarem em mim incondicionalmente!

Por último, porém não menos importante, gostaria de agradecer a Deus por colocar essas pessoas tão maravilhosas no meu caminho que tornaram um sonho, realidade.

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.”

Ralph W. Emerson

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Tipos de enfisema | 19 |
| Figura 2. Fisiopatologia do enfisema pulmonar secundário ao tabagismo..... | 22 |
| Figura 3. Body weight analysis | 45 |
| Figure 4. Lung resistance (R) | 46 |
| Figure 5. Lung dynamic compliance (Cdyn) | 47 |
| Figure 6. Plethysmography | 47 |
| Figure 7. Peak expiratory flow (PEF) | 48 |
| Figure 8. Representative photomicrographs of lung parenchyma stained with hematoxylin-eosin (HE) | 49 |
| Figure 9. Mean linear intercept (Lm)..... | 50 |
| Figure 10. Fraction area occupied by elastic fiber | 51 |
| Figure 11. Fraction area occupied by collagen fiber | 52 |
| Figura 12. Análise do peso corporal | 68 |
| Figura 13. Resistência pulmonar (R) | 69 |
| Figura 14. Complacência pulmonar dinâmica (Cdyn)..... | 70 |
| Figura 15. Pletismografia | 70 |
| Figura 16. Pico de fluxo expiratório (PEF)..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar corado com hematoxilina e eosina (HE)..... | 72 |
| Figura 18. Diâmetro alveolar médio (Lm) | 73 |
| Figura 19. Fração de área ocupada por fibras elásticas..... | 74 |
| Figura 20. Fração de área ocupada por fibras colágenas | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| A | Alvéolo |
| AAT | α 1-antitripsina |
| bpm | Breaths per Minute |
| BR | Bronquíolos Respiratórios |
| BT | Bronquíolos Terminais |
| CAD | Ativação de DNase por Caspase |
| Cdyn | Lung Dynamic Compliance ou Complacência Pulmonar Dinâmica |
| COPD | Chronic Obstructive Pulmonary Disease |
| CPE | Centro de Pesquisa Experimental |
| CRVP | Cirurgia de Redução de Volume Pulmonar |
| CT | Computed Tomography ou Tomografia Computadorizada |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DPOC | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica |
| ECM | Matriz Extracelular |
| FIPE | Research Incentive Fund ou Fundo de Incentivo a Pesquisa |
| GEE | Generalized Estimating Equations ou Equações de Estimativas Generalizadas |
| GOLD | Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| HE | Hematoxylin and Eosin ou Hematoxilina e Eosina |

| | |
|----------|---|
| IL | Interleucina |
| ILAR | Institute of Laboratory Animals Resources |
| irpm | Incurções Respiratórias por Minuto |
| i.t. | Intratracheally ou Intratraqueal |
| Lm | Mean Linear Intercept ou Diâmetro Alveolar Médio |
| MMP | Metaloproteinase |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MV | Minute Ventilation ou Ventilação Minuto |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NE | Elastase Neutrófila |
| nº | Número |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PEEP | Positive End-Expiratory Pressure ou Pressão Positiva no Final da Expiração |
| PEF | Peak Expiratory Flow ou Pico de Fluxo Expiratório |
| PLATINO | Projeto Latinoamericano de Investigação em Obstrução Pulmonar |
| R | Lung Resistance ou Resistência Pulmonar |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| Σ | Somatório |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |

| | |
|-----|------------------------------------|
| ™ | Trade Mark |
| U | Units ou Unidades |
| VT | Tidal Volume ou Volume Corrente |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Introdução..... | 14 |
| Revisão da literatura..... | 16 |
| Enfisema pulmonar | 16 |
| Epidemiologia..... | 16 |
| Alterações fisiopatológicas..... | 17 |
| Classificação | 18 |
| Fisiopatologia | 19 |
| Efeitos sistêmicos..... | 22 |
| Tratamento | 23 |
| Modelos de enfisema pulmonar | 25 |
| Referências bibliográficas | 30 |
| Objetivos..... | 36 |
| Geral..... | 36 |
| Específicos | 36 |
| Artigo em inglês..... | 37 |
| Development of different degrees of emphysema induced by elastase in mice..... | 38 |
| Authors | 38 |
| Abstract | 38 |
| Keywords..... | 39 |
| Introduction..... | 39 |
| Material and methods..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Emphysema induction..... | 41 |
| Body weight | 42 |
| Plethysmography | 42 |
| Histological analysis..... | 43 |
| Statistical analysis..... | 44 |
| Results | 44 |
| Experimental emphysema model establishment | 44 |
| Body weight | 44 |
| Plethysmography | 45 |
| Histological analysis..... | 48 |
| Discussion | 52 |
| References | 56 |
| Artigo em português | 60 |
| Desenvolvimento de diferentes graus de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos | 61 |
| Autores | 61 |
| Resumo | 61 |
| Palavras-chave | 62 |
| Introdução | 62 |
| Materiais e métodos | 63 |
| Indução do enfisema..... | 64 |
| Peso corporal..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Pletismografia | 65 |
| Estudo histológico por microscopia óptica..... | 66 |
| Análise estatística | 67 |
| Resultados | 67 |
| Estabelecimento de modelo experimental de enfisema | 67 |
| Peso corporal..... | 67 |
| Pletismografia | 68 |
| Análise Histológica..... | 71 |
| Discussão | 75 |
| Referências bibliográficas | 79 |

INTRODUÇÃO

O enfisema pulmonar é uma doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) incapacitante e cruel, ao furtar do indivíduo a capacidade de respirar normalmente. A dispnéia grave em alguns pacientes é descrita como afogamento. A importância da DPOC é ressaltada por incidência crescente e custos financeiros em ascensão, além de alta mortalidade [1-3].

O tratamento clínico, mesmo otimizado por novos fármacos e reabilitação pulmonar, promove somente melhora dos sintomas. Por sua vez, os tratamentos cirúrgicos, seja a cirurgia de redução de volume pulmonar (CRVP) ou o transplante de pulmão, cursam com morbidade elevada e mortalidade pós-operatória [2, 4-6]. Apenas recentemente chegaram para os pacientes com enfisema os avanços relacionados a tratamentos minimamente invasivos, o que em outras especialidades médicas já ocorrem há um bom tempo [5, 7-9].

Embora o tratamento com células tronco ainda seja considerado experimental, vários pesquisadores apostam nesta linha como um potencial adjuvante na terapia de diversas enfermidades, inclusive no enfisema pulmonar [10-14]. Dois estudos foram realizados em humanos, porém os resultados demonstram, até o momento, somente a segurança da terapia [15, 16].

Finalmente, para melhor entendimento da doença e teste de novas terapias, o desenvolvimento de modelo experimental é fundamental. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os Serviços de Cirurgia Torácica e Pneumologia têm experiência em todas vertentes terapêuticas contemporâneas: CRVP, transplante de pulmão e, de forma pioneira na América do Sul, o emprego do tratamento minimamente invasivo com válvulas brônquicas colocadas por broncoscopia flexível, desde 2002. A partir

daí a incursão no campo da terapia celular foi um passo natural. Para isso, é necessário obtermos um modelo animal seguro, eficiente e de fácil comprovação em relação ao desenvolvimento experimental do enfisema pulmonar.

Diversos agentes vem sendo utilizados para induzir o enfisema em animais, como por exemplo, papaína, fumaça de cigarro e elastase [17]. Esta última apresenta vantagens, pois é de baixo custo, sua atividade é rápida e induz enfisema panacinar, quando utilizada em várias doses [18, 19]. Entretanto, os modelos descritos na literatura apresentam diversas limitações e nenhum estratificou a gravidade do enfisema através da administração de diferentes doses de elastase [18].

REVISÃO DA LITERATURA

Enfisema Pulmonar

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada por limitação crônica ao fluxo aéreo. Essa limitação é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas nocivas, tendo o tabagismo como seu principal fator de risco [1, 2].

A DPOC pode ser dividida em bronquite crônica e enfisema. A bronquite crônica é definida por presença de tosse crônica produtiva, ocorrendo por três meses em dois anos sucessivos em pacientes onde outras causas para tosse já tenham sido excluídas. O enfisema é definido histologicamente por um aumento permanente dos espaços aéreos distais até os bronquíolos terminais, acompanhado por destruição de suas paredes e sem fibrose óbvia [2]. Podemos encontrar características de bronquite crônica associadas ao quadro de enfisema pulmonar em pacientes com DPOC, sendo, por vezes, difícil definir qual o grau de contribuição de cada patologia no quadro clínico [2, 20].

Epidemiologia

Estima-se a população mundial em 2012 esteja na casa dos sete bilhões de pessoas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) supõe que 210 milhões destas pessoas sejam portadores de enfisema pulmonar, sendo 65 milhões em sua forma moderada ou grave [3]. Dados da *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) apontam que em 1990 a DPOC era a 12^a causa de invalidez e a sexta causa de morte. Prevê-se no ano 2020 venha a ser a quinta causa de invalidez e em 2030, a quarta causa de morte [2, 3, 21].

Na Europa os custos diretos e indiretos da DPOC foram da ordem de 38,7 bilhões de euros no ano 2000 [22]. Atualizar este cálculo para os dias de hoje é assustador. No Brasil, em 2001, a bronquite crônica e o enfisema corresponderam a 243.865 internações a um custo hospitalar de R\$ 104.991.285,76 e a 10.325 óbitos. Neste mesmo período, na Região Sul, ocorreram 100.745 internações por DPOC, a um custo para o Sistema Único de Saúde (SUS) de R\$ 42.341.668,28 e com 3.706 óbitos [23].

Em 2005, o Projeto Latinoamericano de Investigação em Obstrução Pulmonar (PLATINO) demonstrou que na cidade de São Paulo a prevalência da DPOC era de 15,8%. Em 2013, no Brasil, somente no mês de março, foram registrados 509 óbitos, com gastos de mais de 6 milhões de reais apenas em hospitalizações por esta patologia [24, 25].

Alterações fisiopatológicas

As mudanças fisiopatológicas associadas ao enfisema são a destruição progressiva do parênquima pulmonar e a redução da superfície disponível para troca gasosa, levando a uma oxigenação inadequada [20]. Ao reduzir o recolhimento elástico do pulmão, rompendo fibras e destruindo anexos alveolares, ocorre um fenômeno cardinal do enfisema: a limitação do fluxo aéreo. Subvertida a mecânica respiratória, o aprisionamento aéreo e a nova morfologia pulmonar atuam reduzindo a superfície disponível para troca gasosa [17, 20].

Nas vias aéreas periféricas ocorrem as seguintes alterações:

- Inflamação, fibrose e hipertrofia de musculatura lisa, por aumento de espessura da parede da via aérea, promovendo a separação entre o parênquima e a via aérea;
- Inflamação da parede da via aérea promovendo sua deformação e estreitando o seu lúmen, contribuindo para a destruição das paredes alveolares;
- Metaplasia de células caliciformes produzindo excesso de muco, o que pode obstruir o lúmen e alterar a tensão de superfície do fluido de revestimento das vias aéreas periféricas facilitando o colapso de pequenas vias aéreas [17].

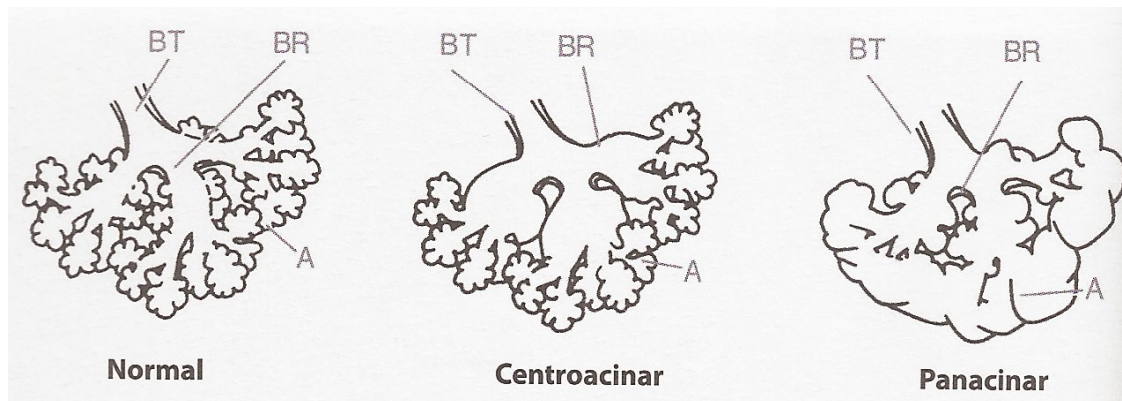
Classificação

O enfisema pulmonar pode ser classificado em:

- Centrilobular (ou centriacinar): caracterizado por destruição focal restrita ao bronquíolo respiratório e porção central do ácino, cercado por áreas de parênquima pulmonar grosseiramente normal. É usualmente mais grave nos lobos superiores do pulmão. Apresenta maior extensão da inflamação de via aérea periférica. A limitação de fluxo aéreo se dá principalmente em função de inflamação de via aérea periférica;
- Panlobular (ou panacinar): caracterizado pela destruição das paredes alveolares de maneira bastante uniforme, com todos os espaços aéreos além do bronquíolo terminal envolvidos. Característico de pacientes que desenvolvem a doença relativamente cedo na vida. Frequentemente associado à deficiência de α 1-antitripsina (AAT). Tem tendência de envolver mais os lobos inferiores. A limitação do fluxo aéreo deve-se principalmente à perda de recolhimento elástico. Há

correlação entre redução do fluxo expiratório e aumento da complacência nessa forma de enfisema [17, 19].

Figura 1: Tipos de enfisema



No enfisema centroacinar há destruição em bronquíolos terminais (BT) e bronquíolos respiratórios (BR). No enfisema panacinar, a destruição também engloba o alvéolo (A). Fonte: West, JB [26]

Fisiopatologia

Vários mecanismos interagem para a patogênese da doença. Eles não são independentes e várias interações entre os processos ocorrem para o desenvolvimento da doença. Os principais são:

1. **Inflamação crônica:** a inalação de partículas nocivas causa um influxo de células inflamatórias para as vias aéreas e pulmões. É caracterizada pelo aumento no número de neutrófilos, macrófagos ativados e linfócitos T ativados. Comparado com pulmões de indivíduos saudáveis, os pulmões com enfisema grave contém aproximadamente dez vezes mais células inflamatórias. Macrófagos que se encontram marcadamente aumentados, tem importante papel no recrutamento de outras células inflamatórias (como neutrófilos) e na liberação de proteases. As alterações inflamatórias são devidas à liberação de múltiplos mediadores

inflamatórios, incluindo mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas. Macrófagos ativados e neutrófilos liberam enzimas elastolíticas, particularmente elastase neutrofílica (NE) e metaloproteinase-9 (MMP-9), que rompem as fibras elásticas do parênquima resultando em alargamento anormal dos espaços aéreos. Além disso, os linfócitos T ativados podem induzir apoptose de células alveolares tipo I. O estreitamento (fechamento) de pequenas vias aéreas resultante de inflamação e fibrose parece ser o mais importante mecanismo para limitação progressiva de fluxo aéreo e aprisionamento de ar [19, 27, 28].

2. Desequilíbrio protease-antiproteases: desequilíbrio entre moléculas proteolíticas e anti-proteolíticas nos pulmões resulta em uma atividade proteolítica aumentada. As proteases digerem a matriz extracelular (ECM), causando destruição do parênquima pulmonar saudável, que leva ao desenvolvimento do enfisema. Esse aumento na atividade proteolítica pode ser consequência da inflamação (liberação de enzimas proteolíticas por células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos), ou podem surgir de fatores genéticos (ex: deficiência de AAT). A deficiência de AAT resulta em falha no controle de enzimas, principalmente da NE. O resultado dessa falha leva à proteólise obrigatória, causando dano tecidual. Os baixos níveis de AAT em indivíduos com deficiência genética amplificam o dano potencial e, portanto, o aparecimento e progressão do enfisema [17, 19, 27, 28].

3. Estresse oxidativo: ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas em excesso, como mecanismos de defesa antioxidantes. Pode levar a disfunção celular e induzir danos na ECM pulmonar ou à morte celular. Adicionalmente, os compostos oxidantes contribuem para a reação inflamatória e então induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios. Os compostos oxidantes podem diretamente causar danos nos constituintes da matriz pulmonar (elastina e

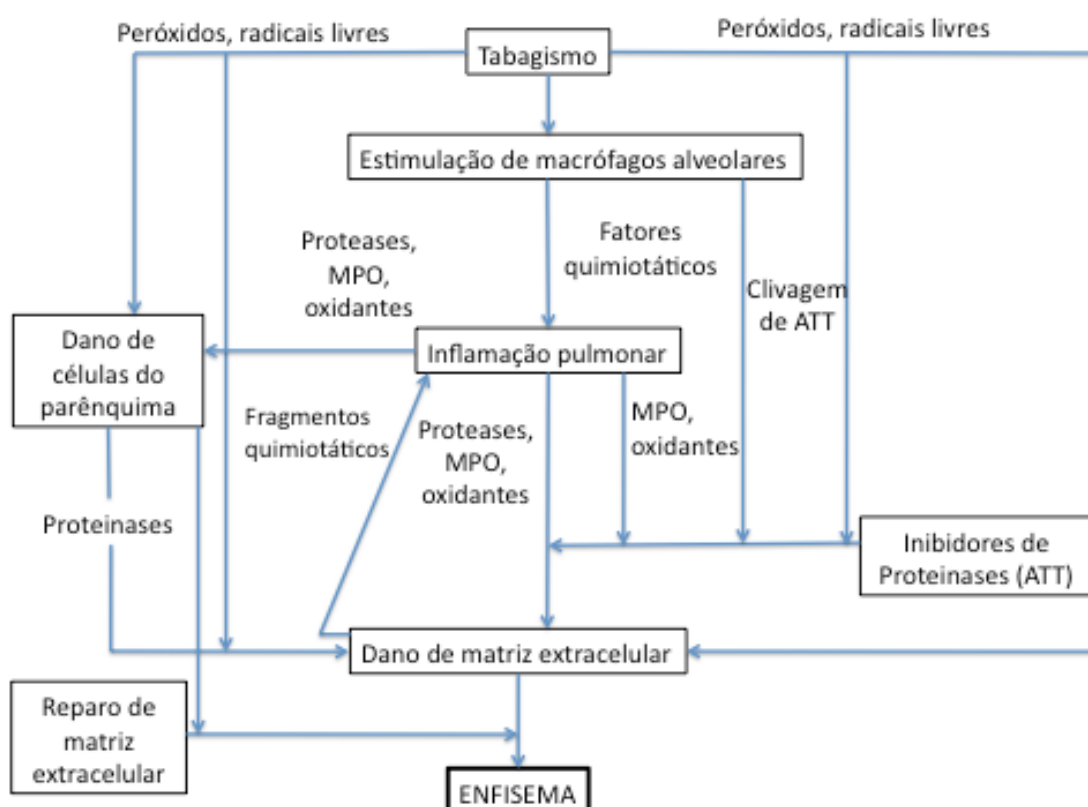
colágeno), além de também poderem interferir nas reações bioquímicas de sua síntese [27, 29]. Espécies reativas de oxigênio são normalmente neutralizadas por agentes antioxidantes endógenos (glutathiona, ácido úrico, bilirrubina) e exógenos (vitamina C e vitamina E). O tabagismo gera componentes oxidantes nas vias aéreas. Estes também podem ser liberados de leucócitos inflamatórios e células epiteliais [27, 29, 30]. Evidências de redução de defesas antioxidantes nos pacientes portadores de DPOC foram encontradas, reforçando ainda mais a ocorrência de estresse oxidativo [30].

4. Apoptose: pode ser desencadeada por três diferentes vias: via extrínseca, mediada por receptor através da ligação de membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) a receptores de morte; via intrínseca mitocondrial, através de sinais químicos e físicos liberando citocromo C pela mitocôndria; e via retículo endoplasmático, através da ativação da caspase-12 em resposta a sinais como hipóxia. Todas as vias ativam a caspase-3, e após diversas reações, ocorre ativação de DNAase por caspase (CAD) que, após translocar para o núcleo da célula, fragmenta seu ácido desoxiribonucleico (DNA) [27]. A apoptose é importante para manutenção da homeostase tecidual normal e deve estar em equilíbrio com proliferação e diferenciação celular. O rompimento do balanço entre apoptose e reparo de células estruturais no pulmão pode contribuir para a destruição do tecido pulmonar em resposta ao tabagismo, levando à doença [17, 27].

De forma resumida, conforme figura 2, podemos observar que o tabagismo causa acúmulo de células inflamatórias que liberam proteases e oxidantes que danificam a matriz extracelular das paredes dos alvéolos, ductos alveolares e bronquíolos respiratórios. Células pulmonares podem ser estimuladas a produzirem e liberarem proteases que repetem os efeitos de proteases liberadas por células

inflamatórias. Agentes derivados de células inflamatórias também inativam inibidores de proteases intrapulmonares, danificam células pulmonares que produzem ECM e interferem no processamento de moléculas da matriz [19].

Figura 2: Fisiopatologia do enfisema pulmonar secundário ao tabagismo.



MPO=mieloperoxidase; ATT= α 1-antitripsina . Fonte: Figura adaptada de Hogg, J.C. & Sênior, R.M. [19]

Efeitos sistêmicos

Embora o enfisema afete primariamente os pulmões, recentemente, comprovou-se que os efeitos sistêmicos da DPOC contribuem significativamente para sua gravidade e mortalidade [31]. Estes efeitos também têm importante impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes [30]. Os efeitos sistêmicos se

relacionam com o tabagismo, a inflamação crônica e estresse oxidativo, a disfunção diafragmática e da musculatura periférica, a hipertensão pulmonar, o sistema renina-angiotensina e o sistema nervoso autônomo [31].

A importante perda de peso é considerada preditora para aumento da mortalidade independentemente da função pulmonar alterada. Ela ocorre devido ao aumento do metabolismo e está relacionada com perda de musculatura esquelética e atrofia de musculatura, principalmente de membros inferiores [30, 32]. A fraqueza de musculatura esquelética se dá devido à combinação de hipóxia crônica, imobilidade e taxa metabólica aumentada [30]. Como consequência, o paciente apresenta redução na capacidade de exercício [32]. É comum encontrarmos também perda de massa corporal magra e efeitos cardiovasculares a nível sistêmico, levando o paciente à caquexia e doenças cardíacas [31, 33].

Tratamento

O enfisema pulmonar é considerado uma doença progressiva e irreversível pela limitação no reparo espontâneo do tecido pulmonar adulto [20]. As alternativas atuais de tratamento para o enfisema são: tratamento clínico, cirúrgico e minimamente invasivo com válvulas endobrônquicas [2].

O tratamento clínico tem como objetivo controle dos sintomas e redução da frequência de exacerbações [6]. São utilizados, geralmente, broncodilatadores, corticosteróides inalatórios e sistêmicos, N-acetilcisteína e oxigenoterapia [1]. Incluem-se também no tratamento programas de cessação do tabagismo, exercício físico, educação, vacinação e manejo das comorbidades. Reabilitação pulmonar deve ser considerada para todos os pacientes com DPOC [2, 6].

As exacerbações frequentes envolvem um alto custo hospitalar [20]. Pacientes com exacerbação aguda permanecem com risco aumentado para eventos subsequentes durante a fase de recuperação e permanecem inativos durante e após hospitalização. Além disso, alguns desses pacientes também falham na recuperação do estado sintomatológico pré-exacerbação e parecem experimentar um estado inflamatório intensificado e persistente [6].

O tratamento cirúrgico é tecnicamente complexo e realizado em pacientes graves e com diversas comorbidades. A CRVP é realizada em pacientes com hiperinflação pulmonar, preferencialmente de lobos superiores e com baixa tolerância ao exercício. Infelizmente apenas 20% da população doente é candidata a essa intervenção, além de ser um procedimento cirúrgico que expõem o paciente a riscos [8]. O transplante pulmonar seria o único tratamento resolutivo da doença. No entanto, é pouco realizado e, dos órgãos sólidos, é o que tem a menor taxa de aproveitamento, devido a eventos como infecção, edema e lesões agudas traumáticas. Além disso, há necessidade de imunossupressão permanente [1].

O tratamento minimamente invasivo abrange a colocação de válvulas endobrônquicas sob procedimento endoscópico [7]. O tratamento se baseia na inserção de válvulas unidirecionais nas áreas pulmonares mais danificadas. A resposta terapêutica ideal é a redução dos volumes pulmonares, com melhora dos fluxos respiratórios (resultado similar ao visto na CRVP) [5]. Até o momento, foram beneficiados somente pacientes com limitação de fluxo aéreo grave, enfisema heterogêneo e hiperinsuflação. Os resultados demonstram melhora na função pulmonar, tolerância ao exercício, qualidade de vida e sintomas [4].

O tratamento com terapia celular está sendo cada vez mais discutido para auxiliar na recuperação destes pacientes. Existem trabalhos mostrando que as células tronco adotam fenótipos como pneumócitos tipo II, dão origem a células alveolares tipo I e fibroblastos. Nestes estudos houve redução da inflamação e depósito de colágeno no tecido pulmonar, reparando o dano tecidual [10, 12, 14]. Observa-se também que o uso desta terapia reduz a apoptose de células alveolares [11, 13, 14], o número de células mononucleares e neutrófilos. Acredita-se que as células diminuem a progressão da doença por exercer efeito anti-inflamatório, inibir a expressão de MMP-2 e MMP-9 (enzimas destruidoras de colágeno), inibir a apoptose e aumentar o número de células proliferativas [13]. Dois grupos publicaram trabalhos testando a segurança da terapia celular em humanos. Os estudos mostram que o procedimento é seguro e sem efeitos adversos [15, 16]. No estudo conduzido por Ribeiro-Paes, os pacientes apresentaram maior tempo de tolerância sem uso de oxigênio e maior capacidade de esforço sem queda na saturação [16]. Já em estudo publicado em 2013, o tratamento reduziu a inflamação sistêmica, porém, não alterou a função pulmonar dos pacientes [15].

Modelos de enfisema pulmonar

Na literatura é possível encontrar várias técnicas experimentais de lesão pulmonar para indução de enfisema pulmonar: irradiação, elastase, papaína, lipossacarídeos ou tratamento com bleomicina [34]. A grande dificuldade encontrada por pesquisadores é que nestes modelos não se observa manifestações gerais que lembram o estado da doença em humanos. Por exemplo, modelos com papaína apresentam alta taxa de mortalidade, uma única instilação de elastase desenvolve um efeito heterogêneo em tamanho e diâmetro de alvéolos [34]. Com o intuito de desenvolver modelos mais parecidos com o enfisema humano, pesquisadores tem

utilizado técnicas como exposição a fumaça de cigarro, instilações repetidas de elastase e modelos genéticos [35].

A exposição crônica à fumaça de cigarro foi relatada a causar enfisema, principalmente, em porcos da Índia. Observa-se aumento do diâmetro do espaço alveolar após três meses de exposição [35]. O enfisema tem padrão progressivo e as anormalidades na função pulmonar são similares com aquelas vistas em humanos com DPOC induzido por tabagismo. A cessação da exposição à fumaça estabiliza, mas não reverte, o aumento do espaço aéreo. O recrutamento neutrofílico ocorre após o uso do primeiro cigarro e é seguido por um acúmulo mais gradual de macrófagos. Influxo de neutrófilos precoce nos pulmões é acompanhado de aumento mensurável na degradação de produtos do colágeno e elastina. Alterações epiteliais incluindo perda dos cílios são observadas após alguns meses de exposição ao cigarro e hiperplasia de células de Clara após seis meses. Aumento da área do ducto alveolar e aumento dos espaços aéreos são claramente observadas após 3-6 meses de exposição à fumaça de cigarro, e destruição mediada por macrófagos parece ser proeminente nesses momentos [36].

O enfisema induzido por elastase é acompanhado por metaplasia de células secretoras e anormalidades de função pulmonar, hipoxemia, e hipertrofia ventricular direita (características de DPOC humano). Também está associado com um aumento de complacência pulmonar (tanto estática como dinâmica) [37].

Após uma única instilação intratraqueal, a elastase provoca uma perda inicial e rápida de elastina e colágeno. Com o passar do tempo, elastina e glicosaminoglicanos retornam ao normal e o colágeno é aumentado, ainda que a ECM intraparenquimatosa permaneça diminuída e distorcida e a arquitetura dos

pulmões é grosseiramente e permanentemente anormal. O aumento do espaço aéreo se desenvolve imediatamente após a lesão elastolítica, seguido de inflamação. A progressão subsequente do enfisema é provavelmente causada pelo efeito destrutivo das proteinases inflamatórias hospedeiras, já que a meia vida da elastase é de aproximadamente 45-50 minutos [36, 38]. Sua efetividade está diretamente relacionada com sua atividade elastolítica, resultando em resposta inflamatória e chegada em grande quantidade de neutrófilos e macrófagos no trato respiratório inferior [36, 38, 39]. Observa-se também aumento de uma variedade de mediadores pró-inflamatórios como interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8, assim como aumento de células parenquimais apoptóticas [38]. Além disso, a destruição da parede da via aérea é parcialmente atribuível ao mecanismo de estresse. Com uma única instilação, independente da dose utilizada, viu-se um acúmulo significativo de neutrófilos no dia 1, porém, essa inflamação foi resolvida em uma semana. Fator de necrose tumoral α (produzido por macrófagos e células epiteliais), que é atribuído como uma das citocinas causadoras do enfisema, também mostrou-se significativamente aumentado no dia 1 e retornou à linha de base em uma semana. O uso de dose elevada mostrou destruição pulmonar grave e um grau de destruição pulmonar atingindo $55,6 \pm 5,2\%$ em três semanas [39].

Com duas injeções de elastase, já é observado diâmetros alveolar e de ducto alveolar (distância de transecção média entre as paredes dos alvéolos, ductos alveolares, e sacos alveolares considerados juntos) maiores que animais com somente uma instilação. Além disso, duas injeções sucessivas induzem lesões parecidas com enfisema progressivo [37]. Em 2009, Lüthje *et al.* demonstraram modelo experimental de enfisema mais semelhante ao humano apresentando não só alterações pulmonares, como também sistêmicas. Foram realizadas instilações

repetidas de elastase conduzindo à inflamação endógena e posterior destruição pulmonar nas semanas subsequentes. O enfisema mostrou-se mais grave, além de os animais apresentarem declínio na capacidade de exercício, perda de peso, maiores concentrações de norepinefrina, elevada complacência estática, hipertensão pulmonar, hipertrofia do ventrículo direito e menor comprimento do diafragma [31].

Portanto, ao compararmos os modelos mais utilizados hoje, podemos observar que o enfisema induzido por elastase é uma abordagem interessante, de baixo custo, pois uma única administração pode rapidamente resultar em características histológicas e morfológicas compatíveis com as de enfisema panacinar. A gravidade da doença está diretamente relacionada com a dose da enzima. Uma única dose de elastase leva ao aumento do espaço aéreo. A lesão elastolítica progride para efeitos destrutivos, induzidos pelas proteases hospedeiras produzidas e ativadas pelas células inflamatórias. Já com repetidas instilações de elastase foram reproduzidas a maioria das manifestações sistêmicas (encurtamento e fraqueza de diafragma, prejuízo da musculatura esquelética, padrão de fibra muscular e intolerância ao exercício, dentre outras), que caracterizam doença grave em humanos, e essas persistiram durante períodos prolongados, após a lesão ser induzida. Já a exposição experimental à fumaça é um procedimento caro, lento, e produz enfisema centrilobular. O dano resultante de enfisema induzido por elastase é homogeneamente distribuído, enquanto partículas da fumaça de cigarro permanecem na árvore brônquica até eles serem lentamente levados aos alvéolos [18].

Diversos estudos foram publicados onde enfisema pulmonar foi induzido com elastase em animais. Os animais mais utilizados são camundongos e ratos [37, 39-

43]. Nos estudos, são utilizadas diversas doses de elastase demonstrando resultados positivos na indução da doença, observados através do diâmetro alveolar médio e, em alguns estudos, por tomografia computadorizada.

Considerando o exposto, o presente trabalho foi realizado com o intuito de desenvolver um modelo de enfisema pulmonar, induzido por elastase, em camundongos, com diversos graus de lesão, para posterior avaliação do uso de novas terapias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, *II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2004. **30**(5): p. 42.
2. Vestbo, J., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(4): p. 347-65.
3. WHO. WHO | *Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. 2013 [cited 2013 june, 22nd]; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs305/en/.
4. Herth, F.J., et al., *Efficacy predictors of lung volume reduction with Zephyr valves in a European cohort*. Eur Respir J, 2012. **39**(6): p. 1334-42.
5. Oliveira, H.G., S.M. Oliveira, and A.V. Macedo-Neto, *Tratamento Endoscópico do Enfisema: uma Atualização*. Pulmão RJ, 2013. **22**(2): p. 76-82.
6. Russell, R., A. Anzueto, and I. Weisman, *Optimizing management of chronic obstructive pulmonary disease in the upcoming decade*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2011. **6**: p. 47-61.
7. de Oliveira, H.G., et al., *Transbronchoscopic pulmonary emphysema treatment: 1-month to 24-month endoscopic follow-up*. Chest, 2006. **130**(1): p. 190-9.
8. Ingenito, E.P., et al., *Bronchoscopic volume reduction: a safe and effective alternative to surgical therapy for emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(2): p. 295-301.

9. Rodriguez, A.N., *Interventions in pulmonary medicine*. 2013, New York: Springer.
10. Abe, S., et al., *Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(11): p. 1158-63.
11. Cruz, F.F., et al., *Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012. **182**(1): p. 26-36.
12. Ortiz, L.A., et al., *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8407-11.
13. Yuhgetsu, H., et al., *Beneficial effects of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation against elastase-induced emphysema in rabbits*. *Exp Lung Res*, 2006. **32**(9): p. 413-26.
14. Zhen, G., et al., *Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 3415-22.
15. Weiss, D.J., et al., *A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD*. *Chest*, 2013. **143**(6): p. 1590-8.
16. Ribeiro-Paes, J.T., et al., *Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011. **6**: p. 63-71.
17. Saetta, M., et al., *Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(6): p. 1304-9.

18. Antunes, M.A. and P.R. Rocco, *Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models*. An Acad Bras Cienc, 2011. **83**(4): p. 1385-96.
19. Hogg, J.C. and R.M. Senior, *Chronic obstructive pulmonary disease - part 2: pathology and biochemistry of emphysema*. Thorax, 2002. **57**(9): p. 830-4.
20. Ishizawa, K., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema*. FEBS Lett, 2004. **556**(1-3): p. 249-52.
21. Pauwels, R.A., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(5): p. 1256-76.
22. Bousquet, J., et al., *Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases*. Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 995-1001.
23. Silva, L.C.C. and A.M. Menezes, *Epidemiologia das Doenças Respiratórias*. Vol. 1. 2001, Rio de Janeiro: Revinter.
24. DATASUS. *Morbidade Hospitalar o SUS - por local de residência - Brasil*. 2013 [cited 2013 june, 17th]; Available from: tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/nruf.def.
25. Menezes, A.M., et al., *Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in Sao Paulo, Brazil*. Cad Saude Publica, 2005. **21**(5): p. 1565-73.

26. West, J.B., *Fisiopatologia Pulmonar: princípios básicos*. 7a ed. 2010, Porto Alegre: Artmed.
27. Demedts, I.K., et al., *Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema*. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 53.
28. Stockley, R.A., D. Mannino, and P.J. Barnes, *Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. **6**(6): p. 524-6.
29. MacNee, W. and R.M. Tuder, *New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I*. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. **6**(6): p. 527-31.
30. Barnes, P.J., *New concepts in chronic obstructive pulmonary disease*. *Annu Rev Med*, 2003. **54**: p. 113-29.
31. Luthje, L., et al., *Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model*. *Respir Res*, 2009. **10**: p. 7.
32. Verhage, T.L., et al., *Associations of muscle depletion with health status. Another gender difference in COPD?* *Clin Nutr*, 2011. **30**(3): p. 332-8.
33. Cazzola, M., et al., *Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers*. *Eur Respir J*, 2008. **31**(2): p. 416-69.
34. Ribeiro-Paes, J.T., et al., *Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas*. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2009. **31**(1): p. 140-8.

35. Tuder, R.M., S. McGrath, and E. Neptune, *The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common?* *Pulm Pharmacol Ther*, 2003. **16**(2): p. 67-78.
36. Mahadeva, R. and S.D. Shapiro, *Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema.* *Thorax*, 2002. **57**(10): p. 908-14.
37. Onclinx, C., et al., *Elastase-induced pulmonary emphysema in rats: comparison of computed density and microscopic morphometry.* *Radiology*, 2006. **241**(3): p. 763-70.
38. Wright, J.L., M. Cosio, and A. Churg, *Animal models of chronic obstructive pulmonary disease.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(1): p. L1-15.
39. Kawakami, M., et al., *Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema.* *Biol Pharm Bull*, 2008. **31**(7): p. 1434-8.
40. Hantos, Z., et al., *Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice.* *J Appl Physiol*, 2008. **105**(6): p. 1864-72.
41. Inoue, K., E. Koike, and H. Takano, *Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: effects of ambient existing particulate matters.* *Int Immunopharmacol*, 2010. **10**(11): p. 1380-9.
42. Inoue, K., et al., *Extensive Analysis of Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats: ALP in the Lung, a New Biomarker for Disease Progression?* *J Clin Biochem Nutr*, 2010. **46**(2): p. 168-76.

43. Vidal, D., et al., *Alterations in pulmonary structure by elastase administration in a model of emphysema in mice is associated with functional disturbances*. Rev Port Pneumol, 2012. **18**(3): p. 128-36.

OBJETIVOS

Geral:

Desenvolver um modelo do enfisema pulmonar através da administração de diferentes doses de elastase em camundongos.

Específicos:

1. Comparar a gravidade da doença através do diâmetro alveolar médio;
2. Avaliar a variabilidade do peso dos animais durante a indução;
3. Avaliar a mecânica pulmonar;
4. Analisar o remodelamento do parênquima pulmonar através da quantificação de fibras elásticas e colágenas no tecido pulmonar.

ARTIGO EM INGLÊS

DEVELOPMENT OF DIFFERENT DEGREES OF EMPHYSEMA INDUCED BY ELASTASE IN MICE

AUTHORS: Kuhl, C. P. ^{1,2,3}, Garcez, T. N. A. ⁴, Magrisso, A. B. ³, Laurino, C. C. F. C. ³, Cirne-Lima, E.O. ^{3,4}, Rocco, P. R. M. ⁵, Macedo-Neto, A.V. ^{1,2,4}.

¹ Surgical Sciences: Post Graduate Degree Program, Federal University of Rio Grande do Sul

² Laboratory of Airways and Lung, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Laboratory of Embryology and Cell Differentiation, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁴ Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁵ Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro

ABSTRACT:

The use of murine models of emphysema is important to test different therapeutic strategies. Depending on the degree of lung damage some therapies result in different effects. The aim of this study was to develop a murine model of emphysema induced by different doses of elastase in order to produce different degrees severity. We tested three doses of elastase (0.1 U, 0.15 U and 0.2 U) administered once a week for four weeks intratracheally. Lung mechanics (plethysmography), mean linear intercept and the fraction area occupied by collagen and elastic fibers were measured in female C57BL/6 mice. This study was conducted at the Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. We observed an increase in lung resistance with higher dose of elastase (0.2 U) [2.02(1.67; 2.34) cmH₂O.s/ml; p=0.008]. In the same group, tidal volume and minute

ventilation reduced. Peak expiratory flow increased significantly in groups treated with 0.15 U and 0.2 U. No significant changes in dynamic lung compliance were observed. Mean linear intercept was higher with 0.15 U and 0.2 U elastase, demonstrating the destruction of the alveolar spaces [E15: 30.31(26.65;43.13) μm and E20: 49.49(31.67;57.71) μm ; $p < 0.0001$). The fraction area occupied by collagen and elastic fibers was lower in the animals that received 0.2 U elastase. We concluded that four intratracheal instillations with 0.2 U elastase, once a week induced changes in lung function and in histology, suggesting an experimental model of severe pulmonary emphysema whereas lower doses resulted in only histological modifications.

KEYWORDS: pulmonary emphysema, lung mechanics, pancreatic elastase, collagen fiber.

INTRODUCTION

Pulmonary emphysema is a chronic obstructive pulmonary disease (COPD) defined by persistent limitation in air flow, whose histologic findings show permanent increase in distal airspace until terminal bronchioles, accompanied by destruction of their walls, without obvious fibrosis [1, 2]. The reduction in alveoli radial support affects elastic recoil property of the lungs, leading to expiratory collapse in small airways and subsequent air trapping. A striking feature of emphysematous lung is the exacerbation of communicant airflow between the surrounding alveolar sacs, mechanism known as collateral ventilation [3]. In 2012, with a world population estimated in seven million people, World Health Organization (WHO) accounted that 210 million people have COPD. It is believed that in 2030 the disease will become

the fourth leading cause of mortality in the world, with an increasing financial cost in industrialized and developing countries [1, 2, 4].

So far, there has been no effective therapy able to mitigate the morphological damage, improving lung function and symptoms. Smoking cessation and pulmonary rehabilitation programs can demonstrate some benefit. However, most patients in advanced stages of the disease present dyspnea with minimal efforts and a poor quality of life [2, 5-8]. To enhance the understanding of physiopathology of emphysema and to test new therapies, experimental models have been developed. There are genetic models, those induced by smoke exposure and also by the use of enzymes like papain and elastase [9]. The induction of emphysema with multiple doses of elastase has the ability to reproduce rapidly emphysema panacinar [10]. It is also observed that higher doses of elastase increase mice mortality [10, 11]. Moreover, the response to different therapies depends on the degree of emphysema [2].

This study aimed to develop different degrees of severity of experimental emphysema induced by elastase in mice. For this purpose, different doses of elastase were used and lung mechanics as well as histology were analysed.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre under number 13-0086. The animals were kept under adequate installations, in compliance with Brazilian Law 11.794/2008, Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific and Didactic, Guidelines for Euthanasia Practice and with the Guide for the Care and Use for Laboratory Animals –

ILAR/EUA (2011), in the Experimental Animal Unit of the Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Emphysema induction

Thirty female C57BL/6 mice, two month old, weighing between 17 and 20 g were used in this study. The animals were anesthetized with isoflurane (5% to induct and 2% to maintain) and received 10 mg/kg of tramadol intraperitoneal. The trachea was accessed through: (1) a longitudinal incision in the midline of the neck with the animal in supine position; (2) median dissection of the muscular plane; (3) posterior tracheoesophageal traction with a clamp; (4) anterior exposure the lower cervical trachea; (5) puncture with insulin syringe and needle in the middle third of cervical trachea; (6) injection of saline or diluted elastase; (7) synthesis of skin incision with nylon 5-0. With the animal still under sedation, exchange positions maneuvers were performed for better distribution of elastase into the lungs.

The mice were divided into the following groups: control (C) and elastase (E10, E15, E20). In C group (n=8), sterile saline solution (0.9%NaCl) was intratracheally (i.t.) instilled (50µl). In E groups, three different porcine pancreatic elastase (PPE) (Sigma-Aldrich) doses i.t. were tested:

- E10.....(n=8).....diluted with 50µl 0.9%NaCl;
- E15.....(n=7).....diluted with 50µl 0.9%NaCl;
- E20.....(n=7).....diluted with 50µl 0.9%NaCl;

All animals received one instillation per week for a regular period of four weeks.

Body weight

The animals were weighed every week before the instillation and at the end of the experiment.

Plethysmography

One week after the fourth i.t. instillation, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneal. Lung mechanics were analysed through plethysmography with FinePointe™ Series Resistance and Compliance system (Buxco, Wilmington, NC, USA). The system was calibrated for maximum volume of 0.25 ml and air pressure to the limit of 40 cmH₂O. Tracheostomy was performed and a cannula inserted into the trachea. The animals were connected to the ventilator with a fixed respiratory rate of 140 breaths per minute (bpm). A positive end-expiratory pressure (PEEP) of 2 cmH₂O was used. Airway measurements were recorded over a 3 minutes period after a 5 minutes acclimation period followed by saline nebulization.

At the end of the experiment, animals were euthanized with an overdose of the same drugs used for anesthesia. The lungs were inflated and the trachea was clamped at end-expiration. The right lung was removed and fixed in 10% formalin for histological analysis. The left lung was immediately cryopreserved at -80°C in for further analysis.

Histological analysis

In order to define important aspects of the experimental model, this study evaluated histological sections of 3 μm thick at the periphery of the right lung. We analyzed the following data:

- (a) size of alveolar diameters;
- (b) percentage of area occupied by collagen fibers;
- (c) percentage of area occupied by elastic fibers.

To evaluate the size of the alveolar diameters, lapidary characteristic of emphysema, the slides were stained with hematoxylin and eosin (HE). Following, through optical microscopy (Axioplan, Zeiss, Thornwood, NY, USA) digital photographic images were performed that allowed subsequent quantitative analysis determined by point-counting technique [12]. With the assistance of Image J software (free software developed at the National Institutes of Health, USA), an overlay of the images with the reticulum was performed. The reticulum contained a reference system with 100 points and 50 line segments, arranged in parallel. To compute the mean linear intercept (L_m) the number of alveolar intercepts was counted in 20 random fields per slide, using a 400x magnification, being $L_m = \Sigma \text{length of the line segments (1250 } \mu\text{m)} / \text{number of intercepts}$.

Collagen (Sirius Red) and elastic fibers (Orcein dye) were quantified in alveolar septa. The results were expressed as a percentage of the amount of collagen and elastic fibers per area (%). The measures, considering a 400x magnification image, were analyzed in 10 random fields using Image J software.

Statistical analysis

For analysis of body weight, the method of Generalized Estimating Equations (GEE) was used and data were expressed by mean \pm standard error. All other data were non-parametric and analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. Non-parametric data were expressed as median (25th-75th interquartile range). All tests were performed using SPSS 20.0. Significance level was $p < 0.05$.

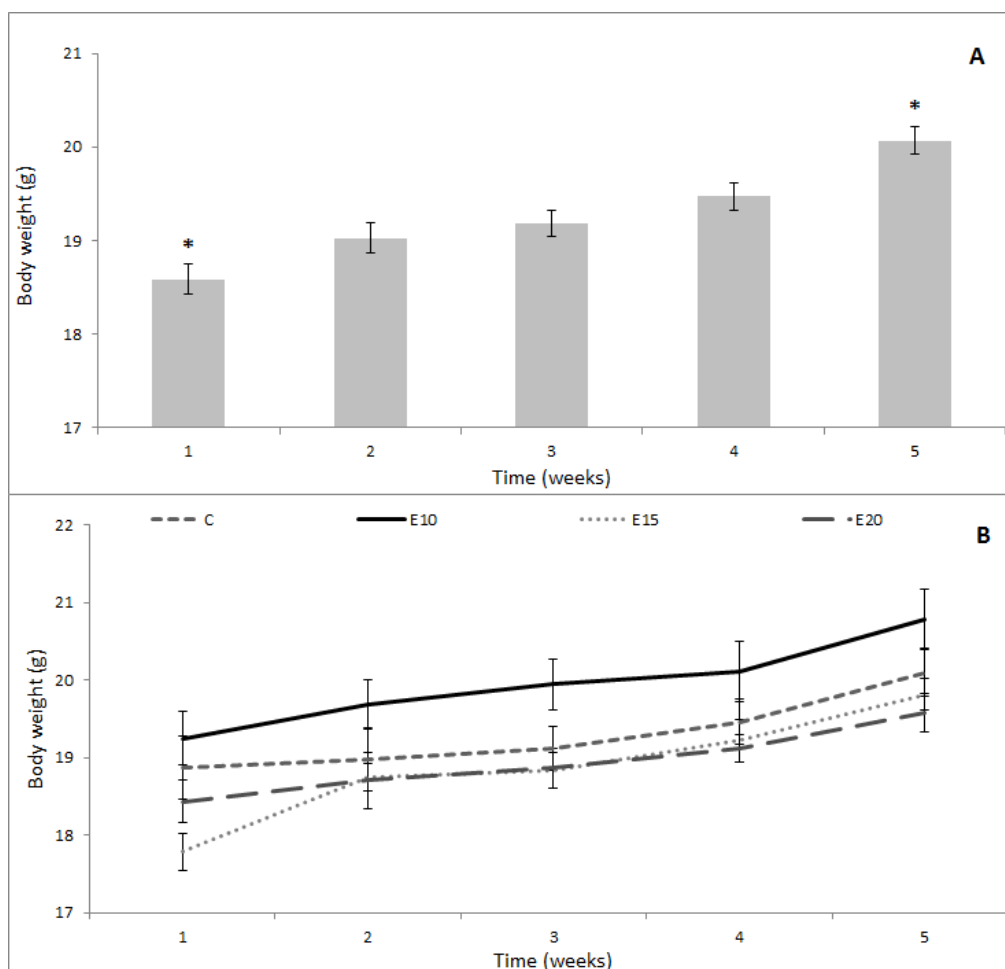
RESULTS

Experimental Emphysema Model Establishment

No animals died neither during anesthesia or surgical procedures. One animal was excluded in E20 group due to pneumonia. Thus, the total sample was 30 animals, eight animals in C group, eight in E10 group, seven in E15 and seven animals in E20 group.

Body Weight

Body weight increased during the experiment regardless the group ($p < 0.0001$)(figure 3A). When we analyzed the body weight gain individually, considering time and group, no statistical difference was detected (figure 3B).

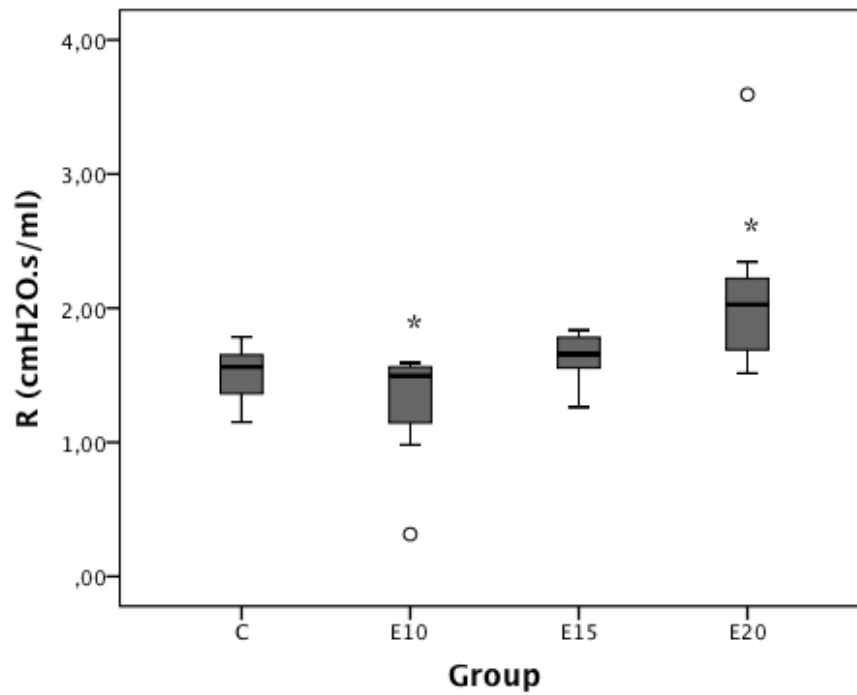
Figure 3: Body weight analysis.

Values expressed as mean \pm standard error. A- All animals from different groups (n=30). * Difference in body weight at week 1 and 5 ($p < 0.0001$). B- Body weight along time. C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks.

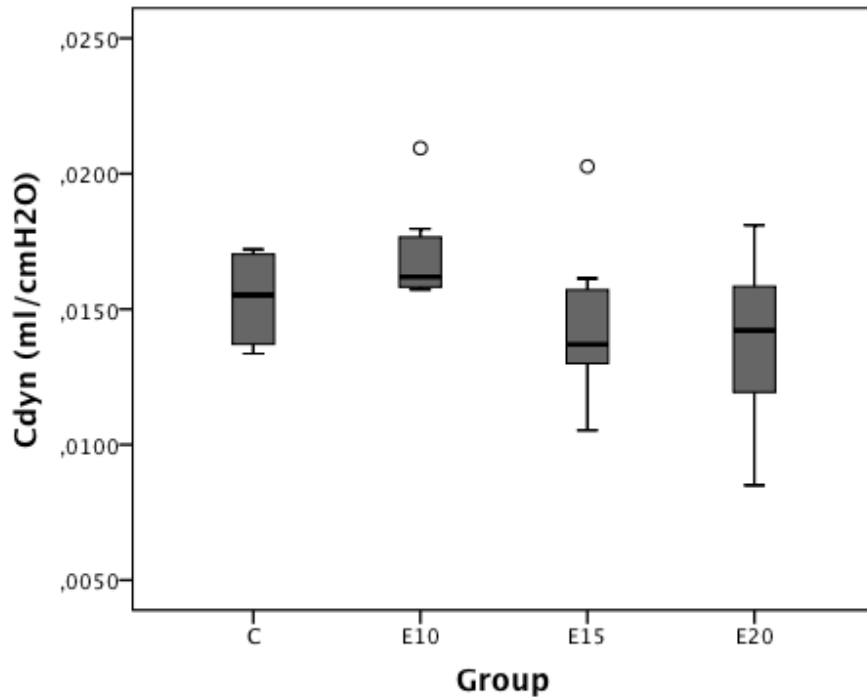
Plethysmography

Lung resistance (R) was higher in E20 than E10 group ($p = 0.008$) (figure 4) and no difference was observed in lung dynamic compliance (C_{dyn}) (figure 5). Tidal volume (V_T ; $p = 0.021$), minute ventilation (MV; $p = 0.013$) and peak expiratory flow (PEF; $p = 0.000$) were more reduced in E20 compared to the other groups (figure 6 and 7).

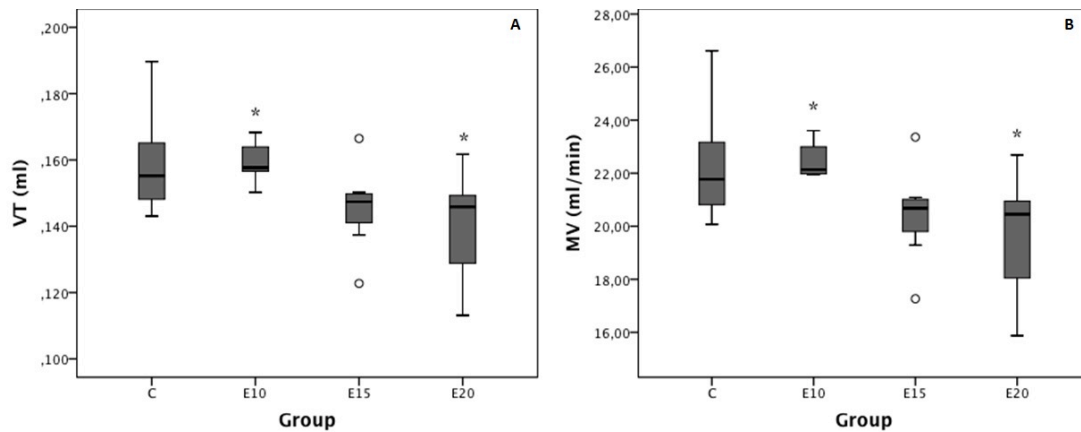
Figure 4: Lung resistance (R).



Values expressed as median of 7-8 animals (25th-75th interquartile range). * E10 versus E20 ($p=0.006$). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks.
o Outlier values.

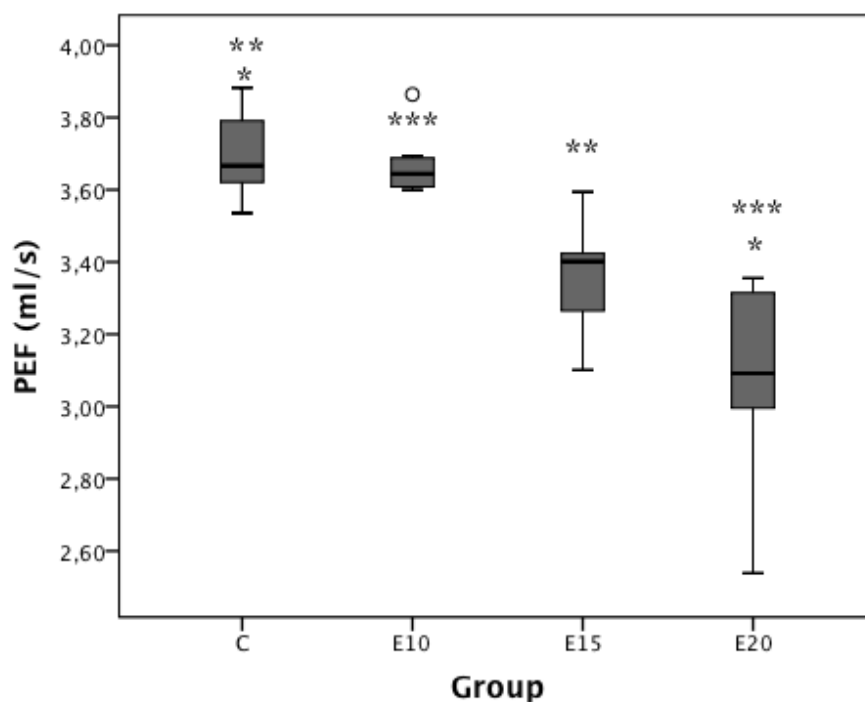
Figure 5: Lung dynamic compliance (Cdyn).

Values expressed as median of 7-8 animals (25th-75th interquartile range). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks. o Outlier values.

Figure 6: Plethysmography.

Values expressed as median of 7-8 animals (25th-75th interquartile range). A- Tidal volume (VT). * E10 versus E20 ($p=0.041$). B- Minute ventilation (MV). * E10 versus E20 ($p=0.024$). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks. o Outlier values.

Figure 7: Peak expiratory flow (PEF).

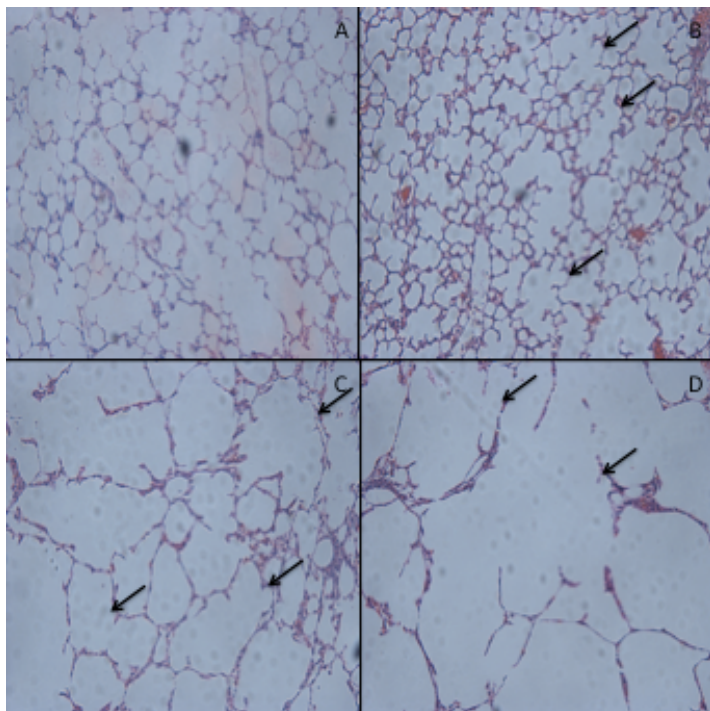


Values expressed as median of 7-8 animals (25th-75th interquartile range). * C versus E20 ($p < 0.0001$). ** C versus E15 ($p = 0.032$). *** E10 versus E20 ($p = 0.001$). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks. o Outlier values.

Histological analysis

Mean linear intercept increased with higher doses (figure 8). Thus Lm was higher in E15 and E20 groups, when compared to control values ($p = 0.028$ and $p = 0.001$, respectively). No significant difference was observed between control and E10 in Lm. Additionally, Lm was greater in E20 than E10 ($p = 0.017$) (figure 9).

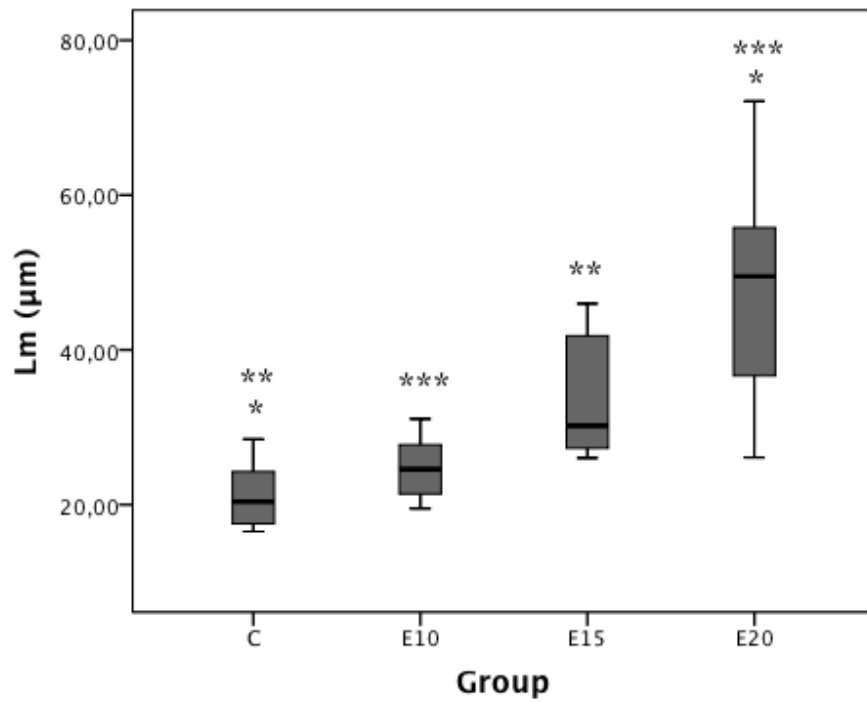
Figure 8: Photomicrographs (200x) of lung parenchyma stained with HE, one week after the 4th elastase instillation.



A- Control group; B- E10; C- E15; D- E20. Arrows show areas with emphysema.

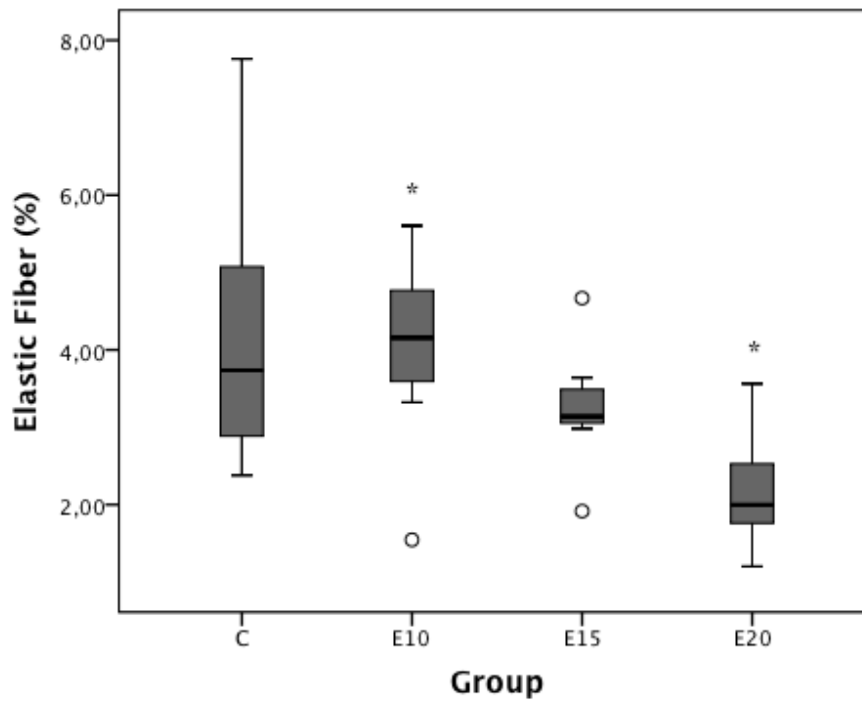
The fraction area of elastic fibers reduced significantly in E20 group when compared to the other groups ($p=0.020$). There was significant difference when E20 was compared with E10 ($p=0.026$)(figure 10). Moreover, fraction area of collagen fiber was also decreased in E15 and E20 compared to C group ($p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively) (figure 11).

Figure 9: Mean linear intercept (Lm).



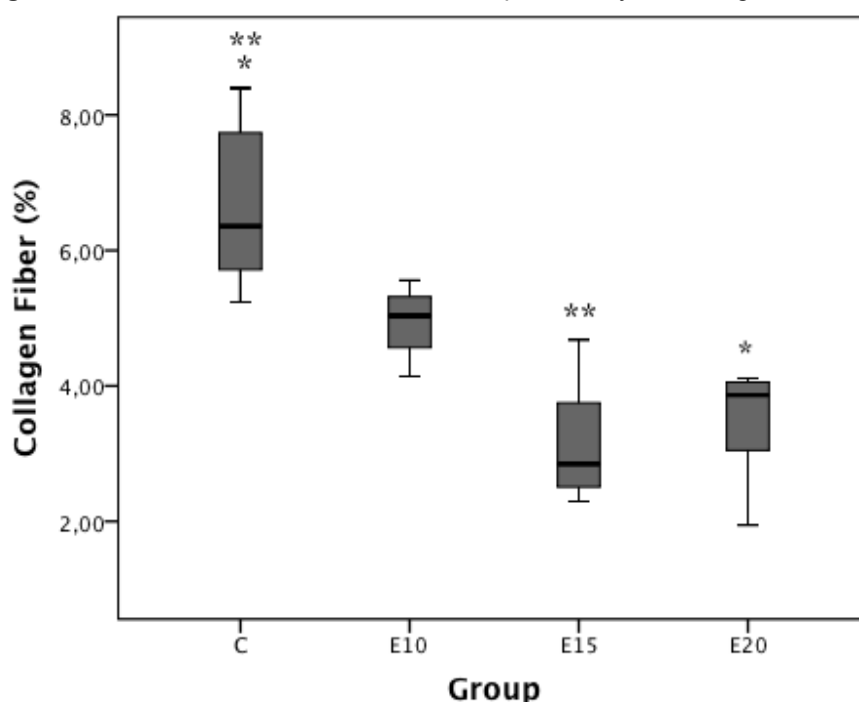
Values are median of 7-8 animals (25th-75th interquartile range). * C versus E20 ($p=0.001$). ** C versus E15 ($p=0.028$). *** E10 versus E20 ($p=0.017$). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks.

Figure 10: Fraction area occupied by elastic fiber.



Values are median 7-8 animals (25th-75th interquartile range). * E10 versus E20 ($p=0.026$). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks. o Outlier values.

Figure 11: Fraction area occupied by collagen fiber.



Values are median 7-8 animals (25th-75th interquartile range). * C versus E20 ($p < 0.0001$). ** C versus E15 ($p < 0.0001$). C= control group; E10= 0.1U elastase once a week for four weeks; E15= 0.15U elastase once a week for four weeks; E20= 0.2U elastase once a week for four weeks.

DISCUSSION

In the current study we developed models of different degrees of emphysema induced by different doses of elastase in mice. For this purpose, lung mechanics and histology were analyzed. Higher dose resulted in lung mechanical changes associated with elastolysis and alveolar hyperinflation. Conversely, 0.15U resulted in histological changes but no significant modifications in lung mechanics. Lower dose led to no significant morphofunctional changes.

Several studies developed experimental emphysema using different doses of elastase. The emphysema induced with several doses of elastase presents advantages when compared with only one dose, such as increased mean linear intercept, damage similar to progressive emphysema in humans and systemic

changes [10, 11, 13]. When we considered the dose of elastase, Cruz *et al.* used 0.1U and shown morphologic changes in lung parenchyma (seen by increased mean linear intercept and collagen fibers and decreased elastic fibers) [14]. When we tried to reproduce their results, no statistical difference was seen in the same parameters. So we tested increasing doses until we could find the one that produced emphysema with not only morphological modifications but also changes in lung function and without mortality. Lütthge *et al.* used an elastase dose of 3.3U/100g (0.66U per animal) in five instillations once a week. The animals developed emphysema with high mean linear intercept (Lm) of 260,7 μm , however with a high mortality rate due to pneumothorax and pulmonary hemorrhage (30%) [11]. In our study, mean Lm was $47.5 \pm 15.8\mu\text{m}$ in E20 group and no mortality was observed, demonstrating the safety of the model. Probably the use of higher doses implies in increased mortality.

We observed that increasing elastase doses produce emphysema with a reduction of the area occupied by collagen in alveolar septa. The remodeling phase of healing involves collagen deposit and begins approximately eight days after the injury. Initially, it is produced collagen III. It is absorbed giving place to collagen I (more mature and resistant collagen)[15]. Hamakawa *et al.* demonstrated that, during emphysema time course, the ratio of collagen III to collagen I first decreased in the early phase (2 days after the treatment with elastase) then gradually returned to the same level as in the control group (21 days after) [16]. This could explain why, seven days after the last instillation, we observed that the fraction area occupied by collagen fiber was reduced. Thus, the time to begin the remodeling phase (increasing collagen and repairing the injuries) was insufficient. Other authors evaluated the behavior of collagen fibers in experimental emphysema and demonstrated it is increased. The difference between their studies to ours is the moment of euthanasia.

Most of them evaluate collagen at least after 14 days of the disease induction [17-19]. When elastic fibers are considered, also a decrease was observed. Some authors believed that the increase in collagen is related to inflammatory pathogenesis of the disease while loss of elastin supports the protease-antiprotease theory [16, 20]. Since there was not enough time to lung remodeling, we believe that loss of elastin was pivot of enlargement of alveolar spaces, supporting the elastolytic hypotheses of emphysema development. Besides reduce fibers, Kononov *et al.* showed considerably reduced elasticity on connective tissue of elastase emphysema, and the networks formed by collagen and elastin exhibited larger deformation and distortion during stretching [21]. So, if the efficiency of the fibers is not good, lung mechanics can be altered[22].

When we analyzed the plethysmographic data, we observed an increase of R in the animals that the emphysema was induced with higher elastase dose (0.15U and 0.2U), as well as a reduction in VT, MV and PEF. Lung resistance is inversely proportional to air flow [23]. Since VT and PEF data were lower in the group with higher alveolar spaces, consequently R was higher. Values for R can stay unaltered due to compensation resulting from hyperinflation in humans. In E20 group that did not happen. However, similar to human emphysema, there is great participation of the peripheral component [23]. Ingenito *et al.* reported, in sheep treated with papain, the same pattern of R, suggesting an underlying airway obstruction [24]. No other studies using mice and whole-body plethysmography reported increased R. Some studies used other evaluation methods that involve muscle paralysis as an adjunct to anesthesia, mainly influencing the evaluation of airway resistance [25-27]. Ito *et al.* showed that R values decreased with increasing

PEEP (higher than 6cmH₂O) but this was not significant [19]. In our study we used low PEEP so maybe this helps the R stays high.

In parenchymal fibrosis there is an increase in collagen fibers and a natural tendency of decrease dynamic compliance [22, 28]. In the whole-body plethysmography no difference in C_{dyn} was observed when compared to control group. It is known that C_{dyn} is deeply related to elastic tissue (specially collagen fibers) [19, 29]. As noted earlier, there was no increase in area occupied by collagen fibers, possibly explaining the unchanged behavior of C_{dyn}.

In 2009, Perez-Padilla *et al.* used data from large population studies to test whether PEF confirmed airflow obstruction. Since patients with higher risk for COPD had lower PEF, they showed the usefulness of the measure as an indicator mortality risk in hospitalized patients, in the emergency room screening of exacerbations and home assessment of the patient [30]. When we analyzed PEF we demonstrated a significant decrease proportional to the increase of the applied elastase dose, confirming the similarity with emphysema seen in humans.

The present study has some limitations: analysis time too short to observe lung remodeling and no method to evaluate inflammation to confirm/exclude the elastolytic hypotheses of emphysema pathogenesis was used, at least in the beginning of the development of the disease. Also, we did not evaluate healthy mice (without instillation of saline).

In conclusion, four instillations of 0.2 U of elastase, once a week, produce an effective and safe model of experimental pulmonary emphysema. As we demonstrated, there is greater airspace enlargement (seen by Lm), reduction in the area occupied by collagen and elastic fibers and lung mechanic changes with the

higher dose, making this model adequate for treatment researches. As perspective, this study can be used as a platform for research in the field of cell therapy in pulmonary emphysema.

This study was supported by the Research Incentive Fund / Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIFE / HCPA).

REFERENCES

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, *II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2004. **30**(5): p. 42.
2. Vestbo, J., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(4): p. 347-65.
3. Cetti, E.J., A.J. Moore, and D.M. Geddes, *Collateral ventilation*. Thorax, 2006. **61**(5): p. 371-3.
4. WHO. WHO | *Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. 2013 [cited 2013 june, 22nd]; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs305/en/.
5. Herth, F.J., et al., *Efficacy predictors of lung volume reduction with Zephyr valves in a European cohort*. Eur Respir J, 2012. **39**(6): p. 1334-42.
6. Oliveira, H.G., S.M. Oliveira, and A.V. Macedo-Neto, *Tratamento Endoscópico do Enfisema: uma Atualização*. Pulmão RJ, 2013. **22**(2): p. 76-82.

7. Russell, R., A. Anzueto, and I. Weisman, *Optimizing management of chronic obstructive pulmonary disease in the upcoming decade*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2011. **6**: p. 47-61.
8. de Oliveira, H.G., et al., *Transbronchoscopic pulmonary emphysema treatment: 1-month to 24-month endoscopic follow-up*. Chest, 2006. **130**(1): p. 190-9.
9. Ribeiro-Paes, J.T., et al., *Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009. **31**(1): p. 140-8.
10. Antunes, M.A. and P.R. Rocco, *Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models*. An Acad Bras Cienc, 2011. **83**(4): p. 1385-96.
11. Luthje, L., et al., *Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model*. Respir Res, 2009. **10**: p. 7.
12. Dunnill, M.S., *Evaluation of a Simple Method of Sampling the Lung for Quantitative Histological Analysis*. Thorax, 1964. **19**: p. 443-8.
13. Onclinx, C., et al., *Elastase-induced pulmonary emphysema in rats: comparison of computed density and microscopic morphometry*. Radiology, 2006. **241**(3): p. 763-70.
14. Cruz, F.F., et al., *Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model*. Respir Physiol Neurobiol, 2012. **182**(1): p. 26-36.
15. Campos, A.C.L., A. Borges-Branco, and A.K. Groth, *Cicatrização de Feridas*. ABCD Arq Bras Cir Dig, 2007. **20**(1): p. 51-8.

16. Hamakawa, H., et al., *Structure-function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(3): p. 517-24.
17. Anciaes, A.M., et al., *Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66**(10): p. 1797-803.
18. Ingenito, E.P., et al., *Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema*. Cell Transplant, 2012. **21**(1): p. 175-89.
19. Ito, S., et al., *Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling*. J Appl Physiol, 2005. **98**(2): p. 503-11.
20. Cardoso, W.V., et al., *Collagen and elastin in human pulmonary emphysema*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(4): p. 975-81.
21. Kononov, S., et al., *Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1920-6.
22. Faffe, D.S. and W.A. Zin, *Lung parenchymal mechanics in health and disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 759-75.
23. Pereira, C.A.C. and M.A.F. Moreira, *Pletismografia - Resistência das Vias Aéreas*. J Pneumol, 2002. **28**(supl 3): p. S139-50.
24. Ingenito, E.P., et al., *Bronchoscopic volume reduction: a safe and effective alternative to surgical therapy for emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(2): p. 295-301.

25. Glaab, T., et al., *Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice*. *Respir Res*, 2007. **8**: p. 63.
26. Macedo-Neto, A.V., et al., *Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats*. *Chest*, 1998. **113**(6): p. 1667-72.
27. Vanoirbeek, J.A., et al., *Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **42**(1): p. 96-104.
28. West, J.B., *Fisiopatologia Pulmonar: princípios básicos*. 7a ed. 2010, Porto Alegre: Artmed.
29. Papandrinopoulou, D., V. Tzouda, and G. Tsoukalas, *Lung compliance and chronic obstructive pulmonary disease*. *Pulm Med*, 2012. **2012**: p. 542769.
30. Perez-Padilla, R., et al., *Can a normal peak expiratory flow exclude severe chronic obstructive pulmonary disease?* *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009. **13**(3): p. 387-93.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

DESENVOLVIMENTO DE DIFERENTES GRAUS DE ENFISEMA PULMONAR INDUZIDO POR ELASTASE EM CAMUNDONGOS

AUTORES: Kuhl, C. P. ^{1,2,3}, Garcez, T. N. A. ⁴, Magrisso, A. B. ³, Laurino, C. C. F. C. ³, Cirne-Lima, E.O. ^{3,4}, Rocco, P. R. M. ⁵, Macedo-Neto, A.V. ^{1,2,4}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁴ Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁵ Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro

RESUMO:

O uso de modelos murinos de enfisema pulmonar é importante para testar diferentes estratégias terapêuticas. Dependendo do grau de dano pulmonar, algumas terapias resultam em diferentes efeitos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo murino de enfisema induzido por diferentes doses de elastase a fim de produzir diferentes graus de severidade. Foram testadas três diferentes doses de elastase (0,1U, 0,15U e 0,2U), administradas uma vez por semana durante quatro semanas, por via intratraqueal. Foram medidas mecânica pulmonar (pletismografia), diâmetro alveolar médio e fração de área ocupada por fibras colágenas e elásticas em camundongos fêmeas C57BL/6. Este estudo foi realizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Observamos aumento na resistência pulmonar com maior dose de elastase (0,2U) [2,02(1,67; 2,34) cmH₂O.s/ml; p=0,008]. . No mesmo grupo, volume corrente

e ventilação minuto reduziram. O pico de fluxo expiratório aumentou significativamente nos grupos tratados com 0,15U e 0,2U. Nenhuma alteração significativa foi observada na complacência pulmonar dinâmica. O diâmetro alveolar médio foi maior nos grupos com 0,15U e 0,2U de elastase demonstrando a destruição dos espaços alveolares [E15: 30,31(26,65;43,13) μm and E20: 49,49(31,67;57,71) μm ; $p < 0,0001$]. . A fração de área ocupada por fibras colágenas e fibras elásticas foi menor nos animais que receberam 0,2U de elastase. Concluímos que quatro instilações intratraqueais de 0,2U de elastase, uma vez por semana induzem alterações na função pulmonar e na histologia, sugerindo um modelo experimental de enfisema pulmonar severo, enquanto que doses menores resultam somente em modificações histológicas.

PALAVRAS-CHAVE: enfisema pulmonar, mecânica pulmonar, elastase pancreática, fibras colágenas.

INTRODUÇÃO

Enfisema pulmonar é uma doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) definida por limitação persistente do fluxo aéreo, cujos achados histológicos evidenciam aumento permanente do espaço aéreo distal até os bronquíolos terminais, acompanhado de destruição das paredes alveolares e sem fibrose óbvia [1, 2]. A diminuição da sustentação radial dos alvéolos prejudica a propriedade de recuo elástico dos pulmões, induzindo ao colapso expiratório nas pequenas vias aéreas e conseqüente aprisionamento de ar. Uma característica marcante do pulmão enfisematoso é a exacerbação do fluxo aéreo comunicante entre os sacos alveolares vizinhos, mecanismo conhecido como ventilação colateral [3]. Em 2012, numa população mundial estimada em sete bilhões de pessoas, a Organização

Mundial de Saúde (OMS) calculou que 210 milhões de pessoas tenham DPOC. Acredita-se que em 2030 a doença se tornará a quarta causa de mortalidade no mundo com um custo financeiro crescente em países industrializados, ou em desenvolvimento [1, 2, 4].

Até o presente momento, não houve terapia eficaz capaz de atenuar o dano morfológico, melhorando a função pulmonar e os sintomas. Cessação do tabagismo e programas de reabilitação pulmonar conseguem demonstrar algum benefício. Entretanto, a maioria dos pacientes em fase avançada da doença apresenta dispnéia aos mínimos esforços e uma péssima qualidade de vida [2, 5-8]. Para melhorar o entendimento da fisiopatologia do enfisema e para testar novas terapias, modelos experimentais tem sido desenvolvidos. Há modelos genéticos, aqueles induzidos por exposição à fumaça e também mediante o uso de enzimas como papaína e elastase [9]. A indução do enfisema com múltiplas doses de elastase tem a capacidade de reproduzir o enfisema panacinar rapidamente [10]. Observa-se também que doses maiores de elastase aumentam a mortalidade dos camundongos [10, 11]. Além disso, a resposta a diferentes terapias depende do grau de severidade do enfisema [2].

Esse estudo objetivou desenvolver diferentes graus de severidade de enfisema pulmonar experimental induzido por elastase em camundongos. Para esse propósito, diferentes doses de elastase foram usadas e foram analisadas a mecânica respiratória assim como histologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob número 13-0086. Os animais foram mantidos em instalações

adequadas, de acordo com a lei brasileira 11.794/2008, Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, Diretrizes da Prática de Eutanásia e com o *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – ILAR/EUA (2011), na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Indução do enfisema

Trinta camundongos C57BL/6 fêmeas, com dois meses de idade, pesando entre 17 e 20 g foram usados neste estudo. Os animais foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 2% para manutenção) e receberam 10 mg/kg de tramadol via intraperitoneal. A traqueia foi abordada através de (1) incisão longitudinal na linha medial da região cervical com o animal em decúbito dorsal simples; (2) dissecação mediana do plano muscular; (3) tração pelo plano posterior traqueoesofágico com pinça; (4) exposição anteriorizada da traqueia cervical inferior; (5) punção mediante emprego de seringa e agulha de insulina no terço médio da traqueia cervical; (6) injeção de salina ou elastase diluída; (7) síntese da incisão cutânea com mononylon 5-0. Ainda com o animal sob sedação, eram realizadas manobras de troca de posturas para melhor distribuição da elastase dentro do pulmão.

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos: controle (C) e elastase (E10, E15 e E20). No grupo C (n=8) houve instilação intratraqueal (i.t.) de 50µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Nos grupos E, três diferentes doses de elastase pancreática porcina (PPE, Sigma-Aldrich) foram testadas por via i.t.:

- E10..... (n=8)..... 0,1U diluída em 50µl de NaCl 0,9%;

- E15.....(n=7)..... 0,15U diluída em 50 μ l de NaCl 0,9%;
- E20..... (n=7)..... 0,2U diluída em 50 μ l de NaCl 0,9%.

Todos animais receberam uma instilação por semana, durante um período regular de quatro semanas.

Peso Corporal

Os animais foram pesados toda semana antes da instilação e ao final do experimento.

Pletismografia

Uma semana após a quarta instilação i.t., os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. A mecânica respiratória foi analisada através de pletismografia com o sistema *FinePointe™ Series, Resistance and Compliance* (Buxco, Wilmington, NC, EUA). O sistema foi pré-calibrado para volume máximo de 0,25 ml e pressão aérea até o limite de 40 cmH₂O. Foi realizada uma traqueostomia e uma cânula foi inserida na traqueia. Os animais foram conectados ao ventilador com frequência respiratória fixa de 140 incursões respiratórias por minuto (irpm). A pressão positiva no final da expiração (PEEP) estabelecida foi de 2 cmH₂O. Medidas de vias aéreas foram gravadas durante três minutos, após um período de aclimatação de cinco minutos seguido por nebulização com solução salina.

No final do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose das mesmas drogas utilizadas na anestesia. Os pulmões foram insuflados e a traqueia clampeada no final da expiração. O pulmão direito foi removido e fixado em

formalina 10% para análise histológica. O pulmão esquerdo foi imediatamente criopreservado a -80°C para posterior análise.

Estudo histológico por microscopia óptica

Visando definir importantes aspectos do modelo experimental esta pesquisa avaliou cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ de espessura na periferia do pulmão direito. Foram analisados os seguintes dados:

- (a) tamanho dos diâmetros alveolares;
- (b) porcentagem de área ocupada por fibras colágenas;
- (c) porcentagem de área ocupada por fibras elásticas.

Para avaliação do tamanho dos diâmetros alveolares, característica lapidar do enfisema, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Na sequência, mediante microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Thornwood, NY, EUA), foram realizadas imagens fotográficas digitais que permitiram posterior análise quantitativa determinada por técnica de contagem de pontos [12]. Com auxílio do *software* Image J (*Software* livre desenvolvido no *National Institutes of Health*, EUA) foi realizada sobreposição da imagem com o retículo. O retículo contém um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta, dispostos em paralelo. Para computar o diâmetro alveolar médio (L_m) o número de interceptos alveolares foi contado em 20 campos aleatórios por lâmina, usando aumento de 400x, sendo $L_m = \Sigma$ do comprimento dos segmentos de reta ($1250\mu\text{m}$) / n° de interceptos.

Fibras colágenas (Sirius Red) e elásticas (corante Orceína) foram quantificadas no septo alveolar. Os resultados foram expressos como porcentagem

da quantidade de fibras colágenas e elásticas por área. As medidas, ainda considerando um aumento de 400x, foram analisadas em 10 campos aleatórios pelo *software* Image J.

Análise estatística

Para análise do peso corporal o método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) foi usado e dados foram expressos por média \pm erro padrão. Os outros dados eram não paramétricos e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Dados não-paramétricos foram expressos por mediana (intervalo interquartil 25-75). Todos os testes foram realizados pelo *software* SPSS 20.0. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

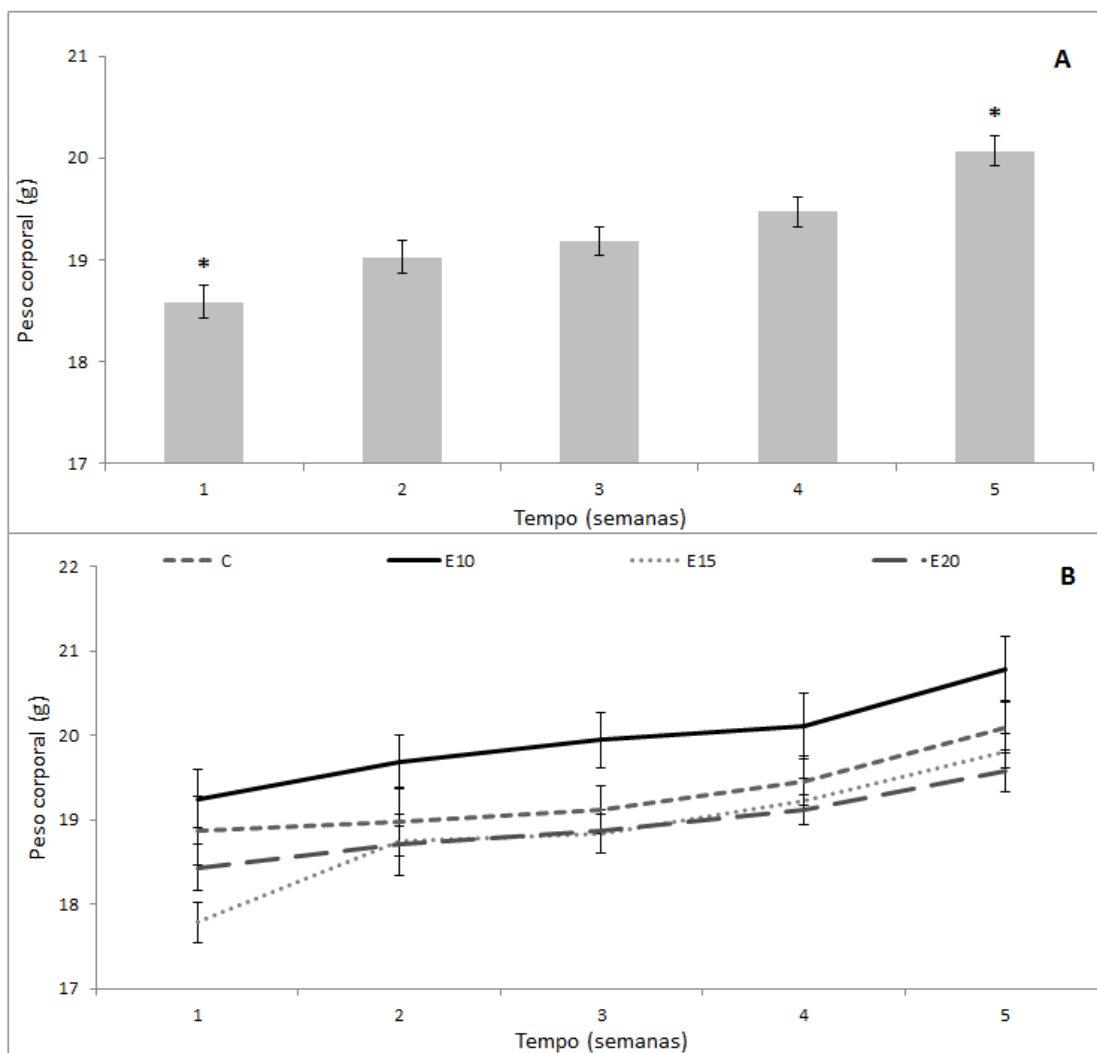
RESULTADOS

Estabelecimento de modelo experimental de enfisema

Nenhum animal morreu durante a anestesia nem nos procedimentos cirúrgicos. Um animal foi excluído no grupo E20 devido à pneumonia. Portanto, a amostra total foi de 30 animais, oito animais no grupo controle, oito no grupo E10, sete no E15 e sete animais no grupo E20.

Peso corporal

O peso corporal aumentou durante o experimento independente do grupo ($p < 0,0001$) (figura 12A). Quando analisamos o peso corporal ganho individualmente, considerando tempo e grupo, nenhuma diferença estatística foi detectada (figura 12B).

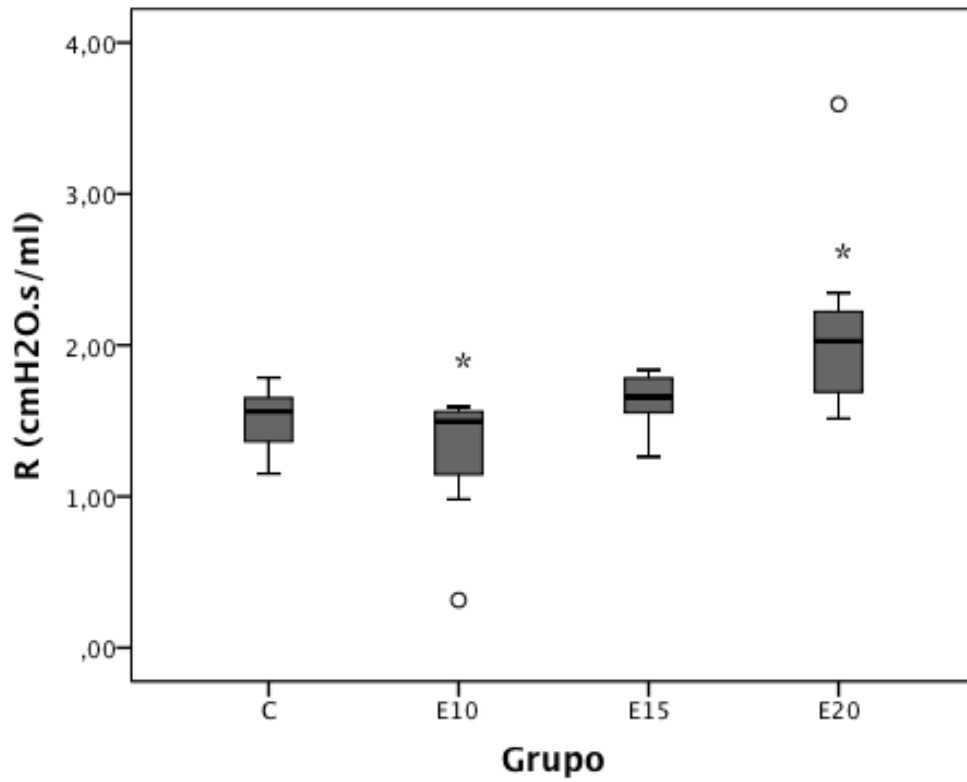
Figura 12: Análise de peso corporal.

Valores expressos por média \pm erro padrão. A - Todos animais dos diferentes grupos (n=30). * Diferença no peso corporal entre semana 1 e 5 ($p < 0,0001$). B- Peso corporal ao longo do tempo. C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas.

Pletismografia

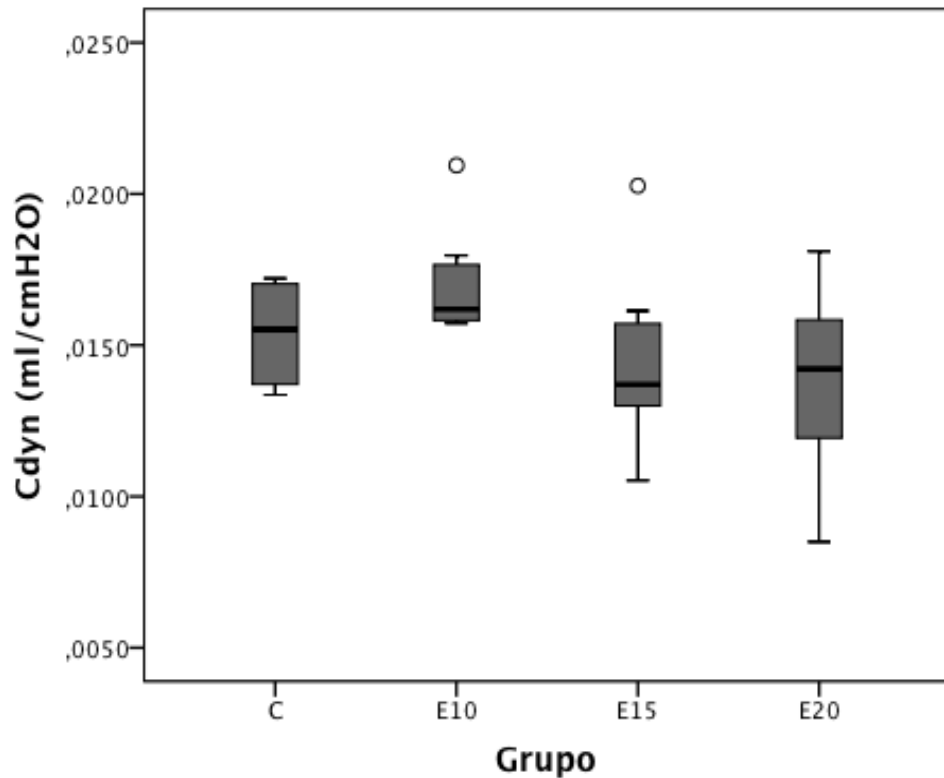
A resistência pulmonar (R) foi maior no grupo E20 do que no E10 ($p=0,008$)(figura 13) e nenhuma diferença na complacência pulmonar dinâmica (Cdyn) foi observada (figura 14). Volume corrente (VT; $p=0,021$), ventilação minuto (MV; $p=0,013$) e pico de fluxo expiratório (PEF; $p < 0,0001$) foram menores no grupo E20 comparado aos demais grupos (figuras 15 e 16).

Figura 13: Resistência pulmonar (R).



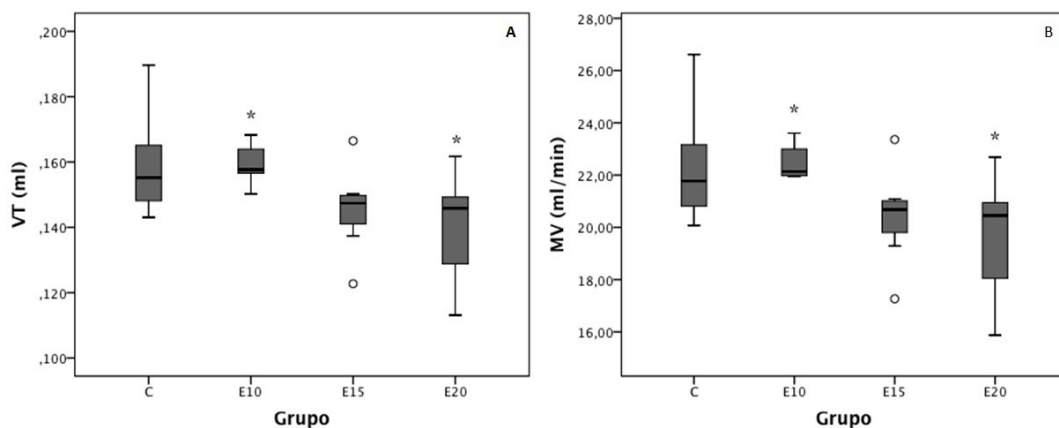
Valores expressos por mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75). * E10 versus E20 ($p=0,006$). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas. o Valor outlier.

Figura 14: Complacência pulmonar dinâmica (Cdyn).



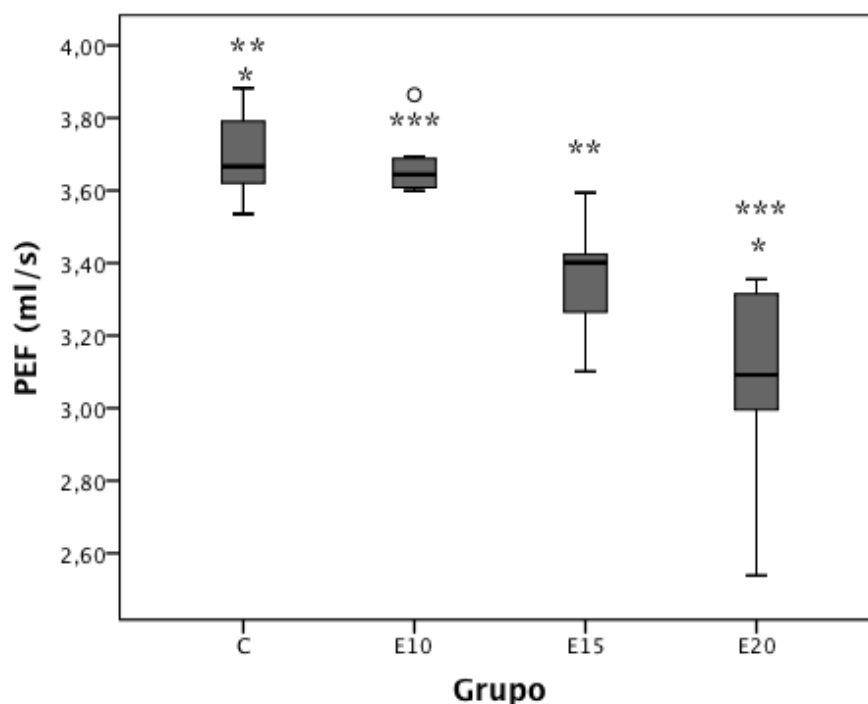
Valores expressos por mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas. o Valor outlier.

Figura 15: Pletismografia.



Valores expressos por mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75). A- Volume corrente (VT). * E10 versus E20 ($p=0,041$). B- Ventilação minuto (MV). * E10 versus E20 ($p=0,024$). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas. o Valor outlier.

Figura 16: Pico de fluxo expiratório (PEF).

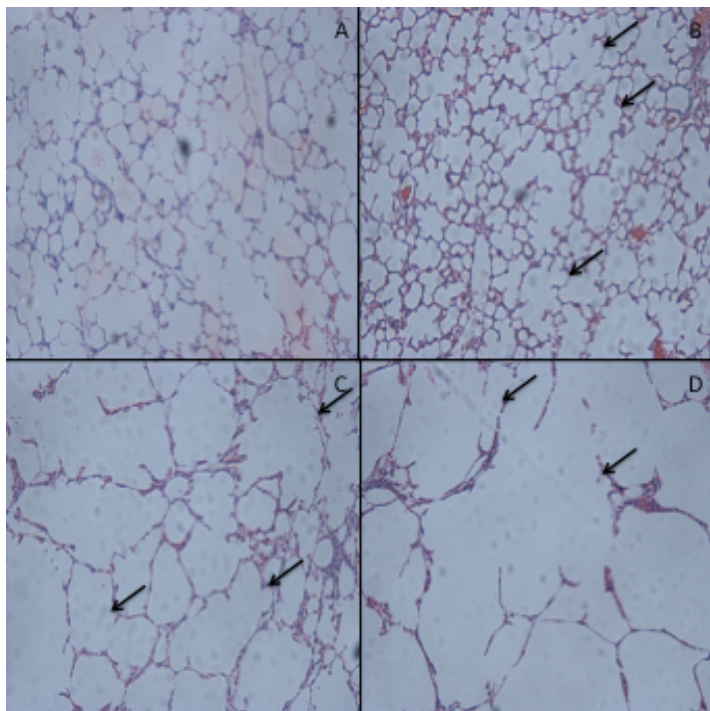


Valores expressos por mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75).
 * C versus E20 ($p < 0,0001$). ** C versus E15 ($p = 0,032$). *** E10 versus E20 ($p = 0,001$). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas. o Valor outlier.

Análise Histológica

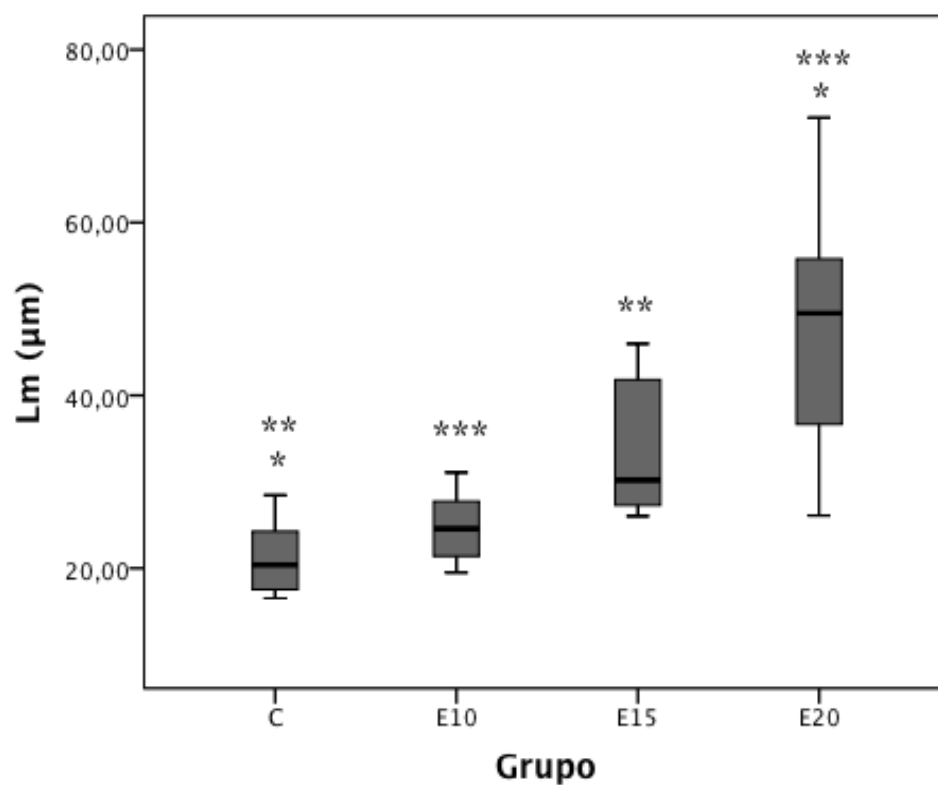
O diâmetro alveolar médio (Lm) aumentou com doses maiores (figura 17). Assim, o Lm foi maior nos grupos E15 e E20, quando comparados com valores do grupo C ($p = 0,028$ e $p = 0,001$, respectivamente). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo controle e E10 no Lm. Adicionalmente, o Lm do grupo E20 foi maior que no E10 ($p = 0,017$) (figura 18).

Figura 17: Fotomicrografias (200x) do parênquima pulmonar corado com HE, uma semana após a 4^a instilação de elastase.



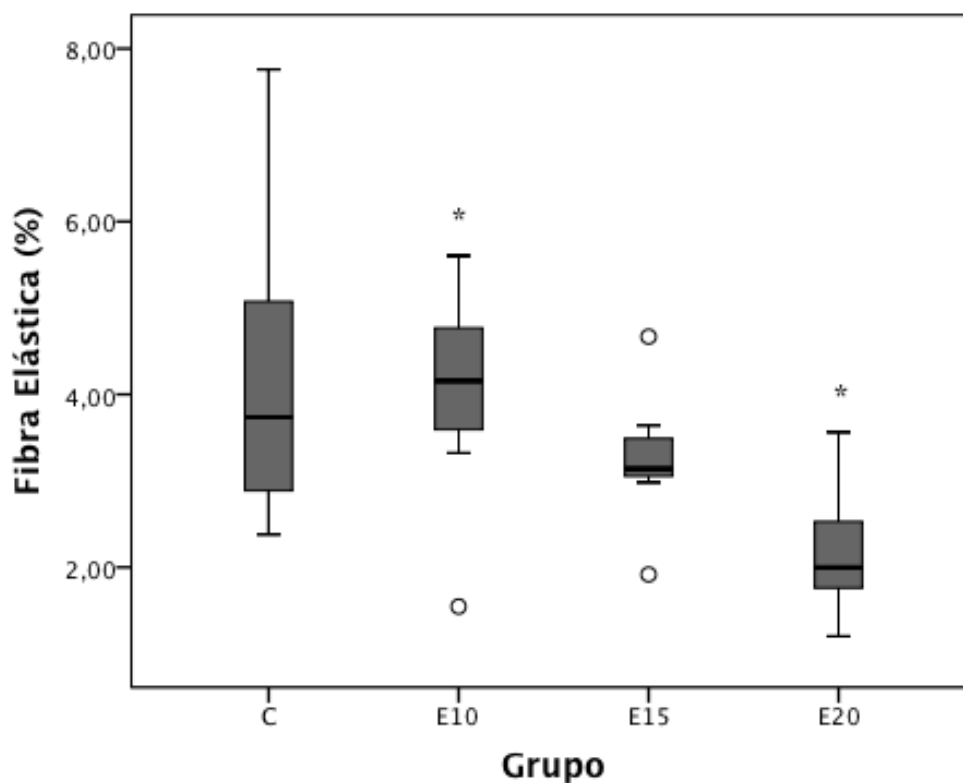
A- Grupo controle; B- E10; C- E15; D- E20. Setas mostram áreas com enfisema.

A fração de área ocupada por fibras elásticas reduziu significativamente no grupo E20 quando comparado com os outros grupos ($p=0,020$). Houve diferença significativa quando E20 foi comparado com E10 ($p=0,026$) (figura 19). Além disso, a fração de área ocupada por fibras colágenas foi menor nos grupos E15 e E20 quando comparados com o grupo C ($p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 20).

Figura 18: Diâmetro alveolar médio (Lm).

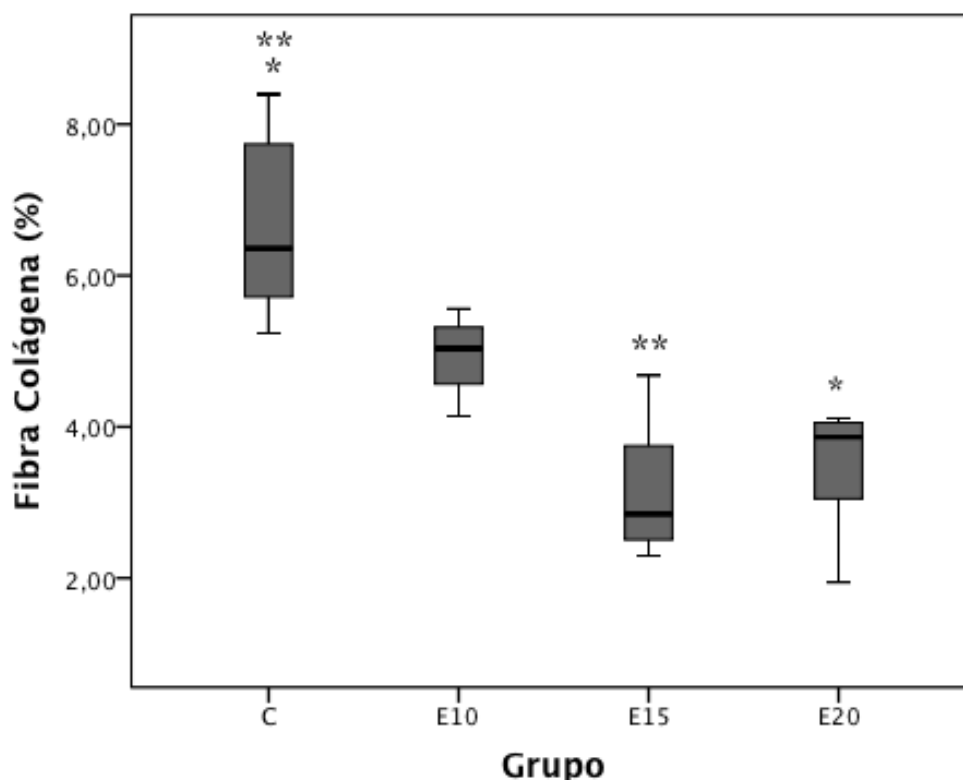
Valores expressos em mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75). * C versus E20 ($p=0,001$). ** C versus E15 ($p=0,028$). *** E10 versus E20 ($p=0,017$). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas.

Figura 19: Fração de área ocupada por fibras elásticas.



Valores expressos em mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75). * E10 versus E20 ($p=0,026$). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas. o Valor outlier

Figura 20: Fração de área ocupada por fibras colágenas.



Valores expressos em mediana de 7-8 animais (intervalo interquartil 25-75). * C versus E20 ($p < 0,0001$). ** C versus E15 ($p < 0,0001$). C= grupo controle; E10= 0,1U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E15= 0,15U de elastase 1x/semana por 4 semanas; E20= 0,2U de elastase 1x/semana por 4 semanas.

DISCUSSÃO

No presente estudo nós desenvolvemos modelos com diferentes graus de enfisema induzidos por diferentes doses de elastase em camundongos. Para esse propósito, mecânica respiratória e histologia foram analisadas. A dose maior resulta em alterações na mecânica respiratória associada com elastólise e hiperinsuflação alveolar. Reciprocamente, 0,15U resultou em mudanças histológicas mas sem modificações na mecânica respiratória. A dose mais baixa não levou a alterações morfológicas significativas.

Diversos estudos desenvolveram enfisema experimental usando diferentes doses de elastase. O enfisema induzido por múltiplas doses de elastase apresenta vantagens quando comparado com uma única dose, como aumento do diâmetro alveolar médio, dano similar ao enfisema progressivo em humanos e alterações sistêmicas [10, 11, 13]. Quando consideramos a dose de elastase, Cruz *et al.* usaram 0,1U e demonstraram alterações morfológicas no parênquima pulmonar (visto pelo aumento do diâmetro alveolar médio e fibras colágenas e redução de fibras elásticas) [14]. Ao tentarmos reproduzir seus achados, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos mesmos parâmetros. Então testamos doses crescentes até conseguirmos encontrar uma que produzisse enfisema com não somente modificações morfológicas mas também, alterações na função pulmonar, e sem mortalidade. Lüthge *et al.* usaram dose de 3,3U/100g (0,66U por animal) em cinco instilações com intervalo de uma por semana. Os animais desenvolveram enfisema com grande diâmetro alveolar médio (Lm) de 260,7 μm , porém com alta taxa de mortalidade devido a pneumotórax e hemorragia pulmonar (30%) [11]. Em nosso estudo, o Lm médio foi de $47,5 \pm 15,8 \mu\text{m}$ no grupo E20 e nenhuma mortalidade foi observada, o que demonstra a segurança do modelo de enfisema. Provavelmente o uso de doses mais altas implica no aumento da mortalidade.

Observamos que doses maiores de elastase produzem enfisema com redução da área ocupada por colágeno no septo alveolar. A fase de remodelamento cicatricial envolve depósito de colágeno e inicia aproximadamente oito dias após a lesão. Inicialmente, é produzido colágeno tipo III. Este é absorvido, dando lugar ao colágeno tipo I (colágeno mais maduro e resistente) [15]. Hamakawa *et al.* demonstraram que, durante o curso do enfisema, a taxa de transposição dos depósitos de colágeno tipo III para colágeno tipo I diminui na fase inicial (dois dias

após o tratamento com elastase), para então, gradualmente, retornar para o mesmo nível do grupo controle (21 dias após) [16]. Isto poderia explicar o porquê de, sete dias após a última instilação, nós observarmos fração de área ocupada por fibras colágenas menor. Assim, o tempo para iniciar a fase de remodelamento (aumentando o colágeno e reparando as lesões) foi insuficiente. Outros autores avaliaram o comportamento das fibras colágenas em enfisema experimental e demonstraram seu aumento. A diferença entre estes estudos e o nosso é o momento de eutanásia. A maioria avalia o colágeno no mínimo após 14 dias de indução da doença [17-19]. Quando consideramos fibras elásticas, também foi observado uma redução. Alguns autores acreditam que o aumento de colágeno está relacionado com a patogênese inflamatória da doença, enquanto que perda de elastina apóia a teoria de protease-antiprotease [16, 20]. Já que não houve tempo para o remodelamento pulmonar, acreditamos que a perda da elastina foi o pivô da transformação dos espaços alveolares, apoiando a hipótese elastolítica do desenvolvimento de enfisema. Além disso, Kononov *et al.* mostraram redução considerável na elasticidade do tecido conjuntivo de enfisema induzido por elastase, e que a rede formada por colágeno e elastina exibia maior deformação e distorção durante seu alongamento [21]. Portanto, se a eficiência das fibras não é adequada, a mecânica respiratória pode ser alterada [22].

Quando analisados os dados da pletismografia, observamos um aumento na R nos animais onde o enfisema foi induzido com doses maiores de elastase (0,15U e 0,2U), assim como redução no VT, MV e PEF. A resistência pulmonar é inversamente proporcional ao fluxo aéreo [23]. Como encontramos dados de VT e PEF menores no grupo com maiores espaços alveolares, conseqüentemente, a R foi maior. Valores de R podem permanecer inalterados devido a compensação

resultante da hiperinsuflação em humanos. No grupo E20 isso não aconteceu. No entanto, similar ao enfisema em humanos há grande participação do componente periférico [23]. Ingenito *et al.* reportaram, em ovelhas tratadas com papaína, o mesmo padrão de R, sugerindo obstrução de vias aéreas subjacentes [24]. Nenhum outro estudo com camundongos e pletismografia de corpo inteiro relatou aumento de R. Alguns estudos utilizam outros métodos de avaliação que envolvem a paralisação da musculatura como adjuvante na anestesia, influenciando principalmente na avaliação da resistência das vias aéreas [25-27]. Ito *et al.* mostraram que valores de R reduzem com o aumento da PEEP (maior que 6 cmH₂O), mas isso não foi significativo [19]. No nosso estudo, usamos PEEP baixa, portanto talvez isso ajude a R permanecer alta.

Na fibrose do parênquima pulmonar há incremento de fibras colágenas e uma tendência natural a diminuição da complacência dinâmica [22, 28]. Na pletismografia de corpo inteiro não observamos diferença na C_{dyn} em relação ao grupo controle. É sabido que C_{dyn} está intimamente relacionada ao tecido elástico (especialmente fibras colágenas) [19, 29]. Como visto anteriormente, não houve aumento da área ocupada pelas fibras colágenas, possivelmente explicando o comportamento inalterado da C_{dyn}.

Em 2009, Perez-Padilla *et al.* usaram dados de grandes estudos populacionais para testar se PEF confirmava obstrução de fluxo aéreo. Como os pacientes com maior risco para DPOC tinham menor PEF, mostrou-se a utilidade da medida como indicador de risco de mortalidade em pacientes hospitalizados, em triagem de exacerbações na emergência e para avaliação domiciliar do paciente [30]. Quando analisamos PEF, demonstramos redução significativa proporcional ao

aumento da dose de elastase aplicada, confirmando a similaridade ao enfisema visto em humanos.

O presente estudo tem algumas limitações: tempo de análise curto para observar remodelamento pulmonar e nenhum método foi utilizado para avaliação da inflamação para confirmar/excluir a hipótese elastolítica da patogênese do enfisema, pelo menos no início do desenvolvimento da doença. Além disso, não avaliamos camundongos saudáveis (sem instilação de solução salina).

Concluimos que quatro aplicações de 0,2U de elastase, uma vez por semana, produz um modelo eficaz e seguro de enfisema pulmonar experimental. Como demonstramos, há maior alargamento do espaço aéreo (visto pelo Lm), redução da área ocupada pelas fibras colágenas e elásticas e alterações na mecânica respiratória com a maior dose, tornando este modelo adequado para pesquisas terapêutica. Como perspectiva, o presente estudo poderá ser utilizado como plataforma para realização de diversas pesquisas no campo da terapia celular em enfisema pulmonar.

Este estudo foi apoiado pelo Fundo de Incentivo a Pesquisa/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, *II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2004. **30**(5): p. 42.

2. Vestbo, J., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(4): p. 347-65.
3. Cetti, E.J., A.J. Moore, and D.M. Geddes, *Collateral ventilation*. Thorax, 2006. **61**(5): p. 371-3.
4. WHO. WHO | *Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. 2013 [cited 2013 june, 22nd]; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs305/en/.
5. Herth, F.J., et al., *Efficacy predictors of lung volume reduction with Zephyr valves in a European cohort*. Eur Respir J, 2012. **39**(6): p. 1334-42.
6. Oliveira, H.G., S.M. Oliveira, and A.V. Macedo-Neto, *Tratamento Endoscópico do Enfisema: uma Atualização*. Pulmão RJ, 2013. **22**(2): p. 76-82.
7. Russell, R., A. Anzueto, and I. Weisman, *Optimizing management of chronic obstructive pulmonary disease in the upcoming decade*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2011. **6**: p. 47-61.
8. de Oliveira, H.G., et al., *Transbronchoscopic pulmonary emphysema treatment: 1-month to 24-month endoscopic follow-up*. Chest, 2006. **130**(1): p. 190-9.
9. Ribeiro-Paes, J.T., et al., *Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009. **31**(1): p. 140-8.
10. Antunes, M.A. and P.R. Rocco, *Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models*. An Acad Bras Cienc, 2011. **83**(4): p. 1385-96.

11. Luthje, L., et al., *Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model*. *Respir Res*, 2009. **10**: p. 7.
12. Dunnill, M.S., *Evaluation of a Simple Method of Sampling the Lung for Quantitative Histological Analysis*. *Thorax*, 1964. **19**: p. 443-8.
13. Onclinx, C., et al., *Elastase-induced pulmonary emphysema in rats: comparison of computed density and microscopic morphometry*. *Radiology*, 2006. **241**(3): p. 763-70.
14. Cruz, F.F., et al., *Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012. **182**(1): p. 26-36.
15. Campos, A.C.L., A. Borges-Branco, and A.K. Groth, *Cicatrização de Feridas*. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 2007. **20**(1): p. 51-8.
16. Hamakawa, H., et al., *Structure-function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **45**(3): p. 517-24.
17. Ancaes, A.M., et al., *Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011. **66**(10): p. 1797-803.
18. Ingenito, E.P., et al., *Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema*. *Cell Transplant*, 2011.
19. Ito, S., et al., *Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling*. *J Appl Physiol*, 2005. **98**(2): p. 503-11.
20. Cardoso, W.V., et al., *Collagen and elastin in human pulmonary emphysema*. *Am Rev Respir Dis*, 1993. **147**(4): p. 975-81.

21. Kononov, S., et al., *Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 1): p. 1920-6.
22. Faffe, D.S. and W.A. Zin, *Lung parenchymal mechanics in health and disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 759-75.
23. Pereira, C.A.C. and M.A.F. Moreira, *Pletismografia - Resistência das Vias Aéreas*. J Pneumol, 2002. **28**(supl 3): p. S139-50.
24. Ingenito, E.P., et al., *Bronchoscopic volume reduction: a safe and effective alternative to surgical therapy for emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(2): p. 295-301.
25. Glaab, T., et al., *Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice*. Respir Res, 2007. **8**: p. 63.
26. Macedo-Neto, A.V., et al., *Respiratory mechanics after prosthetic reconstruction of the chest wall in normal rats*. Chest, 1998. **113**(6): p. 1667-72.
27. Vanoirbeek, J.A., et al., *Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 96-104.
28. West, J.B., *Fisiopatologia Pulmonar: princípios básicos*. 7a ed. 2010, Porto Alegre: Artmed.
29. Papandrinopoulou, D., V. Tzouda, and G. Tsoukalas, *Lung compliance and chronic obstructive pulmonary disease*. Pulm Med, 2012. **2012**: p. 542769.
30. Perez-Padilla, R., et al., *Can a normal peak expiratory flow exclude severe chronic obstructive pulmonary disease?* Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(3): p. 387-93

