

**ROSANGELA MONTEIRO**

**Avaliação das alterações anatômicas cardíacas  
secundárias ao enfisema pulmonar: estudo  
experimental em ratos**

Tese apresentada ao Departamento de  
Cardio-Pneumologia da Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia Torácica e  
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene

São Paulo

2004

"Não confunda jamais conhecimento com sabedoria.

Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida"

S. Carey

***DEDICATÓRIA***

**Aos meus pais e irmãos,**

por tudo que fizeram por mim e pelo que representam em

minha vida...

... pelo exemplo, pelo carinho, pelo colo,

pelo amor em todos os momentos,

... por vocês existirem.

**Ao Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene,**

com quem tenho tido o privilégio de trabalhar há quase 15  
anos... por ter me ensinado os primeiros passos na carreira  
científica e por me apoiar nos demais...

Obrigada por ser meu orientador, meu chefe, meu amigo...

... por estar presente nos momentos mais importantes e  
também nos mais difíceis da minha vida...

## ***AGRADECIMENTOS***

Ao Prof. Dr. Noedir Antônio Groppo Stolf, coordenador da pós-graduação na Área de Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me acolher como primeiro profissional não-médico para realização de Doutorado neste programa. Agradeço pela confiança em mim depositada, proporcionando-me a honrosa oportunidade de desenvolver esta tese.

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo-Fernandes, pelo apoio e incentivo constantes na minha atividade acadêmica pelas valiosas sugestões no planejamento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luís Felipe Pinho Moreira, pela atenção dispensada durante a pós-graduação e pelo exemplo de rigor científico e zelo pela pesquisa.

Ao Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato e ao Dr. Alexandre Ciappina Hueb pelas importantes sugestões na análise do "boneco de tese" apresentado para exame de qualificação, as quais abriram perspectivas para realização de novos estudos em continuidade a esta tese.

Aos amigos Rogério Pazetti, Aristides Tadeu Correia, Dolores Helena Rodrigues Ferreira Rivero e Luiza Antônia Manoel, pela competência e profissionalismo demonstrados durante a realização dos experimentos que resultaram nesta tese.

Ao Dr. Wanderley Marques Bernardo, meu grande amigo e companheiro de todas as horas, por aguçar o meu espírito crítico, dividir seus conhecimentos de metodologia científica e, acima de tudo, por sua amizade incondicional.

Ao Dr. Miguel Lia Tedde, pelo carinho, pelo estímulo e pela incansável disposição em ajudar.

Aos meus amigos do Laboratório Anatômico Cirúrgico do Instituto do Coração, Argemiro Falcetti Junior, Eliana Ogata e Sérgio Spezzia, pelo companheirismo e dedicação sempre demonstrados durante esses anos de convivência.

Às minhas amigas "super-poderosas", Ana Cristina Martins Monteiro, Luciana Azevedo Luppi e Sueli Vieira Santos, pela "gasolina" nos

momentos em que achei que ela fosse acabar, pela certeza de que sempre posso contar com vocês.

À Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros Guiss de Oliveira, funcionárias da Coordenaria de Pós-graduação do Instituto do Coração, por me incentivarem e estarem sempre prontas a ajudar na superação das dificuldades encontradas.

À Creusa Maria Rovieri Dal Bó, pelo auxílio na realização da análise estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva e à farmacêutica Cíntia G. C. do Nascimento Freire, pela realização da gasometria do sangue arterial na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A Yon Morato, pela atenciosa revisão e adequação do summary.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela agradável convivência.

## ***SUMÁRIO***

# SUMÁRIO

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e Enfisema Pulmonar	2
1.2	Modelos Animais de Doença	6
1.3	Modelos Experimentais de Enfisema Pulmonar	8
1.4	Alterações Cardíacas Secundárias ao Enfisema Pulmonar	11
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAL E MÉTODO	15
3.1	Aspectos Éticos	16
3.2	Estudo Piloto	16
3.3	Protocolo Experimental	17
3.3.1	Grupos Experimentais	17
3.3.2	Anestesia	18
3.3.3	Ventilação Mecânica	19
3.3.4	Indução de Enfisema Pulmonar por Papaína	20
3.3.5	Manutenção dos Animais	21
3.3.6	Sacrifício	22
3.4	Parâmetros Analisados	23
3.4.1	Avaliação Sangüínea: Gasometria do Sangue Arterial	23
3.4.2	Avaliação Pulmonar: Análise Histopatológica e Morfométrica para Determinação do Enfisema Pulmonar	24
3.4.3	Avaliação do Peso Corpóreo e de sua Relação com o Peso Cardíaco	27
3.4.4	Avaliação Cardíaca: Análise Morfométrica dos Corações	28
3.5	Análise Estatística	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Mortalidade	34
4.2	Avaliação Sangüínea: Gasometria do Sangue Arterial	35
4.2.1	Saturação de Oxigênio	35
4.2.2	Pressão Parcial de Oxigênio	36
4.2.3	Pressão Parcial de Gás Carbônico	38
4.3	Avaliação Pulmonar: Análise Histopatológica e Morfométrica para Determinação do Enfisema Pulmonar	40
4.4	Avaliação do Peso Corpóreo e de sua Relação com o Peso Cardíaco	43
4.4.1	Peso Corpóreo ao Sacrifício	43
4.4.2	Peso Cardíaco	45

4.4.3	Relação entre o Peso Corpóreo e o Peso Cardíaco	46
4.5	Avaliação Cardíaca: Análise Morfométrica dos Corações	48
4.5.1	Espessura da Parede do Ventrículo Direito	48
4.5.2	Espessura da Parede do Septo Interventricular	49
4.5.3	Espessura da Parede do Ventrículo Esquerdo	50
4.5.4	Área da Cavidade Ventricular Direita	52
4.5.5	Área da Cavidade Ventricular Esquerda	53
5	DISCUSSÃO	56
5.1	Considerações Gerais	57
5.2	Análise do Material e Método	59
5.2.1	Escolha do Rato como Animal de Experimentação	59
5.2.2	Escolha do Modelo de Indução de Enfisema com Papaína	60
5.3	Análise dos Resultados Obtidos	63
5.3.1	Avaliação Sangüínea: Gasometria do Sangue Arterial	63
5.3.2	Avaliação Pulmonar: Análise Histopatológica e Morfométrica para Determinação do Enfisema Pulmonar	64
5.3.3	Avaliação do Peso Corpóreo e de sua Relação com o Peso Cardíaco	66
5.3.4	Avaliação Cardíaca: Análise Morfométrica dos Corações	67
5.4	Perspectivas Futuras	71
6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS	74

***RESUMO***

## RESUMO

Monteiro R. *Avaliação das alterações anatômicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 87p.

**Introdução:** Além das já conhecidas repercussões morfofuncionais que ocorrem nos pulmões de pacientes com enfisema pulmonar, vários órgãos e estruturas sofrem o impacto dessas alterações, dentre eles o coração. Apesar da extensa literatura sobre enfisema pulmonar, há poucos trabalhos avaliando os efeitos do enfisema induzido experimentalmente sobre o coração, sobretudo cronicamente.

**Objetivo:** Este trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência e as repercussões de enfisema pulmonar quimicamente induzido e as alterações morfológicas presentes em corações de ratos após sua indução, acompanhando sua progressão ao longo do tempo.

**Material e Método:** Foram avaliados 75 ratos divididos em dois grupos, papaína (N=50) e controle (N=25), submetidos à instilação intratraqueal de papaína e solução fisiológica, respectivamente. Os animais foram sacrificados 30, 60, 90, 120 ou 180 dias após a instilação. Foi realizada gasometria do sangue arterial, análise morfométrica dos pulmões e coração, bem como avaliação do peso corpóreo e sua relação com o peso cardíaco .

**Resultados:**A instilação de papaína produziu destruição do tecido alveolar, mimetizando alterações morfológicas encontradas no enfisema pulmonar, sem repercussão na função de trocas gasosas. O ventrículo direito e septo interventricular não apresentaram alterações macroscópicas significativas no período de até seis meses após a indução do enfisema. A cavidade do ventrículo direito apresentou dilatação, a partir de 120 dias após indução do enfisema. O ventrículo esquerdo apresentou significativa redução da área de sua cavidade, 90 dias após a indução do enfisema pulmonar, acompanhada de discreto espessamento de sua parede.

**Conclusões:** O modelo experimental empregado foi eficiente para induzir morfológicamente o enfisema pulmonar, embora sem alterações hemogasométricas. A presença de enfisema pulmonar não provocou alterações morfológicas na parede do ventrículo direito e septo interventricular. A destruição alveolar induziu hipertrofia do ventrículo esquerdo e dilatação do ventrículo direito provavelmente secundária a esta.

**Descritores:** Modelos animais de doenças. Ratos Wistar. Papaína/farmacologia. Enfisema pulmonar/induzido quimicamente. Enfisema pulmonar/fisiopatologia. Ventrículo cardíaco/anatomia & histologia.

***SUMMARY***

## SUMMARY

Monteiro R. *Evaluation of the cardiac anatomical alterations secondary to the pulmonary emphysema: experimental study in rats*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 87p.

**Introduction:** Besides the well known morphofunctional repercussions observed in patients lungs with pulmonary emphysema, several organs and structures suffer the alterations impact, the heart among them. In spite of the vast pulmonary emphysema literature, there are few papers analyzing the effects of the experimentally induced emphysema in the heart, above all chronically.

**Objective:** The purpose of this study is to evaluate the occurrence and repercussions of the pulmonary emphysema chemically induced and the morphological alterations present in heart of rats post-induction, following its progression afterwards.

**Material and Method:** Seventy five rats divided into two groups papain (N=50) and control (N=25), submitted to intratracheal instillation of papain and saline solution, respectively, were evaluated. The animals were sacrificed 30, 60, 90, 120 or 180 days post-instillation. Arterial blood gases, cardiac and pulmonary morphometrical analysis as well as body weight and its relation to cardiac weight evaluation were performed.

**Results:** The papain instillation produced alveolar tissue destruction similar to the morphological alterations observed in pulmonary emphysema without arterial blood gases changes. Right ventricle and interventricular septum did not show significant macroscopic alterations until six months after emphysema induction. The right ventricle area presented enlargement 120 days post-induction of the pulmonary emphysema. The left ventricle presented significant cavity area decrease 90 days post-induction of the pulmonary emphysema, followed by slight wall thickening.

**Conclusions:** The adopted experimental model was efficient to morphologically induce the pulmonary emphysema, although, without arterial blood gases changes alterations. The pulmonary emphysema presence did not provoke morphological changes in the right ventricle wall and interventricular septum. The alveolar destruction induced left ventricular hypertrophy and enlargement of the right ventricle, probably secondary to the first one.

**Keywords:** Disease models, animal. Rats, Wistar. Pulmonary emphysema/chemically induced. Pulmonary emphysema/physiopathology. Heart ventricle/anatomy & histology.



## ***INTRODUÇÃO***



## 1 INTRODUÇÃO

### ***1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e Enfisema Pulmonar***

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais causas de morte e incapacitação em todo o mundo, com mais de 16 milhões de indivíduos afetados só nos Estados Unidos <sup>(1,2)</sup>. Representa a quarta e a quinta causa de morte mais freqüente nos Estados Unidos e no Reino Unido, respectivamente <sup>(3)</sup>. No Brasil, é responsável por cerca de 30 mil óbitos/ano, sendo a quinta causa de morte <sup>(4)</sup>. Estima-se que haja três milhões de portadores da doença em nosso país. Ao contrário de diversas doenças crônicas que estão em declínio, a progressão da DPOC é alarmante, exibindo números universalmente crescentes. Prevê-se que até 2020 será a terceira causa de morte mais freqüente no mundo, sendo superada apenas pela doença cardíaca isquêmica e pela doença vascular cerebral <sup>(5)</sup>.

Somente nos Estados Unidos, o ônus da doença é de aproximadamente US\$ 30 bilhões por ano <sup>(5)</sup>. No Brasil, segundo dados do DATASUS, a cada ano são hospitalizados 280 mil brasileiros com DPOC, sendo gastos cerca de R\$ 100 milhões com internações destes pacientes <sup>(4)</sup>.

A denominação DPOC engloba uma série de doenças de diferentes etiologias que têm em comum a presença de obstrução ao fluxo aéreo não completamente reversível. A limitação ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e/ou a gases irritantes <sup>(6)</sup>.



Dentre os pacientes com DPOC, aproximadamente 20% apresentam enfisema pulmonar, enquanto os outros 80% têm bronquite crônica ou, ainda, uma combinação destas duas afecções<sup>(7)</sup>.

O enfisema pulmonar acomete predominantemente indivíduos entre 50 e 75 anos, existindo uma importante relação com tabagismo, que se estima ser responsável por 75 a 90% de todos os casos<sup>(7,8)</sup>. Os números variam nos diferentes artigos, mas há registros de que entre 15 e 25% do total de fumantes desenvolvem DPOC<sup>(9,10)</sup>. Estas discrepâncias são atribuídas à dificuldade de diagnóstico, particularmente nas fases mais precoces da doença<sup>(11)</sup>.

O enfisema pulmonar é o maior responsável pelo custo econômico diretamente relacionado a problemas de saúde determinados pelo tabagismo e, ainda, por custos indiretos de morbidade, perda salarial e morte precoce. Dados sugerem que há cerca 1,1 bilhão de fumantes ao redor do mundo, sendo estimado que, aproximadamente, 500 milhões das pessoas vivas na atualidade irão morrer em consequência do tabagismo<sup>(7)</sup>.

Dada a sua alta prevalência, a DPOC merece destaque como problema de saúde pública, tornando-se assunto de investigação científica aprofundada, sobretudo o enfisema pulmonar pela sua fisiopatologia controversa.

Além do tabagismo, outros fatores têm sido associados ao enfisema pulmonar como poluição atmosférica, deficiência hereditária de  $\alpha_1$ -antitripsina e anomalias hereditárias da síntese da matriz extracelular, como a *cutis laxa*<sup>(12)</sup>.



A palavra enfisema é de origem grega e significa “cheio de ar”, procurando representar as alterações morfofuncionais encontradas nos pulmões de pacientes portadores da doença. A hiperinsuflação leva à redução do recolhimento elástico e à limitação expiratória ao fluxo aéreo, aumenta o trabalho ventilatório, prejudicando as trocas gasosas e levando a incapacidade progressiva para atividades físicas <sup>(13)</sup>.

O enfisema pulmonar é definido, segundo o *National Heart, Lung and Blood Institute* <sup>(14)</sup>, como o aumento permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais, acompanhado de destruição de suas paredes sem a presença de fibrose severa. Portanto, enfisema é um termo de caráter anátomo-patológico, sendo com freqüência, erroneamente, empregado como sinônimo de DPOC.

A destruição das paredes foi caracterizada como presença de uma não-uniformidade no padrão dos espaços aéreos dilatados, levando à perda da arquitetura normal do ácino. Esta destruição alveolar acarreta alterações histológicas que podem ser comprovadas por meio de técnicas morfométricas, dentre elas o cálculo do diâmetro alveolar médio que encontra-se aumentado, representando talvez o indicador mais sensível do processo enfisematoso <sup>(13,14)</sup>.

Outra alteração morfológica observada é a diminuição do diâmetro interno dos bronquíolos, mostrando as conseqüências do rompimento da tração elástica radial exercida pelas paredes alveolares sobre as pequenas vias aéreas <sup>(15)</sup>. Este aspecto ajuda a explicar o fechamento precoce das



pequenas vias aéreas durante a expiração nos pacientes enfisematosos, com conseqüente retenção de ar ao final da expiração.

Há ainda, outro parâmetro morfométrico que pode estar alterado no enfisema pulmonar, que é a superfície alveolar que pode estar reduzida, representando substrato anatômico para explicar a dificuldade de difusão de gases que os pacientes portadores desta doença podem apresentar <sup>(13,15)</sup>.

Vários tipos de enfisema pulmonar podem ser definidos, de acordo com o padrão de acometimento da anatomia e distribuição nos lóbulos e dos ácinos pulmonares, sendo os principais, o centrilobular e o panacinar <sup>(16,17)</sup>.

No enfisema centrilobular, os bronquíolos respiratórios e alvéolos das regiões mais centrais do ácino pulmonar estão acometidos, enquanto que os alvéolos distais estão preservados. Neste tipo de enfisema, as lesões são mais intensas e mais comuns nos lobos superiores, particularmente nos segmentos apicais.

Em contrapartida, no enfisema panacinar, os ácinos estão comprometidos por um alargamento difuso, habitualmente estendendo-se desde a região hilar até a periferia dos pulmões. Este é o padrão de enfisema encontrado com maior freqüência em indivíduos com deficiência da enzima  $\alpha_1$ -antitripsina.

Há, ainda, outros tipos de enfisema pulmonar como o para-septal, que apresenta-se como dilatação pulmonar focal dos espaços aéreos, junto aos septos interlobulares ou sob as pleuras, acompanhado de destruição de suas paredes, e o enfisema irregular, onde os ácinos estão irregularmente



afetados, surgindo na vizinhança de processos inflamatórios crônicos. Contudo, estes tipos são pouco freqüentes e de menor relevância clínica.

## **1.2 Modelos Animais de Doença**

Há cerca de 150 anos modelos animais têm sido desenvolvidos para estudo das causas, mecanismos e terapêutica das doenças humanas.

Os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana foram introduzidos por Claude Bernard, no final do século XIX. Já naquela época, este pesquisador enfatizou a aplicabilidade da experimentação animal aos humanos por meio de situações físicas e/ou químicas que resultassem em alterações nos animais semelhantes às provocadas pelas doenças <sup>(18)</sup>.

Um modelo animal deve apresentar as seguintes características <sup>(18)</sup>:

- permitir o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento animal;
- investigar um processo patológico espontâneo ou induzido;
- assemelhar-se em um ou mais aspectos ao fenômeno/doença em seres humanos.

Na literatura podem ser identificados quatro categorias básicas de modelos animais <sup>(19)</sup>:

- *induzido* – situações em que a condição/doença a ser investigada é induzida experimentalmente;
- *espontâneo* – utilizam variantes genéticas de doenças humanas que ocorrem naturalmente nos animais;



- *negativo* – animais em que uma doença específica não se desenvolve, ou ainda, que demonstrem falta de reatividade a um estímulo específico;
- *órfão* – condição que ocorre naturalmente em animais, mas que ainda não foi descrita em seres humanos e que é “adotada” quando uma doença semelhante é identificada no homem posteriormente.

O modelo induzido, como o que foi empregado em nosso estudo, é a única categoria que permite a escolha livre de espécies. Da mesma forma, o uso tradicional de algumas espécies acaba por consagrar alguns modelos experimentais que se tornam de uso freqüente. O rato é um animal extensivamente usado para estudo de doenças que acometam o trato respiratório, como asma e bronquite, além do próprio enfisema pulmonar.

Segundo Fagundes e Taha <sup>(18)</sup>, em levantamento realizado nas bases de dados PubMed, Lilacs, SciELO e Biblioteca Cochrane, num período de quatro anos, o rato foi o animal mais usado em pesquisa, seguido pelo camundongo, coelho, cão, suíno e primata. Ainda segundo estes autores, cerca de 85% dos artigos experimentais do PubMed e 70% da Lilacs utilizavam ratos ou camundongos.

A busca do entendimento dos fatores etiológicos, mecanismos e tratamento das doenças usando outras espécies animais como modelo trouxe também a difícil tarefa de extrapolação dos resultados destes modelos para seres humanos <sup>(18,20)</sup>.



A reprodução de condições patológicas em animais de experimentação enfrenta uma série de limitações intrínsecas aos mecanismos etiopatogênicos e fisiopatológicos complexos. Assim, estas limitações, apesar de não invalidarem a utilização dos modelos experimentais, requerem cautela no julgamento de seus resultados <sup>(13)</sup>. Apesar do rato e do homem claramente compartilharem muitos processos fisiológicos básicos, cada modelo animal deve ser visto como um componente do processo no estudo da doença e não isoladamente ou extrapolado diretamente para o homem <sup>(3)</sup>.

### ***1.3 Modelos Experimentais de Enfisema Pulmonar***

Considerando-se o grande impacto epidemiológico das doenças obstrutivas crônicas, particularmente do enfisema pulmonar, modelos experimentais que resultem em alterações tanto morfo-histológicas como fisiológicas destes pulmões, mimetizando as alterações encontradas no pulmão humano deste tipo de paciente, revestem-se de extrema importância.

Apesar dos primeiros modelos datarem da década de 60, a busca por um modelo ideal que inclui novos mecanismos de indução de DPOC e o aperfeiçoamento dos existentes levou cerca de 80 pesquisadores a se reunirem, há quase 3 anos, na Universidade de Siena, para discutirem o assunto <sup>(21)</sup>. Em última análise, este encontro teve por objetivo estabelecer um fórum de discussão onde os participantes pudessem trocar informações



geradas em seus experimentos, acelerando a tradução destas em melhoria no tratamento dos pacientes.

Vários modelos animais de enfisema pulmonar têm sido desenvolvidos como ferramenta para investigar os fatores bioquímicos e fisiopatológicos responsáveis pela evolução da doença. O acúmulo dos resultados obtidos em vários trabalhos usando modelos experimentais tem permitido melhor compreensão das respostas celulares, anatômicas e bioquímicas dos pulmões a uma série de agressões e às alterações genéticas. Além disso, estes modelos experimentais têm sido utilizados em estudos de novas drogas e terapêuticas que buscam a reparação e o crescimento do tecido alveolar<sup>(22,23)</sup>.

O enfisema pulmonar pode ser induzido de várias maneiras e utilizando animais de diferentes espécies como roedores, cães, macacos, ovelhas, entre outros.

A administração intrapulmonar de proteinases, partículas e outras substâncias exógenas, bem como a exposição ao cigarro, estão entre os modelos mais relatados na literatura<sup>(3,24-32)</sup>. Modelos que empregam ozônio, elastase pancreática, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio e partículas de diesel têm sido empregados para produzir tosse, inflamação e hipersecreção de muco, alguns dos principais sintomas da DPOC.

A manipulação genética também pode resultar em aumento dos espaços aéreos durante o desenvolvimento e ao longo da vida, surgindo como um novo instrumento para compreensão dos fatores envolvidos na formação e destruição alveolar<sup>(33,34)</sup>.



Cada um dos métodos de indução do enfisema pulmonar tem vantagens e limitações próprias, necessitando de interpretação individualizada.

Gross et al. <sup>(24)</sup>, em 1964, foram os primeiros a induzir o enfisema pulmonar experimental em ratos com instilação intratraqueal de papaína, uma enzima proteolítica extraída da fruta e seiva da árvore da papaia (*Carica papaya*). Originou-se, então, uma série de investigações para a determinação do papel das proteases <sup>(35)</sup> na fisiopatologia do enfisema pulmonar, através da administração de enzimas proteolíticas, como a papaína e a elastase pancreática, por instilação intratraqueal ou por inalação via aerossol <sup>(24-26,36-38)</sup>.

As alterações histopatológicas e morfométricas encontradas em pulmões submetidos à ação da papaína demonstram aumento de espaços alveolares, com ruptura de septos alveolares, satisfazendo critérios morfológicos de reprodução do enfisema pulmonar panacinar, caracterizado por um aumento uniforme dos ácinos desde o bronquíolo respiratório até o alvéolo terminal <sup>(25,38,39)</sup>. O tipo panacinar é o mais comum, constituindo aproximadamente 95% dos casos de enfisema pulmonar.

Além dos aspectos morfológicos, vários estudos avaliaram a alterações na dinâmica respiratória de animais após exposição dos animais à papaína. Alguns estudos demonstraram alterações da mecânica ventilatória como aumento da capacidade residual funcional, do volume total pulmonar e da complacência pulmonar, sugerindo diminuição da pressão de



recolhimento elástico desses pulmões, reproduzindo, assim, alterações funcionais do enfisema pulmonar em humanos<sup>(13,37,40)</sup>.

#### **1.4 Alterações Cardíacas Secundárias ao Enfisema Pulmonar**

Além das já conhecidas repercussões morfofuncionais que ocorrem nos pulmões em pacientes com enfisema pulmonar, vários órgãos e estruturas sofrem o impacto dessas alterações, como o diafragma<sup>(41-43)</sup>, o coração<sup>(44-47)</sup> e o corpo carotídeo<sup>(48,49)</sup>, entre outros.

Apesar da extensa literatura sobre enfisema pulmonar, há poucos artigos avaliando os efeitos do enfisema induzido experimentalmente sobre o coração, sobretudo cronicamente.

A doença crônica obstrutiva do pulmão é a causa mais freqüente do aumento do ventrículo direito devido à hipertensão pulmonar hipóxica, sendo a hipertrofia desta câmara observada com freqüência em muitos pacientes. Em outras palavras, as alterações cardíacas refletem a sobrecarga do órgão frente a um regime de hipertensão pulmonar.

Entretanto, vários estudos apresentam resultados controversos quanto à associação entre a massa muscular do ventrículo direito e o grau de destruição tecidual causado pelo enfisema. Esta associação foi confirmada por autores como Hasleton<sup>(50)</sup> e Mitchell et al.<sup>(51)</sup>, enquanto que o mesmo não foi demonstrado nos estudos realizados por Hicken et al.<sup>(45,46)</sup>.

A hipertrofia ventricular esquerda também foi associada ao enfisema pulmonar por Edwards<sup>(52)</sup>. Por outro lado, Sutinen et al.<sup>(44)</sup> não encontraram correlação estatisticamente significativa entre enfisema pulmonar e



hipertrofia ventricular esquerda, embora tenham observado vários casos com associação destes fatores. Foraker et al. <sup>(53)</sup> concluíram que o enfisema severo está acompanhado de uma atrofia do ventrículo esquerdo. Para alguns autores, como Murphy et al. <sup>(54)</sup>, a hipertrofia do ventrículo esquerdo relatada em alguns estudos de necropsia está associada a outras doenças, como hipertensão arterial sistêmica ou aterosclerose coronariana.

Alguns autores, como Michelson <sup>(55)</sup>, Ishikawa et al. <sup>(56)</sup> e Kohama et al. <sup>(57)</sup>, observaram que alterações morfológicas similares ocorrem nos dois ventrículos cardíacos e no septo interventricular. Possivelmente, esses resultados sejam controversos por avaliarem corações de indivíduos em fases distintas da doença e com graus variáveis de enfisema pulmonar. Segundo Sulkowska et al. <sup>(47)</sup>, em um modelo de indução de enfisema pulmonar experimental por instilação de papaína, as primeiras evidências de hipertrofia do ventrículo direito já estão presentes no terceiro mês de experimento, entretanto, a evidente hipertrofia de ambos ventrículos e do septo interventricular só pode ser observada após 6 meses do início do experimento.

Assim, fica claro que não há consenso na literatura sobre alterações morfológicas cardíacas relacionadas ao enfisema pulmonar, merecendo a atenção dos pesquisadores e justificando melhor investigação experimental.



## **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Inicialmente, avaliar morfofuncionalmente a ocorrência e as repercussões do enfisema pulmonar quimicamente induzido em ratos pela instilação intratraqueal de papaína.

Como objetivo principal, avaliar as alterações morfológicas presentes em corações de ratos portadores de enfisema pulmonar, acompanhando sua progressão ao longo do tempo.



## ***MATERIAL E MÉTODO***



---

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-61).

Todos os animais receberam cuidados de acordo com as normas estabelecidas no “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”<sup>(58)</sup> (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996*) e seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Legislação Brasileira e do Colégio Brasileiro de Experimentação<sup>(59)</sup>.

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### 3.2 Estudo Piloto

Apesar do modelo experimental de indução do enfisema pulmonar por papaína já ter sido utilizado com sucesso no desenvolvimento de outro projeto em nosso laboratório<sup>(13,28)</sup>, foi realizado um estudo piloto.

Neste estudo piloto, foram utilizados 20 ratos para o treinamento dos procedimentos, sistematização da técnica e estabelecimento do modelo experimental.

Esta fase revestiu-se de especial importância, pois no trabalho de



Fusco <sup>(13)</sup>, anteriormente realizado em nosso laboratório, os animais foram mantidos por um período médio de 40 dias e o presente estudo previa o acompanhamento de alguns grupos por até seis meses após a indução do enfisema pulmonar. Com a realização destes experimentos iniciais, pudemos comprovar que as lesões produzidas pela instilação da papaína eram irreversíveis ao longo do tempo e que, a despeito da lesão pulmonar e de suas possíveis repercussões, os animais sobreviviam por períodos superiores a seis meses após a agressão química. A realização do projeto piloto possibilitou, ainda, definir seis meses após a instilação como o limite máximo para a avaliação, já que após este período os animais começam a apresentar alterações histológicas pulmonares associadas à senilidade.

### ***3.3 Protocolo Experimental***

#### ***3.3.1 Grupos Experimentais***

Foram utilizados neste estudo 75 ratos machos, da raça Wistar, adultos e sadios, pesando entre 200 e 300g (média de  $275,3 \pm 16,9$ g), provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Inicialmente, os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais:

- **Grupo Papaína (n=50)** → animais submetidos à instilação intratraqueal de solução de papaína;
- **Grupo Controle (n=25)** → animais submetidos à instilação intratraqueal de solução fisiológica isotônica a 0,9 %.

Os animais foram mantidos por um período entre 30 e 180 dias, sendo sacrificados 10 animais do grupo Papaína e cinco do grupo Controle em cinco momentos distintos após a data de instilação (30, 60, 90, 120 e 180 dias). Desta forma, formaram-se os subgrupos do grupo Papaína P30, P60, P90, P120 e P180 e os do grupo controle C30, C60, C90, C120 e C180.

### **3.3.2 Anestesia**

Todos os animais foram submetidos à sedação por inalação de isoflurano a 2% (Forane, FARMASA – Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A) em uma câmara fechada. Depois de sedados, os ratos foram pesados em balança digital (Filizola, modelo BP-6), sendo, em seguida, identificados com perfurador de orelha.

A anestesia foi realizada com isoflurano a 2%, sob O<sub>2</sub> a 100%, utilizando-se um nebulizador de gases (Enflovapor, K Takaoka modelo 1223).



### 3.3.3 Ventilação Mecânica

O animal foi colocado em um suporte de intubação (especialmente confeccionado para este fim), sendo mantido suspenso pelos dentes incisivos superiores.

A intubação orotraqueal foi realizada sob visão direta com auxílio de um laringoscópio pediátrico com lâmina adaptada para pequenos animais, sendo introduzida uma sonda de polietileno de 2mm de diâmetro e 7cm de extensão (Figura 1).

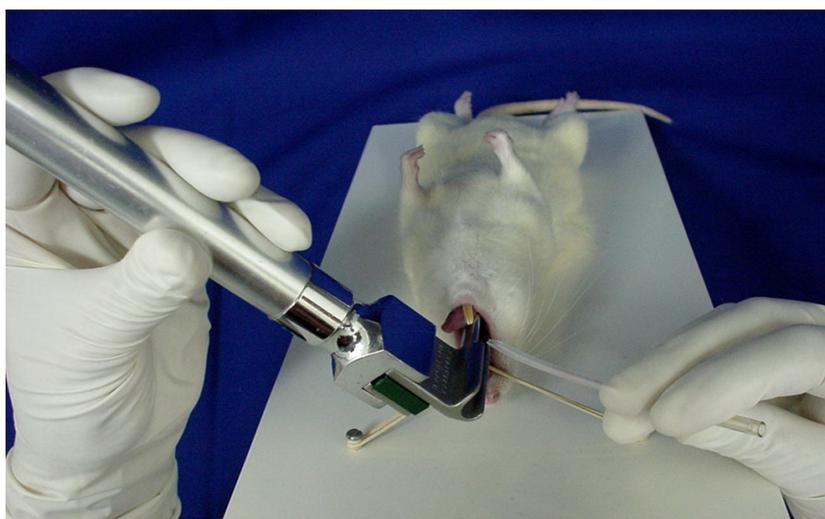


Fig. 1 – Fotografia demonstrando técnica de intubação orotraqueal utilizando-se laringoscópio pediátrico e sonda de polietileno.

A ventilação mecânica foi estabelecida com um ventilador Harvard® (modelo 683, Harvard-Rodent Ventilator) com volume corrente de 10ml/kg e frequência respiratória de 80 ciclos por minuto (Figura 2).

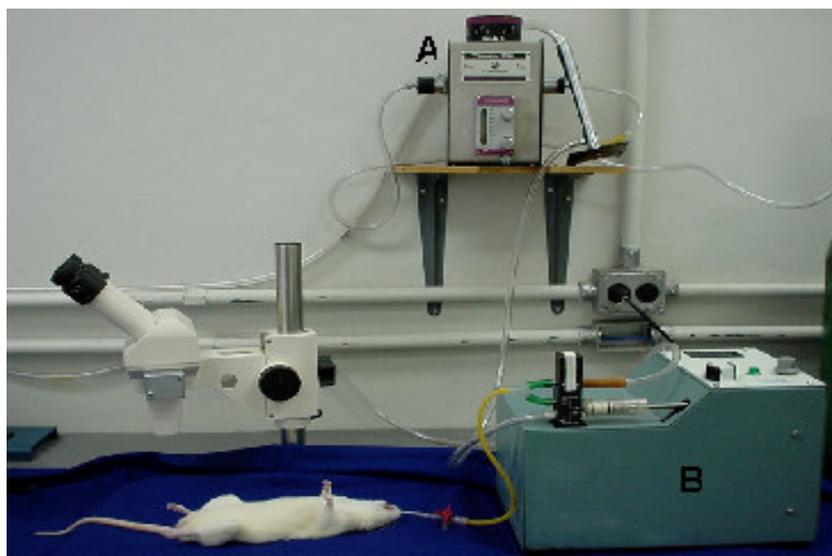


Fig. 2 – Fotografia demonstrando o rato intubado, anestesiado e sob ventilação mecânica, pronto para instilação da solução de papaína. A – Nebulizador de gases. B- ventilador para pequenos animais.

### **3.3.4 Indução de Enfisema Pulmonar por Papaína**

Os animais dos grupos P30, P60, P90, P120 e P180 foram submetidos à instilação intratraqueal de 6mg/kg de papaína (manipulada e fornecida pela Farmácia Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) dissolvida em 1ml de solução fisiológica a 0,9%, por meio de sonda orotraqueal, em infusão lenta, por cerca de dois minutos (Figura 3).

Nos animais dos grupos controle (grupos C30, C60, C90, C120 e C180) o procedimento adotado foi o mesmo, exceto pela solução fisiológica instilada que não continha papaína dissolvida.



Fig. 3 – Fotografia demonstrando técnica de instilação da solução de papaína.

Após a instilação, os animais foram desconectados do ventilador, extubados e mantidos em observação até que a respiração espontânea se estabelecesse, sendo, em seguida, encaminhados ao biotério.

### **3.3.5 Manutenção dos Animais**

No biotério, após a indução do enfisema pulmonar, os ratos foram acomodados em gaiolas coletivas com capacidade para cinco animais, mantidas em sala climatizada com iluminação artificial por período de 12 horas, intercaladas pelo mesmo período sem iluminação. Neste período os animais receberam ração específica e água sem restrições.



### 3.3.6 *Sacrifício*

Após o período estabelecido (30, 60, 90, 120 ou 180 dias), os animais foram pesados e sacrificados.

Para realização do sacrifício os animais foram anestesiados, conforme protocolo anestésico prévio à instilação.

Foi realizada uma incisão longitudinal da cavidade abdominal, seguida de secção da aorta abdominal para exsangüinação e sacrifício do animal (Figura 4).



Fig. 4 – Fotografia demonstrando animal sendo sacrificado, onde observa-se a aorta abdominal sendo pinçada para posterior secção.

Através de esternotomia mediana foi retirado o bloco coração-pulmão (Figura 5), que foi lavado em solução fisiológica, sendo, em seguida, isolados o coração e o pulmão.

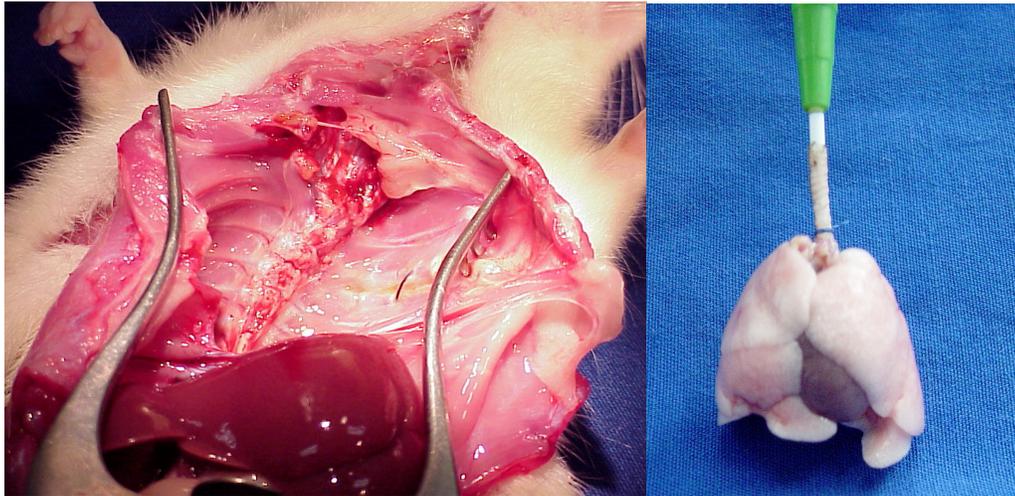


Fig. 5 – Fotografias demonstrando retirada do bloco coração-pulmão, após sacrifício do animal.

### **3.4 Parâmetros Analisados**

Podemos dividir os parâmetros analisados em quatro grupos de avaliações: sanguínea; pulmonar; peso corpóreo e sua relação com o peso cardíaco; cardíaca.

#### **3.4.1 Avaliação Sanguínea: Gasometria do Sangue Arterial**

Previamente ao sacrifício do animal, foram coletados aproximadamente 0,4 ml de sangue diretamente da aorta abdominal, com auxílio de seringa heparinizada (Heparin, heparina sódica 5000UI/ml, Cristália).

O sangue foi encaminhado à Divisão de Laboratório Central (Bioquímica) do Prédio dos Ambulatórios do Hospital das Clínicas da



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para realização de gasometria do sangue arterial.

O método de membrana de íon seletivo foi empregado na análise do sangue, utilizando-se o equipamento Omni Modular Sistema (AVL-Roche), sendo avaliados os seguintes parâmetros: saturação de oxigênio ( $\text{SatO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ) e pressão parcial de gás carbônico ( $\text{PaCO}_2$ ).

#### ***3.4.2 Avaliação Pulmonar: Análise Histopatológica e Morfométrica para Determinação do Enfisema Pulmonar***

Os pulmões foram fixados sob pressão. Para tanto, a traquéia foi canulada com sonda de polietileno, a qual foi conectada a um reservatório contendo formaldeído a 10% tamponado, que foi infundido sob pressão contínua (25cm de altura) por 48 horas. Além disso, durante o período de fixação sob pressão, os pulmões foram mantidos imersos em outra cuba contendo o mesmo agente fixador.

Após o período de fixação, foram realizados cortes do parênquima pulmonar, sendo retiradas três amostras de cerca de 2mm de espessura do pulmão esquerdo (porção cranial, média e caudal) e três do pulmão direito (amostra dos lobos cranial, médio e caudal), representando as porções centrais e periféricas dos pulmões direito e esquerdo (Figura 6).

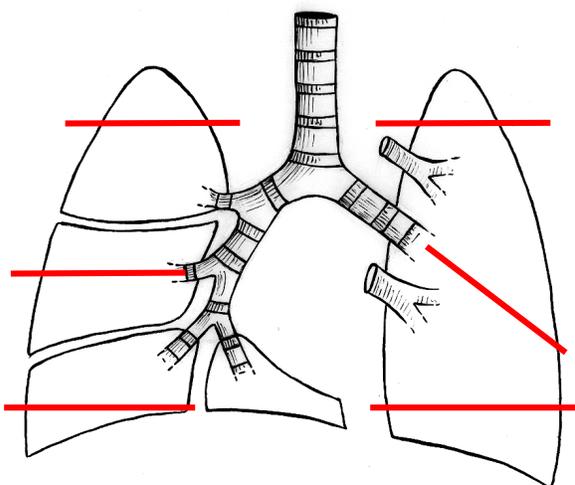


Fig. 6 – Esquema da anatomia dos pulmões do rato: pulmão direito com quatro lobos (cranial, médio, caudal e retrocava) e pulmão esquerdo com um único lobo, exibindo nível de corte para retirada dos fragmentos para análise histológica.

Esses cortes foram submetidos às técnicas histológicas habituais com inclusão em parafina para obtenção de cortes de 5 $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE).

Todas as lâminas foram codificadas (cegadas) e avaliadas em microscópio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss). Inicialmente, observava-se toda a superfície da lâmina e todas as estruturas pulmonares ali representadas, sob aumento do microscópio de 100X.

Com objetivo de realizar a morfometria, 20 campos microscópicos não coincidentes de cada lâmina foram escolhidos aleatoriamente e examinados com o auxílio de uma ocular reticulada acoplada ao microscópio óptico, com aumento de 400X.



A quantificação do enfisema pulmonar foi realizada pela análise histopatológica (presença de destruição alveolar) e pela medida do diâmetro alveolar médio.

Esta técnica de determinação do diâmetro alveolar médio consiste na determinação do número de vezes que estruturas da parede alveolar interceptam um conjunto de retas coerentes <sup>(60,61)</sup>, técnica largamente empregada em estudos que requerem quantificação do enfisema pulmonar <sup>(39,62,63)</sup> – Figura 7. Nos casos de enfisema, o número de interceptos das estruturas alveolares com o sistema de retas é menor, indicando destruição alveolar.

O diâmetro alveolar médio (Lm) foi obtido pela relação:

$$Lm = Ltot / Li$$

Onde: Ltot = comprimento total das retas do campo microscópico

Li = número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo

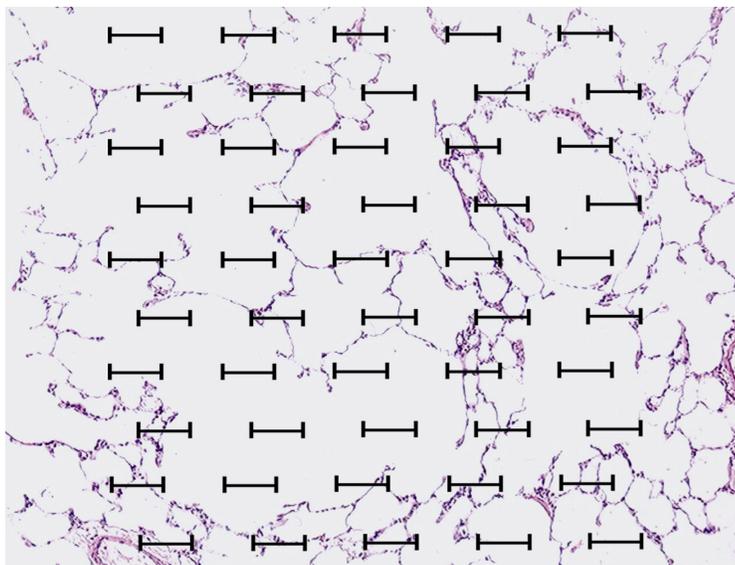


Fig. 7 – Corte histológico de pulmão de rato submetido à papaína com retículo para análise morfométrica. HE 100x.

### **3.4.3 Avaliação do Peso Corpóreo e de sua Relação com o Peso Cardíaco**

Previamente ao sacrifício, todos os animais foram pesados como forma de avaliar indiretamente o impacto da severidade do enfisema sobre seu estado geral e nutricional.

O coração foi dissecado e os vasos da base seccionados ao nível das comissuras valvares. Posteriormente, o coração foi pesado em balança de precisão (Micronal – Mettler Toledo, modelo AG204).

Foi estabelecida uma relação (RP) entre o peso cardíaco e corpóreo:

$$RP = PA / PC$$

Onde: PA = peso do animal no momento do sacrifício

PC = peso do coração



#### **3.4.4 Avaliação Cardíaca: Análise Morfométrica dos Corações**

Para sua fixação, os corações foram imersos em solução de formol tamponado a 10%, por um período mínimo de 48 horas.

Após fixação dos corações, foi realizada uma secção transversal dos ventrículos no ponto médio da distância entre o ápice e o sulco coronário do coração (Figura 8).



Fig. 8 – Fotografia exibindo coração de rato após secção transversal dos ventrículos.

Para realização das mensurações das estruturas cardíacas foi utilizado o software Image Tool, desenvolvido pelo Department of Dental Diagnostic Science of the University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA.



Para aquisição das imagens que seriam processadas pelo software, as peças foram fotografadas com câmera digital (Sony, modelo CyberShot DSC P9) fixa a uma estativa fotográfica (Pentax), mantendo-se distância constante.

Com a imagem das cavidades ventriculares digitalizadas na tela do computador, o primeiro passo para análise e mensuração destas foi a calibração do software. Para tanto, utilizando-se régua que foi colocada ao lado do espécime anatômico no momento da realização das fotografias, registramos no software uma área conhecida.

Em seguida, com o auxílio do mouse foram delimitadas as estruturas que seriam mensuradas:

- *espessura da parede do ventrículo direito* – aferida no ponto médio da parede livre;
- *espessura do septo interventricular* – mensurada no seu ponto médio;
- *espessura da parede do ventrículo esquerdo* – aferida no ponto médio entre os músculos papilares cranial e caudal (Figura 9);
- *área da cavidade ventricular direita* – para delimitação da área o cursor (mouse) foi continuamente movido, respeitando reentrâncias e trabeculações presentes no interior do ventrículo. Com a região delimitada, o software calculava a área automaticamente;



- *área da cavidade ventricular esquerda* – delimitada da mesma forma que a área do ventrículo direito, movendo-se o cursor ao longo dos limites internos da cavidade.

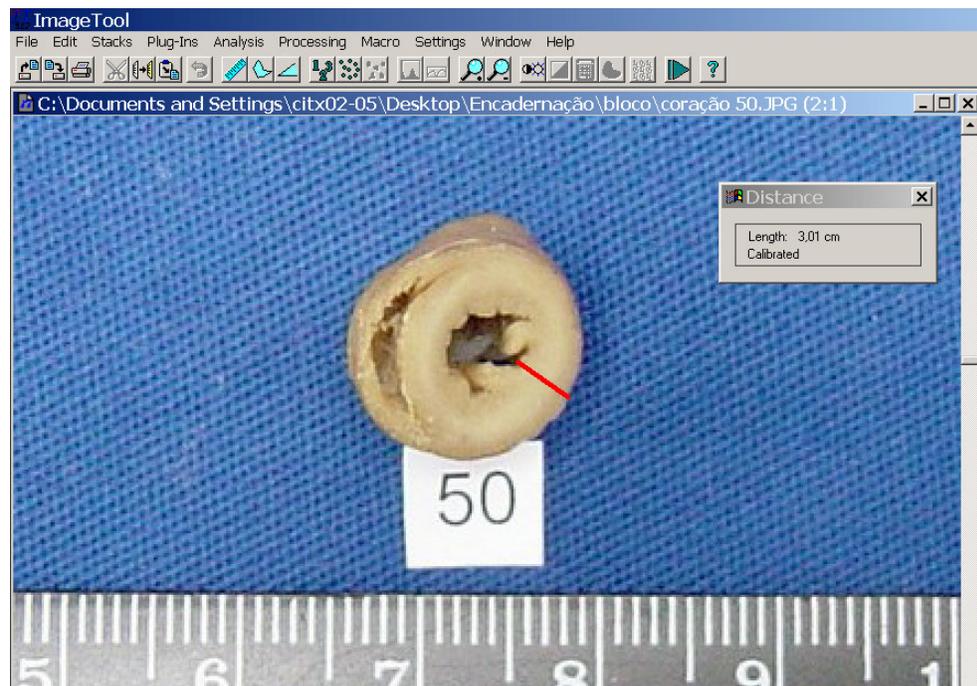


Fig. 9 – Representação da mensuração da espessura da parede do ventrículo esquerdo, utilizando-se o programa Image Tool.

A representação esquemática do desenho do estudo é apresentada na Figura 10.

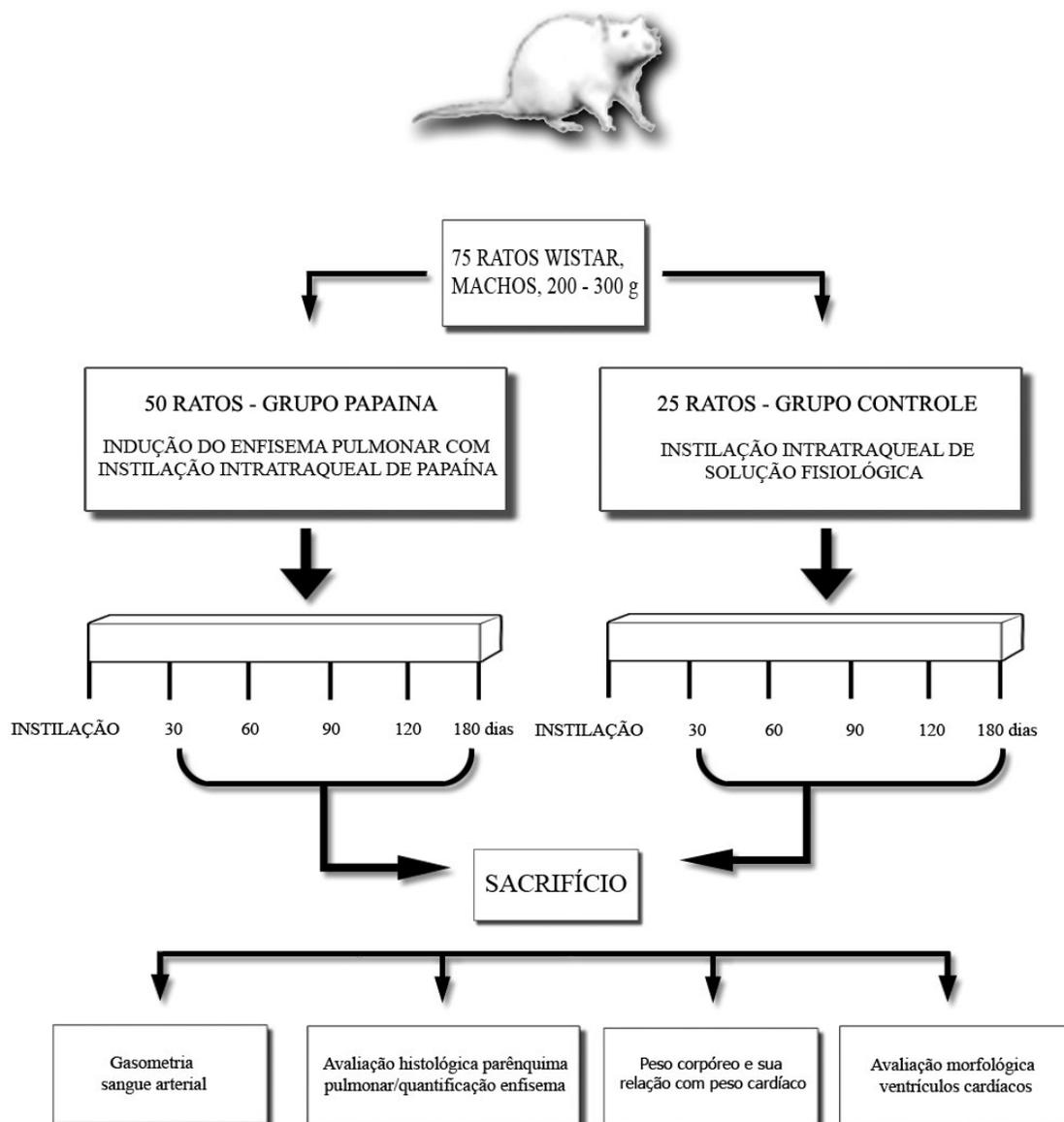


Fig. 10 – Representação esquemática do desenho do estudo.



### **3.5 Análise Estatística**

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente, através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias e desvio-padrão.

Para testar a hipótese de igualdade de médias foi utilizada a Análise de Variância a dois fatores: grupo (papaína e controle) e tempo pós-instilação intratraqueal de papaína (30, 60, 90, 120 e 180 dias). As diferenças entre os grupos foram discriminadas pelo teste t de Bonferroni.

O nível de significância para as análises foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

Os cálculos estatísticos foram realizados através do sistema SAS (*Statistical Analysis System*).



## ***RESULTADOS***



## 4 RESULTADOS

### 4.1 *Mortalidade*

Posteriormente à instilação intratraqueal de solução fisiológica com ou sem papaína dissolvida, houve, respectivamente, sete e um óbitos. As mortes foram atribuídas a edema pulmonar, pois, logo após a instilação, os animais apresentaram desconforto respiratório e hemoptise, seguidos de parada cardiorrespiratória. Considerando que as mortes ocorreram minutos após a instilação, antes mesmo que todos os animais constituintes do grupo fossem submetidos ao procedimento, esses ratos foram substituídos e os grupos a que pertenciam completados.

Tardiamente, observamos dois óbitos no grupo P30, ambos no período de 48 horas pós-instilação, estes animais não foram substituídos por julgarmos que já pertenciam à casuística.

A apresentação dos resultados seguirá os grupos de avaliações propostos na seção Material e Método, a saber: sangüínea; pulmonar; peso corpóreo e sua relação com o peso cardíaco; cardíaca.



## 4.2 Avaliação Sangüínea: Gasometria do Sangue Arterial

A análise gasométrica do sangue arterial não pode ser realizada em alguns animais, pois o intervalo de tempo entre a coleta e a realização da análise sangüínea foi superior ao recomendado. Por este motivo, o subgrupo a análise estatística do subgrupo C60 foi prejudicada.

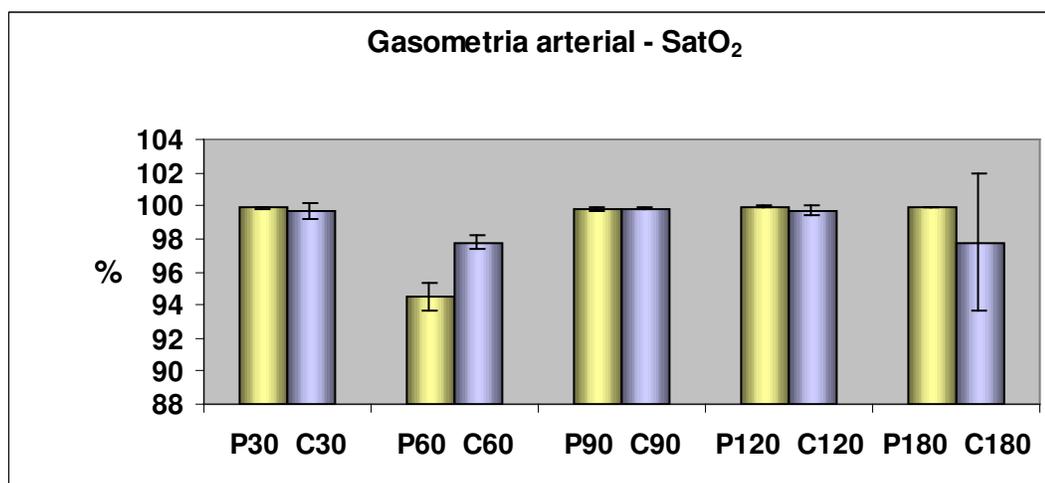
### 4.2.1 Saturação de Oxigênio

Os grupos papaína e controle não diferiram quanto à  $\text{SatO}_2$  no sangue arterial, com  $p=0,0449$  - muito próximo de  $0,05$  - (Gráfico e Tabela 1).

No grupo papaína, a  $\text{SatO}_2$  manteve-se dentro dos parâmetros considerados normais, exceto no grupo P60 onde esteve abaixo deste nível, diferindo significativamente em relação aos demais períodos analisados ( $p<0,05$ ).

Não se observou influência do fator tempo no grupo controle.

**GRÁFICO 1 – Saturação de oxigênio ( $\text{SatO}_2$ ) média no sangue arterial (em %), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**





**TABELA 1 - Média, valores mínimo e máximo da saturação de oxigênio (SatO<sub>2</sub>) no sangue arterial (em %), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	99,88 ± 0,05	99,8	99,9
	Controle	5	99,68 ± 0,44	98,9	99,9
60	Papaína	8	94,48 ± 0,83	92,8	95,3
	Controle	2	97,80 ± 0,42	97,5	98,1
90	Papaína	10	99,79 ± 0,17	99,4	99,9
	Controle	5	99,84 ± 0,09	99,7	99,9
120	Papaína	9	99,93 ± 0,05	99,9	100
	Controle	5	99,72 ± 0,25	99,4	99,9
180	Papaína	9	99,89 ± 0,03	99,8	99,9
	Controle	4	97,80 ± 4,20	91,5	99,9

DP – desvio padrão

#### 4.2.2 Pressão Parcial de Oxigênio

A PaO<sub>2</sub>, em todos os momentos avaliados, esteve diminuída no grupo enfisema em relação ao grupo controle, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas aos 120 dias (P120XC120, p<0,001) - Gráfico e Tabela 2.

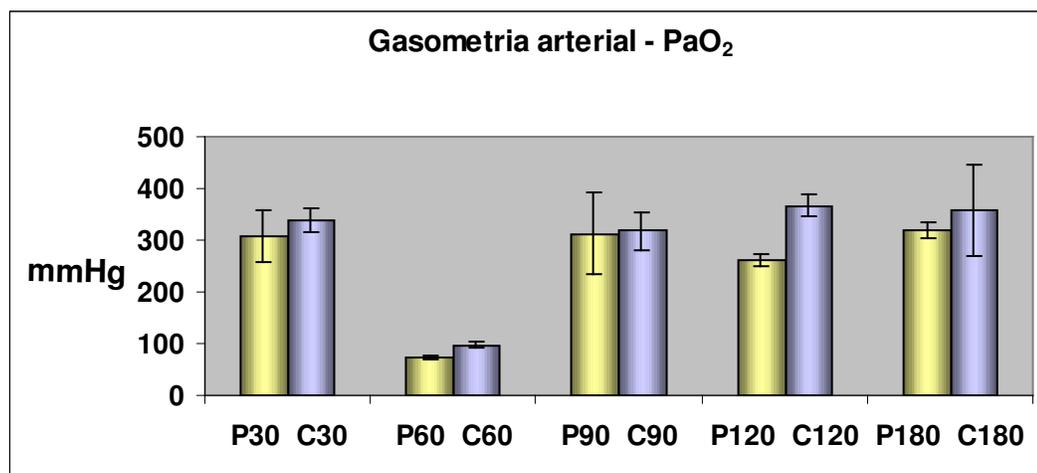
O subgrupo P60 apresentou PaO<sub>2</sub> muito inferior aos outros subgrupos. No grupo papaína houve diferença estatisticamente significativa entre os seguintes subgrupos:

P30XP60 p=0,0001    P30XP120 p=0,0332    P60XP90 p=0,0001  
 P60XP120 p=0,0001    P60XP180 p=0,0001    P90XP120 p=0,0155  
 P120XP180 p=0,0077

Não observamos diferenças significativas no controle entre os seus subgrupos.



**GRÁFICO 2 – Pressão parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>) média no sangue arterial (em mmHg), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 2 - Média, valores mínimo e máximo da pressão parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>) no sangue arterial (em mmHg), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	308,84 ± 50,19	225,0	372,0
	Controle	5	338,22 ± 22,71	309,5	372,0
60	Papaína	8	73,35 ± 4,27	65,4	78,9
	Controle	2	97,90 ± 7,07	92,9	102,9
90	Papaína	10	312,72 ± 77,69	175,7	418,2
	Controle	5	318,48 ± 36,45	269,2	363,1
120	Papaína	9	261,42 ± 11,64	244,2	276,9
	Controle	5	366,54 ± 20,17	333,2	385,0
180	Papaína	9	319,68 ± 13,98	295,9	343,6
	Controle	4	357,80 ± 89,22	229,4	423,3

DP – desvio padrão



### 4.2.3 Pressão Parcial de Gás Carbônico

A PaCO<sub>2</sub>, em todos os momentos avaliados, exceto aos 30 dias, foi maior no grupo enfisema em relação ao grupo controle (Gráfico e Tabela 3):

P30XC30 p=0,9653      P90XC90 p=0,0004  
P120XC120 p=0,0003      P180XC180 p=0,0006

Em relação ao fator tempo, o grupo papaína apresentou variações nos diferentes momentos avaliados, sem que tenha sido observado um padrão, com diferença estatisticamente significativa em:

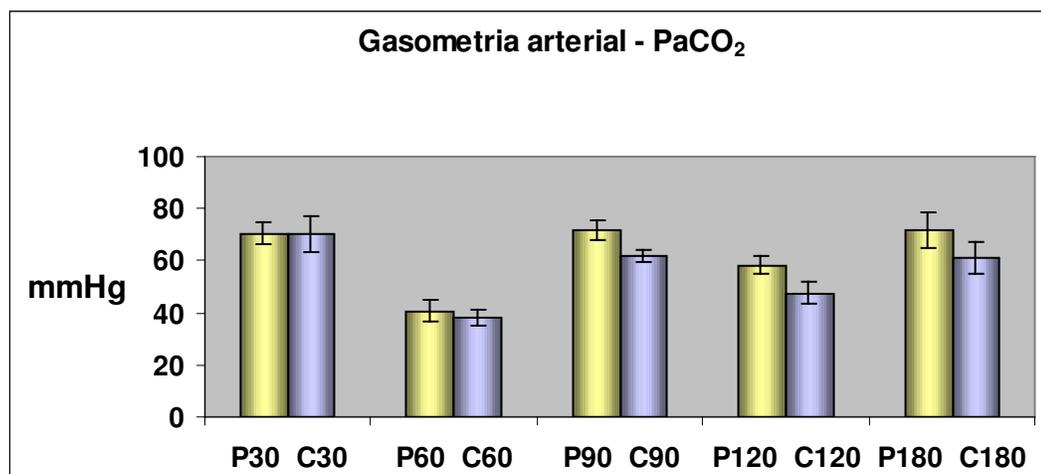
P30XP60 p=0,0001      P30XP120 p=0,0001      P60XP90 p=0,0001  
P60XP120 p=0,0001      P60XP180 p=0,0001      P90XP120 p=0,0001  
P120XP180 p=0,0001

No grupo controle, observamos comportamento similar ao grupo papaína, com diferença estatisticamente significativa nas seguintes comparações:

C30XC90 p=0,0075      C30XC120 p=0,0001      C30XC180 p=0,0078  
C90XC120 p=0,0001      C120XC180 p=0,0001



**GRÁFICO 3 – Pressão parcial de gás carbônico (PaCO<sub>2</sub>) média no sangue arterial (em mmHg), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 3 - Média, valores mínimo e máximo da pressão parcial de gás carbônico (PaCO<sub>2</sub>) no sangue arterial (em mmHg), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	70,40 ± 4,12	62,7	75,7
	Controle	5	70,28 ± 6,73	61,9	77,3
60	Papaína	8	40,75 ± 4,14	35,2	46,9
	Controle	2	38,35 ± 3,18	36,1	40,6
90	Papaína	10	71,82 ± 3,68	66,4	76,8
	Controle	5	61,82 ± 2,59	58,9	65,8
120	Papaína	9	58,06 ± 3,42	52,6	64,6
	Controle	5	47,58 ± 4,36	43,2	53,8
180	Papaína	9	71,86 ± 7,09	63,8	82,6
	Controle	4	61,35 ± 6,08	55,4	69,8

DP – desvio padrão



### **4.3 Avaliação Pulmonar: Análise Histopatológica e Morfométrica para Determinação do Enfisema Pulmonar**

Observamos, no grupo em que houve instilação de solução de papaína, alterações morfológicas características de lesões enfisematosas, com padrão de enfisema panacinar. Houve destruição de septos e aumento dos espaços alveolares, com formação de estruturas nas extremidades dessa ruptura conhecidas como “baquetas” (Figura 11).

No total, foram avaliados 2920 campos microscópicos para cálculo do diâmetro alveolar médio.

O aumento do diâmetro alveolar médio e conseqüente diminuição da área de superfície alveolar foram observados nos dois pulmões dos animais submetidos à instilação de papaína (Gráfico e Tabela 4).

O grupo papaína apresentou diâmetro alveolar médio maior que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). O diâmetro alveolar médio no grupo controle oscilou entre 77,78 e 81,26 $\mu$ m, não apresentando diferença significativa entre os diferentes momentos avaliados. Da mesma forma, o grupo papaína apresentou um diâmetro alveolar médio que variou entre 101,71 e 124,02 $\mu$ m nos diferentes momentos avaliados. Exceto pelo grupo P30, o diâmetro alveolar médio no grupo papaína manteve-se constante ao longo dos períodos de avaliação.

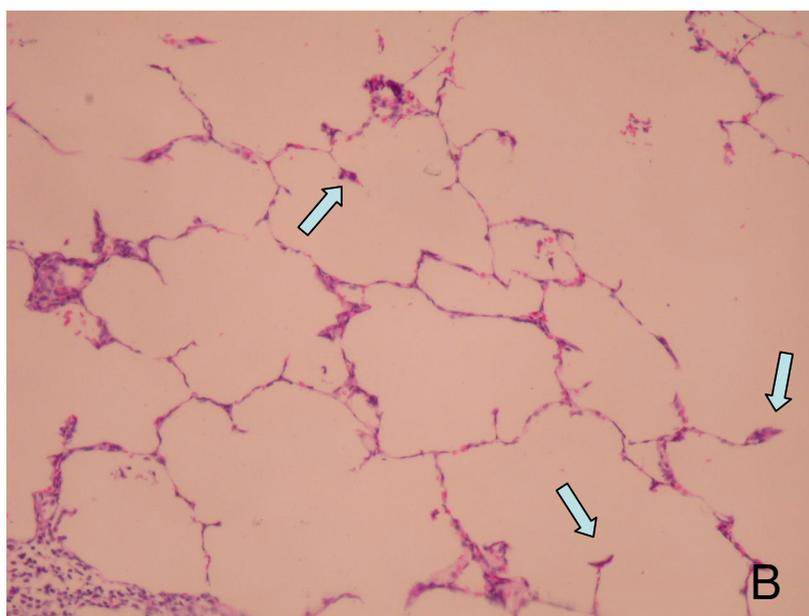
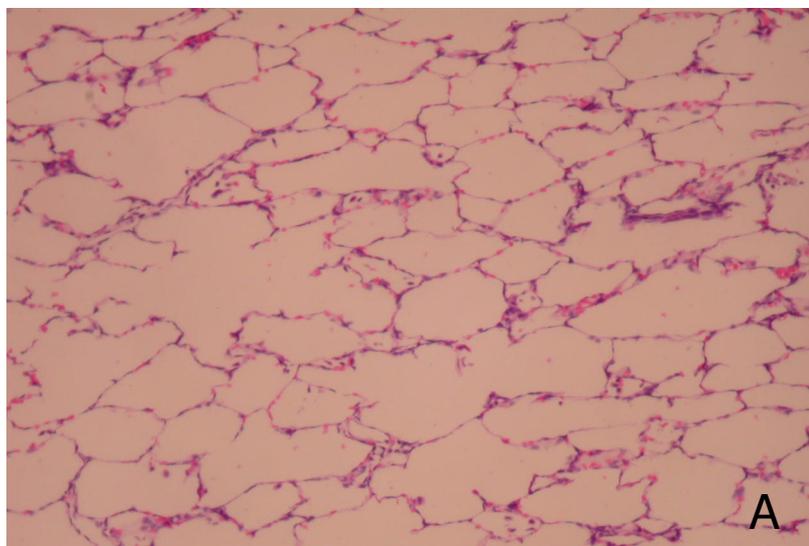
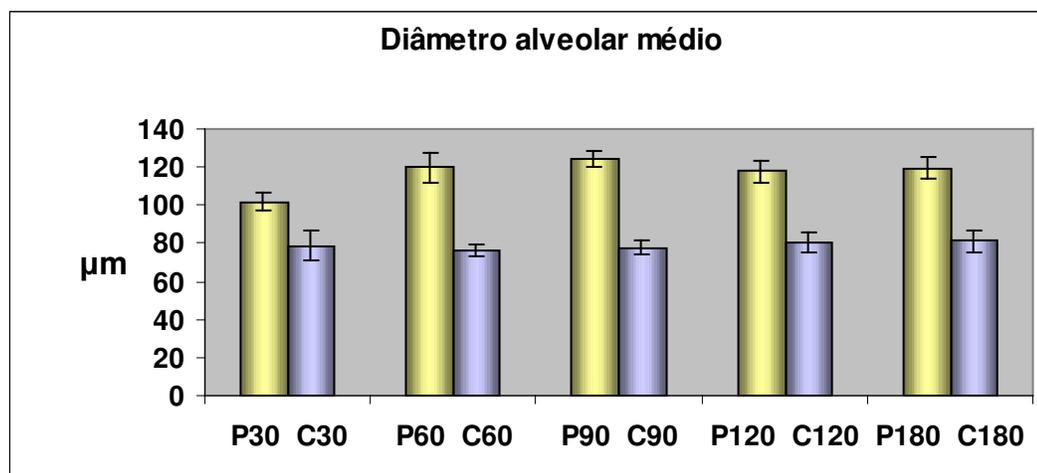


Fig. 11 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de ratos submetidos à instilação de solução fisiológica (A) ou papaína (B). Setas sinalizando a formação de “baquetas”. Coloração HE. Aumento de 100X.



**GRÁFICO 4 – Diâmetro alveolar médio (em  $\mu\text{m}$ ), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 4 – Média, valores mínimo e máximo do diâmetro alveolar médio (em  $\mu\text{m}$ ), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	101,71 $\pm$ 4,60	97,1	111,3
	Controle	5	78,78 $\pm$ 7,76	70,2	87,3
60	Papaína	10	119,81 $\pm$ 7,62	104,2	128,4
	Controle	5	76,08 $\pm$ 2,94	72,1	80,1
90	Papaína	10	124,02 $\pm$ 4,35	115,3	128,3
	Controle	5	77,78 $\pm$ 3,80	73,2	83,2
120	Papaína	10	117,80 $\pm$ 5,81	107,2	126,1
	Controle	5	80,88 $\pm$ 5,27	74,4	86,3
180	Papaína	10	119,62 $\pm$ 5,52	11,9	129,0
	Controle	5	81,26 $\pm$ 5,57	74,0	88,2

DP – desvio padrão



#### **4.4 Avaliação do Peso Corpóreo e de sua Relação com o Peso Cardíaco**

##### **4.4.1 Peso Corpóreo ao Sacrifício**

Os animais dos grupos P30 e C30 dias e dos grupos P120 e C120 apresentaram peso similar entre si no momento do sacrifício (Gráfico e Tabela 5). Nos demais tempos de sacrifício, 60, 90 e 180 dias após indução do enfisema, os grupos papáina e controle apresentaram peso corpóreo distinto, respectivamente,  $p=0,0002$ ,  $p=0,0011$  e  $p=0,0002$ .

No grupo papáina, os animais apresentaram peso estatisticamente diferente em todos os subgrupos:

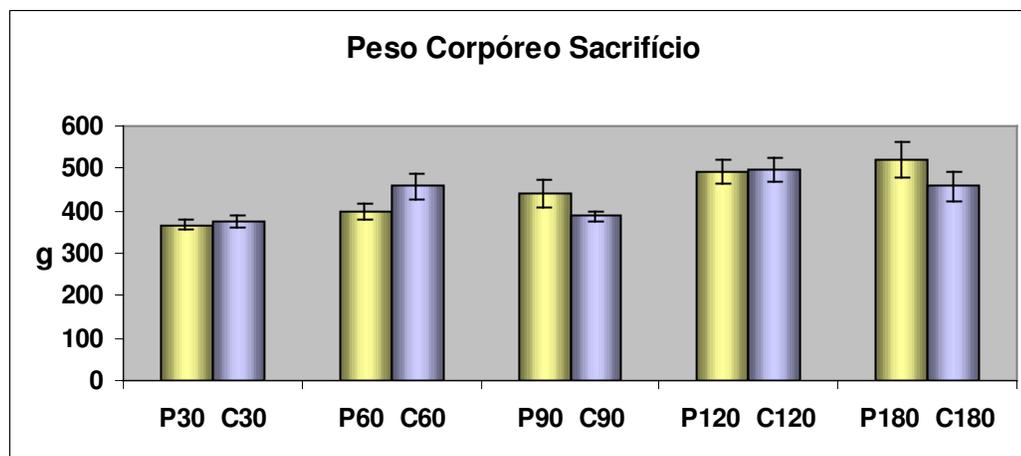
P30XP60	$p=0,0305$	P30XP90	$p=0,0001$	P30XP120	$p=0,0001$
P30XP180	$p=0,0001$	P60XP90	$p=0,0011$	P60XP120	$p=0,0001$
P60XP180	$p=0,0001$	P90XP120	$p=0,0001$	P90XP180	$p=0,0001$
P120XP180	$p=0,0383$				

No grupo controle, somente a comparação entre os subgrupos C30XC90 e C60XC180 não apresentou diferença significativa. Nas demais comparações realizadas entre os subgrupos houve diferença estatisticamente significativa:

C30XC60	$p=0,0001$	C30XC120	$p=0,0001$	C30XC180	$p=0,0001$
C60XC90	$p=0,0002$	C60XC120	$p=0,0266$	C90XC120	$p=0,0001$
C90XC180	$p=0,0001$	C120XC180	$p=0,0281$		



**GRÁFICO 5 – Peso corpóreo médio no momento do sacrifício (em gramas), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 5 – Média, valores mínimo e máximo de peso corpóreo no momento do sacrifício (em gramas), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	367,0 ± 12,24	348	378
	Controle	5	376,0 ± 15,17	362	396
60	Papaína	10	396,4 ± 18,92	374	430
	Controle	5	458,0 ± 31,37	412	496
90	Papaína	10	439,2 ± 32,83	410	500
	Controle	5	386,8 ± 12,52	375	404
120	Papaína	10	493,7 ± 28,59	453	535
	Controle	5	498,2 ± 27,60	465	531
180	Papaína	10	520,2 ± 40,45	474	592
	Controle	5	458,4 ± 34,68	424	512

DP – desvio padrão



#### 4.4.2 *Peso Cardíaco*

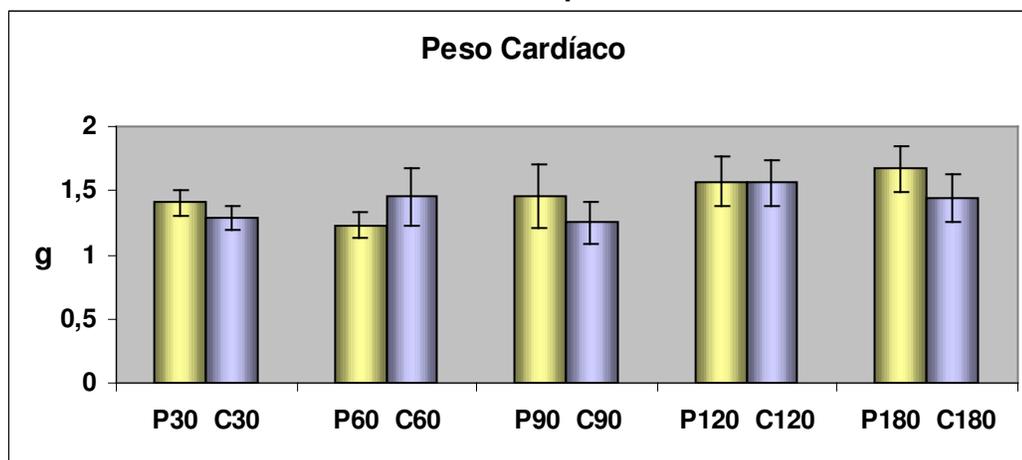
Os animais dos grupos P30 e C30 dias e dos grupos P120 e C120 apresentaram peso cardíaco similar entre si, respectivamente,  $p=0,2348$  e  $p=0,9521$ . Nos demais tempos de sacrifício, 60, 90 e 180 dias, os grupos papaína e controle apresentaram peso cardíaco distinto, respectivamente,  $p=0,0296$ ;  $p=0,0269$ ;  $p=0,0164$  (Gráfico e Tabela 6).

No grupo papaína, as comparações entre os subgrupos P30XP90, P30XP120, P90XP120 e P120XP180 não apresentaram diferença significativa. Nas demais comparações realizadas, observamos diferenças significativas, como segue:

P30XP60  $p=0,0349$     P30XP180  $p=0,0027$     P60XP90  $p=0,0046$   
P60XP120  $p=0,0001$     P60XP180  $p=0,0001$     P90XP180  $p=0,0098$

No grupo controle, em relação à avaliação do fator tempo, apenas os subgrupos C30XC120 e C90XC120 apresentaram diferença significativa,  $p=0,0186$  e  $p=0,0060$ , respectivamente.

**GRÁFICO 6 – Peso cardíaco médio (em gramas), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 6 - Média, valores mínimo e máximo do peso cardíaco (em gramas), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

<b>Dia</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>30</b>	<b>Papaína</b>	8	1,41 ± 0,10	1,31	1,63
	<b>Controle</b>	5	1,29 ± 0,09	1,15	1,39
<b>60</b>	<b>Papaína</b>	10	1,23 ± 0,10	1,10	1,38
	<b>Controle</b>	5	1,45 ± 0,23	1,29	1,83
<b>90</b>	<b>Papaína</b>	10	1,46 ± 0,25	1,17	1,98
	<b>Controle</b>	5	1,25 ± 0,16	1,01	1,40
<b>120</b>	<b>Papaína</b>	10	1,57 ± 0,19	1,28	1,89
	<b>Controle</b>	5	1,56 ± 0,18	1,30	1,79
<b>180</b>	<b>Papaína</b>	10	1,67 ± 0,18	1,41	1,95
	<b>Controle</b>	5	1,44 ± 0,19	1,18	1,62

*DP – desvio padrão*

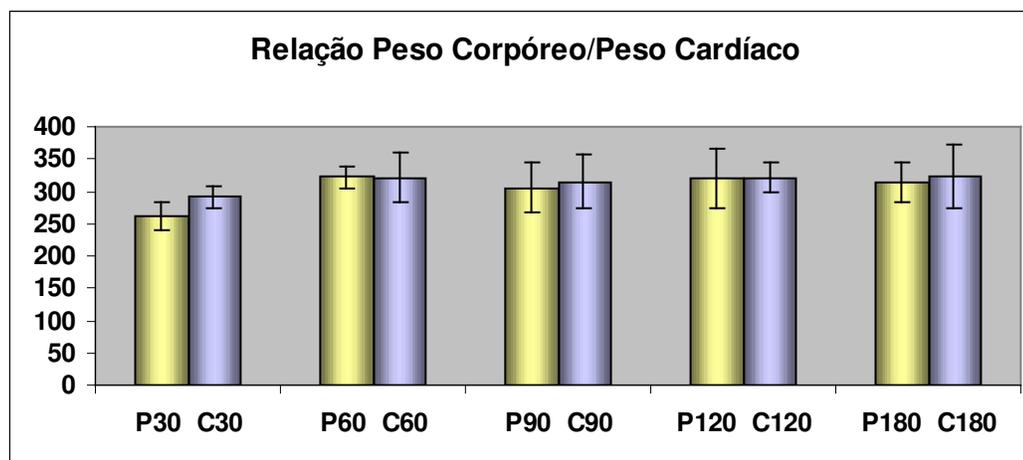
#### **4.4.3 Relação entre o Peso Corpóreo e o Peso Cardíaco**

A análise da relação entre o peso corpóreo e o peso cardíaco demonstra que os grupos papaína e controle apresentam um padrão similar, que se mantém nos diferentes períodos analisados, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,2394$ ) - Gráfico e Tabela 7.

Apenas os subgrupos P30 e C30 diferem significativamente dos demais, apresentando médias menores que os outros ( $p<0,05$ ).



**GRÁFICO 7 – Relação média entre o peso corpóreo no momento do sacrifício e o peso cardíaco, nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 7 - Média, valores mínimo e máximo da relação entre o peso corpóreo no momento do sacrifício e o peso cardíaco, nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	261,02 ± 22,41	215,00	282,72
	Controle	5	291,46 ± 17,30	273,16	315,66
60	Papaína	10	322,42 ± 16,72	298,92	346,64
	Controle	5	320,63 ± 38,43	271,59	366,15
90	Papaína	10	305,30 ± 38,92	247,54	352,62
	Controle	5	314,33 ± 41,13	278,73	381,22
120	Papaína	10	319,52 ± 45,86	240,21	388,72
	Controle	5	320,83 ± 22,92	297,41	357,50
180	Papaína	10	312,91 ± 30,34	278,08	370,11
	Controle	5	323,64 ± 48,82	279,78	399,15

DP – desvio padrão

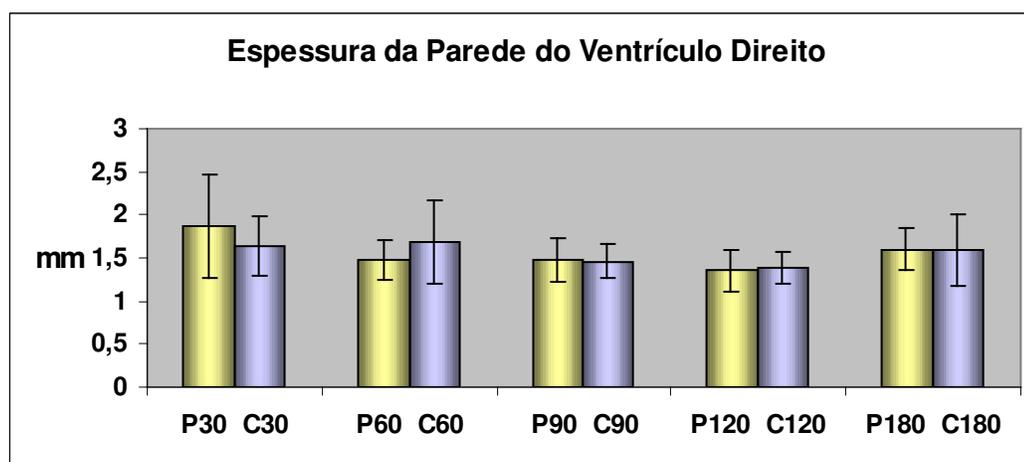


## 4.5 Avaliação Cardíaca: Análise Morfométrica dos Corações

### 4.5.1 Espessura da Parede do Ventrículo Direito

A espessura da parede livre do ventrículo direito foi similar entre os grupos controle e papaína ( $p=9735$ ) e nos diferentes momentos avaliados ( $p=0,0555$ ) - Gráfico e Tabela 8.

**GRÁFICO 8 – Espessura média da parede do ventrículo direito (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



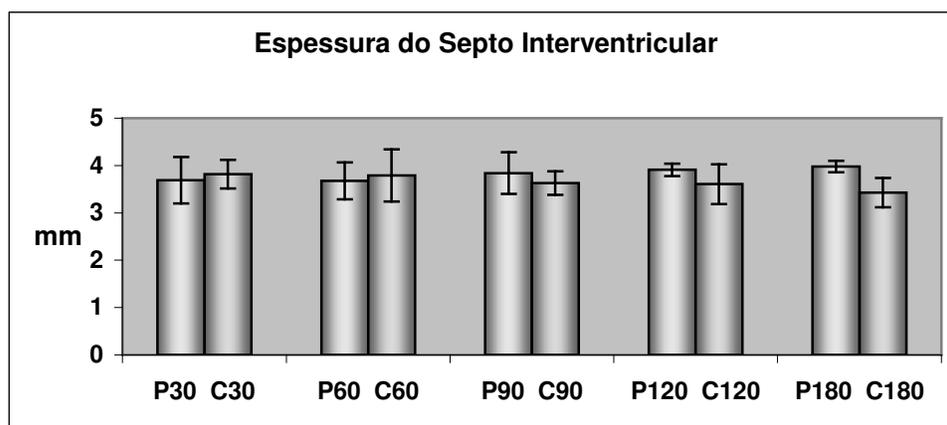
**TABELA 8 - Média, valores mínimo e máximo da espessura da parede do ventrículo direito (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	1,87 ± 0,60	1,38	3,23
	Controle	5	1,64 ± 0,34	1,27	2,13
60	Papaína	10	1,48 ± 0,23	1,10	1,81
	Controle	5	1,69 ± 0,48	1,36	2,47
90	Papaína	10	1,48 ± 0,26	1,09	1,92
	Controle	5	1,46 ± 0,20	1,14	1,70
120	Papaína	10	1,35 ± 0,24	0,85	1,70
	Controle	5	1,39 ± 0,19	1,16	1,66
180	Papaína	10	1,60 ± 0,24	1,22	1,90
	Controle	5	1,59 ± 0,42	1,18	2,19

DP – desvio padrão

#### 4.5.2 Espessura da Parede do Septo Interventricular

A espessura do septo interventricular foi similar entre os grupos controle e papaína ( $p=0,0737$ ) e nos diferentes momentos avaliados  $p=0,9944$  (Gráfico e Tabela 9). Observa-se uma tendência de aumento da espessura do septo interventricular nos corações do grupo papaína, a partir de 90 dias, embora sem diferença estatisticamente significativa.

**GRÁFICO 9 – Espessura média do septo interventricular (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

**TABELA 9 - Média, valores mínimo e máximo da espessura do septo interventricular (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	3,69 ± 0,49	3,07	4,33
	Controle	5	3,82 ± 0,30	3,62	4,34
60	Papaína	10	3,68 ± 0,39	3,33	4,47
	Controle	5	3,79 ± 0,55	3,24	4,54
90	Papaína	10	3,84 ± 0,44	3,13	4,46
	Controle	5	3,63 ± 0,25	3,26	3,95
120	Papaína	10	3,91 ± 0,13	3,77	4,20
	Controle	5	3,61 ± 0,42	3,26	4,29
180	Papaína	10	3,98 ± 0,12	3,76	4,21
	Controle	5	3,43 ± 0,31	2,93	3,76

DP – desvio padrão

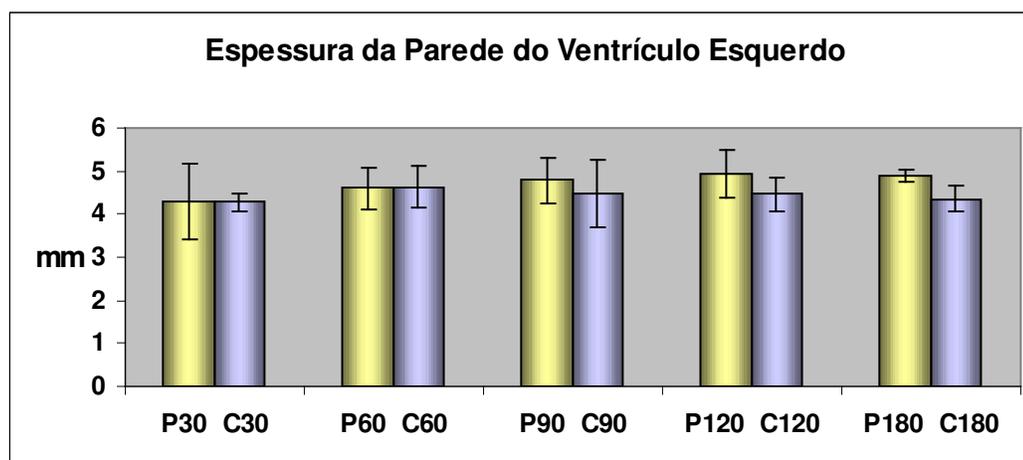
#### 4.5.3 Espessura da Parede do Ventrículo Esquerdo

A espessura da parede do ventrículo esquerdo mostrou aumento nos corações de ratos submetidos à instilação intratraqueal de papaína quando comparada ao grupo controle ( $p=0,0497$ ) - Gráfico e Tabela 10.

Da mesma forma que o septo interventricular, observa-se uma tendência de espessamento da parede livre do ventrículo no grupo papaína, a partir de 90 dias, embora sem diferença estatisticamente significativa.



**GRÁFICO 10 – Espessura média da parede do ventrículo esquerdo (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 10 - Média, valores mínimo e máximo da espessura da parede do ventrículo esquerdo (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média ± DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	4,29 ± 0,86	3,37	6,02
	Controle	5	4,28 ± 0,20	3,96	4,49
60	Papaína	10	4,61 ± 0,48	3,85	5,17
	Controle	5	4,63 ± 0,48	3,97	5,31
90	Papaína	10	4,78 ± 0,53	4,05	5,85
	Controle	5	4,47 ± 0,78	3,80	5,68
120	Papaína	10	4,93 ± 0,55	3,86	5,80
	Controle	5	4,46 ± 0,38	3,94	5,01
180	Papaína	10	4,88 ± 0,14	4,70	5,12
	Controle	5	4,36 ± 0,29	3,96	4,66

DP – desvio padrão



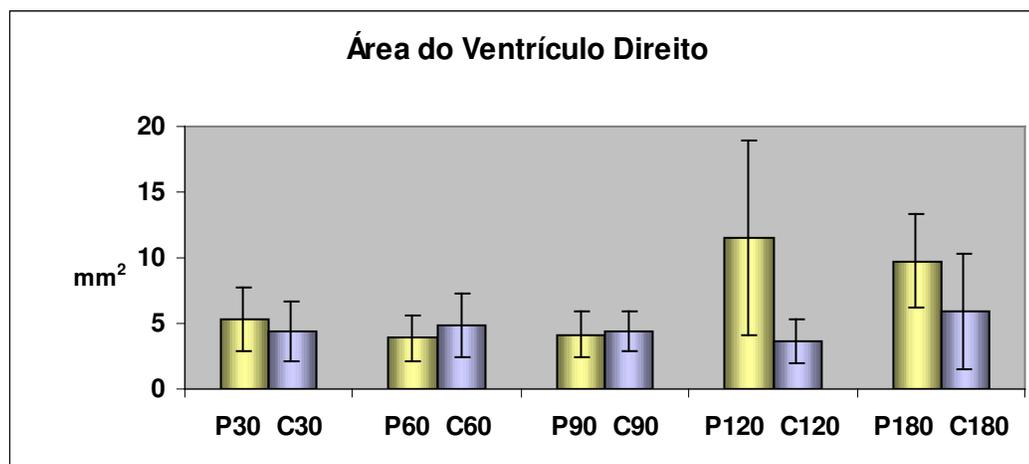
#### 4.5.4 Área da Cavidade Ventricular Direita

A área média da cavidade do ventrículo direito foi similar nos grupos controle e papaína nos diferentes momentos avaliados, exceto nos subgrupos P120 e P180 que apresentaram área média superior aos respectivos controles ( $p=0,001$ ) - Gráfico e Tabela 11.

No grupo papaína, os subgrupos P30, P60 e P90 apresentam área média sem diferença estatisticamente significativa, exibindo aumento da área ventricular direita nos subgrupos P120 e P180 ( $p=0,0001$ ), os quais não diferem entre si ( $p=0,6543$ ).

Enquanto que no grupo controle, apenas o subgrupo C180 difere de forma estatisticamente significativa dos demais.

**GRÁFICO 11 – Área média da cavidade ventricular direita (em  $\text{mm}^2$ ), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 11 - Média, valores mínimo e máximo da área da cavidade ventricular direita (em mm<sup>2</sup>), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

<b>Dia</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>30</b>	<b>Papaína</b>	8	5,31 ± 2,38	3,65	9,85
	<b>Controle</b>	5	4,43 ± 2,24	2,91	8,37
<b>60</b>	<b>Papaína</b>	10	3,89 ± 1,78	2,08	6,72
	<b>Controle</b>	5	4,91 ± 2,41	3,06	8,55
<b>90</b>	<b>Papaína</b>	10	4,10 ± 1,74	1,59	7,23
	<b>Controle</b>	5	4,39 ± 1,49	2,66	6,19
<b>120</b>	<b>Papaína</b>	10	11,54 ± 7,45	5,13	30,44
	<b>Controle</b>	5	3,67 ± 1,63	1,97	5,72
<b>180</b>	<b>Papaína</b>	10	9,77 ± 3,59	4,37	13,98
	<b>Controle</b>	5	5,94 ± 4,39	5,55	7,88

*DP – desvio padrão*

#### **4.5.5 Área da Cavidade Ventricular Esquerda**

Como pode ser observado no Gráfico e na Tabela 12, no grupo papaína a área média da cavidade do ventrículo esquerdo apresentou redução a partir de 90 dias, o mesmo não tendo sido observado no grupo controle:

P30XC30 p=0,8087 P60XC60 p=0,7955 P90XC90 p=0,0335

P120XC120 p<0,001 P180XC180 p<0,001

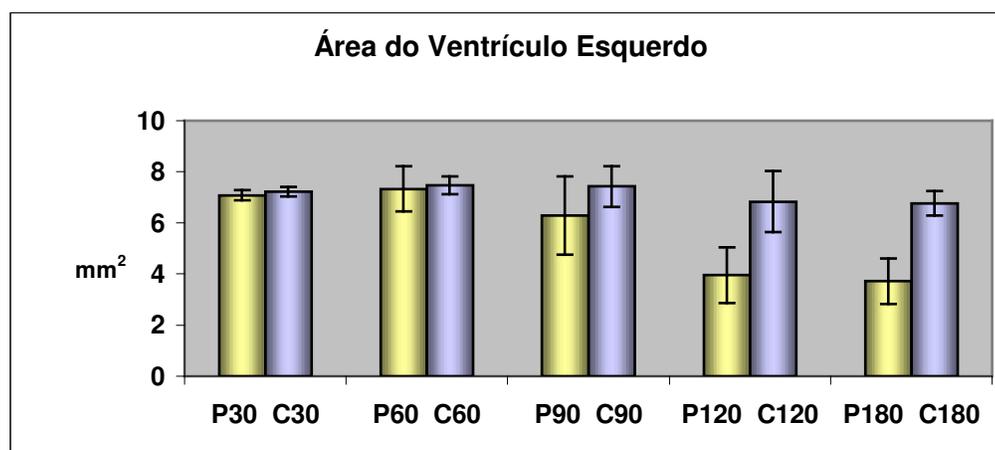
No grupo papaína, somente as comparações entre os subgrupos P30XP60, P30XP90 e P120XP180 não apresentaram diferença estatisticamente significativa, respectivamente, p=0,5821, p=0,0822 e



$p=0,5658$ . Nas demais comparações, as diferenças foram estatisticamente significativas com  $p=0,0166$  para P60XP90 e  $p=0,0001$  para as restantes.

No grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados.

**GRÁFICO 12 – Área média da cavidade ventricular esquerda (em  $\text{mm}^2$ ), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**



**TABELA 12 - Média, valores mínimo e máximo da área da cavidade ventricular esquerda (em  $\text{mm}^2$ ), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados**

Dia	Grupo	N	Média $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
30	Papaína	8	7,08 $\pm$ 0,20	6,78	7,40
	Controle	5	7,22 $\pm$ 0,18	6,98	7,44
60	Papaína	10	7,33 $\pm$ 0,88	5,42	8,68
	Controle	5	7,47 $\pm$ 0,36	6,95	7,89
90	Papaína	10	6,29 $\pm$ 1,54	4,07	8,51
	Controle	5	7,42 $\pm$ 0,80	6,58	8,73
120	Papaína	10	3,96 $\pm$ 1,09	2,11	5,50
	Controle	5	6,83 $\pm$ 1,19	5,25	8,44
180	Papaína	10	3,71 $\pm$ 0,89	2,53	5,60
	Controle	5	6,76 $\pm$ 0,48	6,15	7,19

DP – desvio padrão



Em alguns animais, a redução da cavidade ventricular esquerda foi muito importante (Figura 12).



Fig. 12 – Foto de coração de rato submetido à instilação intratraqueal de papaína (grupo P180), demonstrando importante hipertrofia da parede do ventrículo esquerdo e redução da luz da cavidade.



## ***DISCUSSÃO***



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 *Considerações Gerais*

A DPOC acomete cerca de 5% da população adulta brasileira e apresenta índice de mortalidade ascendente. A taxa de mortalidade por DPOC, nos Estados Unidos, aumentou aproximadamente 70% nos últimos 20 anos, enquanto que a mortalidade por doenças cardíacas e cerebrovasculares diminuiu 45 e 58%, respectivamente. Além disso, a DPOC leva a significativa incapacidade, perda de produtividade e piora da qualidade de vida, que se agravam substancialmente com a progressão da doença<sup>(10)</sup>.

As alterações fisiopatológicas associadas com o enfisema são a progressiva destruição do parênquima pulmonar e a redução da superfície para trocas gasosas, resultando em oxigenação inadequada. Considerando-se que os pulmões não possuem capacidade de crescimento ou regeneração, até o momento, o enfisema pulmonar é considerado progressivo e irreversível.

Diante do que foi exposto e dos custos advindos de tratamentos hospitalares prolongados, o impacto econômico, social e na saúde pública da doença é muito grande, motivando a realização de estudos em diversas áreas.

Neste contexto, modelos animais têm sido muito úteis não só para compreender a fisiopatologia da doença, como também para testar novas drogas e abordagens terapêuticas.



Modelo de indução de enfisema pulmonar, utilizando elastase pancreática porcina em camundongos, foi empregado para estabelecer o papel das células tronco na regeneração do parênquima pulmonar<sup>(64)</sup>. Outros trabalhos experimentais buscaram avaliar a ação do ácido retinóico na reparação alveolar<sup>(22,23)</sup>.

Para estudo das repercussões funcionais obtidas com a cirurgia redutora de volume pulmonar, vários grupos também lançaram mão de modelos experimentais para indução do enfisema<sup>(13,65,66)</sup>.

No nosso meio, Fló<sup>(67)</sup>, utilizando o mesmo modelo adotado neste estudo, conduziu experimentos objetivando avaliar o efeito da atividade física sobre o desenvolvimento do enfisema pulmonar.

A viabilidade da toracoscopia com infravermelho para auxiliar na identificação de áreas enfisematosas durante operações<sup>(68)</sup>, os efeitos da irradiação com Nd:YAG laser na morfometria e função pulmonar<sup>(69)</sup> e o papel de drogas antioxidantes como a N-acetilcisteína na atenuação das lesões enfisematosas<sup>(70)</sup>, também foram estudados em animais após indução química de enfisema pulmonar.

A investigação dos mecanismos de destruição do parênquima pulmonar *in vivo* pela administração de enzimas proteolíticas e outras substâncias, causando enfisema pulmonar e DPOC, tem sido uma das áreas mais intensas de pesquisa sobre doenças pulmonares nos últimos 40 anos<sup>(71)</sup>. Em suma, são inegáveis as possibilidades criadas pelos modelos que reproduzem as alterações morfofuncionais encontradas no enfisema pulmonar.



## **5.2 Análise do Material e Método**

### **5.2.1 Escolha do Rato como Animal de Experimentação**

Os ratos estão entre os animais mais utilizados na experimentação animal<sup>(18)</sup> e têm estado em destaque na literatura, nos últimos anos, pela possibilidade de manipulação genética<sup>(72)</sup>.

Nossa opção pelo emprego do rato foi motivada pelo reconhecimento de suas vantagens, como amplo conhecimento sobre sua fisiologia acumulado na realização de vários experimentos em nosso laboratório<sup>(13,73,74)</sup>, rápida procriação, manutenção fácil e barata, tamanho pequeno e possibilidade de instilação de vários de animais simultaneamente.

Além disso, é sabido que roedores e seres humanos apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas em suas árvores brônquicas, mas que exibem, com freqüência, respostas semelhantes quando expostos a uma substância que produza lesão pulmonar<sup>(67,75)</sup>. Os resultados de vários estudos mostram que as alterações na função pulmonar secundárias ao enfisema induzido experimentalmente podem ser demonstradas no rato<sup>(13,21)</sup>.

Com a realização de experimentos sucessivos, tem-se aprendido muito sobre a biologia do rato e, apesar das diferenças, há muitas similaridades, particularmente com respeito ao enfisema, o espaço aéreo do homem e do rato são bastante semelhantes. O camundongo, por exemplo, tem menos ramificações de vias aéreas e ausência de bronquíolos terminais<sup>(76)</sup>.



### **5.2.2 Escolha do Modelo de Indução de Enfisema com Papaína**

Considerando-se que a etiologia mais freqüente do enfisema pulmonar está relacionada ao tabagismo <sup>(7,8)</sup>, o modelo de exposição ao cigarro parece ser a alternativa mais atraente e real. Então, por que a escolha do modelo de indução do enfisema pulmonar por papaína?

Se por um lado o modelo de indução com cigarro teoricamente seria melhor, por outro o Dr. Wright (University of British Columbia, Canadá), em uma revisão apresentada durante a *First Siena International Conference on Animal Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* <sup>(21)</sup>, destacou que o tempo necessário para produzir lesões enfisematosas com este modelo é superior a 12 meses em algumas espécies. A cobaia talvez seja a espécie mais susceptível, desenvolvendo significativo aumento dos espaços aéreos em poucos meses de exposição ao cigarro <sup>(77)</sup>, enquanto que os ratos parecem ser mais resistentes, necessitando de mais tempo para apresentarem alterações similares <sup>(76)</sup>. Este é um detalhe muito importante quando se decide trabalhar com rato como no presente estudo, pois as alterações encontradas podem ser atribuídas à senilidade, representando um viés. O envelhecimento do pulmão humano está associado a alterações em suas propriedades elásticas, demonstradas mais comumente como diminuição da capacidade de recolhimento elástico <sup>(78)</sup>.

Além disso, o Dr. Wright <sup>(21)</sup> ponderou que a DPOC desenvolve-se em 15-20% dos fumantes e que incidência similar observa-se nestes modelos.



No mesmo evento<sup>(21)</sup>, o Dr. Martorana (Siena University, Itália) afirmou que é possível desenvolver o enfisema pulmonar espontaneamente em ratos transgênicos, mas que a progressão é lenta, levando cerca de 8 a 12 meses. Lembrou, também, que o processo poderia ser acelerado pela exposição à fumaça do cigarro ou a outras substâncias irritantes.

Optamos pelo modelo de papaína por ser relativamente simples, por ser capaz de reproduz muitos aspectos da doença e por satisfazer critérios morfológicos do enfisema pulmonar, como aumento dos espaços aéreos e ruptura de septos alveolares. A papaína é reconhecida por apresentar uma potente atividade elastolítica, degradando não apenas a elastina como também o colágeno dos tecidos<sup>(71)</sup>. Nossos resultados mostraram significativo aumento do diâmetro alveolar médio nos animais submetidos à administração de papaína. A utilização do modelo em investigações prévias em nosso laboratório<sup>(13,28)</sup> também foi um dos fatores preponderantes na escolha, não só pela experiência acumulada, mas por possibilitar comparações entre os diferentes estudos. Além disso, o estabelecimento do enfisema cerca de um mês após a instilação, como observado no nosso estudo, é fundamental para um projeto que pretende acompanhar os animais por vários meses.

É evidente que a indução do enfisema pulmonar por exposição ao cigarro pode causar uma variedade de outras anormalidades não observadas neste modelo.

Cloreto de cádmio é um agente químico extensivamente utilizado para produzir aumento do espaço aéreo, entretanto, este parece ser secundário à



fibrose com subsequente junção e alargamento. Agentes irritativos, como poluentes, oxidantes (dióxido de nitrogênio) e ozônio, causam alterações nas vias aéreas dentre elas lesões de células epiteliais e perda de cílios, mas em geral o enfisema é pouco significativo <sup>(76)</sup>.

Em resumo, todos os modelos têm contribuído para o conhecimento da lesão pulmonar, apresentando vantagens e limitações. Entretanto, segundo Shapiro <sup>(72)</sup>, nenhum deles tem reproduzido a exposição ao cigarro como um modelo autêntico de DPOC.

Outro questionamento que cabe diz respeito à administração única da papaína. Seria mais fisiológico induzir o enfisema com instilações seriadas, já que, no enfisema pulmonar humano, a lesão instala-se aos poucos, cronicamente. Em geral, o indivíduo é submetido a repetidas agressões e/ou exposições, como no enfisema ocasionado pelo tabagismo.

A maioria dos trabalhos <sup>(13,47,63,67)</sup> reporta uma única instilação, mas há alguns <sup>(38,79,80)</sup> em que são realizadas instilações seriadas, com menores doses de papaína. Considerando-se que as alterações histológicas reportadas nos diferentes estudos são compatíveis com enfisema pulmonar humano, adotamos a instilação única, evitando assim nova manipulação do animal, com procedimentos como anestesia e intubação e desconfortos decorrentes para o animal.



### **5.3 Análise dos Resultados Obtidos**

#### **5.3.1 Avaliação Sangüínea: Gasometria do Sangue Arterial**

A gasometria arterial, colhida em repouso e em ar ambiente, é o exame recomendado para determinação e quantificação das repercussões da DPOC sobre as trocas gasosas<sup>(10)</sup>. A PaO<sub>2</sub> avalia o grau de hipoxemia, enquanto a PaCO<sub>2</sub>, o nível de ventilação alveolar.

Embora alguns estudos tenham comprovado a presença de hipoxemia arterial em animais portadores de enfisema produzido experimentalmente<sup>(80,82)</sup>, em nosso estudo não encontramos alterações importantes nos valores hemogasométricos, demonstrando que, a despeito da destruição observada no tecido alveolar, não houve repercussão na função de trocas gasosas.

Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos que também não encontraram alterações hemogasométricas em animais pós-indução de enfisema pulmonar. Martorana et al.<sup>(38)</sup>, na análise gasométrica do sangue arterial de cães, 3 e 6 meses após indução enfisema com papaína, obtiveram PaO<sub>2</sub> e PaCO<sub>2</sub> dentro dos limites normais. Pushpakom et al.<sup>(39)</sup>, em estudo realizado também em cães, não encontraram alterações estatisticamente significativas nos parâmetros hemogasométricos.

Segundo Martorana et al.<sup>(38)</sup>, é possível que no cão e no rato, assim como no homem, existam mecanismos bem desenvolvidos para ventilação colateral<sup>(83,84)</sup>, o que poderia evitar alterações significativas nas trocas



gasosas sangüíneas até que a lesão torne-se de extrema gravidade. Além disso, em determinadas situações pode ocorrer desproporção da gasometria arterial com a função pulmonar<sup>(10)</sup>.

Possivelmente, estas discrepâncias possam ser atribuídas aos diferentes protocolos de administração da papaína e ao grau de enfisema resultante.

### ***5.3.2 Avaliação Pulmonar: Análise Histopatológica e Morfométrica para Determinação do Enfisema Pulmonar***

A avaliação histopatológica dos pulmões demonstrou destruição alveolar difusa, caracterizando um enfisema do tipo panacinar, padrão também encontrado por outros investigadores<sup>(13,38,67)</sup>.

O cálculo do diâmetro alveolar médio empregado neste estudo é um método classicamente utilizado para quantificação do enfisema pulmonar. É sabido que, em ratos saudáveis, sem doenças pulmonares, o diâmetro alveolar médio é ao redor de  $70\mu\text{m}$ <sup>(60)</sup>.

No presente estudo, os animais do grupo papaína apresentaram diâmetro alveolar médio entre  $101,71\mu\text{m}$  e  $124,02\mu\text{m}$ , enquanto que no grupo controle este variou entre  $77,78$  e  $81,26\mu\text{m}$ . Em estudo realizado previamente em nosso laboratório, este diâmetro médio oscilou entre  $100$  e  $149\mu\text{m}$  em ratos expostos à ação da papaína<sup>(13,28)</sup>. Outros autores também encontraram valores similares aos nossos achados<sup>(47,63)</sup>. Estes dados demonstram que, nos pulmões de animais submetidos à ação da papaína,



houve importante aumento dos espaços alveolares conseqüente à ruptura de septos interalveolares. Nos animais do grupo submetido à instilação de solução fisiológica, as estruturas alveolares estavam preservadas.

A análise do diâmetro alveolar em nosso material mostra que o subgrupo P30 apresenta um diâmetro alveolar médio inferior aos demais subgrupos expostos à ação da papaína, que não diferem entre si. A destruição do parênquima pulmonar tem início com a agressão provocada pela papaína, progredindo até estabilizar-se no período entre 30 e 60 dias, quando se observa significativa redução da superfície alveolar interna. Estes dados corroboram a afirmação de Fusco <sup>(13)</sup> de que o enfisema estabiliza-se ao redor de 40 dias. Um padrão similar foi observado em hamsters após instilação de papaína ou elastase pancreática, verificando-se significativa progressão do enfisema entre 1 e 2 meses após a exposição, seguida de estabilização da lesão histológica <sup>(91,92)</sup>.

Outros autores afirmam que a lesão estabiliza-se ao redor do terceiro mês após a exposição inicial à papaína <sup>(47,63)</sup>. Martorana et al. <sup>(38)</sup> observaram que as alterações da arquitetura pulmonar observadas após a administração de papaína são progressivas por um período de algumas semanas e depois se estabilizam, não tendo sido observadas diferenças entre os cães analisados aos 3 e 6 meses após a indução do enfisema.

Em trabalho realizado por Johanson et al. <sup>(81)</sup>, os ratos foram submetidos à administração única de papaína e sacrificados em diferentes períodos que variaram de horas até 3 meses após a exposição. Observaram com estes experimentos que a maior expressão das alterações (hemorragia



alveolar, infiltrado de polimorfonucleares, inflamação, dilatação dos espaços aéreos centrilobulares) foi observada entre 2 e 4 semanas, não havendo regressão ou progressão das lesões.

A comparação entre os diferentes estudos deve ser feita de forma cautelosa, pois há variações quanto à espécie animal estudada, bem como quanto à dose de papaína administrada.

### **5.3.3 Avaliação Peso Corpóreo e de sua Relação com o Peso Cardíaco**

Perda de peso e desnutrição são situações muito freqüentes em pacientes com enfisema pulmonar<sup>(85)</sup>, influenciando no prognóstico destes, pela diminuição da força dos músculos respiratórios, alteração na capacidade ventilatória e influenciando negativamente a resposta imune, necessária para a defesa contra as infecções<sup>(44)</sup>. Apesar disto, há poucos estudos *post mortem* correlacionando peso corpóreo e grau de enfisema.

Alguns autores afirmam que o peso corpóreo é inversamente proporcional à severidade do enfisema, sendo, portanto, um indicador indireto da condição física do indivíduo frente à doença<sup>(44)</sup>.

O exato mecanismo da perda de peso em pacientes portadores de enfisema pulmonar não é conhecido<sup>(86)</sup>. Várias hipóteses têm sido formuladas, incluindo inflamação crônica, perda da força muscular associada com a idade, inatividade e administração de esteróides<sup>(85,87)</sup>. Uma das hipóteses mais aceita refere-se ao consumo elevado de oxigênio na respiração, tal condição poderia ser sustentada pela hiperinsuflação e perda na capacidade recolhimento elástico pulmonar, causando uma relação



comprimento-tensão desfavorável aos músculos respiratórios e conseqüente aumento no gasto energético <sup>(88)</sup>. Os dados disponíveis sugerem que a etiologia seja multifatorial, incluindo hipermetabolismo, presença de mediadores inflamatórios e alterações produzidas pela exacerbação da doença <sup>(10)</sup>.

Em nossos animais não observamos perda de peso significativa que nos permitisse inferir a debilidade do animal frente à destruição alveolar provocada pela instilação de papaína. A relação peso corpóreo do animal e peso cardíaco também não mostrou alterações importantes. Fló <sup>(67)</sup> também não observou redução no peso de animais submetidos à instilação de papaína, relatando um aumento de peso significativo ao longo de nove semanas, sem diferença entre os ratos submetidos à administração de papaína e os do grupo controle. Outros autores <sup>(89,90)</sup> observaram perda de peso inicial em ratos após a administração de papaína, com recuperação destes animais igualando-se ao grupo controle após alguns dias.

### **5.3.3 Avaliação Cardíaca: Análise Morfométrica dos Corações**

Uma das complicações mais freqüentemente reportadas em pacientes portadores de DPOC é o *cor pulmonale*, caracterizado por dilatação e hipertrofia do ventrículo direito, e potencialmente insuficiência secundária à hipertensão primária <sup>(93)</sup>. Estudos de necropsia revelam que o *cor pulmonale* está presente em 34% dos indivíduos portadores de bronquite crônica e enfisema pulmonar <sup>(94)</sup>.



Embora o *cor pulmonale* seja freqüentemente observado nos pacientes, não encontramos em nossos animais sinais de sua presença, como inicialmente esperado. Fló <sup>(67)</sup>, empregando modelo similar ao nosso, afirma que não foram observadas alterações no volume do coração dos animais submetidos à instilação de papaína por um período de até nove semanas. Entretanto, os primeiros sinais de hipertrofia ventricular direita parecem já estar presentes três meses após a indução do enfisema, com evidente hipertrofia aos seis meses<sup>(47)</sup>.

Vários mecanismos têm sido considerados como fatores na patogênese do *cor pulmonale* no enfisema pulmonar, incluindo hipóxia, redução do leito vascular pulmonar e aumento da pressão arterial pulmonar, aumento da viscosidade do sangue causada por policitemia secundária à hipóxia, entre outros <sup>(95)</sup>.

No estudo realizado por Icochea et al.<sup>(95)</sup>, a hipóxia foi identificada como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de *cor pulmonale*, em hamsters portadores de enfisema pulmonar induzido experimentalmente, já que a oxigenoterapia produziu melhora na função ventricular direita. A hipertrofia do ventrículo direito pode ser considerada como um indicativo de hipertensão pulmonar, a qual por sua vez está relacionada ao grau de hipóxia alveolar<sup>(48)</sup>. A hipóxia alveolar é um potente constritor dos vasos pulmonares e há uma relação inversamente proporcional entre a pressão arterial pulmonar e a PaO<sub>2</sub> em pacientes com *cor pulmonale* <sup>(80)</sup>.

Talvez a ausência de alterações hemogasométricas importantes, visto ser a vasoconstrição hipóxica um dos determinantes da hipertensão



pulmonar, possa explicar porque não observamos alterações no ventrículo direito nos animais do presente estudo.

Outro aspecto a ser considerado é que o grau de destruição alveolar provocada no protocolo de indução de enfisema pulmonar por nós empregado possa não ter sido suficiente para reprodução das condições morfofisiológicas necessárias para o desenvolvimento do *cor pulmonale*. Entretanto, alguns autores afirmam que não há relação entre a presença de hipertrofia ventricular direita e a porcentagem de pulmão destruído pelo enfisema <sup>(45,48,56)</sup>.

Além disso, é possível que o *cor pulmonale* desenvolva-se mais tardiamente, necessitando de um período maior de observação.

Em resumo, o *cor pulmonale* é uma condição que envolve muito mais que a destruição alveolar.

Observamos em nosso estudo aumento da área da cavidade do ventrículo direito, a partir de 120 dias após a instilação de papaína, associado à hipertrofia do ventrículo esquerdo. A dilatação do ventrículo direito representa uma resposta desta câmara à sobrecarga de volume conseqüente à hipertrofia ventricular esquerda.

Vários autores afirmam que a presença de hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com enfisema pulmonar é um assunto controverso<sup>(93)</sup> e muitos atribuem-na à hipertensão arterial sistêmica<sup>(48,55)</sup>, algumas vezes não detectada clinicamente. Assim, uma hipótese que aventamos para explicar presença de hipertrofia do ventrículo esquerdo nos nossos animais foi a possibilidade da papaína induzir hipertensão arterial



sistêmica, já que a hipertrofia geralmente está associada à sobrecarga de pressórica. Não encontramos na literatura nenhum trabalho que associasse a droga à hipertensão arterial sistêmica.

Segundo Ishikawa et al. <sup>(56)</sup>, um dos problemas mais embaraçosos encarado pelos clínicos e patologistas é a suposta existência de hipertrofia biventricular na doença pulmonar obstrutiva.

Murphy et al. <sup>(54)</sup> afirmam que a incidência de hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com enfisema pulmonar oscila nas diferentes publicações, acometendo entre 24 e 86% dos pacientes. Embora alguns estudos de necropsia <sup>(52,55)</sup> tenham reportado hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com DPOC, trabalhos realizados com métodos não-invasivos e cateterização demonstraram dimensões e função normais nestes pacientes <sup>(96-98)</sup>. Por outro lado, Jardim et al. <sup>(99)</sup> reportam hipertrofia de ventrículo esquerdo em 10 pacientes portadores de DPOC.

Hipertrofia ventricular esquerda isolada, sem associação com hipertrofia direita, também foi encontrada em alguns casos de necropsia <sup>(55)</sup>.

Fatores químicos, como diminuição da PaO<sub>2</sub>, aumento do dióxido de carbono e na concentração de íon hidrogênio, têm sido considerados como desencadeadores da hipertrofia do ventrículo esquerdo <sup>(55,57)</sup>. Nossos achados não corroboram estas afirmações, pois observamos hipertrofia ventricular esquerda sem alterações hemogasométricas significativas. Sutinen et al. <sup>(44)</sup>, em estudo de necropsia, encontraram hipertrofia de ventrículo esquerdo em muitos pacientes com enfisema pulmonar, entretanto sem associação estatística.



Por fim, concordamos com os autores que afirmam que a associação entre enfisema pulmonar e hipertrofia ventricular esquerda é uma questão não resolvida<sup>(55)</sup>, com causas obscuras<sup>(54)</sup>, merecendo, portanto, investigações mais aprofundadas.

#### **5.4 Perspectivas Futuras**

Este estudo representa mais um passo de nossa equipe na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da pneumopatias avançadas.

Consideramos que a próxima etapa é a avaliação histopatológica do coração para identificar se as alterações encontradas no ventrículo esquerdo devem-se à hipertrofia dos miócitos ou à proliferação das células do tecido conjuntivo.

Em estudos futuros, acreditamos que se faz necessário o acompanhamento destes animais com métodos de avaliação *in vivo* como o ecocardiograma, bem como, monitoração da pressão arterial e sistêmica e pulmonar. Há, ainda, a possibilidade de utilização de soluções com diferentes concentrações de papaína, promovendo graus distintos de enfisema para avaliações comparativas.



## **CONCLUSÕES**



## 6 CONCLUSÕES

Diante do que foi exposto, concluímos que:

*Em relação ao modelo empregado para indução do enfisema pulmonar:*

- Este foi eficiente, produzindo destruição do tecido alveolar e mimetizando alterações morfológicas encontradas no enfisema pulmonar, que se estabelecem até 60 dias após a agressão inicial sem progressão.
- Apesar da destruição do tecido pulmonar, não houve repercussão importante na função de trocas gasosas.
- A presença de enfisema pulmonar não interferiu na relação entre a massa corpórea e a massa cardíaca.

*Em relação às alterações cardíacas:*

- A parede livre do ventrículo direito e o septo interventricular não apresentaram alterações morfológicas significativas, no período de até 6 meses após a instilação intratraqueal de papaína.
- O ventrículo direito apresenta sinais de dilatação a partir de 120 dias após a indução do enfisema pulmonar, possivelmente secundária à hipertrofia ventricular esquerda.
- O ventrículo esquerdo apresentou significativa redução da área de sua cavidade, 90 dias após a indução do enfisema pulmonar, acompanhada de discreto espessamento de sua parede.



## ***REFERÊNCIAS***



## 7 REFERÊNCIAS

1. MacIntyre NR. Chronic obstructive pulmonary disease: emerging medical therapies. *Respir Care* 2004;49(1):64-71.
2. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Rev Med* 2003;54:113-29.
3. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease: experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax* 2002;57(10):908-14.
4. Datasus. Ministério da Saúde, Brasil. 2004. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>
5. American Lung Association. Estados Unidos da América, 2004. Disponível em: <http://www.lungusa.org>
6. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI / WHO Global Initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1256-76.
7. Tudor RM, McGrath S, Neptune E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? *Pulm Pharmacol Ther* 2003;16(2):67-78.
8. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. New York: W.B. Saunders Company, 1999.



9. Blundell R, Harrison DJ, Wallace WAH. Emphysema: the challenge of the remodelled lung. *J Pathol* 2004; 202(2):141-4.
10. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Oliveira JCA, Jardim JRB, Rufino R, org. I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *J Pneumol* 2000;26(supl 1):S1-52.
11. Pena VS, Miravittles M, Gabriel R, Jimenez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF et al. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest* 2000;118(4):981-9.
12. Senior RM, Kuhn C. The pathogenesis of emphysema. In: Fishman AP, editor. *Pulmonary diseases and disorders*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1998. p.1209-18.
13. Fusco LB. Estudo morfométrico e da mecânica ventilatória em ratos portadores de enfisema experimental provocado por papaína submetidos ou não à redução de volume pulmonar [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;1999.
14. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bengali Z. The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(1):182-5.



15. Saetta M, Ghezzi H, Kim WD, King M, Angus GE, Wang NS et al. Loss of alveolar attachments in smokers: a morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(4):894-900.
16. Goldberg M. Emphysema and bullous disease. In: Person FG, editor. *Thoracic surgery*. New York:Churchill Livingstone;1995. p.561-80.
17. Maitra A, Kumar V. The lung and the upper respiratory tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editors. *Robbins Basic Pathology*. 7th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier Science;2002. p.453-508.
18. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19(1):59-65.
19. Salén JCW. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kesel ML, editors. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. 3rd ed. Boston: CRC Press;1995.
20. Calabrese EJ. *Principles of animal extrapolation*. Michigan: Lewis Publishers;1991.
21. Hele D. First Siena International Conference on Animal Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy, September 30-October 2, 2001. *Respir Res* 2002;3(1):12-4.
22. Massaro GD, Massaro D. Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(5):L955-60.



23. McGowan SE. Contributions of retinoids to the generation and repair of the pulmonary alveolus. *Chest* 2002;121(5supl) 206S-8.
24. Gross P, Babyak MA, Tolker E, Kaschak M. Enzymatically produced pulmonary emphysema: a preliminary report. *J Gnatol* 1964;36:481-4.
25. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986;133(1):149-69.
26. Hayes JA, Korthy A, Snider GL. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamster. *J Pathol* 1975;117(1):1-14.
27. Yamato H, Sun JP, Churg A, Wright JL. Cigarette smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with diffusely decreased capillary density and capillary narrowing. *Lab Invest* 1996;75(2):211-9.
28. Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol* 2002;28(1):1-7.
29. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman Jr HA et al. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 2000;192(2):1587-600.
30. Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE, Fabbri LM. Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system: insights from experimental animal research. *Eur Respir J* 1995;8(8):1357-71.



31. Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD et al. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke: the effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26(1):52-7.
32. Snider GL, Lucey EC, Faris B, Jung-Legg Y, Stone PJ, Franzblau C. Cadmium-chloride-induced air-space enlargement with interstitial pulmonary fibrosis is not associated with destruction of lung elastin: implications for the pathogenesis of human emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(4):918-23.
33. McGowan S, Jackson SK, Jenkins-Moore M, Dai HH, Chambon P, Snyder JM. Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(2):162-7.
34. Wendel DP, Taylor DG, Albertine KH, Keating MT, Li DY. Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(3):320-6.
35. Janoff A. Elastases and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(2):417-33.
36. Weinbaum G, Marco V, Ikeda T, Mass B, Meranze DR, Kimbel P. Enzymatic production of experimental emphysema in the dog: route of exposure. *Am Rev Respir Dis* 1974;109(3):351-7.
37. Haddad AG, Pimmel RL, Scaperoth DD, Bromberg PA. Forced oscillatory respiratory parameters following papain exposure in dogs. *J Appl Physiol* 1979;46(1):61-6.



38. Martorana PA, Wusten B, van Even P, Gobel H, Schaper J. A six-month study of the evolution of papain-induced emphysema in the dog. *Am Rev Respir Dis* 1982;126(5):898-903.
39. Pushpakom R, Hogg JC, Woolcock AJ, Angus AE, Macklem PT, Thurlbeck WM. Experimental papain-induced emphysema in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1970;102(5):778-89.
40. Takaro T, White SM. Unilateral severe experimental pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1973;108(2):334-42.
41. Ruel M, Deslauriers J, Maltais F. The diaphragm in emphysema. *Chest Surg Clin N Am* 1998;8(2):381-99.
42. Lewis MI, Zhan WZ, Sieck GC. Adaptations of the diaphragm in emphysema. *J Appl Physiol* 1992;72(3):934-43.
43. Kelsen SG, Supinski GS, Oliven A. Diaphragm structure and function in elastase-induced emphysema. *Chest* 1984;85(6 suppl):55S-8.
44. Sutinen S, Paakko P, Tienari J. Weights of the body and cardiac ventricles in pulmonary emphysema. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1985;407(3):249-57.
45. Hicken P, Heath D, Brewer D. The relation between the weight of the right ventricle and the percentage of abnormal air space in the lung in emphysema. *J Pathol Bacteriol* 1966;92(2):519-28.
46. Hicken P, Brewer D, Heath D. The relation between the weight of the right ventricle of the heart and the internal surface area and number of



- alveoli in the human lung in emphysema. *J Pathol Bacteriol* 1966;92(2):529-46.
47. Sulkowska M, Musiatowicz B, Sulkowski S, Zimnoch L, Ejsmont-Pietrow G, Sulik M et al. Cor pulmonale in experimental lung emphysema. I-The morphometric evaluation of pulmonary and myocardium changes. *Rocz Akad Med Bialymst* 1995;40(2):335-43.
48. Edwards C, Heath D, Harris P. The carotid body in emphysema and left ventricular hypertrophy. *J Pathol* 1971;104(1):1-13.
49. Herget J, Brown CA, Kutilek S, Barer GR, Palecek F. Enlargement of carotid bodies in rats with lung emphysema or silicosis. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1982;18(1):75-9.
50. Hasleton PS. Right ventricular hypertrophy in emphysema. *J Pathol* 1973;110(1):27-36.
51. Mitchell RS, Stanford RE, Silvers GW, Dart G. The right ventricle in chronic airway obstruction: a clinicopathologic study. *Am Rev Respir Dis* 1976;114(1):147-54.
52. Edwards CW. Left ventricular hypertrophy in emphysema. *Thorax* 1974;29(1):75-80.
53. Foraker AG, Bedrossian CW, Anderson Jr. AE. Myocardial dimensions and proportions in pulmonary emphysema. *Arch Pathol* 1970;90(4):344-7.



- 
54. Murphy ML, Adamson J, Hutcheson F. Left ventricular hypertrophy in patients with chronic bronchitis and emphysema. *Ann Intern Med* 1974;81(3):307-13.
55. Michelson N. Bilateral ventricular hypertrophy due to pulmonary disease. *Dis Chest* 1960;38:435-46.
56. Ishikawa S, Fattal GA, Popiewicz J, Wyatt JP. Functional morphometry of myocardial fibers in cor pulmonale. *Am Rev Respir Dis* 1972;105(3):358-67.
57. Kohama A, Tanouchi J, Hori M, Kitabatake A, Kamada T. Pathologic involvement of the left ventricle in chronic cor pulmonale. *Chest* 1990;98(4):794-800.
58. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory animal resources. National Research Council of the National Academy of Sciences. Washington, D.C. National Academy Press; 1996. p.1-35.
59. Normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais. Lei da República Federativa do Brasil nº 6638, artigos 1-8 (8 de maio de 1979). Disponível em URL: [http:// www.meusite.com.br/COBEA](http://www.meusite.com.br/COBEA).
60. Bivin WS, Crawford MP, Brewer NR. Morphophysiology. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editors. *The laboratory rat. I- Biology and diseases*. Bridgewater: American College of Laboratory Animal Medicine Series; 1979. p.74-103.
61. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and others organs. *Lab Invest* 1963;12:131-55.



62. Horsky P, Saunier C, Hartemann D. Papain-induced emphysema: the influence of preliminary oxygenation. *Respiration* 1984;45(1):16-21.
63. Sulkowski S, Musiatowicz B, Sulkowska M, Sobaniec-Lotowska M, Dzieciol J, Sulik M et al. Changes of myocardial capillary density in progression of experimental lung emphysema. *Exp Toxicol Pathol* 1996;48(1):19-28.
64. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Letters* 2004;556:249-52.
65. Chen JC, Serna DL, Brenner M, Powell LL, Huh J, McKenna Jr. R et al. Diffusing capacity limitations of the extent of lung volume reduction surgery in an animal model of emphysema. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117(4):728-35.
66. Shrager JB, Kim DK, Hashmi YJ, Lankford EB, Wahl P, Stedman HH et al. Lung volume reduction surgery restores the normal diaphragmatic length-tension relationship in emphysematous rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121(2):217-24.
67. Fló CM. Efeito da atividade física sobre a evolução do enfisema pulmonar: um estudo experimental em ratos [tese de doutorado]. São Paulo:Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2003.
68. Gotoh M, Okamoto T, Yamamoto Y, Liu D, Kameyama K, Hayashi E et al. Development of a canine model of pulmonary emphysema and



- imaging of the emphysematous lung with infrared thoracoscopy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126(6):1916-21.
69. Akahane T, Kurokawa Y, Chiba R, Yaegashi H, Takahashi T, Satomi S. Effects of Nd:YAG laser irradiation on morphometry and lung function in elastase-induced emphysema in rats. *Lasers Surg Med* 1998;23(4):204-12.
70. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, Gonzalez-Mangado N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema rats. *Chest* 2004;125(4):1500-6.
71. Turino GM. The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. *Chest* 2002;122(3):1958-60.
72. Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:4-7.
73. Rivero DH, Lorenzi-Filho G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PH. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. *Chest* 2001;119(5):1510-5.
74. Werebe EC, Pazetti R, Milanez de Campos JR, Fernandez PP, Capelozzi VL, Jatene FB et al. Systemic distribution of talc after intrapleural administration in rats. *Chest* 1999;115(1):190-3.
75. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001;56:972-7.
76. Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest* 2000;117(5 suppl):223S-7.



77. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 1990;142(6 pt 1):1422-8.
78. Johanson Jr WG, Pierce AK. Lung structure and function with age in normal rats and rats with papain emphysema. *J Clin Invest* 1973;52:2921-7.
79. Martorana PA, van Even P, Wusten B, Schaper J. Increased myocardial capillary density in dogs with experimental emphysema. *Lab Invest* 1984;50(5):592-6.
80. Rubin LJ, Windberg P, Taylor W, Heatfield B. Pulmonary vascular structural and functional changes in papain-induced emphysema in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:704-9.
81. Johanson Jr WG, Pierce AK, Reynolds RC. The evolution of papain emphysema in the rat. *J Lab Clin Med* 1971;78(4):599-607.
82. Lucey EC, O'Brien JJ, Pereira W, Snider GL. Arterial blood gas values in emphysematous hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1980;121:83-9.
83. Woolcock AJ, Macklem PT. Mechanical factors influencing collateral ventilation in human, dog and pig lungs. *J Appl Physiol* 1971;30:99-115.
84. Terry PB, Traystman RJ, Newbell HH, Batra G, Menkes HA. Collateral ventilation in man. *N Engl J Med* 1978;298:10-5.



- 
85. Wouters EF. Nutrition and metabolism in COPD. *Chest* 2000;117(5 Suppl 1):274S-80.
86. Mineo TC, Bollero P, Mineo D, Nofroni I. Body weight and nutritional changes after reduction pneumoplasty for severe emphysema: a randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124(4):660-7.
87. Congleton J. The pulmonary cachexia syndrome: aspects of energy balance. *Proc Nutr Soc* 1999;58(2):321-8.
88. Hugli O, Schutz Y, Fitting JW. The daily energy expenditure in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(1):294-300.
89. Boyd RL, Fisher MJ, Jaeger MJ. Non-invasive lung function tests in rats with progressive papain-induced emphysema. *Respir Physiol* 1980;40(2):181-90.
90. Koblre V, Hurych J, Holusa R. Changes in pulmonary connective tissue after a single intratracheal instillation of papain in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1982;125(2):239-43.
91. Martorana PA, McKeel NM, Richard JW, Share NN. Function-structure correlation studies on excised hamster lungs in papain-induced emphysema. *Can J Physiol Pharmacol* 1973;51:635-41.
92. Snider GL, Sherter CB. A one-year study of the evolution of elastase-induced emphysema in hamsters. *J Appl Physiol* 1977;43:721-9.
93. Minai OA, Maurer JR, Kesten S. Comorbidities in end-stage lung disease. *J Heart Lung Transplant* 1999;18(9):891-903.



94. Packe GE, Cayton RM, Edwards CW. Comparison of right ventricular weight at necropsy in interstitial pulmonary fibrosis and in chronic bronchitis and emphysema. *J Clin Pathol* 1986;39:594-5.
95. Icochea A, Cooper BS, Kuhn C. The effect of oxygen on cor pulmonale in experimental emphysema induced by elastase or elastase and beta-aminopropionitrile in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1982;126(5):792-6.
96. Kachel RG. Left ventricular function in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 1978;74(3):286-90.
97. Matthay RA, Berger HJ, Davies R, Loke J, Mahler DA, Gottschalk A et al. Right and left ventricular exercise performance in chronic obstructive pulmonary disease: radionuclide assessment. *Ann Intern Med* 1980;93(2):234-9.
98. Matthay RA, Ellis Jr. JH, Steele PP. Methoxamine-induced increase in afterload: effect on left ventricular performance in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Rev Respir Dis* 1978;117(5):871-7.
99. Jardin F, Guerret P, Prost JF, Farcot JC, Ozier Y, Bourdarias JP. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular function in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:135-42.

---

Referências adequadas ao Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, updated November 2003, organizadas pelo International Committee of Medical Journal Editors ("Vancouver Group"). Disponível em: <http://www.icmje.org>