

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

LÍDIA MARIA CARNEIRO DA FONSECA

**LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE
LIPOPOLISSACÁRIDE EM RATOS WISTAR COM OU SEM ENFISEMA
INDUZIDO POR ELASTASE**

**JUIZ DE FORA
2015**

LÍDIA MARIA CARNEIRO DA FONSECA

**LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL
DE LIPOPOLISSACÁRIDE EM RATOS WISTAR COM OU SEM ENFISEMA
INDUZIDO POR ELASTASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo

JUIZ DE FORA

2015

LÍDIA MARIA CARNEIRO DA FONSECA

**LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL
DE LIPOPOLISSACÁRIDE EM RATOS WISTAR COM OU SEM ENFISEMA
INDUZIDO POR ELASTASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Jorge Montessi
Faculdade de Ciências Médicas de Juiz de Fora

Prof. Dr. Maycon Moura Reboredo
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo e Ana Lúcia, pelo inesgotável empenho em me guiar pelo caminho dos estudos e aos meus irmãos, Ana Alice e João Pedro, companheiros nesta caminhada. Ao meu esposo João Victor pelo amor, amizade e todo apoio prestado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro pela orientação inteligente e impecável deste trabalho, por ser um exemplo que eu procuro sempre seguir e por transmitir a mim a vontade de continuar estudando.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo pela orientação deste trabalho e pela paciência durante a execução dos experimentos.

À Prof^ª. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda por ter prestado sempre com prontidão todo auxílio necessário com a histologia e com os experimentos.

Ao Prof. Dr. Júlio César Abreu de Oliveira, pela participação valiosa e fundamental em minha formação.

Ao Prof. Erich Vidal de Carvalho por ser incansável fonte de orientação, ajuda e incentivo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Fernando Reis Fonseca, Aydra Mendes Almeida Bianchi e Thais Fernanda Fazza pela transmissão dos preciosos conhecimentos em procedimentos experimentais e por tornarem possível este trabalho ao dividirem comigo as longas horas gastas com os experimentos.

À Prof^ª. Maria Aparecida Esteves Rabelo por sua imprescindível ajuda na histologia.

Aos demais colegas e acadêmicos do Núcleo de Pneumologia, pelo aprendizado constante durante as nossas reuniões.

Aos integrantes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF que gentilmente nos acolheram permitindo a execução dos nossos experimentos.

À Rede Mineira TOXIFAR e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

"Penso, logo existo."

René Descartes

RESUMO

Introdução: A forma como pulmões com enfisema respondem a uma agressão sistêmica como a sepse não é conhecida. É possível que as alterações inflamatórias e estruturais nos pulmões com enfisema alterem a resposta dos mesmos à sepse influenciando no desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo.

Objetivo: Comparar a lesão pulmonar secundária à sepse, induzida por lipopolissacarídeo (LPS) intraperitoneal, em ratos com e sem enfisema induzido pela administração intratraqueal de elastase. **Métodos:** Vinte e quatro ratos Wistar adultos foram randomizados para quatro grupos de seis animais: controle (C-C), enfisema (E-C), controle com sepse (C-LPS) e enfisema com sepse (E-LPS). O enfisema foi induzido pela injeção intratraqueal de elastase pancreática de porco (12 UI/ animal). Após três semanas deste procedimento, a sepse foi induzida pela injeção intraperitoneal de LPS da *Escherichia coli* (10 mg/Kg). Vinte e quatro horas após a indução da sepse, os animais foram submetidos à ventilação mecânica por 10 minutos para posterior coleta da gasometria arterial. A seguir, foram eutanasiados e as seguintes análises foram realizadas: lavado broncoalveolar (LBA), permeabilidade pulmonar e histologia. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil), quando apropriado, e comparados por ANOVA seguida do teste de Tukey, ou por Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney. **Resultados:** O escore de lesão pulmonar foi significativamente maior nos grupos C-LPS [0,62 (0,19)] e E-LPS [0,59 (0,13)] em comparação com os grupos C-C [0,11 (0,09)] e E-C [0,15 (0,05)] ($p < 0,05$). A contagem total de células (C-LPS=2,37 \pm 0,74; E-LPS=5,37 \pm 0,13; C-C=0,73 \pm 0,36; E-C=3,09 \pm 7,53 $\times 10^5$) e de neutrófilos [C-LPS=1,39 (1,48); E-LPS=4,39 (1,95); C-C=0,07 (0,11); E-C=0,68 (0,61) $\times 10^5$] no LBA foi significativamente maior nos grupos C-LPS e E-LPS comparado aos grupos C-C e E-C ($p < 0,05$). Animais do grupo E-LPS apresentaram maior contagem de células totais e de neutrófilos no LBA em comparação com o grupo C-LPS ($p < 0,05$). Na avaliação da razão albumina LBA/soro, o grupo E-LPS apresentou aumento significativo quando comparado ao C-LPS [0,069 (1,243) vs. 0,007 (0,002), respectivamente, $p < 0,05$]. Não foram observadas diferenças significativas nas trocas gasosas entre os grupos. **Conclusões:** A presença de enfisema foi acompanhada de maior inflamação pulmonar em resposta à agressão sistêmica induzida pela injeção intraperitoneal de LPS, levando a uma maior lesão da barreira alvéolo-capilar.

Palavras-chave: enfisema pulmonar, sepse, lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo, elastase pancreática, lipopolissacarídeos.

ABSTRACT

Introduction: The response of lungs with emphysema to a systemic insult such as sepsis is not known. Structural and inflammatory abnormalities in lungs caused by emphysema might alter their response to sepsis and thus influence the incidence and severity of acute respiratory distress syndrome. We therefore aimed to compare the severity and extension of acute lung injury in response to intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS) injection in rats with and without emphysema induced by elastase. **Methods:** Twenty four adult Wistar rats were randomized into 4 groups, each of them with 6 animals: control (C-C), emphysema without sepsis (E-C), control with sepsis (C-LPS) and emphysema with sepsis (E-LPS). Emphysema was induced by intratracheal instillation of pancreatic porcine elastase (12 IU/animal). Three weeks later, sepsis was induced by intraperitoneal *Escherichia coli* LPS injection (10 mg/kg). Twenty four hours after sepsis induction, animals underwent mechanical ventilation for 10 minutes and then blood was sampled for gasometric analysis. Thereafter, euthanasia and the following analysis were performed: BAL, lung permeability and histology. Results were expressed as mean \pm standard deviation or median (interquartile range), when appropriate, and compared using ANOVA followed by Tukey test or Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test. **Results:** Significant increase in lung injury score was observed in the C-LPS [0.62 (0.19)] and E-LPS [0.59 (0.13)] compared to the groups C-C [0.11 (0.09)] and E-C [0.15 (0.05)] ($p < 0.05$). Total cell (C-LPS= 2.37 ± 0.74 ; E-LPS= 5.37 ± 0.13 ; C-C= 0.73 ± 0.36 ; E-C= $3.09 \pm 7.53 \times 10^5$) and neutrophil counts [C-LPS= $1.39 (1.48)$; E-LPS= $4.39 (1.95)$; C-C= $0.065 (0.11)$; E-C= $0.68 (0.61) \times 10^5$] in the BAL were significantly higher in the groups that received LPS ($p < 0.05$). Significantly higher total cell and neutrophil counts in the BAL were also observed in the E-LPS group compared to C-LPS ($p < 0.05$). The group E-LPS showed a significant increase in the BAL/serum albumin ratio compared to C-LPS [0.069 (1.243) vs. 0.007 (0.002), respectively] ($p < 0.05$). There were no significant differences in the gas exchange levels among the groups. **Conclusions:** The presence of emphysema increases the inflammatory response in the lungs to a systemic stimulus, represented in this model by the intraperitoneal injection of LPS.

Keywords: pulmonary emphysema, sepsis, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, pancreatic elastase, lipopolysaccharides.

LITA DE TABELAS

TABELA 1	SISTEMA DE ESCORE DE LESÃO PULMONAR.....	52
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
FIGURA 2	LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO.....	47
FIGURA 3	CORTE HISTOLÓGICO DE PARÊNQUIMA PULMONAR SOB RETÍCULO PARA MORFOMETRIA	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	<i>American Thoracic Society</i>
DAD	Dano alveolar difuso
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
EN	Elastase neutrofilica
EPP	Elastase pancreática de porco
EUA	Estados Unidos da América
FR	Frequência Respiratória
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
GOLD	<i>Global initiative for chronic obstructive lung disease</i>
HCO ₃	Nível de bicarbonato
I:E	Relação inspiração e expiração
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
LBA	Lavado broncoalveolar
Lm	Intercepto linear médio
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacáride
MIF	Fator inibidor de macrófago

MIP2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
MMP	Metaloproteinase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NFκ-β	Fator de transcrição nuclear κ-β
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaO ₂ /FiO ₂	Relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e a fração inspirada de oxigênio
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PCR	Proteína C reativa
PEEP	Pressão expiratória final positiva
Ph	pH arterial
SF 0,9%	Solução fisiológica a 0,9%
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4
TLR2	Receptor <i>toll-like</i> 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UI	Unidades internacionais
UTI	Unidade de terapia intensiva
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
V _T	Volume corrente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA / ENFISEMA: EPIDEMIOLOGIA, DEFINIÇÃO, FISIOPATOLOGIA E APRESENTAÇÃO CLÍNICA	18
2.2	MODELOS ANIMAIS DE ENFISEMA	23
2.3	A SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO COMO CONSEQUÊNCIA PULMONAR DA SEPSE	26
2.4	MODELOS ANIMAIS DE LPA.....	29
2.4.1	Modelo animal de LPA por LPS intraperitoneal.....	30
2.5	DPOC / ENFISEMA E ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS.....	33
2.6	ENFISEMA E SRDA.....	36
3	HIPÓTESES.....	40
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	OBJETIVO GERAL.....	41
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5	MÉTODOS.....	42
5.1	ANIMAIS.....	42
5.2	CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO	42
5.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	43
5.3.1	Protocolo para indução de enfiseма por elastase.....	43
5.3.2	Protocolo para indução de sepse e LPA.....	44
5.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44

5.5	COLETA DE SANGUE ARTERIAL, EUTANÁSIA E REMOÇÃO DOS PULMÕES	46
5.6	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	48
5.6.1	Trocas gasosas.....	48
5.6.2	Lavado broncoalveolar.....	48
5.6.3	Determinação da permeabilidade pulmonar.....	49
5.6.4	Histologia.....	49
5.6.5	Morfometria para quantificação do enfisema pulmonar.....	49
5.6.6	Histologia para avaliação do dano tecidual pulmonar.....	51
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6.1	RESUMO DO ARTIGO.....	54
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
8	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICES.....	71
	ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é um importante problema de saúde em razão de sua alta prevalência, morbidade e mortalidade (LANDIS et al., 2014). Projeções apontam para um aumento de sua prevalência podendo ser, em 2030, a terceira causa de morte no mundo (MATHERS; LONCAR, 2006).

Dois componentes contribuem, de forma variável entre os indivíduos, para limitação ao fluxo aéreo na DPOC: o enfisema e a bronquite crônica. Este último caracteriza-se pelo acometimento das vias aéreas onde há inflamação, fibrose, deposição de muco e aumento da resistência ao fluxo aéreo (GOLD, 2015; KIM; CRINER, 2013). Sua presença tem sido associada a maior predisposição para a ocorrência de exacerbações. (BURGEL et al., 2009; MIRAVITLLES, 2011; PRESCOTT; LANGE; VESTBO, 1995). Tais eventos fazem parte do curso natural da doença em alguns pacientes, manifestam-se como piora aguda dos sintomas respiratórios e são a expressão de inflamação aumentada no pulmão, na maioria das vezes após uma agressão infecciosa (SETHI, 2000a, 2000b). Já o enfisema, outro importante componente da DPOC, é definido como a “presença do aumento permanente do espaço aéreo distal ao bronquíolo terminal acompanhado pela destruição de suas paredes e sem sinal óbvio de fibrose” (SNIDER et. al., 1985). Indivíduos com o predomínio de enfisema parecem experimentar menos exacerbações e, talvez por isso, a resposta de pulmões com enfisema frente a agressões inflamatórias vem sendo pouco estudada, menos ainda quando essas agressões são sistêmicas, extrapulmonares (FUJIMOTO et al., 2006; HAN et al., 2009).

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em resposta a uma infecção é denominada sepse (AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS, 1992). Essa é também uma condição muito frequente e que, em suas formas mais graves, apresenta elevada mortalidade (ANGUS et al., 2001; MARTIN et al., 2003; SILVA et al., 2004; ZANON et al., 2008). Nos pulmões, esta inflamação sistêmica pode lesar a membrana alvéolo-capilar e resultar em edema pulmonar com insuficiência respiratória aguda hipoxêmica grave, configurando a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (WARE; MATTHAY, 2000).

A inflamação é um ponto comum entre a SDRA e o enfisema. A resposta anormal à exposição à fumaça do cigarro ativa o sistema imune levando a inflamação crônica nas vias aéreas e alvéolos, o que, aliado ao reparo ineficiente, resulta na destruição alveolar que caracteriza o enfisema (HOGG, 2004; HOGG et al., 1994). Na SDRA, uma variedade de insultos pode atingir os pulmões a partir do endotélio vascular ou do epitélio alveolar e levar à inflamação com quebra da integridade da membrana alvéolo-capilar, fator central na sua fisiopatologia (WARE; MATTHAY, 2000).

É possível que as alterações estruturais e imunológicas promovidas pelo enfisema nos pulmões modifiquem a resposta dos mesmos à sepse e, desta forma, influenciem no desenvolvimento de SDRA. Embora haja evidências de que indivíduos com enfisema tenham mais células e mediadores inflamatórios, tanto no pulmão quanto de forma sistêmica, estudos têm apontado também para falhas no sistema imune e, portanto, prejuízo para montar um processo inflamatório com a função de defesa nesses pacientes (BAINES; SIMPSON; GIBSON; 2011; FINKELSTEIN et al., 1995; RETAMALES et al., 2001; WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002). Entre essas falhas podemos citar alterações nas funções de

macrófagos alveolares, neutrófilos e linfócitos T circulantes (BERENSON et al., 2006; HODGE, S. et al., 2003a, 2003b; PRIETO et al., 2001; TAYLOR et al., 2010).

Modelos animais de lesão pulmonar aguda (LPA) e de enfisema têm sido utilizados para melhor compreensão dessas condições e podem ser úteis em revelar a interação entre elas. Alguns estudos experimentais avaliaram a relação entre enfisema e infecção pulmonar. Embora com algumas divergências, em sua maioria eles mostraram maior inflamação no pulmão, em resposta à infecção, nos animais com enfisema (INOUE et al., 2003; GANESAN et al., 2012; PANG et al., 2008; SAJJAN et al., 2009; TOKAIRIN et al., 2008; WANG; WANG; LIU, 2010). Entretanto, nenhum estudo em humanos ou animais avaliou a resposta dos pulmões com enfisema a um insulto sistêmico, quando a primeira estrutura a recebê-lo é o endotélio vascular da barreira alvéolo-capilar, tal como ocorre na sepse. Portanto a relação entre enfisema e a LPA em resposta à sepse não é conhecida, o que motivou a condução deste estudo.

1 2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA / ENFISEMA:

EPIDEMIOLOGIA, DEFINIÇÃO, FISIOPATOLOGIA E APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A DPOC, que tem como um dos seus componentes o enfisema, é um importante problema de saúde em razão de sua alta prevalência, morbidade e mortalidade (LANDIS et al., 2014). Em 2011, sua prevalência foi estimada em 12,7 milhões de indivíduos nos Estados Unidos da América (EUA) (AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2011). O projeto Platino, que teve como objetivo investigar a prevalência da DPOC em indivíduos com mais de 40 anos em cinco grandes cidades da América Latina, utilizando para identificação dos casos uma ferramenta objetiva, a espirometria, encontrou valores entre 7,8%, na Cidade do México, e 19,7%, em Montevidéu. Na cidade de São Paulo, a prevalência foi de 15,8% (MENEZES et al., 2005). A exposição continuada ao tabaco e o envelhecimento da população têm criado expectativa de aumento da prevalência e do impacto da DPOC na população mundial nos próximos anos. Uma projeção feita para o ano de 2030 apontou que a DPOC passaria da quinta para a quarta causa de morte no mundo (MATHERS; LONCAR, 2006). Entretanto, em 2010, esta condição já ocupava a terceira posição dentre as causas de morte nos EUA (NATIONAL VITAL STATISTICS REPORT, 2013). No Brasil, segundo dados do DATASUS, em 2012, a DPOC foi responsável por mais de 40.000 mortes.

Segundo o *Global initiative for chronic obstructive lung disease*, (GOLD) (2015), a DPOC é uma “doença comum, prevenível e tratável, caracterizada por limitação persistente ao fluxo aéreo, que é usualmente progressiva e associada à

inflamação crônica aumentada nas vias aéreas e pulmões em resposta às partículas nocivas ou gases”.

Conforme descrito em sua definição, a DPOC cursa com alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. Inflamação, fibrose e deposição de muco ocorrem nas vias aéreas e caracterizam a bronquite crônica (GOLD, 2015; KIM; CRINER, 2013). No parênquima pulmonar, a destruição alveolar que resulta na perda do recolhimento elástico caracteriza o enfisema. Este é um importante componente da DPOC e é mais precisamente definido como a “presença do aumento permanente do espaço aéreo distal ao bronquíolo terminal acompanhado pela destruição de suas paredes e sem sinal óbvio de fibrose” (SNIDER et. al., 1985).

O tabagismo é o principal fator de risco para a DPOC, mas a exposição a outros agentes, tais como fumaça de fogão a lenha e poluentes da indústria, também estão associados ao seu desenvolvimento (ANTHONISEN; CONNETT; MURRAY, 2002; SMITH; MEHTA, 2003). A fisiopatologia do enfisema reside na resposta anormal à exposição a esses agentes, que resulta na inflamação crônica e destruição dos alvéolos (HOGG et al., 1994). Fletcher e Peto (1977) demonstraram que apenas 15% a 20% dos tabagistas apresentam queda acelerada da função pulmonar. A presença de inflamação mais exagerada no parênquima pulmonar nesses indivíduos pode explicar a suscetibilidade para o desenvolvimento do enfisema (RETAMALES et al., 2001).

A exposição crônica à fumaça do cigarro ou a outros poluentes é responsável por deflagrar a resposta inflamatória pela ativação dos sistemas imune inato e adaptativo (HOGG, 2004). Este estado inflamatório aumentado parece persistir mesmo após a cessação do tabagismo (LAPPERRE et al., 2006; RUTGERS et al.,

2000). A quebra da barreira entre o tecido pulmonar e o espaço aéreo, causada pelo tabagismo, dá início à resposta inata (JONES et al., 1980). Nesta fase, células como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e células natural killer, são recrutadas para o alvéolo (HODGE, G. et al., 2013; SAETTA et al., 1993). Partículas nocivas, depositadas no epitélio alveolar, ao serem reconhecidas, fagocitadas e destruídas pelos macrófagos alveolares, promovem a ativação dessas células. Essas, uma vez ativadas, produzem citocinas e quimiocinas responsáveis por estimular e atrair as demais células, amplificando o processo inflamatório (BARNES, 2004). Quando as partículas nocivas funcionam como antígenos e são apresentadas por células dendríticas aos linfócitos T e B, tem início a resposta imune adaptativa (LIU, 2001). A partir daí, as participações de linfócitos T CD4 e T CD8 e de fatores humorais, como anticorpos IgM e IgG, tornam o processo de fagocitose e destruição celular mais nocivo (MAJO; GHEZZO; COSIO, 2001).

Diversas citocinas e quimiocinas são secretadas pelo epitélio e por células inflamatórias e participam da regulação e perpetuação da inflamação (CHUNG, 2001). Níveis elevados de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α têm sido observados no escarro de pacientes com DPOC (KEATINGS et al., 1996). Dentre as mais estudadas na fisiopatologia do enfisema estão a IL-1 β e o TNF- α . Essas são responsáveis por iniciar e controlar a resposta inata e ainda têm efeito estimulante sobre linfócitos B e T durante a resposta adaptativa. O TNF- α estimula ainda a produção da IL-8, um importante quimiotático e ativador de neutrófilos (LE; VILCEK, 1987).

O estresse oxidativo tem papel importante na patogênese do enfisema pulmonar, sendo responsável por lesão tecidual e por amplificação da inflamação. A fumaça do cigarro contém inúmeras espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido (O_2^-) e o óxido nítrico (NO), que se somam àquelas produzidas por

macrófagos e neutrófilos ativados (CHURCH; PRYOR, 1985). Embora o epitélio pulmonar seja uma fonte importante de antioxidantes, parecer haver, nos indivíduos com enfisema, um desequilíbrio com predomínio dos agentes oxidantes (BOWLER; BARNES; CRAPO, 2004).

A hipótese de que o predomínio de agentes proteolíticos sobre seus inibidores exerça papel central na gênese do enfisema baseia-se na observação do seu desenvolvimento em indivíduos com deficiência de alfa-1 antitripsina, um inibidor da elastase de neutrófilos (EN), e em animais que receberam enzimas elastolíticas (ERIKSSON, 1965; GROSS et al., 1965). Sabe-se também que a expressão de enzimas como EN e uma variedade de metaloproteinases (MMP) está associada ao desenvolvimento do enfisema em humanos (BETSUYAKU et al, 2000.; LIM et al., 2000). O papel destas enzimas também tem sido demonstrado em estudos experimentais com animais (SHAPIRO et al., 2003; WERT et al., 2000; ZHENG et al., 2000). Neutrófilos e macrófagos ativados são os responsáveis pela liberação das enzimas proteolíticas, como as MMPs, a EN, a proteinase 3 e as catepsinas (FINLAY et al., 1997; OHBAYASHI, 2002; RAO et al., 1991). Elas têm a função de facilitar a passagem dessas células através dos tecidos, porém, quando secretadas em excesso, acabam por lesar os mesmos. A proteólise que ocorre sobre os componentes da matriz extracelular, cuja função é a sustentação das estruturas alveolares, resulta na ruptura e destruição dos alvéolos que caracterizam o enfisema (OWEN, 2008).

A DPOC é uma condição heterogênea em que a bronquite crônica e o enfisema contribuem de forma variável entre os indivíduos para a limitação ao fluxo aéreo, este por perda do recolhimento elástico e aquela por obstrução das vias aéreas. A heterogeneidade também existe na forma como a doença se manifesta

cl clinicamente e progride, permitindo agrupar os pacientes em diferentes fenótipos (HAN et al., 2010; MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012). De especial interesse é o fenótipo “exacerbador”, uma vez que esse evento representa alta morbidade, traz risco de morte e é responsável por significativa parcela dos gastos com a doença (RUTTEN-VAN MOLKEN et al., 1999; SEEMUNGAL et al., 1998). O estudo ECLIPSE, que acompanhou longitudinalmente mais de 2000 pacientes com DPOC, encontrou um padrão de exacerbação que permanece estável ao longo do tempo e que é independente do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1): um grupo de pacientes apresenta exacerbações frequentes e outro não exacerba (HURST et al., 2010). Identificar os fatores que tornam o indivíduo suscetível, assim como traçar estratégias terapêuticas específicas para esse grupo pode trazer impacto na história natural da doença. A história prévia de exacerbação foi o principal fator de risco para ocorrência desse evento encontrado na coorte do ECLIPSE e em outros estudos (HURST et al., 2010; MAKE et al., 2015; SEEMUNGAL et al., 1998).

A diferente parcela de contribuição da bronquite crônica e do enfisema em cada indivíduo também pode estar relacionada à predisposição para exacerbação. A presença de tosse e a produção aumentada de secreção respiratória, manifestações da bronquite crônica, têm sido fatores de risco independentes para a ocorrência de exacerbações (BURGEL et al., 2009; MIRAVITLLES, 2011; PRESCOTT; LANGE; VESTBO, 1995). Alguns destes pacientes apresentam colonização crônica das vias aéreas por bactérias que servem como gatilho para as exacerbações (MURPHY et al., 2004; SETHI et al., 2002; SETHI, 2000a, 2000b). Postula-se que o estado inflamatório alterado, em razão da doença, leve a falha dos mecanismos de

eliminação de microorganismos e permita a perpetuação da colonização bacteriana no pulmão.

Já entre os pacientes com predomínio de enfisema, as alterações mais importantes são a perda do recolhimento elástico do tecido pulmonar, o que resulta em aprisionamento aéreo e hiperinsuflação, com o quadro clínico marcado principalmente por dispneia e intolerância ao exercício (BALDI et al., 2001; GUGGER et al., 1991). Ao contrário dos pacientes com bronquite crônica, esses não tendem a apresentar exacerbações frequentes (FUJIMOTO et al., 2006; HAN et al., 2009).

A evidência de que um grupo de indivíduos com DPOC é suscetível a infecções repetidas das vias aéreas tem motivado a realização de estudos para melhor compreensão de como pulmões com enfisema reagem às agressões inaladas, como, por exemplo, vírus, bactérias e poluentes. Portanto, há certo conhecimento sobre como o epitélio alveolar responde ao que é inalado. Entretanto, pouco é conhecido sobre a relação entre DPOC, sobretudo no espectro do enfisema, e agressões sistêmicas como, por exemplo, os mediadores inflamatórios da sepse. É possível que as alterações estruturais e imunológicas promovidas pelo enfisema nos pulmões alterem a resposta dos mesmos à sepse e desta forma influencie no desenvolvimento de SDRA nestes pacientes.

2.2 MODELOS ANIMAIS DE ENFISEMA

Modelos animais de enfisema têm sido úteis para a melhor compreensão dos mecanismos implicados na patogênese da DPOC, assim como para o

desenvolvimento de novas terapias. Esses modelos podem também ser usados para avaliar a interação entre o enfisema e outras agressões.

Os modelos que se baseiam no desequilíbrio entre proteólise e anti-proteólise têm sido amplamente utilizados. Esses envolvem a instilação na via aérea do animal de um agente com potencial proteolítico, como a papaína, a EN ou a elastase pancreática de porco (EPP) (MACHADO et al., 2014; STONE et al., 1990; YOKOYAMA et al., 1987).

Em ratos, uma única instilação de EPP leva ao desenvolvimento de enfisema panlobular (DAMON; MAUDERLY; JONES, 1982; YOKOYAMA et al., 1987). Quando doses repetidas de elastase são administradas, os animais exibem, além do enfisema, repercussões sistêmicas como perda de peso, intolerância ao exercício e alterações cardiovasculares, como a hipertensão pulmonar (ANTUNES et al., 2014; LUCAS, 2015; LUTHJE et al., 2009). Entretanto uma dose da enzima é suficiente para induzir as alterações pulmonares.

A elastase, além de ter suas propriedades proteolíticas, é capaz de deflagrar um processo inflamatório no alvéolo, logo após a sua instilação, que caracteriza a fase aguda da lesão. Vecchiola et al. (2011) estudaram a fase aguda da lesão induzida pela elastase em ratos e encontraram um processo inflamatório caracterizado por quebra da barreira alvéolo-capilar, recrutamento de células no espaço alveolar e aumento de citocinas. Na análise histológica, encontraram características de dano alveolar difuso (DAD), como infiltrado de polimorfonucleares e deposição de membrana hialina. Van de Lest et al. (1995) encontraram achados semelhantes. Ambos estudos mostraram a regressão dessa fase entre três e sete dias após a administração da elastase, comprovando que, tardiamente, o desfecho se caracteriza por destruição das paredes alveolares, aumento do espaço aéreo e

perda da arquitetura pulmonar normal, aspectos que definem o enfisema (MAHADEVA; SHAPIRO, 2002).

A matriz extracelular tem a função de sustentação das estruturas alveolares e determina as propriedades mecânicas do pulmão. Elastina, colágeno e proteoglicanas são seus principais componentes (DUNSMORE; RANNELS, 1996; FERNANDES; BONACCI; STEWART, 2006). A elastase atua não somente sobre a elastina, mas sobre os diversos componentes dessa matriz, promovendo um processo de degradação e reparo que culmina no enfisema. Minutos após a exposição à elastase já se inicia a proteólise. Van de Lest et al. (1995) demonstraram a destruição de proteoglicanas da matriz extracelular entre três horas e sete dias após a exposição à elastase. A redução do conteúdo de elastina no parênquima pulmonar foi demonstrada desde 15 minutos até 16 dias após a instilação da elastase (MORRIS et al., 1981, 1986). Contrapondo-se à proteólise, um processo de reparo logo tem início e, no quarto dia após a elastase, já se veem pequenos agrupamentos de microfibrilas de elastina (MORRIS et al., 1981). Lucey et al. (1998) encontraram, nos primeiros dias após a exposição, expressão aumentada de mRNA da elastina e colágeno tipo I que se concentravam na pleura, parede de grandes vasos e grandes vias aéreas. Entretanto, nos espaços alveolares a expressão foi muito discreta ou ausente. Esses achados fortalecem a hipótese de que o reparo ineficiente resulta em enfisema.

Uma limitação importante do modelo de enfisema induzido por elastase é que ele não é capaz de mimetizar a DPOC como um todo. Embora a metaplasia de células globosas nas vias aéreas, após a administração de EPP já tenha sido demonstrada, outros aspectos relevantes da bronquite crônica não são observados (CHRISTENSEN et al., 1977). Reflexo disto é a falha em se encontrar aumento da

resistência das vias aéreas neste modelo, ficando evidentes apenas as anormalidades geradas pela destruição do parênquima pulmonar, tais como o aumento da complacência e dos volumes pulmonares (BELLOFIORE et al., 1989; HAMAKAWA et al., 2011; HANTOS et al., 2008; YOKOYAMA et al., 1987). Portanto, este modelo reflete o que seria, em humanos, o fenótipo enfisematoso, no qual a participação da bronquite crônica é pequena ou nula (MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012).

2.3 A SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO COMO CONSEQUÊNCIA PULMONAR DA SEPSE

A ocorrência da SIRS em resposta à infecção define a sepse. Seus critérios foram inicialmente estabelecidos em 1992 e incluíam aumento da temperatura, das frequências cardíaca e respiratória e alteração na contagem de leucócitos (AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS, 1992). Em 2001, um novo consenso promovido por diversas entidades acrescentou a necessidade de um foco infeccioso definido e tornou mais amplos os critérios incluindo outros sinais de disfunção orgânica (LEVY et al., 2003).

A sepse é uma entidade muito frequente e traz alta mortalidade. Nos EUA é a principal causa de morte entre pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (ANGUS et al., 2001). Um estudo que avaliou a epidemiologia da sepse entre os anos de 1979 e 2000 nos EUA mostrou aumento significativo de sua incidência e, apesar da redução de sua letalidade, houve aumento do número absoluto de mortes (MARTIN et al., 2003). Em 2002, Silva et al. (2004) seguiram mais de 1000

pacientes admitidos em UTIs no Brasil com o objetivo de estudar a epidemiologia da sepse no país. Foi encontrada uma incidência de sepse de 61,4% e uma mortalidade por sepse grave de 52,2%. Já em 2006, Zanon et al. (2008) encontraram mortalidade de 10,1% para sepse, 22,6% para sepse grave e 64,8% para choque séptico entre pacientes admitidos em cinco UTIs brasileiras.

O processo inflamatório, inicialmente voltado para conter o foco infeccioso, quando excessivo, toma proporções sistêmicas e representa o componente central na fisiopatologia da sepse. O reconhecimento de antígenos do agente infeccioso por receptores específicos na superfície de macrófagos, tais como TLR 2 e TLR 4, dá início a uma via de sinalização que culmina com o lançamento de citocinas que orquestram a inflamação (REMICK, 2007). As alterações sistêmicas ocorrem em um crescente de gravidade, passando pela sepse grave, em que há disfunção de órgãos, até o choque séptico, em que já há a falência circulatória (LEVY et al., 2003).

Nos pulmões, a inflamação sistêmica resultante da sepse pode lesar a membrana alvéolo-capilar e resultar em edema pulmonar com insuficiência respiratória aguda hipoxêmica grave, configurando a SDRA (WARE; MATTHAY, 2000). Autores que se basearam nos critérios de SDRA do Consenso Americano-Europeu mostraram uma incidência desta condição, na última década, de 5 a 7,2 novos casos por 100.000 habitantes por ano na Europa e de 33,8 por 100.000 habitantes por ano nos EUA (LI et al., 2011; LINKO et al., 2009; SIGURDSSON et al., 2013; VILLAR et al., 2011). Um estudo que avaliou a incidência e os desfechos da SDRA no Brasil, utilizando-se dos critérios do mesmo consenso e também a definição de Berlim, encontrou uma incidência de LPA de 3,8 e de SDRA de 6,3 por 100.000 habitantes por ano (CASER et al., 2014). A mortalidade por SDRA ainda

permanece alta e estudos mais recentes a descrevem como algo em torno de 40% a 50% (CASER et al., 2014; PHUA et al., 2009; VILLAR et al., 2011).

A SDRA pode ocorrer em resposta a um insulto local, como, por exemplo, pneumonia, contusão, aspiração, ou sistêmico, como sepse, pancreatite aguda, trauma e múltiplas transfusões. De acordo com a origem do insulto, a SDRA tem sido classificada em pulmonar ou extrapulmonar, sendo a sepse a principal causa dentre todas elas (PEPE et al., 1982). Independentemente da agressão inicial, que pode ser ao epitélio alveolar nas causas pulmonares, ou ao endotélio nas extrapulmonares, o processo inflamatório resulta em perda da integridade da membrana alvéolo-capilar, com conseqüente aumento da sua permeabilidade (WARE; MATTHAY, 2000). A fisiopatologia da SDRA pode ser dividida em três etapas evolutivas. A primeira delas é a exsudativa e predomina na primeira semana após a agressão (KATZENSTEIN; BLOOR; LEIBOW, 1976; THILLE et al., 2013). Nesta fase, em função do aumento da permeabilidade capilar, o alvéolo é inundado por um fluido rico em proteínas que se depositam em conjunto com restos celulares formando membranas hialinas (PUGIN et al., 1999). O edema pulmonar contribui ainda para a perda da ação do surfactante aumentando o colapso alveolar (GREENE et al., 1999). Formam-se então extensas áreas de pulmão colapsado onde ocorre o shunt, responsável pela hipoxemia. Clinicamente a SDRA manifesta-se por insuficiência respiratória aguda hipoxêmica e o DAD é o achado histológico desta primeira fase (WARE; MATTHAY, 2000). A segunda etapa, denominada fibroproliferativa, ocorre durante a segunda e terceira semanas e é marcada por reparação, com intensa proliferação celular, especialmente de pneumócitos tipo 2 e fibroblastos. Na terceira fase pode haver resolução da lesão ou progressão para

remodelamento com fibrose (KATZENSTEIN; BLOOR; LEIBOW, 1976; THILLE et al., 2013).

Os critérios de SDRA, definidos em 1994 pelo Consenso Americano-Europeu, foram recentemente revisados, estabelecendo-se os critérios de Berlim (BERNARD et al., 1994; RANIERI et al., 2012). Os últimos incluem a instalação aguda, em menos de sete dias, de hipoxemia definida como uma PaO_2 menor que $300 \text{ cmH}_2\text{O}$, aferida com uma PEEP maior ou igual $5 \text{ cmH}_2\text{O}$, presença de opacidades alveolares bilaterais na imagem do tórax e a não completa explicação deste quadro por insuficiência cardíaca esquerda ou sobrecarga de volume. De acordo com a PaO_2 , a SDRA pode ser graduada em diferentes níveis de gravidade: leve, com PaO_2 entre 300 e $200 \text{ cmH}_2\text{O}$; moderada, com PaO_2 entre 200 e $100 \text{ cmH}_2\text{O}$; e grave, com PaO_2 menor que $100 \text{ cmH}_2\text{O}$ (RANIERI et al., 2012).

2.4 MODELOS ANIMAIS DE LPA

Modelos animais também têm sido empregados para o estudo da fisiopatologia da LPA e na busca de novas terapias e estratégias ventilatórias para a SDRA. Entretanto, nenhum deles é capaz de apresentar todas as características da SDRA em humanos. Animais e humanos diferem quanto à anatomia, fisiologia e também quanto ao contexto em que ocorre a LPA. Roedores têm a parede alveolar e a barreira alvéolo-capilar menos espessas que humanos e suas vias aéreas apresentam menos ramificações até o bronquíolo terminal (HOFMANN; KOBLINGER; MARTONEN, 1989). Ratos possuem menos neutrófilos e esses produzem menos espécies reativas de oxigênio (JOHNSON et al., 1999). A

imunologia também difere entre roedores e humanos (MESTAS; HUGHES, 2004). Enquanto os animais utilizados nos experimentos são jovens e saudáveis, humanos geralmente desenvolvem a LPA com idade mais avançada e em um contexto de terapia intensiva em que, além das comorbidades, há diversos fatores que contribuem para lesão pulmonar.

Enquanto em humanos os critérios para diagnóstico de SDRA estão bem definidos, em modelos animais não havia consenso quanto à sua caracterização. Um comitê organizado pela *American Thoracic Society* (ATS), recomendou que pelo menos três dos seguintes achados estejam presentes em um modelo animal para que seja definido o quadro de LPA: evidência histológica de lesão tecidual, alteração na barreira alvéolo-capilar, presença de resposta inflamatória e evidência de disfunção fisiológica (MATUTE-BELLO et al., 2011).

2.4.1 MODELO ANIMAL DE LPA POR LPS INTRAPERITONEAL

Uma vez que a sepse é a principal causa de LPA, a administração de lipopolissacáride (LPS) tem sido empregada para causar sepse e, conseqüentemente, lesão pulmonar em diversas espécies. O LPS, ou endotoxina, é uma glicoproteína presente na membrana celular externa de bactérias gram-negativas que possui propriedades altamente pró-inflamatórias, funcionando como um potente ativador do sistema imune (RAETZ et al., 1991). No soro, a endotoxina liga-se à proteína ligadora de LPS (TOBIAS; SOLDAU; ULEVITCH, 1986) e o complexo formado é reconhecido pelo receptor de membrana CD14, presente na superfície de células como as mononucleares, células mesoteliais no peritônio e

células endoteliais da membrana alvéolo-capilar (BANNERMAN; GOLDBLUM, 2003; KATO et al., 2004; WRIGHT et al., 1990). O receptor transmembrana TLR4 é responsável pela transdução de sinal para o interior da célula (TAPPING et al., 2000). Uma cascata de sinalização ocorre no citoplasma, culminando com a ativação do fator de transcrição NF κ - β . Este age no núcleo celular, onde promove a expressão gênica que resulta no aumento da produção de citocinas, na expressão moléculas de adesão e de fatores teciduais e em apoptose. Ainda por mecanismos desconhecidos, o LPS via TLR4 é capaz de ativar as caspases, enzimas proteolíticas que exercem papel central na morte celular programada (BANNERMAN; GOLDBLUM, 2003).

Quando administrada em animais por via intratraqueal, endovenosa ou intraperitoneal, a endotoxina reproduz a lesão à membrana alvéolo-capilar, com aspectos semelhantes à SDRA em humanos (BECK-SCHIMMER et al., 2005; KABIR et al., 2002; LIU; HSU; CHEN, 2007). A sensibilidade à endotoxina é muito variável entre as espécies. Roedores, por exemplo, possuem baixa sensibilidade e necessitam de doses mais altas de LPS para deflagrarem a inflamação (WINKLER, 1989). A endotoxina é de fácil administração e o modelo é bastante reprodutível (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

Quando o LPS é administrado por via intraperitoneal, são deflagradas peritonite e sepse e mediadores inflamatórios a partir deste foco atingem os pulmões levando ao desenvolvimento de LPA de origem extrapulmonar. Estudos em animais demonstraram que parte da endotoxina é reabsorvida e aparece no compartimento intravascular em poucas horas (HIRANO, 1996). Copeland et al. (2005) compararam as vias intraperitoneal e endovenosa em camundongos utilizando imunoglobulina e, embora tenham encontrado maior concentração sérica desta molécula quando

administrada por via endovenosa, quantidade significativa também foi recuperada no soro após sua injeção intraperitoneal. O LPS parece então agir localmente, onde interage com receptores TLR4 na membrana de células mesenquimais do peritônio, dando início à via de sinalização que culminará com o lançamento de citocinas inflamatórias na circulação e também à distância, podendo chegar aos pulmões, onde inicialmente terá contato com o endotélio vascular da barreira alvéolo-capilar.

O modelo animal de LPA por LPS intraperitoneal caracteriza-se por lesão pulmonar leve e transitória. Rojas et al. (2005) e Kabir et al. (2002) buscaram caracterizar este modelo e encontraram a rápida instalação de sepse e LPA, poucas horas após uma única administração de endotoxina, com normalização dos parâmetros avaliados após passadas 48 horas. O estado inflamatório é caracterizado pelo aumento de diversas citocinas, como IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , e MCP-1, tanto na circulação sistêmica quanto nos pulmões. Essas começam a se elevar em duas a seis horas após o estímulo e em 24 horas quase todas já retornaram aos seus níveis basais. No lavado broncoalveolar, foi descrito um aumento tardio, em 96 horas, do número de macrófagos e não foi encontrado aumento de neutrófilos até 24 horas após administração do LPS (BLACKWELL et al., 1999; STEINMULLER et al., 2006).

Copeland et al. (2005) compararam a resposta inflamatória sistêmica em camundongos e humanos que receberam LPS por via intraperitoneal e endovenosa respectivamente. Embora maiores concentrações de endotoxina tenham sido necessárias para induzir a sepse em camundongos, as duas espécies demonstraram o mesmo padrão de indução de citocinas e celularidade no sangue. Em conformidade com os demais estudos em animais, a elevação das citocinas e células foi rápida e transitória.

As alterações histológicas pulmonares no modelo de LPA induzido por LPS intraperitoneal caracterizam-se por congestão vascular, infiltrado neutrofílico e espessamento do septo alveolar. Estes achados atingem um pico em 24 horas. Embora He et al. (2009) tenham encontrado sinais óbvios de inflamação no tecido pulmonar 72 horas após a injeção de LPS, os demais estudos mostraram que após 48 horas restam apenas alterações residuais. Diferentemente da LPA em humanos, a formação de membrana hialina não é comum e os neutrófilos aparecem muito pouco no espaço alveolar, ficando quase restritos ao septo alveolar (ROJAS et al., 2005). Rojas et al. (2005) obtiveram variáveis da função pulmonar a partir da pletismografia de corpo inteiro. Em concordância com o padrão demonstrado para as citocinas, houve um pico de alteração na resistência das vias aéreas, frequência respiratória e volume minuto quatro horas após a administração do LPS com normalização em 48 horas.

Em relação à capacidade do modelo em gerar edema pulmonar, Steinmuller et al. (2006) não encontraram aumento da permeabilidade alvéolo-capilar avaliada a partir da injeção endovenosa de albumina marcada e sua posterior detecção no lavado broncoalveolar (LBA) e no sangue. Estudos que utilizaram a relação entre peso úmido e peso seco de um lobo pulmonar, encontraram a presença de edema coincidindo com as alterações inflamatórias, com pico em seis horas e retorno ao basal em 48 horas (KABIR et al., 2002; ROJAS et al., 2005). A ausência de inundação dos alvéolos nos cortes histológicos sugere que o edema esteja restrito ao interstício.

2.5 DPOC / ENFISEMA E ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS

A inflamação, a partir da ativação dos sistemas imunes inato e adaptativo, está na gênese do enfisema. O encontro de número aumentado de células inflamatórias no pulmão e no escarro de pacientes com enfisema leva à ideia de que esse estado inflamatório seja persistente (BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011; FINKELSTEIN et al., 1995; RETAMALES et al., 2001). Além disso, a elevação dos níveis séricos de marcadores inflamatórios nesses indivíduos sugere que a inflamação não está restrita ao compartimento pulmonar (AGUSTI et al., 2012; BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011; KARADAG et al., 2008; WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002). Alguns estudos correlacionaram achados histológicos ou radiológicos de enfisema com o aumento de células inflamatórias no tecido pulmonar. Retamales et al. (2001) compararam a presença de células inflamatórias nos cortes histológicos de pulmão de indivíduos tabagistas com e sem enfisema, detectado por TC de tórax. Maior contagem de macrófagos, linfócitos T CD4 e CD8 foi encontrada no tecido pulmonar daqueles indivíduos com enfisema definido radiologicamente. Finkelstein et al. (1995) encontraram número aumentado de linfócitos T no tecido pulmonar com alterações histológicas compatíveis com enfisema em comparação com amostras de pulmão sem a doença.

Vários estudos têm demonstrado a elevação de marcadores inflamatórios no soro de pacientes com DPOC, apontando para a possibilidade de haver um estado inflamatório também sistêmico (AGUSTI et al., 2012; GAN et al., 2004; KARADAG et al., 2008; WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002). Um grupo de pacientes com DPOC e inflamação sistêmica persistente foi caracterizado por Agusti et al. (2012) na coorte do estudo ECLIPSE. Um padrão de elevação de proteína C reativa (PCR), IL-6, fibrinogênio e da contagem de células no soro foi mantido ao longo do

seguimento de três anos de forma independente do predomínio de enfisema ou bronquite crônica em cada paciente.

Entretanto, maior número de células inflamatórias e elevação de citocinas podem não significar maior capacidade de defesa contra patógenos e estudos apontam para prejuízo da resposta imune, principalmente inata, nesses pacientes (SCHLEIMER, 2005; SHAYKHIEV; CRYSTAL, 2013). Macrófagos alveolares têm a função de reconhecer e fagocitar partículas patogênicas inaladas e células apoptóticas e a partir daí ativar a resposta imune (BARNES, 2004). Embora em quantidade aumentada, principalmente nas áreas de maior destruição enfisematosa, já foi demonstrado que no ambiente alveolar da DPOC essas células são programadas para o lançamento de fatores anti-inflamatórios e de remodelamento (BARNES, 2004; SHAYKHIEV et al., 2009). Com isso, capacidade reduzida para fagocitar e promover o *clearance* de células apoptóticas e de patógenos comuns na DPOC como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*, já foi demonstrada em humanos com DPOC e em modelos animais de enfisema (BERENSON et al., 2006; HODGE, S. et al., 2003; PANG et al., 2008; TAYLOR et al., 2010). Macrófagos alveolares desses pacientes também exibiram menor capacidade de lançar citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-10 quando estimulados por antígenos bacterianos (BERENSON et al., 2006). Quando o estímulo foi o LPS, tais células também exibiram menor capacidade de promover a quimiotaxia de neutrófilos (KAUR; SINGH, 2013).

Anormalidades sistêmicas nas funções de neutrófilos, monócitos, linfócitos e células natural killer de indivíduos com DPOC já foram demonstradas. Neutrófilos circulantes desses pacientes exibem alterações na migração: se locomovem com maior rapidez, fazem um trajeto maior e possuem menor acurácia ao se orientarem

para o estímulo quimioatrativo (SAPEY et al., 2011). Isso, além de resultar em menor defesa contra patógenos, promove maior lesão tecidual, uma vez que, por onde passam, os neutrófilos ativados lançam proteinases (OWEN et al., 1995). Linfócitos T isolados do soro de pacientes com DPOC demonstraram maior predisposição para apoptose (HODGE, S. et al., 2003). Redução da atividade citotóxica de células natural killer, e da capacidade de fagocitose de monócitos e neutrófilos circulantes também já foram demonstradas nesses pacientes (PRIETO et al., 2001).

2.6 ENFISEMA E SRDA

Uma vez que o desenvolvimento da SDRA envolve ativação da resposta imune e inflamação pulmonar exacerbada, levando ao dano tecidual com lesão da membrana alvéolo-capilar, as alterações imunológicas no pulmão em função do enfisema poderiam alterar a sua ocorrência.

A exposição à fumaça do cigarro é o principal fator de risco para o desenvolvimento do enfisema. Estudos mostram que o tabagismo ativo pode levar a alterações no epitélio e endotélio pulmonar semelhantes às que ocorrem na SDRA (JONES et al., 1980; LI X. Y. et al., 1996). Alguns estudos encontraram associação entre SDRA e tabagismo ativo ou passivo. Toy et al. (2012) e Calfee et al. (2011) apontaram o tabagismo ativo e passivo como fator de risco independente para o desenvolvimento de SDRA após múltiplas transfusões e trauma, respectivamente. Hsieh et al. (2014) avaliaram o impacto do tabagismo sobre a gravidade da SDRA e a mortalidade por esta causa. Concluiu-se que indivíduos tabagistas com SDRA, apesar de serem mais jovens, terem escores de gravidade melhores e menos

comorbidades, apresentavam a mesma mortalidade em 60 dias quando comparados a pacientes também com SDRA e sem exposição ao tabaco. Tais estudos, porém, ou não definiram a presença de DPOC entre os pacientes estudados ou tiveram um número muito pequeno de indivíduos com este diagnóstico. Outros autores encontraram a DPOC, juntamente com uma série de outras comorbidades, como fator associado a maior incidência de SDRA em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico, hemorragia subaracnóidea e lesão da medula espinhal (RINCON et al., 2014; VEERAVAGU et al., 2014; VEERAVAGU et al., 2013).

Estudos experimentais avaliaram o *clearance* bacteriano a partir de modelos animais de enfisema e infecção pulmonar. Embora sem o objetivo de encontrar como desfecho a LPA, tais estudos permitiram avaliar a repercussão da infecção pulmonar, um dos principais gatilhos para a LPA, sobre o pulmão com enfisema. Inoue et al. (2003) estudaram as repercussões inflamatórias pulmonares e sistêmicas em camundongos com enfisema induzido por elastase 24 e 72 horas após a inoculação intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae*. Foi encontrado um prejuízo da resposta inflamatória pulmonar, além de persistência bacteriana prolongada, tanto no pulmão quanto no soro, entre os animais com enfisema comparados aos seus controles. Utilizando-se dos mesmos modelos, Tokairin et al. (2008) buscaram avaliar a resposta inflamatória e também o mecanismo pelo qual se daria a maior suscetibilidade a infecção bacteriana entre os indivíduos com enfisema, a partir da detecção da expressão dos receptores TLR no pulmão. Os resultados encontrados divergiram do estudo anterior. Além de demonstrar que os pulmões com enfisema foram capazes de reagir à infecção com uma resposta inflamatória mais importante, houve maior expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 nos macrófagos alveolares desses animais. O menor grau de inflamação encontrado

no primeiro estudo pode ter sido decorrente da menor acurácia do método empregado para a determinação no tamanho do inóculo bacteriano.

Wang, D., Wang, Y e Liu (2010) estabeleceram um modelo de infecção pulmonar por inoculação intratraqueal de *Haemophilus influenzae* em hamsteres com enfisema induzido por elastase. Em concordância com o trabalho de Tokairin et al., também foi encontrada maior inflamação no pulmão dos animais com enfisema em relação aos controles. Essa foi evidenciada sobretudo por alterações histológicas, mais pronunciadas nos animais com enfisema, tais como acúmulo de neutrófilos, congestão capilar, áreas de consolidação e edema pulmonar. Pang et al., (2008) em um modelo de enfisema induzido por elastase seguido da infecção pulmonar por *Haemophilus influenzae*, em camundongos, encontraram persistência bacteriana prolongada entre os animais com enfisema. Nos cortes histológicos os sinais de inflamação diferiram apenas 72 horas após a infecção, quando ainda persistiam nos animais com enfisema. Ganesan et al. (2012) e Sajjan et al. (2009) estudaram a inflamação, persistência do patógeno e alguns possíveis mecanismos de suscetibilidade em um modelo de enfisema induzido por exposições repetidas a elastase e a LPS, por via intratraqueal, seguido da infecção por *Haemophilus influenzae* ou rinovirus. O modelo de enfisema utilizado diferiu dos anteriores, pois também exibia alterações compatíveis com bronquite crônica. Animais com enfisema exibiram prejuízo do clearance do patógeno e maior inflamação do parênquima pulmonar.

Tais estudos corroboram a ideia de que há prejuízo da resposta imune local, demonstrado pela falha no *clearance* de patógenos no pulmão com enfisema. Apesar disso, a inflamação em resposta à agressão inalada é mais exuberante nesses animais, o que pode significar uma maior propensão ao desenvolvimento de

LPA no pulmão enfisematoso. Não é conhecido, entretanto, como reagem os pulmões com enfisema em resposta a um estímulo sistêmico que inicialmente entra em contato com o epitélio alveolar. Nenhum estudo em humanos ou animais avaliou a relação entre o enfisema e o desenvolvimento de LPA em resposta à sepse e, portanto, esta relação não é conhecida.

3 HIPÓTESES

H0: A presença de enfisema não interfere na LPA que ocorre em resposta à sepse induzida por LPS intraperitoneal

H1: A presença de enfisema interfere na LPA que ocorre em resposta à sepse induzida por LPS intraperitoneal.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a LPA secundária à sepse induzida por LPS intraperitoneal em ratos com e sem enfisema induzido pela administração de elastase.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a LPA secundária à sepse induzida por LPS intraperitoneal em ratos com e sem enfisema induzido pela administração de elastase a partir da análise de:

- a) Parâmetros gasométricos;
- b) Contagem de células inflamatórias no LBA;
- c) Histopatologia pulmonar;
- d) Permeabilidade capilar pulmonar.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para este estudo experimental foram utilizados ratos Wistar adultos, previamente saudáveis, com peso de 308 ± 26 , provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR – UFJF, Juiz de Fora, Minas gerais, Brasil). Os animais receberam cuidados segundo a diretriz do Conselho Nacional de Experimentação Animal (DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS, 2013). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF, protocolo número 066/2013 (ANEXO A).

5.2 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha selecionada (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. Cada gaiola abrigava três animais, que foram mantidos em armários climatizados (Alesco, Brasil) pelo período de uma semana antecedendo o procedimento experimental. Os armários localizavam-se em alojamento com lâmpadas incandescentes, controladas automaticamente para acenderem às 6:00 h e apagarem às 18:00 h, mantendo um fotoperíodo de 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*.

5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Neste estudo experimental foram desenvolvidos dois modelos: enfisema induzido por administração intratraqueal de elastase e LPA por administração intraperitoneal de LPS.

5.3.1 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DE ENFISEMA POR ELASTASE

Para indução do enfisema, EPP foi administrada por via intratraqueal, conforme já descrito em estudos prévios (YOKOYAMA et al., 1987). O peso dos animais foi obtido (Balança Filizola MF 4006033, Brasil) para cálculo das doses das medicações utilizadas. A seguir os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de ketamina (BioChimico, Brasil) e 8 mg/kg xilazina (Rhobifarma, Brasil), ambas por via intraperitoneal. Estas doses foram suficientes para manter o animal em plano anestésico, caracterizado pela supressão do reflexo córneo-palpebral, por aproximadamente uma hora.

Os animais já anestesiados foram colocados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica aquecida (Heat Pad EFF422, Reino Unido). Os membros superiores foram fixados com fita adesiva a 90° em relação ao corpo e os inferiores, estendidos paralelamente ao corpo. Após o posicionamento, foi realizada a tricotomia da face ventral da região cervical e feita anestesia local com 0,3 ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Hipolabor, Brasil). Em seguida, foi feita uma incisão longitudinal medial na face ventral do pescoço, de aproximadamente 2 cm de extensão, com posterior divulsão dos tecidos. A traqueia foi exposta e puncionada com agulha

hipodérmica (13 X 4,5) para instilação, conforme a randomização, de 12 unidades de EPP (Elastase, Porcine Pancreas, Calbiochem, EUA) diluídas em 0,15 ml de solução tampão fosfato (PBS), ou do mesmo volume de PBS. A pele foi então suturada com fio Nylon 3-0 (Polysuture SP420, Brasil). Após a cirurgia, os animais foram observados até a recuperação anestésica e então acondicionados em gaiolas individuais onde receberam analgesia com 2 mg de tramadol (Cristália, Brasil) em biscoito a cada 12 horas por 48 horas.

5.3.2 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DE SEPSE E LESÃO PULMONAR AGUDA

Três semanas após a administração da elastase, os animais foram novamente randomizados para receber, por via intraperitoneal, LPS (*Escherichia coli* lipopolysaccharides - 055:B5, Sigma – Aldrich, Israel) na dose de 10 mg/Kg (KABIR et al., 2002), ou o mesmo volume de solução fisiológica estéril a 0,9% (SF).

5.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A partir da randomização realizada para instilação intratraqueal de EPP ou PBS e para a infusão intraperitoneal de LPS ou salina, foram constituídos quatro grupos (Figura 1):

- a) Grupo enfisema e LPS (E-LPS, n=6)
- b) Grupo enfisema e controle (E-C, n=6)
- c) Grupo controle e LPS (C-LPS, n=6)
- d) Grupo controle e controle (C-C, n=6)

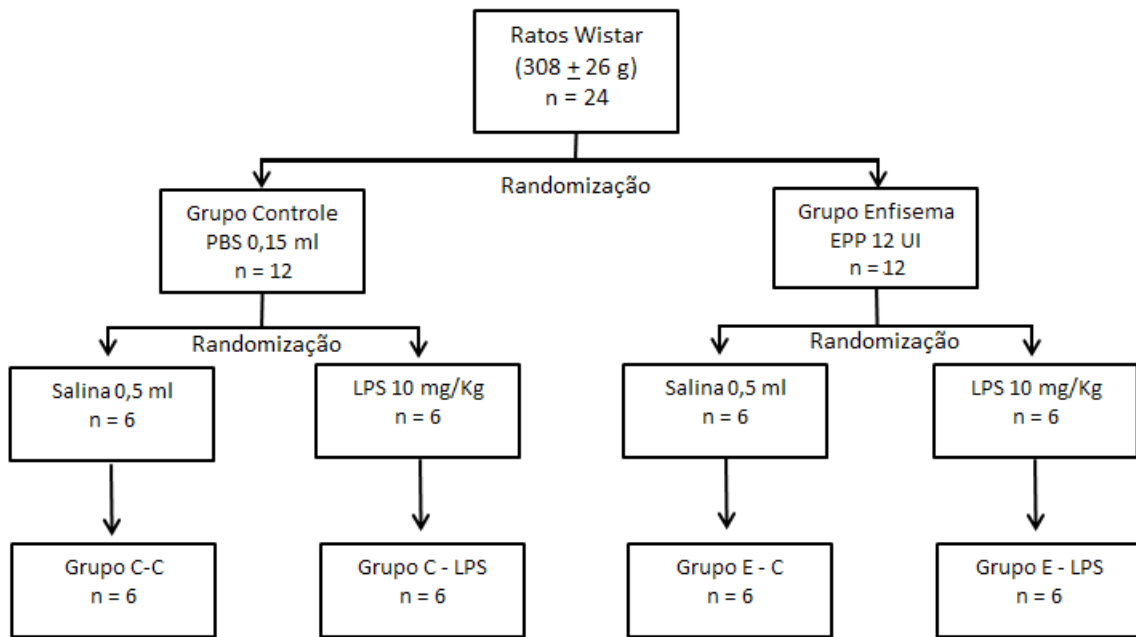


Figura 1. Distribuição dos animais entre os grupos experimentais.

EPP: elastase pancreática porcina; PBS: solução tampão fosfato; LPS:

Lipopolissacáride; E-LPS: enfisema-lipopolissacáride; E-C: enfisema-controle;

C-LPS: controle-lipopolissacáride; C-C: controle-controle.

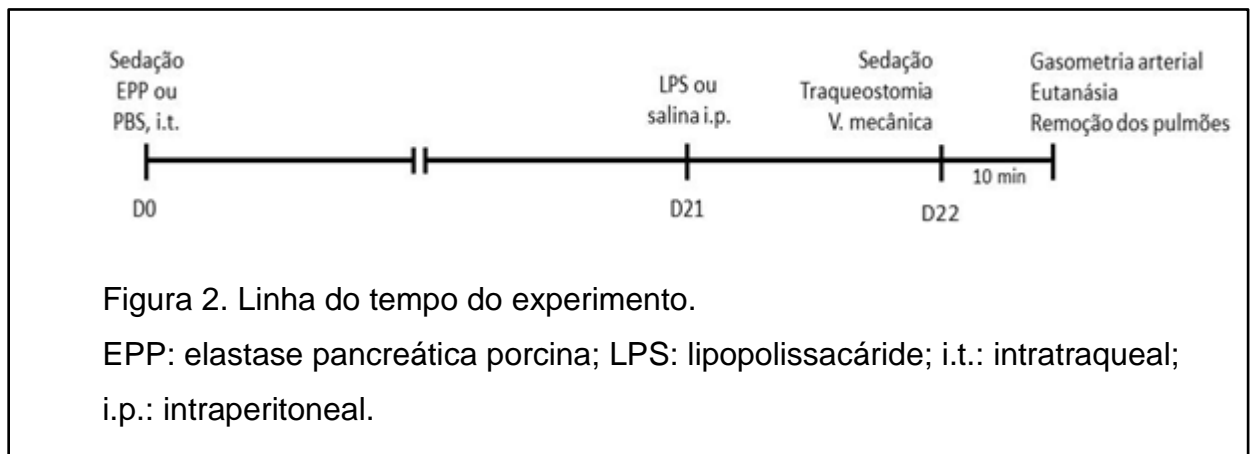
5.5 COLETA DE SANGUE ARTERIAL, EUTANÁSIA E REMOÇÃO DOS PULMÕES

Vinte e quatro horas após a administração do LPS, os animais foram novamente pesados, anestesiados e posicionados como descrito anteriormente. Foi feita a incisão medial na face ventral da região cervical com divulsão dos tecidos e exposição completa do terço proximal da traqueia. Com uma lâmina de bisturi número 23 (Maxicor, Brasil) foi feita uma incisão na traqueia, entre seus anéis de cartilagem, e imediatamente foi introduzida uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic[®], Clay-Adams Inc., EUA), com 1,5 mm diâmetro interno e 7,5 cm de comprimento, fixada na porção proximal por fio seda 2.0 (Polysuture SP420, Brasil). A artéria carótida comum direita foi dissecada e canulada com cateter de polietileno, 20 G (Arrow, EUA) com a finalidade de coletar sangue para a realização de gasometria arterial e administração de medicamentos.

Os animais foram mantidos em posição supina e acoplados, através da traqueostomia, a ventilação mecânica (Inspira ASV, Harvard Apparatus, EUA). Foi realizado bloqueio neuromuscular com rocurônio (Eurofarma, Brasil) (1 mg/Kg) através do cateter inserido na carótida e os animais foram mantidos em ventilação mecânica, para estabilização, com os seguintes parâmetros: modo ventilatório volume-controlado, volume corrente (V_T) de 6 ml/Kg, frequência respiratória (FR) de 80 incursões por minuto, relação inspiração:expiração (I:E) de 1:2, FIO_2 de 100% e PEEP de 5 cmH₂O. Ao término de 10 minutos de ventilação mecânica, foi coletado sangue pelo cateter inserido na carótida e os animais foram submetidos a eutanásia por exsanguinação através do mesmo cateter.

Para manutenção dos pulmões insuflados após suas retiradas do tórax, foi realizada pausa inspiratória no ventilador e a traqueia foi ocluída por fio de algodão.

O tórax foi aberto, a parede torácica anterior removida, a porção abdominal do esôfago identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática. As estruturas do pescoço foram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça presa ao esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traqueia foi seccionada acima do local ocluído pelo fio de algodão e, posteriormente, o esôfago e o coração separados dos pulmões e das vias aéreas por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. O brônquio fonte direito foi ocluído por um fio de algodão e o pulmão direito foi mantido insuflado para análise histológica, enquanto o pulmão esquerdo foi utilizado para o LBA. A figura 2 mostra o fluxo do experimento ao longo do tempo.



5.6 VARIÁVEIS ANALISADAS

5.6.1 TROCAS GASOSAS

Amostra de aproximadamente 0,3 ml de sangue arterial foi coletada através do cateter inserido na carótida, com seringa heparinizada, ao término da ventilação mecânica. O sangue foi analisado pelo gasômetro (ABL90 Flex Radiometer, Dinamarca) para determinação dos seguintes parâmetros: pH, PaO₂, PaCO₂, e bicarbonato (HCO₃).

5.6.2 LAVADO BRONCOALVEOLAR

Para obtenção do LBA, o brônquio fonte direito foi canulado e 5 ml de PBS contendo ácido etilenodiamino tetracético (10 nM) foram instilados e aspirados lentamente por três vezes. O LBA obtido foi centrifugado e submetido à contagem total e diferencial de células e à dosagem de albumina.

A contagem total de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) após a diluição das amostras em uma solução de Turk (2% ácido acético). O sedimento de células foi diluído em PBS e depois corado pela técnica de May-Grunwald para contagem diferencial de células, sendo esta feita sobre um mínimo de 300 células.

5.6.3 DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE PULMONAR

Para avaliação da permeabilidade capilar pulmonar, a albumina foi dosada no LBA e no soro, coletados no momento da eutanásia, pelo método do verde de bromocresol (Labtest Diagnostics, Brasil). A razão albumina do LBA/albumina do soro foi então determinada.

5.6.4 HISTOLOGIA

O lobo inferior do pulmão esquerdo, mantido inflado, foi separado do restante do órgão e fixado em formaldeído tamponado a 10% por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas a banhos em uma série crescente de álcool etílico e diafanizadas em xilol para posterior impregnação em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais do parênquima pulmonar do lobo inferior, com 4 μm de espessura. Após a montagem do material em lâminas de vidro, os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina para análise histopatológica do enfisema e da LPA. Todas as lâminas foram analisadas por patologista sem conhecimento dos grupos experimentais.

5.6.5 MORFOMETRIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ENFISEMA PULMONAR

Para a quantificação do enfisema, foi realizada a morfometria para a determinação do diâmetro alveolar médio (Lm) nas lâminas coradas com

hematoxilina-eosina (DUNNILL, 1962). Foram analisados dez campos por animal, com aumento de 100X, sendo excluídos aqueles com predominância de grandes vasos ou brônquios. Um retículo composto por 50 retas e 100 pontos foi adaptado à ocular do microscópio de luz convencional (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) e cada campo foi fotografado utilizando o programa Axiovision semi-automático versão 4.5 para Windows (Zeiss, Jena, Alemanha) (figura 3). O L_m foi determinado pela seguinte fórmula (equação 1):

$$L_m = \frac{L_{tot}}{L_i}$$

Onde L_{tot} é o comprimento total das retas e L_i é o número de vezes em que as estruturas alveolares interceptaram as retas.

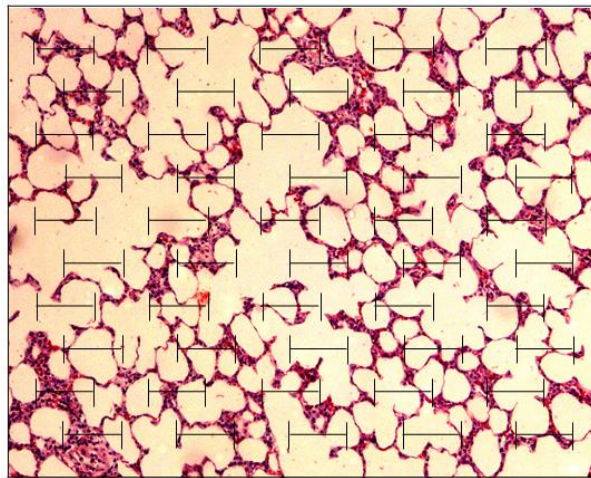


Figura 3. Retículo com 100 pontos e 50 linhas para morfometria.

Corte histológico de parênquima pulmonar corado com H&E, aumento final de 100 X.

5.6.6 HISTOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DO DANO TECIDUAL PULMONAR

Para avaliação da LPA, o escore de lesão pulmonar aguda recomendado pela ATS (MATUTE-BELLO, et al., 2011) foi determinado utilizando o microscópio de luz convencional (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha). Neste escore foram avaliados os seguintes parâmetros: número de neutrófilos no interstício (incluindo aqueles próximos aos capilares); número de neutrófilos no espaço alveolar; formação de membrana hialina; presença de debri protéico no espaço alveolar (como filamentos de fibrina) e espessura da parede alveolar. Para obtenção do escore foram avaliados 20 campos diferentes em cada lâmina, com aumento de 400X, sendo que pelo menos 50% de cada campo deveria estar preenchido por alvéolos pulmonares. Os campos compostos predominantemente por brônquios ou grandes vasos foram excluídos da análise. Cada um dos cinco achados histológicos foi graduado de acordo com o esquema apresentado na tabela 1. Para gerar o escore, foi realizada a soma dos pontos obtidos em cada campo analisado, para cada uma das cinco variáveis independentes. Estes pontos foram usados em uma fórmula, que aplica pesos para cada variável, com base em sua relevância na caracterização da lesão pulmonar (equação 2).

Tabela 1. Escore de lesão pulmonar preconizado pela *American Thoracic Society*

Parâmetros	Escore por campo		
	0	1	2
A. Neutrófilos no espaço alveolar	Nenhum	1-5	>5
B. Neutrófilos no espaço intersticial	Nenhum	1-5	>5
C. Membrana hialina	Nenhum	1	>1
D. Debrí protéico preenchendo o espaço aéreo	Nenhum	1	>1
E. Espessamento do septo alveolar	< 2x	2x-4x	>4x

Equação 2:

$$\text{Escore} = \frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{\text{Número de campos} \times 100}$$

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão, enquanto os dados não paramétricos foram expressos como mediana (intervalo interquartil). Os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Tukey quando necessário. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney quando necessário. A correção de Bonferroni foi aplicada para as análises repetidas. A diferença foi considerada estatisticamente significativa com resultado de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc, Illinois, EUA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma do artigo intitulado “*Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal LPS injection in Wistar rats*” (Apêndice A), o qual foi submetido à revista *Critical Care* (Anexo B).

6.1 RESUMO DO ARTIGO

Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal lipopolysaccharide injection in Wistar rats.

Lídia Maria Carneiro da Fonseca^{1,2}, Maycon Moura Reboredo^{1,2}, Leda Marília Fonseca Lucinda^{1,2}, Aydra Mendes Almeida Bianchi^{1,2}, Fernando Fonseca Reis^{1,2}, Thaís Fernanda Fazza^{1,2}, Maria Aparecida Esteves Rabelo¹, Júlio César Abreu Oliveira¹, Bruno do Valle Pinheiro^{*1,2}

1. Pulmonary Research Laboratory, Federal University of Juiz de Fora, Av. Eugênio do Nascimento - s/nº, Dom Bosco, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brazil

2. Center of Reproductive Biology, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Khelmer - s/n, Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36036-900, Brazil

*Corresponding author: Rua Benjamin Constant, 1044/1001, Santa Helena Juiz de Fora – Minas Gerais, 36015-400, Brazil

Lídia Maria Carneiro da Fonseca: lidiamariacarneiro@gmail.com

Maycon Moura Reboredo: mayconreboredo@yahoo.com.br

Leda Marília Fonseca Lucinda: ledamarilia@yahoo.com.br

Aydra Mendes Almeida Bianchi: aydra@ig.com

Fernando Fonseca Reis: fernandocajuri@yahoo.com.br

Thais Fernanda Fazza: thaisfazza@hotmail.com

Maria Aparecida Esteves Rabelo: maerabelo@gmail.com

Júlio César Abreu Oliveira: julioabreuoliveira@gmail.com

Bruno do Valle Pinheiro: bvallepinheiro@gmail.com

Abstract

Introduction: The response of lungs with emphysema to a systemic insult such as extrapulmonary sepsis is not known. Structural and inflammatory abnormalities in lungs caused by this condition might alter their response to sepsis and thus influence the incidence and severity of acute lung injury (ALI). We therefore aimed to compare the severity and extension of ALI in response to intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS) injection in rats with and without emphysema induced by elastase.

Methods: Adult male Wistar rats were randomized into 4 groups, each of them with 6 animals: control (C-C), emphysema without sepsis (E-C), normal lung with sepsis (C-LPS) and emphysema with sepsis (E-LPS). Emphysema was induced by intratracheal instillation of elastase (12 IU/animal). Three weeks later, sepsis was induced by intraperitoneal *Escherichia coli* LPS injection (10 mg/kg). Euthanasia and the following analysis were performed 24 hours after sepsis induction: blood gas measures, bronchoalveolar lavage (BAL), lung permeability and histology. Parametric data were expressed as mean \pm standard deviation, whereas non-parametric data were expressed as median (interquartile range).

Results: Significant increase in lung injury score was observed in the C-LPS [0.62 (0.19)] and E-LPS [0.59 (0.13)] groups compared to C-C [0.11 (0.09)] and E-C [0.15 (0.05)] ($p < 0.05$) Total cell and neutrophil counts in the BAL were also significantly higher in the groups that received LPS ($p < 0.05$). When both groups that received LPS (E-LPS and C-LPS) were compared, the group with emphysema showed greater total cell and neutrophil counts in the BAL. Animals in the group E-LPS showed significant increase in alveolocapillary membrane permeability, demonstrated

by higher BAL/serum albumin ratio, compared to E-C and C-C groups. There were no significant differences in the gas exchange levels among the groups.

Conclusions: The presence of emphysema induced by elastase increases the inflammatory response in the lungs to a systemic stimulus, represented in this model by the intraperitoneal injection of LPS.

Keywords: pulmonary emphysema, sepsis, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, pancreatic elastase, lipopolysaccharides.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A forma como pulmões com enfisema respondem a uma agressão sistêmica como a sepse não é conhecida. É possível que as alterações estruturais e imunológicas promovidas pelo enfisema nos pulmões modifiquem a resposta dos mesmos à sepse e, desta forma, influenciem no desenvolvimento de SDRA. Neste estudo nós comparamos a resposta inflamatória aguda secundária à injeção intraperitoneal de LPS em ratos Wistar com e sem enfisema induzido por elastase. Animais com enfisema desenvolveram inflamação mais acentuada em resposta à injeção intraperitoneal de LPS como demonstrado por maior contagem total de células e de neutrófilos no LBA. Esses animais apresentaram também lesão mais intensa da membrana alvéolo-capilar, inferida pelo aumento da razão da albumina LBA/soro. Maior inflamação basal foi encontrada nos animais que receberam elastase, demonstrada por número aumentado de células totais, neutrófilos e macrófagos no LBA dos animais com enfisema, quando comparados aos seus controles normais. O último achado está em consonância com o que é observado em pacientes com enfisema e poderia justificar a resposta pulmonar mais acentuada à sepse encontrada nesses animais. Entretanto, nós não estudamos os mecanismos implicados na resposta mais intensa à sepse nos pulmões com enfisema e esses devem ser investigados. Nossos achados sugerem que a presença de enfisema associa-se à maior predisposição à LPA frente a estímulos sistêmicos. Portanto, no cuidado de pacientes com DPOC expostos às agressões inflamatórias agudas, deve-se estar atento para a ocorrência de SDRA tanto para a realização do diagnóstico precoce e quanto para que sejam tomadas medidas que minimizem a lesão.

8 CONCLUSÃO

A presença de enfisema aumenta a inflamação pulmonar em resposta a uma agressão sistêmica, representada neste trabalho, pela injeção intraperitoneal de LPS. A inflamação persistente nos pulmões com enfisema pode explicar essa resposta mais intensa. Dessa forma, o cuidado de pacientes com DPOC expostos a fatores de risco para SDRA, deve conter medidas para a prevenção de agressões adicionais e para o diagnóstico precoce da síndrome.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, New York, v. 20, n. 6, p. 864-874, 1992.

American Lung Association/ Health Education Division. National Health Interview Survey Raw Data: Trends in COPD (chronic bronchitis and emphysema): morbidity and mortality. 2011. Disponível em: <www.lung.org > Acesso em: 12 mai. 2015.

AGUSTI, A. et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e37483, 2012.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, New York, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.

ANTHONISEN, N. R.; CONNETT, J. E.; MURRAY, R. P. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 166, n. 5, p. 675-679, 2002.

ANTUNES, M. A. et al. Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. **Respir Res**, London, v. 15, n.1, p. 118, 2014.

BAINES, K. J.; SIMPSON, J. L.; GIBSON, P. G. Innate immune responses are increased in chronic obstructive pulmonary disease. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e18426, 2011.

BALDI, S. et al. Relationship between extent of pulmonary emphysema by high-resolution computed tomography and lung elastic recoil in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 164, n. 4, p. 585-589, 2001.

BANNERMAN, D. D.; GOLDBLUM, S. E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 284, n. 6, p. L899-914, 2003.

BARNES, P. J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. **Copd**, London, v. 1, n. 1, p. 59-70, 2004.

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

BECK-SCHIMMER, B. et al. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. **Respir Res**, London, v. 6, p. 61, 2005.

BELLOFIORE, S. et al. Effects of elastase-induced emphysema on airway responsiveness to methacholine in rats. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 66, n. 2, p. 606-612, 1989.

BERENSON, C. S. et al. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. **J Infect Dis**, Chicago, v. 194, n. 10, p. 1375-1384, 2006.

BERENSON, C. S. et al. Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 174, n. 1, p. 31-40, 2006.

BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 149, n. 3, p. 818-824, 1994.

BETSUYAKU, T. et al. Decline in FEV(1) in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. **Respiration**, Basel, v. 67, n. 3, p. 261-267, 2000.

BLACKWELL, T. S. et al. Chemotactic gradients predict neutrophilic alveolitis in endotoxin-treated rats. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 159, n. 5, p. 1644-1652, 1999.

BOWLER, R. P.; BARNES, P. J.; CRAPO, J. D. The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Copd**, London, v. 1, n. 2, p. 255-277, 2004.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS**. Brasília, 2012. Disponível em: <www.datasus.gov.br> Acesso em: 10 mai. 2015.

BURGEL, P. R. et al. Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subjects. **Chest**, Chicago, v. 135, n. 4, p. 975-982, 2009.

CALFEE, C. S. et al. Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 183, n. 12, p. 1660-1665, 2011.

CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients. **Crit Care Med**, New York, v. 42, n. 3, p. 574-582, 2014.

CHRISTENSEN, T. G. et al. Irreversible bronchial goblet cell metaplasia in hamsters with elastase-induced panacinar emphysema. **J Clin Invest**, New York, v. 59, n. 3, p. 397-404, 1977.

CHUNG, K. F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J Suppl**, Copenhagen, v. 34, p. 50s-59s, 2001.

CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 64, p. 111-126, 1985.

COPELAND, S. et al. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. **Clin Diagn Lab Immunol**, Washington, v. 12, n. 1, p. 60-67, 2005.

DAMON, E. G.; MAUDERLY, J. L.; JONES, R. K. Early effects of intratracheal Instillation of elastase on mortality, Respiratory function, and pulmonary morphometry of F-344 rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, New York, v. 64, n. 3, p. 465-475, 1982.

DUNNILL, M. S. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. **Thorax**, London, v. 17, n. 4, p. 320-328, 1962.

DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. **American J Physiol**, Bethesda, v. 270, n. 1, p. L3-27, 1996.

ERIKSSON, S. Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. **Acta Med Scand**, Sotckholm, v. 432, p. 1-85, 1965.

FERNANDES, D. J.; BONACCI, J. V.; STEWART, A. G. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. **Curr Drug Targets**, Hilversum, v. 7, n. 5, p. 567-577, 2006.

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

FINLAY, G. A. et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 156, n. 1, p. 240-247, 1997.

FLETCHER, C.; PETO, R. The natural history of chronic airflow obstruction. **Br Med J**, London, v. 1, n. 6077, p. 1645-1648, 1977.

FUJIMOTO, K. et al. Clinical analysis of chronic obstructive pulmonary disease phenotypes classified using high-resolution computed tomography. **Respirol**, Carlton, v. 11, n. 6, p. 731-740, 2006.

GAN, W. Q. et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. **Thorax**, London, v. 59, n. 7, p. 574-580, 2004.

GANESAN, S. et al. Elastase/LPS-exposed mice exhibit impaired innate immune responses to bacterial challenge: role of scavenger receptor A. **Am J Pathol**, New York, v. 180, n. 1, p. 61-72, 2012.

Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2015. Disponível em <<http://www.goldcopd.org/>>. Acesso em 05 mai. 2015.

GREENE, K. E. et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 160, n. 6, p. 1843-1850, 1999.

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

GUGGER, M. et al. Extent of pulmonary emphysema in man and its relation to the loss of elastic recoil. **Clin Sci**, Oxford, v. 80, n. 4, p. 353-358, 1991.

HAMAKAWA, H. et al. Structure-function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Am J Respir Cell Mol Biol**, New York, v. 45, n. 3, p. 517-524, 2011.

HAN, M. K. et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 182, n. 5, p. 598-604, 2010.

HAN, M. K. et al. Clinical significance of radiologic characterizations in COPD. **Copd**, London, v. 6, n. 6, p. 459-467, 2009.

HANTOS, Z. et al. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 105, n. 6, p. 1864-1872, 2008.

HE, Z.; ZHU, Y.; JIANG, H. Inhibiting toll-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study. **Respir Res**, London, v. 10, p. 126, 2009.

HIRANO, S. Migratory responses of PMN after intraperitoneal and intratracheal administration of lipopolysaccharide. **Am J Physiol**, Philadelphia, v. 270, n. 5, p. L836-845, 1996.

HODGE, G. et al. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway. **Respirol**, Carlton, v. 18, n. 2, p. 369-376, 2013.

HODGE, S. et al. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. **Immunol Cell Biol**, Adelaide, v. 81, n. 4, p. 289-296, 2003.

HODGE, S. et al. Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 285, n. 2, p. L492-499, 2003.

HOFMANN, W.; KOBLINGER, L.; MARTONEN, T. B. Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. **Health Phys**, New York, v. 57, p. 41-46, 1989.

HOGG, J. C. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, London, v. 364, n. 9435, p. 709-721, 2004.

HOGG, J. C. et al. Lung structure and function in cigarette smokers. **Thorax**, London, v. 49, n. 5, p. 473-478, 1994.

HSIEH, S. J. et al. Prevalence and impact of active and passive cigarette smoking in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, New York, v. 42, n. 9, p. 2058-2068, 2014.

HURST, J. R. et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, Boston, v. 363, n. 12, p. 1128-1138, 2010.

INOUE, S. et al. Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 167, n. 5, p. 764-770, 2003.

JOHNSON, J. L. et al. Disparities in the respiratory burst between human and rat neutrophils. **J Leukoc Biol**, Winston-Salem, v. 65, n. 2, p. 211-216, 1999.

JONES, J. G. et al. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. **Lancet**, London, v. 1, n. 8159, p. 66-68, 1980.

KABIR, K. et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. **Shock**, Augusta, v. 17, n. 4, p. 300-303, 2002.

KARADAG, F. et al. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. **Lung**, New York, v. 186, n. 6, p. 403-409, 2008.

KATO, S. et al. Endotoxin-induced chemokine expression in murine peritoneal mesothelial cells: the role of toll-like receptor 4. **J Am Soc Nephrol**, Baltimore, v. 15, n. 5, p. 1289-1299, 2004.

KATZENSTEIN, A. L.; BLOOR, C. M.; LEIBOW, A. A. Diffuse alveolar damage: the role of oxygen, shock, and related factors. A review. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 85, n. 1, p. 209-228, 1976.

KAUR, M.; SINGH, D. Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2. **J Pharmacol Experimental Ther**, Baltimore, v. 347, n. 1, p. 173-180, 2013.

KEATINGS, V. M. et al. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 153, n. 2, p. 530-534, 1996.

KIM, V.; CRINER, G. J. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 187, n. 3, p. 228-237, 2013.

LANDIS, S. H., et al. Continuing to Confront COPD International Patient Survey: methods, COPD prevalence, and disease burden in 2012-2013. **Int J Chronic Obstr Pulm Dis**, Auckland, v. 9, p. 597-611, 2014.

LAPPERRE, T. S. et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. **Thorax**, London, v. 61, n. 2, p. 115-121, 2006.

LE, J.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **Lab Invest**, Baltimore, v. 56, n. 3, p. 234-248, 1987.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, New York, v. 31, n. 4, p. 1250-1256, 2003.

LI, G. et al. Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 183, n. 1, p. 59-66, 2011.

LI, X. Y. et al. Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability. **Thorax**, London, v. 51, n. 5, p. 465-471, 1996.

LIM, S. et al. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10 **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 162, n. 4, p. 1355-1360, 2000.

LINKO, R. et al. Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: a prospective cohort study. **Intensive Care Med**, New York, v. 35, n. 8, p. 1352-1361, 2009.

LIU, D. D.; HSU, Y. H.; CHEN, H. I. Endotoxin-induced acute lung injury is enhanced in rats with spontaneous hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oxford, v. 34, n. 1-2, p. 61-69, 2007.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, Cambridge, v. 106, n. 3, p. 259-262, 2001.

LUCAS, I. H. Comparação entre ventilação com volume controlado e variável em modelo de enfisema pulmonar. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2015.

LUCEY, E. C. et al. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 158, n. 2, p. 555-564, 1998.

LUTHJE, L. et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. **Respir Res**, London, v. 10, p. 7, 2009.

MACHADO, M. N. et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema in male and female mice. **Respir Physiol Neurobiol**, Amsterdam, v. 200, p. 90-96, 2014.

- MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S. D. Chronic obstructive pulmonary disease 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. **Thorax**, London, v. 57, n. 10, p. 908-914, 2002.
- MAJO, J.; GHEZZO, H.; COSIO, M. G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 17, n. 5, p. 946-953, 2001.
- MAKE, B. J. et al. A score to predict short-term risk of COPD exacerbations (SCOPEX). **Int J Chronic Obstr Pulm Dis**, Auckland, v. 10, p. 201-209, 2015.
- MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, Boston, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.
- MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. e442, 2006.
- MATUTE-BELLO, G. et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **Am J Respir Cell Mol Biol**, New York, v. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.
- MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 295, n. 3, p. L379-399, 2008.
- MENEZES, A. M., et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. **Lancet**, London, v. 366, n. 9500, p. 1875-1881, 2005.
- MESTAS, J.; HUGHES, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J Immunol**, Baltimore, v. 172, n. 5, p. 2731-2738, 2004.
- MIRAVITLLES, M. Cough and sputum production as risk factors for poor outcomes in patients with COPD. **Respir Med**, London, v. 105, n. 8, p. 1118-1128, 2011.
- MIRAVITLLES, M.; CALLE, M.; SOLER-CATALUNA, J. J. Clinical phenotypes of COPD: identification, definition and implications for guidelines. **Arch Bronconeumol**, Barcelona, v. 48, n. 3, p. 86-98, 2012.
- MORRIS, S. M. et al. Ultrastructural changes in hamster lung 15 min to 3 hr after exposure to pancreatic elastase. **Anat Rec**, Philadelphia, v. 215, n. 2, p. 134-143, 1986.
- MORRIS, S. M. et al. Ultrastructural changes in hamster lung four hours to twenty-four days after exposure to elastase. **Anat Rec**, Philadelphia, v. 201, n. 3, p. 523-535, 1981.
- MURPHY, T. F. et al. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 170, n. 3, p. 266-272, 2004.

OHBAYASHI, H. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. **Expert Opin Invest Drugs**, London, v. 11, n. 7, p. 965-980, 2002.

OWEN, C. A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease **Int J Chronic Obstr Pulm Dis**, Auckland, v. 3, n. 2, p. 253-268, 2008.

OWEN, C. A. et al. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. **J Cell Biol**, New York, v. 131, n. 3, p. 775-789, 1995.

PANG, B. et al. Diminished ICAM-1 expression and impaired pulmonary clearance of nontypeable Haemophilus influenzae in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema. **Infect Immun**, Washington, v. 76, n. 11, p. 4959-4967, 2008.

PEPE, P. E. et al. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. **Am J Surg**, New York, v. 144, n. 1, p. 124-130, 1982.

PHUA, J. et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 179, n. 3, p. 220-227, 2009.

PRESCOTT, E.; LANGE, P.; VESTBO, J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 8, n. 8, p. 1333-1338, 1995.

PRIETO, A. et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (immunoferon). **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 163, n. 7, p. 1578-1583, 2001.

PUGIN, J. et al. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med**, New York, v. 27, n. 2, p. 304-312, 1999.

RAETZ, C. R. et al. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **Faseb J**, Bethesda, v. 5, n. 12, p. 2652-2660, 1991.

RANIERI, V. M. et al. ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA**, Chicago, v. 307, n. 23, p. 2526-33, 2012.

RAO, N. V. et al. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 266, n. 15, p. 9540-9548, 1991.

REMICK, D. G. Pathophysiology of sepsis. **Am J Pathol**, New York, v. 170, n. 5, p. 1435-1444, 2007.

- RETAMALES, I. et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 164, n. 3, p. 469-473, 2001.
- RINCON, F. et al. The prevalence and impact of mortality of the acute respiratory distress syndrome on admissions of patients with ischemic stroke in the United States. **J Intensive Care Med**, Cambridge, v. 29, n. 6, p. 357-364, 2014.
- ROJAS, M. et al. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 288, n. 2, p. L333-341, 2005.
- RUTGERS, S. R. et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. **Thorax**, London, v. 55, n. 1, p. 12-18, 2000.
- RUTTEN-VAN MOLKEN, M. P. et al. Current and future medical costs of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in The Netherlands. **Respir Med**, London, v. 93, n. 11, p. 779-787, 1999.
- SAETTA, M. et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. **Am Rev Respir Dis**, New York, v. 147, n. 2, p. 301-306, 1993.
- SAJJAN, U. et al. Elastase- and LPS-exposed mice display altered responses to rhinovirus infection. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 297, n. 5, p. L931-944, 2009.
- SAPEY, E. et al. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 183, n. 9, p. 1176-1186, 2011.
- SCHLEIMER, R. P. Innate immune responses and chronic obstructive pulmonary disease: "Terminator" or "Terminator 2"? **Proc Am Thorac Soci**, New York, v. 2, n. 4, p. 342-346, 2005.
- SEEMUNGAL, T. A. et al. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 157, n. 5, p. 1418-1422, 1998.
- SETHI, S. Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. **Chest**, Chicago, v. 117, n. 5, p. 380s-385s, 2000.
- SETHI, S. et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, Boston, v. 347, n. 7, p. 465-471, 2002.
- SETHI, S. et al. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. **Chest**, Chicago, v. 118, n. 6, p. 1557-1565, 2000.
- SHAPIRO, S. D. et al. Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. **Am J Pathol**, New York, v. 163, n. 6, p. 2329-2335, 2003.

SHAYKHIEV, R.; CRYSTAL, R. G. Innate immunity and chronic obstructive pulmonary disease: a mini-review. **Gerontology**, Basel, v. 59, n. 6, p. 481-489, 2013.

SHAYKHIEV, R. et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **J Immunol**, Baltimore, v. 183, n. 4, p. 2867-2883, 2009.

SIGURDSSON, M. I. et al. Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. **Acta Anaesthesiol Scand**, Copenhagen, v. 57, n. 1, p. 37-45, 2013.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, London, v. 8, n. 4, p. R251-260, 2004.

SMITH, K. R.; MEHTA, S. The burden of disease from indoor air pollution in developing countries: comparison of estimates. **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v. 206, n. 4-5, p. 279-289, 2003.

SNIDER G. L., et al. The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of Lung Diseases, Workshop. **Am Rev Respir Dis**, New York, v. 132, n. 1, p. 182-185, 1985.

STEINMULLER, M. et al. Endotoxin induced peritonitis elicits monocyte immigration into the lung: implications on alveolar space inflammatory responsiveness. **Respir Res**, London, v. 7, p. 30, 2006.

STONE, P. J. et al. Alpha 1-protease inhibitor moderates human neutrophil elastase-induced emphysema and secretory cell metaplasia in hamsters. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 3, n. 6, p. 673-678, 1990.

TAPPING, R. I. et al. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. **J Immunol**, Baltimore, v. 165, n. 10, p. 5780-5787, 2000.

TAYLOR, A. E. et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 35, n. 5, p. 1039-1047, 2010.

THILLE, A. W. et al. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 187, n. 7, p. 761-7, 2013.

TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; ULEVITCH, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. **J Exp Med**, New York, v. 164, n. 3, p. 777-793, 1986.

TOKAIRIN, Y. et al. Enhanced immediate inflammatory response to Streptococcus pneumoniae in the lungs of mice with pulmonary emphysema. **Respir**, Carlton, v. 13, n. 3, p. 324-332, 2008.

TOY, P. et al. Transfusion-related acute lung injury: incidence and risk factors. **Blood**, New York, v. 119, n. 7, p. 1757-1767, 2012.

USA. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Health statistics. **National Vital Statistics Report: Deaths: Final Data for 2010**. v. 61, n. 4, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr61/nvsr61_04.pdf> Acesso em: 12 mai. 2015.

VAN DE LEST, C. H. et al. Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 8, n. 2, p. 238-245, 1995.

VECCHIOLA, A. et al. Differences in acute lung response to elastase instillation in two rodent species may determine differences in severity of emphysema development. **Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol**, Bethesda, v. 301, n. 1, p. R148-158, 2011.

VEERAVAGU, A. et al. Acute lung injury in patients with subarachnoid hemorrhage: a nationwide inpatient sample study. **World Neurosurgery**, New York, v. 82, n. 1-2, p. e235-241, 2014.

VEERAVAGU, A. et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in patients with vertebral column fracture(s) and spinal cord injury: a nationwide inpatient sample study. **Spinal Cord**, Houndmills, v. 51, n. 6, p. 461-465, 2013.

VILLAR, J. et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. **Intensive Care Med**, New York, v. 37, n. 12, p. 1932-1941, 2011.

WANG, D.; WANG, Y.; LIU, Y. N. Experimental pulmonary infection and colonization of *Haemophilus influenzae* in emphysematous hamsters. **Pulm Pharmacol Ther**, London, v. 23, n. 4, p. 292-299, 2010.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1334-1349, 2000.

WERT, S. E. et al. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 97, n. 11, p. 5972-5977, 2000.

WINKLER, G. C. Review of the significance of pulmonary intravascular macrophages with respect to animal species and age. **Exp Cell Biol**, v. 57, n. 6, p. 281-286, 1989.

WOUTERS, E. F.; CREUTZBERG, E. C.; SCHOLS, A. M. Systemic effects in COPD. **Chest**, Chicago, v. 121, n. 5, p. 127s-130s, 2002.

WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, Washington, v. 249, n. 4975, p. 1431-1433, 1990.

YOKOYAMA, E. et al. An emphysema model in rats treated intratracheally with elastase. **Environ Res**, New York, v. 42, n. 2, p. 340-352, 1987.

ZANON, F. et al. Sepsis in the intensive care unit: etiologies, prognostic factors and mortality. **Rev Bra Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 128-134, 2008.

ZHENG, T. et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. **J Clin Invest**, New York, v. 106, n. 9, p. 1081-1093, 2000.

APÊNDICES

ANEXO A

Comprovante do parecer da comissão de ética na experimentação animal (CEEA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais

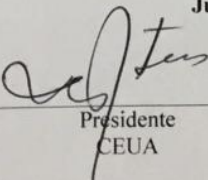
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 066/2013 – CEUA sobre “AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÃO PULMONAR AGUDA APÓS SEPSE POR ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATOS WISTAR COM ENFISEMA INDUZIDO POR ELASTASE”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MAYCON DE MOURA REBOREDO, com a colaboração de BRUNO DO VALLE PINHEIRO, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, AYDRA MENDES ALMEIDA BRANCHI, FERNANDO FONSECA DOS REIS and LÍDIA MARIA CARNEIRO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 11/02/2014. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 40 ratos (40 machos), da linhagem Wistar, conforme solicitado e que serão entregues no período de 10/03/2014 A 04/08/2014.

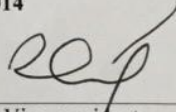
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 066/2013 - CEUA about “AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÃO PULMONAR AGUDA APÓS SEPSE POR ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATOS WISTAR COM ENFISEMA INDUZIDO POR ELASTASE” under responsibility of MAYCON DE MOURA REBOREDO, with collaboration of BRUNO DO VALLE PINHEIRO, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, AYDRA MENDES ALMEIDA BRANCHI, FERNANDO FONSECA DOS REIS and LÍDIA MARIA CARNEIRO- is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 11/02/2014. For the development of this research 40 rats (40 male) of the Wistar lineage, will be released as requested and they will be delivered in the period of 10/03/2014 A 04/08/2014..

Juiz de for a, 17 de Fevereiro de 2014



Presidente
CEUA



Vice-presidente
CEUA

ANEXO B

Comprovante de submissão do artigo “*Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal lipopolysaccharide injection in Wistar rats*”.

Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal lipopolysaccharide injection in Wistar rats

Lídia Maria Carneiro da Fonseca, M.D; Maycon Moura Reboredo, M.D., PhD; Leda Marília Fonseca Luncinda, PhD; Aydra Mendes Almeida Bianchi, M.D.; Fernando Fonseca Reis, M.D.; Maria Aparecida Esteves Rabelo, M.D.; Thais Fernanda Fazza, R.R.T.; Julio César Abreu Oliveira, M.D., PhD; Bruno do Valle Pinheiro, M.D., PhD

Critical Care

Dear Dr Pinheiro,

Thank you for submitting your manuscript 'Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal lipopolysaccharide injection in Wistar rats' to Critical Care.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://cric.edmgr.com/>

Best wishes,

Editorial Office

Critical Care

<http://ccforum.com/>