

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

Maria Aparecida Esteves Rabelo

**Desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por instilação
intratraqueal de lipopolissacáride em um modelo animal de enfisema pulmonar
por administração de elastase**

Juiz de Fora - MG

2017

Maria Aparecida Esteves Rabelo

**Desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por instilação
intratraqueal de lipopolissacáride em um modelo animal de enfisema pulmonar
por administração de elastase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro

Coorientadora: Profa. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda

Juiz de Fora - MG

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaboração: Sabrina Valadão Bibliotecária CRB6-2542

R114d Rabelo, Maria Aparecida Esteves

Desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida instilação intratraqueal de lipopolissacáride em um modelo animal de enfisema pulmonar por administração de elastase /Maria Aparecida Esteves Rabelo. – Juiz de Fora, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

69 f.; 29,7 cm.

Orientador: Bruno do Valle Pinheiro
Coorientadora: Leda Marília Fonseca Lucinda

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora. Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, 2016.

Referências Bibliográficas: p. 46-57.

1. Enfisema. 2. Lesão pulmonar aguda. 3. Modelo experimental. 4. Lipopolissacarídeo. 5. Intratraqueal. I. Pinheiro, Bruno do Valle. II. Lucinda, Leda Marília Fonseca. III. Título.

CDD 616.24

Maria Aparecida Esteves Rabelo

Desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por instilação intratraqueal de lipopolissacáride em um modelo animal de enfisema pulmonar por administração de elastase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovado em: Juiz de Fora-MG, ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Bruno Curty Bergamini
HGEJF - Hospital Geral do Exército, Juiz de Fora

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

Profa. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro pela orientação, paciência e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

A minha coorientadora Prof^a Dr^a. Leda Marilia Fonseca Lucinda pela orientação desse trabalho, pela paciência e auxílio necessário durante a execução desse experimento.

Ao Prof.Dr. Maycon de Moura Reboredopela participação valiosa e fundamental durante o experimento.

A Lidia Maria Carneiro da Foncesca pela valiosa participação durante a execução desse experimento.

Aos demais membros do Núcleo de Pneumologia, pelo aprendizado constante durante as nossas reuniões.

Gostaria de em especial agradecer ao Aduino Regino da Silva pela dedicação na execução impecável da técnica histológica.

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

A rede Mineira TOXIFAR e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para execução desse projeto.

RESUMO

Introdução: A relação entre o enfisema e a lesão pulmonar aguda (LPA) ainda não está bem definida. O objetivo deste estudo foi comparar a gravidade da LPA em resposta à instilação intratraqueal de lipopolissacáride (LPS) em ratos com e sem enfisema. **Métodos:** Vinte e quatro ratos Wistar machos adultos foram randomizados para quatro grupos: grupo controle (G-C), grupo LPA (G-LPA), grupo enfisema (G-E) e grupo enfisema com LPA (G-E-LPA). O enfisema foi induzido por instilação intratraqueal de elastase (12 UI). Após três semanas, os animais dos grupos LPA receberam LPS intratraquealmente (2 mg/Kg). A eutanásia e as seguintes análises foram realizadas 24 horas após a indução de LPA: medidas dos gases sanguíneos, lavado broncoalveolar (LBA), expressão de RNAm de mediadores inflamatórios e histologia pulmonar. **Resultados:** Os animais dos grupos G-LPA ($0,55 \pm 0,15$) e G-E-LPA ($0,69 \pm 0,08$) apresentaram maior score de LPA em relação ao G-C ($0,12 \pm 0,04$) e G-E ($0,60 \pm 0,04$) ($p < 0,05$). A contagem total de células (G-E = $3,09 \pm 0,83$; G-LPA = $4,45 \pm 1,90$; G-E-LPA = $5,90 \pm 2,10$; G-C = $0,73 \pm 0,37 \times 10^5$) e de neutrófilos (G-E = $0,69 \pm 0,35$; G-LPA = $2,53 \pm 1,09$; G-E-LPA = $3,86 \pm 1,40$; G-C = $0,09 \pm 0,07 \times 10^5$) no LBA foram maiores nos grupos G-E, G-LPA e G-E-LPA quando comparados ao G-C ($p < 0,05$). As expressões de RNAm de IL-6, TNF- α e CXCL2 foram maiores nos animais que receberam LPS (G-LPA e G-E-LPA) em comparação com G-C e G-E ($p < 0,05$). Embora não haja diferenças estatísticas entre os animais com e sem enfisema em resposta à instilação de LPS, observou-se uma tendência de maior score de LPA e celularidade no LBA no G-E-LPA. O G-E-LPA também mostrou uma razão LBA/albumina sérica aumentada. **Conclusão:** A presença de enfisema foi associada a uma tendência de aumento da resposta inflamatória pulmonar secundária à instilação intratraqueal de LPS.

Palavras-chave: Enfisema. Lesão pulmonar aguda. Modelo experimental. Lipopolissacarídeo. Intratraqueal.

ABSTRACT

Introduction: The response of lungs with emphysema to an acute lung injury (ALI) remains unclear. The aim of this study was to compare the severity of ALI in response to intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) in rats with and without emphysema. **Methods:** Twenty four adult male Wistar rats were randomized to four groups: control group (C-G), ALI group (ALI-G), emphysema group (E-G), emphysema and ALI group (E-ALI-G). The emphysema was induced by intratracheal instillation of elastase (12 UI). After three weeks, the animals of ALI groups received LPS intratracheally (2 mg/Kg). Euthanasia and the following analysis were performed 24 hours after ALI induction: blood gas measures, bronchoalveolar lavage (BAL), mRNA expression of inflammatory mediators and lung histology. **Results:** The animals of ALI-G (0.55 ± 0.15) and E-ALI-G (0.69 ± 0.08) showed a higher ALI score compared to C-G (0.12 ± 0.04) and E-G (0.16 ± 0.04) ($p < 0.05$). Total cell count (E-G = 3.09 ± 0.83 ; ALI-G = 4.45 ± 1.90 ; E-ALI-G = 5.90 ± 2.10 ; C-G = $0.73 \pm 0.37 \times 10^5$) and neutrophil count (E-G = 0.69 ± 0.35 ; ALI-G = 2.53 ± 1.09 ; E-ALI-G = 3.86 ± 1.40 ; C-G = $0.09 \pm 0.07 \times 10^5$) in the BAL were higher in the groups E-G, ALI-G and E-ALI-G when compared to C-G ($p < 0.05$). The IL-6, TNF- α , and CXCL2 mRNA expressions were higher in the animals that received LPS (ALI-G and E-ALI-G) compared to the C-G and E-G ($p < 0.05$). Although there were no statistical differences between the animals with and without emphysema in response to LPS instillation, we observed a trend of higher ALI score and BAL cellularity in the E-ALI-G. The E-ALI-G also showed an increased BAL/serum albumin ratio. **Conclusion:** The presence of emphysema was associated with a trend of increase in the inflammatory pulmonary response to intratracheal LPS instillation.

Keywords: Emphysema. Acute lung injury. Experimental model. Lipopolysaccharide. Intratracheal.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Escore de lesão pulmonar preconizado pela American Thoracic Society Society	46
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Desenho da alocação de grupos experimentais41
- FIGURA 2:** Retículo com 100 pontos e 50 linhas para morfometria. Corte histológico de parênquima pulmonar corado com H&E, aumento final de 100 X.45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	American Thoracic Society
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
CPAP	Pressão positiva contínua nas vias aéreas
CXCL2	Quimiocina ligante 2
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPP	Elastase pancreática de porco
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
FR	Frequência respiratória
GOLD	Iniciativa global para doença pulmonar obstrutiva crônica
HCO ₃	Bicarbonato
ICAM	Molécula de adesão intercelular
INF- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LP _{IV}	Lesão pulmonar induzida pela ventilação
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MMP	Metaloproteinase de matriz
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono (CO ₂) no sangue arterial
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF-B	Fator de crescimento derivado de plaquetas fator-B
PEEP	Pressão positiva no final da expiração
PBS	Solução tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico

RNA _m	Ácido ribonucleico (mensageiro)
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TGF	Fator de crescimento transformador
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VT	Volume corrente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA	16
2.2 MODELOS ANIMAIS DE ENFISEMA.....	21
2.3 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.....	24
2.4 MODELOS ANIMAIS DE LESÃO PULMONAR AGUDA.....	30
2.5 INTERAÇÃO ENTRE ENFISEMA E SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.....	33
3 HIPÓTESES	36
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5 MÉTODOS	38
5.1 ANIMAIS.....	38
5.2 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO	38
5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	39
5.3.1 Protocolo para indução de enfisema por elastase.....	39
5.3.2 Protocolo para indução da lesão pulmonar aguda	40
5.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	40
5.5 COLETA DE SANGUE ARTERIAL, EUTANÁSIA E REMOÇÃO DOS PULMÕES	41
5.6 VARIÁVEIS ANALISADAS	43
5.6.1 Histopatologia.....	43
5.6.1.1 Morfometria para quantificação do enfisema pulmonar.....	44
5.6.1.2 Avaliação da lesão pulmonar	45
5.6.2 Lavado broncoalveolar	47
5.6.3 Extração de RNA e real time PCR (qPCR).....	47
5.6.4 Trocas gasosas	49
5.6.5 Determinação da permeabilidade pulmonar.....	49
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

6.1 RESUMO DO ARTIGO.....	51
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
8 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A.....	67
ANEXO B.....	68

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma enfermidade que se caracteriza pela obstrução ao fluxo aéreo, a qual decorre de alterações estruturais das pequenas vias aéreas e/ou do parênquima pulmonar, cujas participações podem variar entre os pacientes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A DPOC é altamente prevalente e também apresenta alta morbidade e mortalidade. Ela causa expressivos impactos econômicos e sociais, com perspectiva de ser a quinta causa de aposentadoria por doença no mundo, em 2020 (SEEMUNGAL; HURST; WEDZICHA, 2009).

Um dos componentes da DPOC é o enfisema, caracterizado por alargamento dos espaços aéreos distais com redução da força elástica do parênquima e destruição das paredes das vias aéreas, devido ao desequilíbrio protease-antiprotease, levando à quebra do parênquima pulmonar, mecanismo fundamental na patogênese do enfisema. Há, portanto, intensa perda de tecido elástico, lesão de célula epitelial e endotelial e reparação limitada (MACNEE, 2007).

No enfisema, ocorre ativação das imunidades inata e adquirida, através da ativação de receptores *Toll-like* (TLRs) nas células epiteliais e macrófagos presentes nos alvéolos. A ativação desses receptores aumenta a expressão do fator nuclear Kappa B nessas células, fator que pode modular a taxa de transcrição de muitas citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ (DI STEFANO et al., 2002; BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011). Este estado inflamatório não se restringe aos pulmões, sendo evidenciados níveis elevados de citocinas no soro desses pacientes (BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011; AGUSTI et al., 2012). Além disso, alguns

estudos sugerem comprometimento da resposta imune, sobretudo a inata, em pacientes com enfisema, o que pode prejudicar a defesa contra a agressão de outros patógenos (SCHLEIMER, 2005; SHAYKHIEV; CRYSTAL, 2013). Essas alterações imunológicas pulmonares e sistêmicas podem interferir na lesão pulmonar aguda (LPA) presente na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), visto que esta também decorre de respostas imunes e inflamatórias com consequente lesão da membrana alvéolo-capilar.

A SDRA é uma condição de insuficiência respiratória aguda decorrente da lesão, de natureza inflamatória e difusa, da barreira constituída pelo epitélio alveolar e pelo endotélio, a qual determina aumento da permeabilidade vascular e disfunção do sistema surfactante, resultando em edema e colapso pulmonar, com consequente redução das unidades alveolares aeradas (WARE; MATTHAY, 2000). A lesão inflamatória que resulta na SDRA pode ser secundária a uma agressão direta dos pulmões ou a uma agressão sistêmica, sendo denominadas, respectivamente, de SDRA pulmonar e extrapulmonar (PELOSI et al., 2003). Independentemente se a lesão é originalmente pulmonar ou sistêmica, a SDRA apresenta um padrão temporal de evolução, constituída de uma fase exsudativa aguda e uma fase fibroproliferativa (THILLE et al., 2013; LORENTE et al., 2015).

A relação entre enfisema e LPA já foi estudada em alguns modelos experimentais que têm sido utilizados para o estudo dos mecanismos associados com a patogênese da DPOC e da SDRA, respectivamente. Estudos que avaliaram a resposta inflamatória em pulmão de animais com enfisema e LPA mostraram-se divergentes. Tokairin et al. (2008) observaram que camundongos com enfisema induzido por elastase apresentaram, após a inoculação intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae*, resposta inflamatória mais intensa. Por outro lado, Inoue

et al. (2003), com o mesmo modelo, observaram menor resposta inflamatória pulmonar e persistência bacteriana prolongada, tanto no pulmão quanto no soro, entre os animais com enfisema. O primeiro estudo aponta para um comprometimento da resposta imune local no enfisema, que compromete o clearance de patógenos no pulmão. Entretanto, a inflamação em resposta à agressão inalada é mais exuberante nesses animais, o que pode significar maior propensão ao desenvolvimento de LPA no pulmão enfisematoso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

A DPOC é uma enfermidade que se caracteriza pela obstrução ao fluxo aéreo, a qual decorre de alterações estruturais das pequenas vias aéreas e/ou do parênquima pulmonar, cujas participações podem variar de paciente para paciente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A iniciativa global para DPOC (GOLD), em sua última versão publicada em 2016, define-a, de forma descritiva, como uma “condição comum, passível de prevenção e tratamento, caracterizada por limitação persistente ao fluxo aéreo, geralmente progressiva, associada a uma resposta inflamatória crônica aumentada nas vias aéreas e pulmões a partículas ou gases nocivos”. Na definição, o documento ainda cita que exacerbações e comorbidades contribuem para a gravidade geral do quadro dos pacientes (GOLD, 2016).

Trata-se de uma doença comum, cuja prevalência varia de região para região, sobretudo em função da prevalência do tabagismo, que é seu principal fator de risco (BUIST; VOLLME; MCBURNIE, 2008). Sua prevalência sofre também variações entre os diferentes estudos em função dos critérios usados para seu diagnóstico, que podem ir desde questionários padronizados até a realização de espirometria (HALBERT et al., 2006; MENEZES et al., 2008). No Brasil, a prevalência da DPOC, avaliada na cidade de São Paulo pela aplicação de questionários e espirometria em indivíduos com idade acima de 40 anos, foi de 18% entre homens (intervalo de confiança de 95% de 14,6% a 21,4%) e de 14% entre

mulheres (intervalo de confiança de 95% de 10,8% a 17,1%)(MENEZES et al., 2008).

Além de elevada prevalência, a DPOC apresenta altas morbidade e mortalidade. Ela causa expressivos impactos econômicos e sociais, com perspectiva de ser a quinta causa de aposentadoria por doença no mundo, em 2020 (SEEMUNGAL; HURST; WEDZICHA, 2009). Atualmente a DPOC é a quarta causa de morte no mundo, havendo projeções de que se torne a terceira até 2020 (BAKKE et al., 2011; GOLD, 2016).

A DPOC envolve dois espectros, a bronquite crônica e o enfisema pulmonar, em função do predomínio de acometimento das vias aéreas ou do parênquima pulmonar. A bronquite crônica classicamente é caracterizada com bases clínicas, sendo definida pela presença de tosse produtiva crônica por pelo menos três meses, durante dois anos consecutivos. Já o enfisema tem sido caracterizado em bases morfológicas, sendo definido pela presença de destruição e alargamento dos espaços aéreos distais, como bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e paredes alveolares, com conseqüente aumento do espaço morto alveolar (GOLD, 2016).

A bronquite crônica resulta de uma resposta inflamatória exagerada a estímulos ambientais nocivos, principalmente a fumaça de cigarro (BARNES, 2004; KIM et al., 2015). O epitélio das vias respiratórias é heterogêneo, contendo células ciliadas, células secretoras e células basais, além de uma barreira física mucociliar. A fumaça do cigarro e outros agentes ativam as células epiteliais brônquicas diretamente ou indiretamente, pela expressão de receptores como os *Toll-like* (TLRs), levando à liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL)-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF)- α , proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1, proteína induzida

por interferon gama (INF- γ), IL-10 e mediadores derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas) (SWAMY et al., 2010; NOAH; ZHOU; JASPERS, 2012; MÜLLER; JASPERS, 2012). Estes mediadores recrutam células inflamatórias, incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD8+, linfócitos B e células dendríticas, as quais secretam mediadores adicionais, como espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas (elastase de neutrófilos, metaloproteinases de matriz), além de novas citocinas, amplificando a inflamação e contribuindo para as alterações teciduais que caracterizam a doença (MACNEE, 2007).

Nas vias aéreas de maior calibre, as células e as citocinas inflamatórias induzem a hiperplasia das células calciformes e a ativação das células basais, com mudança da via de diferenciação, surgindo metaplasias escamosa e mucosa, o que resulta na hipersecreção, marcada clinicamente pela presença de tosse e produção de escarro (PARK et al., 2007; KIM et al., 2015). Já nas vias aéreas de menor calibre (<2 mm), sobretudo bronquíolos, as alterações mais marcantes são o espessamento da parede em função de infiltrado inflamatório, constituído por neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD8+ (HASEGAWA et al., 2006; HOGG, 2004). Ao mesmo tempo, citocinas imunomoduladoras, como IL-10 e IL-13, e proteínas expressas no epitélio das vias aéreas (catelicidina) atuam sobre este processo inflamatório e ativam o reparo através de fatores de crescimento produzidos por epitélio (fator de crescimento do fibroblasto – FGF e fator de crescimento transformador-TGF), que são capazes de ativar fibroblastos subepiteliais com o aumento da deposição de colágeno. Essas alterações caracterizam o remodelamento das pequenas vias aéreas e são responsáveis pela obstrução não completamente reversível ao fluxo aéreo, clinicamente manifesta por dispneia,

sibilos e hiperinsuflação pulmonar (LEE et al., 2002; KRANENBURG et al., 2002; KRANENBURG et al., 2005; SUM et al., 2014).

No enfisema, as mesmas exposições, sobretudo à fumaça do cigarro, induzem a ativação das imunidades inata e adquirida, através da ativação de TLRs nas células epiteliais e macrófagos presentes nos alvéolos. A ativação desses receptores aumenta a expressão do fator nuclear Kappa B nessas células, fator que pode modular a taxa de transcrição de muitas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), TNF- α , ICAM-1, responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ (DI STEFANO et al., 2002; BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011).

Os macrófagos alveolares são a principal linha de defesa frente às partículas inaladas e encontram-se aumentados (5 a 10 vezes) em pacientes com enfisema, em comparação com indivíduos saudáveis, provavelmente por recrutamento de monócitos da circulação em resposta às citocinas (MCP-1) (JONSSON et al., 1986). Apesar desta presença, os macrófagos alveolares dos pacientes com enfisema têm sua capacidade anti-inflamatória reduzida (PONS et al., 2005).

Os neutrófilos também estão aumentados no enfisema e têm papel crucial na sua patogênese ao produzirem mediadores inflamatórios citotóxicos, proteases e espécies reativas do oxigênio (CAZZOLA; NOVELLI, 2010). Eles são recrutados para o parênquima a partir de mediadores secretados pelas células epiteliais, macrófagos alveolares e pelos próprios neutrófilos, com destaque para IL-8 e leucotrieno B4 (BARNES, 2004). A principal ação dos neutrófilos no enfisema se dá pela liberação de enzimas proteolíticas, como elastase neutrofílica, catepsina G, proteinase-3, metaloproteinases de matriz (MMP-8 e MMP-9), capazes de lesar a matriz extracelular, sobretudo suas fibras colágenas e elásticas (CHURG et al.,

2007). Entre essas enzimas, destaca-se a elastase neutrofílica, que tem potente ação catalítica sobre a elastina (STOCKLEY; MANNINO; BARNES, 2009). A degradação da matriz extracelular, além de comprometer a integridade do parênquima, resulta no recrutamento de neutrófilos e monócitos, amplificando a inflamação (SHAPIRO et al., 2003; MIN et al., 2011).

Além das proteases, as espécies reativas do oxigênio liberadas diretamente pela fumaça do cigarro ou por células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos), atuam na destruição do parênquima, com redução das defesas antiproteolíticas, e na amplificação da inflamação (KIRKHAM; RAHMAN, 2006). A destruição do parênquima pulmonar resulta na perda de sustentação das pequenas vias aéreas, que se colabam, contribuindo para a obstrução ao fluxo aéreo. A redução do componente elástico secundária a essa destruição dificulta a exalação, favorecendo a hiperinsuflação. Essas duas alterações, obstrução ao fluxo aéreo e hiperinsuflação, manifestam-se clinicamente como dispneia (GOLD, 2016).

Os linfócitos também estão aumentados no enfisema, sobretudo os CD8+ (MACNEE, 2007), e lesam o parênquima pela ação de perforinas, que criam poros nas células epiteliais, e de granzimas, que penetram nos poros e induzem apoptose (SAETTA et al., 2001). Em conjunto, as células inflamatórias, as proteases e as espécies reativas tóxicas do oxigênio induzem a apoptose de células epiteliais e endoteliais do parênquima pulmonar, o que contribui para o desenvolvimento do enfisema (HENSON; VANDIVIER; DOUGLAS, 2006).

Por fim, um importante componente na gênese do enfisema é o remodelamento, deflagrado pelos próprios processos lesivos, com participação de peptídeos denominados fatores de crescimento (PARRA et al., 2007). Esses fatores, tais como TGF- β (fator de crescimento transformante β), VEGF (fator de crescimento

endotelial vascular), fator de crescimento derivado de plaquetas fator-B (PDGF-B), fator de crescimento epidérmico (EGF), promovem a formação de tecido de granulação, com proliferação de fibroblastos e músculo liso, além de angiogênese, na tentativa de reparo da lesão (KASAHARA et al., 2001; BARNES, 2008). Infelizmente a reparação não se dá de forma perfeita, havendo deposição excessiva de matriz extracelular, fibrose, formação de folículos linfoides, alterações epiteliais, com comprometimento da função do órgão, sobretudo com limitação ao fluxo aéreo (GOLD, 2016).

2.2 MODELOS ANIMAIS DE ENFISEMA

Modelos animais de enfisema têm sido utilizados para o estudo dos mecanismos associados com a patogênese da DPOC e para o desenvolvimento de novas terapias. Os modelos mais utilizados são aqueles baseados no desequilíbrio entre proteólise e antiproteólise. A indução do enfisema nestes modelos animais ocorre pela instilação de um agente com potencial proteolítico na via aérea, como a papaína, a elastase neutrofílica ou a elastase pancreática de porco (EPP) (YOKOYAMA et al., 1987; STONE et al., 1990; MACHADO et al., 2014).

Alguns estudos mostraram que uma única instilação de EPP em ratos foi capaz de desenvolver enfisema panlobular (DAMON; MAUDERLY; JONES, 1982; YOKOYAMA et al., 1987). Em um destes estudos os autores avaliaram o efeito de diferentes doses de EPP na mortalidade, na função e na morfologia pulmonar em ratos. Foi observado que a dose única de 1.0 UI/g induziu um modelo satisfatório de enfisema pulmonar com alterações funcionais e morfológicas e com taxa de

mortalidade de 9% (DAMON; MAUDERLY; JONES, 1982). Outros estudos mostraram que, quando doses repetidas de EPP são administradas, os animais podem apresentar, além do enfisema, repercussões sistêmicas como perda de peso, intolerância ao exercício e alterações cardiovasculares (ANTUNES et al., 2014; LUTHJE et al., 2009).

As alterações pulmonares ocasionadas pela elastase já foram bem descritas por alguns trabalhos. Hantos et al. (2008) avaliaram a mecânica respiratória após três semanas da instilação da EPP e observaram que nos animais com o enfisema ocorreu elevação do volume pulmonar associado com aumento do diâmetro alveolar, redução da elastância, mas sem alteração na resistência das vias aéreas. Além da quebra das fibras elásticas, a indução do enfisema por EPP pode afetar a matriz extracelular, que tem a função de sustentação das estruturas alveolares e tem como principais componentes a elastina, o colágeno e as proteoglicanas (MORRIS et al., 1986; DUNSMORE; RANNELS, 1996; FERNANDES; BONACCI; STEWART, 2006). Neste sentido, Kononov et al. (2001) observaram que as forças mecânicas durante a respiração são capazes de causar alteração no remodelamento da malha de colágeno o que contribui para a progressão do enfisema. Van de Lest et al. (1995) observaram que, entre três horas e sete dias após a exposição à elastase, ocorre destruição de proteoglicanas da matriz extracelular,

Em um estudo recente, Skurikhin et al. 2016 observaram, em um modelo experimental de enfisema, que as alterações da matriz extracelular foram acompanhadas de mudança na microcirculação e nos tecidos conectivos por redução de precursores angiogênicos e células endoteliais. Paralelamente foi observado aumento das células de Clara e do nível de proteína secretada por estas células nos animais com enfisema. As células de Clara podem diferenciar-se em

células epiteliais ciliadas, restaurar o epitélio dos bronquíolos, absorver e decompor toxinas (RICHARDS; OREFFO; LEWIS, 1990). Este aumento das células de Clara foi atribuído a uma reação compensatória da degradação da matriz dos tecidos conectivos e da perda de células epiteliais pulmonar (SKURIKHIN et al., 2016). Os autores também observaram que o enfisema foi acompanhado por resposta inflamatória, confirmada por infiltrados de linfócitos, macrófagos e neutrófilos nos pulmões, além de aumento de citocinas inflamatórias sérica e tecidual após três, sete e 14 dias da indução.

Outros trabalhos confirmaram a resposta inflamatória após a indução de enfisema por elastase em modelos experimentais em uma fase mais aguda. Vecchiola et al. (2011) estudaram a fase aguda da lesão induzida pela elastase (quatro e 12 horas) 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, como infiltrado de polimorfonucleares e deposição de membrana hialina. Van de Lest et al. (1995) encontraram achados semelhantes após três horas de instilação intratraqueal de EPP em ratos.

Apesar dos resultados confirmarem a indução do enfisema após a instilação de elastase, estes modelos não estão associados com a instalação de bronquite crônica e, conseqüentemente, não reproduzem completamente a DPOC (MIRAVITLLES; CALLE; SOLER-CATALUNA, 2012).

2.3 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma condição de insuficiência respiratória aguda decorrente da lesão, de natureza inflamatória e difusa, da barreira constituída pelo epitélio alveolar e pelo endotélio, a qual determina aumento da permeabilidade vascular e disfunção do sistema surfactante, resultando em edema e colapso pulmonar, com conseqüente redução das unidades alveolares aeradas. Essas alterações determinam achados clínicos, radiográficos e funcionais que compõem o cenário clínico que permite o diagnóstico da síndrome (WARE; MATTHAY, 2000).

Os atuais critérios utilizados para o diagnóstico de SDRA foram definidos em 2012, na chamada Conferência de Berlim, e incluem: 1. instalação aguda, dentro de sete dias; 2. presença de opacidades alveolares bilaterais na radiografia ou tomografia computadorizada de tórax, não completamente explicadas por derrame pleural, atelectasias ou nódulos; 3. falência respiratória não completamente explicada por insuficiência cardíaca ou hipervolemia, podendo ser necessária avaliação objetiva (ex. ecocardiograma) para excluir edema hidrostático caso nenhum fator de risco tenha sido identificado; 4. hipoxemia definida por $\text{PaO}_2/\text{F}_1\text{O}_2$ menor que 300 cmH_2O , estando o paciente recebendo pressão positiva no final da expiração (PEEP) ou pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) de pelo menos 5 cmH_2O . De acordo com a intensidade da hipoxemia, a SDRA pode ser classificada em: leve, com PaO_2 entre 300 e 200 cmH_2O (com PEEP ou CPAP \geq 5 cmH_2O); moderada, com PaO_2 entre 200 e 100 cmH_2O (com PEEP \geq 5 cmH_2O); e

grave, com PaO_2 menor que $100 \text{ cmH}_2\text{O}$ (com $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cmH}_2\text{O}$) (The ARDS Definition Task Force. RANIERI et al., 2012).

A SDRA é uma condição relativamente comum, com incidência estimada entre 7 a 18 casos por 100.000 habitantes por ano (RUBENFELD et al., 2005; VILLAR et al., 2011). No Brasil, um estudo já utilizando os critérios da Conferência de Berlim para o diagnóstico de SDRA encontrou incidência de 6,3 casos por 100.000 habitantes por ano (CASER et al., 2014). Trata-se também de uma condição grave, com taxas de mortalidade que ainda se situam entre 40% a 60%, a despeito de todos os avanços obtidos nas últimas décadas no tratamento do paciente crítico (PHUA et al., 2009; CASER et al., 2014). Em uma coorte prospectiva, conduzida em 45 UTIs brasileiras, com 773 pacientes ventilados por mais de 24 horas, a SDRA ocorreu em 31% dos pacientes, com mortalidade hospitalar de 52%, enquanto os pacientes que não apresentaram a síndrome tiveram mortalidade hospitalar de 37%. Em análise multivariada, a SDRA, em suas formas moderada e grave, constituiu-se em fator de risco isolado para óbito, com odds ratios de 1,92 ($p = 0,002$) e 2,12 ($p = 0,045$), respectivamente (AZEVEDO et al., 2013).

Além de elevada mortalidade, a SDRA impõe grande morbidade a seus pacientes (HERRIDGE et al., 2016). Sua ocorrência implica em maior duração da ventilação mecânica e internação mais prolongada na UTI, períodos em que os pacientes encontram-se vulneráveis a agressões cumulativas, associadas não só à SDRA e suas condições precipitantes, mas também às manipulações terapêuticas e monitorizações a que são submetidos, com suas respectivas complicações, com destaque para a pneumonia associada à ventilação mecânica (KALIL et al., 2016) e a polineuropatia do paciente crítico (UNROE et al., 2010). Mais recentemente,

estudos têm demonstrado que mesmo após um a dois anos, pacientes que sobreviveram à SDRA apresentam comprometimento da função pulmonar e da capacidade física (WEINERT et al., 1997; DAVIDSON et al., 1999), limitações motoras decorrentes de problemas articulares e fraqueza muscular (HERRIDGE et al., 2011), distúrbios psiquiátricos como depressão, ansiedade, déficits cognitivos e de memória (DAVYDOW et al., 2009; WILCOX et al., 2013; PARKER et al., 2015), todos resultando em comprometimento importante da qualidade de vida.

A lesão inflamatória que resulta na SDRA pode ser secundária a uma agressão direta dos pulmões ou a uma agressão sistêmica, sendo denominadas, respectivamente, de SDRA pulmonar e extrapulmonar (PELOSI et al., 2003). Dentre as causas pulmonares estão a pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, contusão pulmonar, embolia gordurosa, quase afogamento, inalação de gases tóxicos e edema de reperfusão. Já entre as causas sistêmicas destacam-se a sepse, choque circulatório, politrauma, trauma crânio-encefálico, múltiplas transfusões, pancreatite aguda, queimaduras, circulação extracorpórea e overdose de drogas (FOWLER et al., 1983; PEPE et al., 1982; PINHEIRO et al., 2011).

Independentemente se a lesão é originalmente pulmonar ou sistêmica, a SDRA apresenta um padrão temporal de evolução. Numa fase inicial, denominada exsudativa e que se estende ao longo da primeira semana de evolução, há o influxo de um edema alveolar rico em proteínas, decorrente da quebra da barreira alvéolo-capilar, tanto em seu componente endotelial, quanto epitelial (THILLE et al., 2013; LORENTE et al., 2015). Ademais de contribuir para a ocorrência do edema alveolar, a lesão da barreira, sobretudo de seu componente epitelial, dificulta a reabsorção do edema formado, que poderia se dar por transporte ativo através das células epiteliais (MATTHAY; WIENER-KRONISH, 1990; WIENER-KRONISH et al., 1991). A

lesão dos pneumócitos tipo II compromete a produção do surfactante, levando ao colapso alveolar, também característico nesta fase inicial da síndrome, e a reparação do epitélio, que se dá por sua diferenciação em pneumócitos tipo I (GREENE et al., 1999).

A principal célula inflamatória envolvida nessa fase exsudativa são os neutrófilos, conforme demonstrado por acúmulo dessas células em lavado broncoalveolar (PITTET et al., 1997) ou tecido pulmonar obtidos de pacientes nos primeiros dias de evolução (BACHOFEN; WEIBEL, 1982; THILLE et al., 2013), bem como de diferentes modelos animais de lesão pulmonar aguda (MATUTE-BELLO, et al., 2011). Eles aderem-se à membrana alvéolo-capilar lesada e a ultrapassam, alcançando a luz alveolar preenchida pelo edema inflamatório (WARE; MATTHAY, 2000). A atração e a ativação dos neutrófilos parecem ser mediadas por citocinas liberadas por macrófagos alveolares, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (WHEELER; BERNARD, 2007). Uma vez ativados, os neutrófilos liberam oxidantes, proteases, leucotrienos, fator de ativação plaquetária e outras moléculas inflamatórias, amplificando a lesão local (VADASZ; SZNAJDER, 2011).

É nessa fase exsudativa que a SDRA apresenta sua maior expressão clínica. O edema e o colapso alveolar são responsáveis pela grave hipoxemia que estes pacientes apresentam. Esses alvéolos não ventilados continuam sendo perfundidos, o que determina áreas de baixa relação ventilação-perfusão (V/Q) e *shunt*, com conseqüente hipoxemia. Em situações extremas, as alterações na V/Q podem contribuir para a ocorrência de hipercapnia, embora esta seja uma alteração infrequente na SDRA (SHARP; MILLAR; MEDFORD, 2015; PAPAIZIAN et al., 2016). Essas alterações também comprometem a mecânica pulmonar, com importante redução da complacência, decorrente do edema intersticial e alveolar e do colapso

alveolar. Essa redução de complacência resulta na necessidade de grandes pressões para abertura, durante a inspiração, das unidades fechadas (JANZ; WARE, 2014). Outra alteração funcional comum na SDRA é a hipertensão pulmonar secundária, sobretudo, à vasoconstrição dos vasos pulmonares adjacentes aos alvéolos não ventilados, portanto com baixas tensões de oxigênio (RYAN; FROLICH, 2014). Em conjunto, essas alterações são responsáveis pelas manifestações clínicas da SDRA, caracterizada por dispneia, taquipneia e sinais de maior esforço ventilatório, achados que se somam àqueles associados à condição de base que originou a lesão pulmonar. Completam o quadro a hipoxemia e suas manifestações e os achados de imagem de edema e colapso alveolar.

A segunda fase da SDRA é denominada fibroproliferativa, cujas alterações, embora possam iniciar-se já na primeira semana, são mais marcantes nas segunda e terceira semanas de evolução (THILLE et al., 2013). Nesta fase há acúmulo de miofibroblastos e produção de matriz extracelular no interior dos alvéolos, que ficam preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, com neoformação vascular associada. Nas paredes alveolares ocorre hiperplasia de pneumócitos tipo II e acúmulo de colágeno e fibronectina (ROCCO et al., 2009). A essa fase, em alguns pacientes, segue-se a ocorrência de fibrose, descrita como presente em até 55% dos casos de necropsia realizada em pacientes que faleceram após três semanas de evolução (MEDURI, 1993). Por outro lado, estudos que seguem os pacientes que sobreviveram ao processo, mostram recuperação funcional e resolução das alterações tomográficas ao longo de um ano, mostrando a reversibilidade das alterações (HERRIDGE et al., 2003).

A intensidade da fase proliferativa e sua evolução para fibrose e não para resolução imediata parecem ser fatores de pior prognóstico na SDRA. Ela decorre

da migração de fibroblastos e de outras células mesenquimais, como os miofibroblastos, para as áreas lesadas e da secreção, pelos mesmos, de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (ROCCO et al., 2009). A migração e ativação dos fibroblastos parecem ser mediadas pelos macrófagos alveolares, que se encontram aumentados nessa fase da SDRA e produzem mediadores inflamatórios (IL-10, IL-4, IL-13) e de crescimento (fator de crescimento transformador β e α (TGF- β e TGF- α); fator de necrose tumoral, TNF- α ; fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF; fator de crescimento de fibroblastos, FGF; fator de crescimento insulina-*like*, IGF) (HENKE et al., 1993). Cria-se assim um desbalanço entre moléculas pró-fibróticas, sobretudo TGF- β , e antifibróticas, como PGE2 e interferon- γ (INF- γ), com predomínio das primeiras (MADTES et al., 1998).

Mais recentemente tem sido reconhecido o papel da lesão epitelial na evolução da SDRA para a fase fibroproliferativa e fibrose. O desnudamento do epitélio é reparado por pneumócitos tipo II, que podem se diferenciar em pneumócitos tipo I ou em fibroblastos, e por células mesenquimais (KIM et al., 2006). Além da lesão direta, os pneumócitos tipo II sofrem apoptose induzida sobretudo por TGF- β , dificultando a reconstituição epitelial, favorecendo a fibroproliferação (KUWANO et al., 2007). O reconhecimento da intensidade da fase fibroproliferativa como marcador de gravidade abre perspectivas para utilização de alguns marcadores evolutivos da SDRA, com destaque para o pró-colágeno tipo-III, cuja expressão está aumentada em formas mais graves ou quando a ventilação mecânica está sendo ofertada de forma lesiva (GARCIA et al., 2004).

2.4 MODELOS ANIMAIS DE LESÃO PULMONAR AGUDA

Modelos animais de LPA têm sido utilizados para o estudo da patogênese da SDRA, bem como os efeitos de novos tratamentos e estratégias ventilatórias. O modelo animal de LPA deve englobar idealmente uma ou mais características observadas na LPA em humanos, como início rápido após o insulto, comprometimento funcional pulmonar, evidência de lesão no parênquima pulmonar por meio da histologia, resposta inflamatória e aumento da permeabilidade da membrana alveolocapilar. Como existe baixa probabilidade de se encontrar todas estas alterações em um modelo animal de LPA, a principal consideração para a sua escolha deve ser o objetivo da pesquisa experimental a ser abordada (MATUTEBELLO et al., 2011).

Entretanto, nenhum destes modelos consegue apresentar todas as características da SDRA observadas nos humanos. Existem importantes diferenças entre modelos experimentais e humanos quanto à anatomia, fisiologia, imunologia e também quanto ao contexto em que ocorre a LPA. Roedores têm a parede alveolar e a barreira alvéolo-capilar menos espessas quando comparados aos humanos e suas vias aéreas apresentam menor número de 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). Segundo as recomendações de um comitê organizado pela *American Thoracic Society*, o quadro de LPA em um modelo animal deve ser definido quando pelo menos três dos seguintes achados estiverem presentes: evidência histológica

de lesão tecidual, alteração na barreira alvéolo-capilar, presença de resposta inflamatória e evidência de disfunção fisiológica (MATUTE-BELLO et al., 2011).

Vários modelos são utilizados para induzir a LPA em animais, sendo que a lesão pulmonar induzida pela ventilação (LPIV), a instilação de bactérias vivas e a administração de endotoxina representam os que têm sido mais comumente utilizados (MATUTE-BELLO et al., 2011). Outros modelos incluem ácido oleico por via intravenosa, hiperóxia, aspiração de ácido clorídrico, depleção de surfactante, isquemia e reperfusão, ligação e perfuração do ceco, entre outros (MATUTE-BELLO et al., 2008).

Nos modelos de LPIV é empregada a ventilação mecânica com volume corrente (VT) elevado e/ou altas pressões inspiratórias, com o uso ou não de pressão positiva no final da expiração (MATUTE-BELLO et al., 2011). Estes modelos apresentam características típicas de lesão tecidual como: espessamento intersticial, infiltrados de neutrófilos nos alvéolos, aumento da permeabilidade capilar, recrutamento de células inflamatórias, além de hipoxemia (TSUNO et al., 1991; PARKER et al., 1998; YOSHIKAWA et al., 2005; LOPEZ-AGUILAR et al., 2010; REIS et al., 2016). No estudo conduzido por HENZLER et al. (2011), os autores observaram que o dano alveolar difuso ocorre de forma mais significativa no modelo de LPIV, quando comparado com outros dois modelos de LPA (aspiração de ácido e depleção de surfactante).

A inalação por aerossol, instilação intranasal direta, endotraqueal ou endobrônquica de bactérias representam modelos amplamente utilizados para o estudo de pneumonia em animais por gerar uma infecção pulmonar. Estes modelos são acompanhados de lesão tecidual e inflamação (MIZGERD; SKERRETT, 2008).

O modelo animal que emprega a endotoxina de bactéria gram-negativa, o lipopolissacáride (LPS), simula a LPA na septicemia, quando administrado pelas vias peritoneal e venosa, e na pneumonia, quando administrado por via direta, intratraqueal. O LPS é um lipoglicídeo encontrado na membrana externa, sendo responsável por modelar a lesão causada por infecção bacteriana (MATUTE-BELLO et al., 2008). Quando o LPS é administrado em animais por via intratraqueal, endovenosa ou intraperitoneal, é capaz de reproduzir 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).

O modelo de endotoxina é acompanhado de lesão tecidual considerável, o que pode ser evidente em curto intervalo de tempo e é caracterizado por acúmulo de neutrófilos no espaço alveolar e intersticial, espessamento de parede e presença de edema e debris protéico no espaço alveolar (MEYRICK et al., 1983; ROTTA; STEINHORN, 1998; FONSECA, 2015). Este modelo é acompanhado de resposta inflamatória sistêmica e pulmonar precoce de forma mais robusta em relação ao modelo de LPIV (LOPEZ-AGUILAR et al., 2010). O início da resposta inflamatória e o aumento da permeabilidade epitelial neste modelo estão associados à ativação da resposta imune inata pelo receptor TLR4 (MARTIN; MATUTE-BELLO, 2011). Logo após a instilação intratraqueal de LPS, ocorre aumento de células no lavado broncoalveolar e elevação de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-8, entre outras (MATUTE-BELLO et al., 2008).

No estudo conduzido por Domenici-Lombardo et al. (1995), foi avaliado o desenvolvimento da LPA, após 12, 24 e 48 horas da instilação intratraqueal de LPS em ratos, utilizando parâmetros morfológicos e hematológicos, além de imagens por tomografia computadorizada. Após 12 horas, foram observados neutrófilos nos

capilares do septo interalveolar e monócitos tanto no interior dos capilares quanto no espaço intersticial. Com 24 horas, o quadro se alterou progressivamente e cursou com hipoxemia, hipercapnia e acidose, infiltrado difuso e heterogêneo bilateral na tomografia computadorizada e macrófagos no espaço alveolar. Após 48 horas, os neutrófilos estavam presentes no interstício septal e os macrófagos eram numerosos no alvéolo, onde também se observou deposição de fibrina. Estes autores ainda observaram pela microscopia eletrônica que o recrutamento de monócitos do sangue, seguido da sua diferenciação em macrófagos, ocorre rapidamente após a instilação de LPS, liberando citocinas quimioatrativas para neutrófilos.

2.5 INTERAÇÃO ENTRE ENFISEMA E SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

O enfisema, como já discutido, é uma doença de natureza inflamatória, fato comprovado pela presença de número aumentado de leucócitos no escarro e na biópsia pulmonar de pacientes com este diagnóstico (FINKELSTEIN et al., 1995; RETAMALES et al., 2001; BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011). Na verdade este estado inflamatório não se restringe aos pulmões, sendo evidenciados níveis elevados de citocinas no soro desses pacientes (WOUTERS; CREUTZBERG; SCHOLS, 2002; KARADAG et al., 2008; BAINES; SIMPSON; GIBSON, 2011; AGUSTI et al., 2012).

A despeito do aumento das células inflamatórias nos pulmões e das citocinas no sangue, alguns estudos sugerem comprometimento da resposta imune,

sobretudo a inata, em pacientes com enfisema, o que pode prejudicar a defesa contra a agressão de outros patógenos (SCHLEIMER, 2005; SHAYKHIEV; CRYSTAL, 2013). Isso acontece, por exemplo, em relação aos macrófagos, que são células que têm a função de reconhecer e fagocitar partículas patogênicas inaladas e células apoptóticas e, a partir daí, ativar a resposta imune (BARNES, 2004). No enfisema, os macrófagos, apresentam capacidade reduzida para fagocitar e depurar células apoptóticas e patógenos comuns na DPOC como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*, (HODGE et al., 2003; BERENSON et al., 2006; PANG et al., 2008; TAYLOR et al., 2010). Eles ainda exibem menor capacidade de liberar citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-10, quando estimulados por antígenos bacterianos (BERENSON et al., 2006), e de promover quimiotaxia de neutrófilos quando estimulados por LPS (KAUR; SINGH, 2013).

A função neutrofílica também está prejudicada na DPOC, havendo menor capacidade quimiotática (SAPEY et al., 2011) e maior liberação de proteinases após ativação, o que contribui com maior lesão tecidual a partir de um estímulo nocivo (OWEN et al., 1995). Outras alterações nas células inflamatórias na DPOC incluem: maior predisposição a apoptose dos linfócitos T (HODGE et al., 2003), menor atividade citotóxica de células natural killer, menor capacidade de fagocitose de monócitos e neutrófilos circulantes (PRIETO et al., 2001).

Essas alterações imunológicas pulmonares e sistêmicas presentes no enfisema podem interferir na LPA presente na SDRA, visto que esta também decorre de respostas imunes e inflamatórias a partir de insultos pulmonares ou sistêmicos, com conseqüente lesão da membrana alvéolo-capilar. 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 et al., 1996) e,

epidemiologicamente, já se demonstrou a associação entre tabagismo e a ocorrência de SDRA (CALFEE et al., 2011; TOY et al., 2012). Outros autores encontraram a DPOC como fator associado a maior incidência de SDRA (VEERAVAGU et al., 2013; RINCON et al., 2014; VEERAVAGU et al., 2014).

A relação entre enfisema e LPA já foi estudada em alguns modelos experimentais. Tokairin et al. (2008) observaram que camundongos com enfisema induzido por elastase apresentaram, após a inoculação intratraqueal de *Streptococcus pneumoniae*, resposta inflamatória mais intensa, com maior expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 nos macrófagos alveolares. Por outro lado, Inoue et al. (2003), com o mesmo modelo, observaram menor resposta inflamatória pulmonar e persistência bacteriana prolongada, tanto no pulmão quanto no soro, entre os animais com enfisema. Outros autores mostraram que animais com enfisema apresentam menor capacidade de depuração de *Haemophilus influenzae*, quando instilados por via traqueal, mesmo que apresentem maior resposta inflamatória (PANG et al., 2008; SAJJAN et al., 2009; WANG et al., 2010; GANESAN et al., 2012). Esses estudos apontam para comprometimento da resposta imune local no enfisema, que afeta o *clearance* de patógenos no pulmão. Entretanto, 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.

Esses estudos experimentais e clínicos apontam para uma interação entre a presença de enfisema e a resposta pulmonar a insultos agudos. Entretanto, seus resultados não são homogêneos, o que nos motivou a avaliar a resposta à instilação pulmonar de LPS em ratos com enfisema pulmonar induzido por elastase.

3 HIPÓTESES

H0: A presença de enfisema não influencia o desenvolvimento da LPA induzida por LPS intratraqueal.

H1: A presença de enfisema influencia o desenvolvimento da LPA induzida por LPS intratraqueal.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o desenvolvimento da LPA induzida por LPS intratraqueal em ratos Wistar com e sem enfisema induzido pela administração de elastase.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar o desenvolvimento da LPA induzida por LPS intratraqueal em ratos Wistar com e sem enfisema a partir da análise da:

- a) Histopatologia pulmonar;
- b) Contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar;
- c) Expressão do mRNA das citocinas IL-6, TNF- α , and CXCL2 no lavado broncoalveolar;
- d) Gasometria;
- e) Permeabilidade pulmonar.

5 MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Neste estudo experimental foram utilizados 24 ratos Wistar adultos, previamente saudáveis, com peso de $312,3 \pm 31,9$ g, 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 026/2014 (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

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 de 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 da lesão pulmonar aguda

Três semanas após a administração da elastase, os animais foram novamente randomizados para receber, por via intratraqueal, LPS (*Escherichia coli* lipopolysaccharides - 055:B5, Sigma – Aldrich, Israel) na dose de 2 mg/Kg (GROSS, Christine M. et al, 2015) ou o mesmo volume de solução fisiológica estéril a 0,9% (SF). Os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente para a administração de EPP.

5.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

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

- a) grupo controle (G-C);
- b) grupo lesão pulmonar aguda (G-LPA);
- c) grupo enfisema (G-E);
- d) grupo enfisema e lesão pulmonar aguda (G-E-LPA).

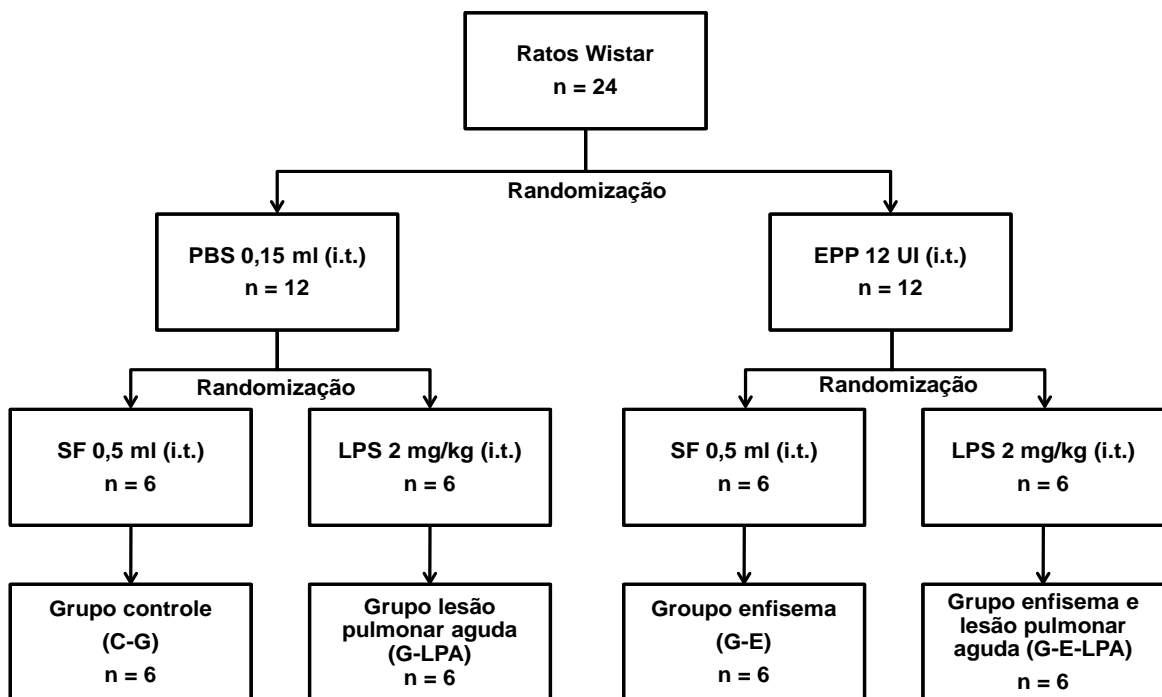


FIGURA 1: Desenho da alocação de grupos experimentais. EPP = elastase pancreática porcina; i.t. = Intratraqueal; LPS = lipopolissacarídeo; PBS = solução tampão fosfato; SF = solução fisiológica.

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, VT de 6 ml/Kg, frequência respiratória (FR) de 80 incursões por minuto, relação inspiração:expiração (I:E) de 1:2, FIO₂ 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 lobo superior do pulmão direito foi utilizado para o PCR e o inferior foi mantido insuflado para análise histológica, enquanto o pulmão esquerdo foi utilizado para o LBA.

5.6 VARIÁVEIS ANALISADAS

5.6.1 Histopatologia

O lobo inferior do pulmão direito, 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. Foram realizados novos cortes no material histológico do grupo controle e grupo enfisema e

corados pelo o método de Verhoeff-Van Gieson para evidenciar as fibras elásticas. Os cortes histológicos foram desparafinadas, hidratadas e colocadas durante 15 minutos em solução contendo 4ml de hematoxilina alcoólica 5%, 4ml cloreto férrico 10% e 4ml de iodo de Verhoeff. Após a coloração, os cortes foram lavados em água corrente e em seguida realizada e diferenciação utilizando a solução de cloreto férrico 2% para evidenciar as fibras elásticas. Para contracorar foi utilizada a solução de Van Gieson durante 5 segundos. A solução de Van Gieson é constituída por: 360 mL de ácido pícrico, 40 mL de fucsina ácida1%, 400 ml de água destilada. Posteriormente os cortes histológicos foram rapidamente desidratados em álcool etílico em graus crescentes, diafanizados através de xilol e cobertos por lamínulas. As fibras elásticas nesta coloração aparecem em preto (BLACK, Peter N. et al, 2008). Todas as lâminas foram analisadas por um patologista sem conhecimento dos grupos experimentais.

5.6.1.1 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 semiautomático versão 4.5

para Windows (Zeiss, Jena, Alemanha) (figura 2). O Lm foi determinado pela seguinte fórmula (equação 1):

$$Lm = \frac{L_{tot}}{Li}$$

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

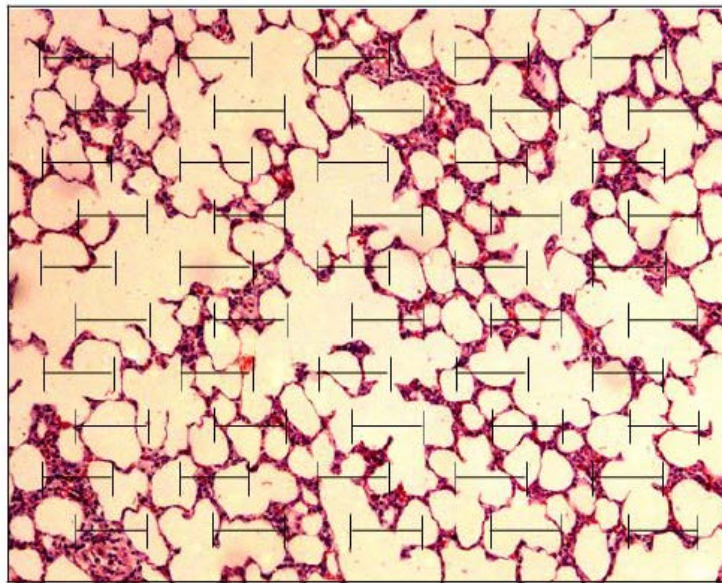


FIGURA 2: Retículo com 100 pontos e 50 linhas para morfometria. Corte histológico de parênquima pulmonar corado com H&E, aumento final de 100 X.

5.6.1.2 Avaliação da lesão pulmonar

Para avaliação da LPA, o escore de lesão pulmonar 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 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

FONTE:MATUTE-BELLO, G. et al., 2011.

Equação 2:

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

5.6.2 Lavado broncoalveolar

Para obtenção do LBA, o brônquio fonte esquerdo 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 Extração de RNA e *real time* PCR (qPCR)

O lobos superiores direitos dos pulmões foram removidos e pequenos fragmentos foram obtidos. Estes fragmentos foram transferidos para criotubos para trabalhos em criogenia até -196°C livres de RNase e DNase, DNA e inibidores de PCR, com 1ml de Trizol (Invitrogen, EUA). Esta solução de trizol é capaz de extrair o

o RNA total, as amostras permaneceram congeladas em freezer -80°C por aproximadamente 30 dias. Posteriormente foram descongeladas e seguiu-se a separação de fases por clorofórmio e isopropanol. A concentração de RNA extraído foi obtida utilizando o NanoDropTM 1000 Espectrofotômetro (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, $2\mu\text{g}$ de RNA total foi transcrito a DNA complementar (cDNA) utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Para a reação de qPCR foram utilizados *primers* dos genes: IL-6, TNF- α e CXCL2. Todos os primers foram desenhados em diferentes éxons, para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico utilizando o programa Primer BLAST (NCBI, 2012).

Através dos resultados das curvas padrão para determinação da eficiência dos *primers* (eficiência aceitável superior a 90%), padronizou-se a utilização da diluição de 1:5 de cDNA para todas as amostras. As reações foram feitas no volume final de $10\mu\text{L}$, contendo $2,6\mu\text{L}$ de água ultrapura, $1,4\mu\text{L}$ da mistura de um dos pares de *primers Forward* e *Reverse* de cada gene, $1\mu\text{L}$ de cDNA diluído e $5\mu\text{L}$ de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

O ensaio de qPCR foi realizado no aparelho StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 40 ciclos; em cada ciclo, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* e extensão a 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em duplicata, e como controle negativo para a reação de qPCR foram utilizados poços que continham o *mix* da reação mais os *primers*, na ausência do template (cDNA). A análise das curvas de *melting* e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Para análise da expressão gênica através de qPCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene controle (β -actina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do ΔCt da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA dos animais controle. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ utilizou-se a fórmula seguinte: [ΔCt (amostra) – ΔCt (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

5.6.4 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).

5.6.5 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.

5.7 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 “*Acute lung injury in response to intratracheal instillation of lipopolysaccharide in an animal model of emphysema induced by elastase*” (Apêndice A), o qual foi submetido à revista *Lung* (Anexo B).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A forma como pulmões com enfisema respondem a LPA não é bem conhecida. É possível que as alterações estruturais e imunológicas promovidas pelo enfisema nos pulmões modifiquem a resposta dos mesmos à LPA e, desta forma, influenciem no desenvolvimento de SDRA. Neste estudo foi comparado o desenvolvimento da LPA induzida por LPS intratraqueal em ratos Wistar com e sem enfisema induzido pela administração de elastase.

O enfisema foi induzido por instilação intratraqueal de EPP que ocasionou alterações histológicas e morfológicas compatíveis com as do enfisema panacinar. Os animais dos grupos enfisema apresentaram maior Lm e ausência de fibra elástica nas paredes das pequenas vias aéreas e alvéolos, comprovando a eficácia do modelo. Além disso, a instilação EPP foi acompanhada de maior resposta inflamatória no BAL, principalmente por aumento de macrófagos.

Neste estudo, a instilação intratraqueal LPS gerou LPA nos ratos com e sem enfisema. Os animais do grupo LPA apresentaram maiores scores de lesão pulmonar, confirmado por elevado espessamento da parede alveolar, maior infiltrado de neutrófilos no interstício e nos alvéolos, além de elevados debris protéicos nos espaços aéreos. Estes animais também apresentaram maiores contagens de células totais, neutrófilos e macrófagos no BAL e maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e quimiotáticas para neutrófilos (CXCL-2).

Quando os dois grupos com LPA foram comparados, os animais com enfisema apresentaram tendência a maior inflamação em resposta ao LPS como demonstrado por maior contagem total e diferencial de células no LBA, e maior

score de lesão pulmonar. Entretanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

8 CONCLUSÃO

Foi demonstrado que a presença de enfisema associou-se a uma tendência de aumento da resposta inflamatória pulmonar secundária a instilação intratraqueal de LPS.

REFERÊNCIAS

- AGUSTÍ, 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, maio 2012.
- ANTUNES, M. A. et al. Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. **Respiratory Research**, London, v. 15, n. 1, p. 118, out. 2014.
- ARDS DEFINITION TASK FORCE. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **Jama**, Chicago, v. 307, n. 23, p. 2526-2533, jun.2012.
- AZEVEDO, L. C. P. et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: a multicenter, prospective, cohort study. **Critical Care Medicine**, New York, v. 17, n. 2, p. R63, abr. 2013.
- BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. **Clinics in Chest Medicine**, San Francisco, v. 3, n. 1, p. 35-56, jan. 1982.
- 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, mar. 2011.
- BAKKE, P. S. et al. Recommendations for epidemiological studies on COPD. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 38, n.6, p.1261-1277, dez. 2011.
- BARNES, P. J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, London, v. 1, n. 1, p. 59-70, abr. 2004.
- BARNES, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 56, n. 4, p. 515-548, dez. 2004.
- BARNES, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor. v.118, n.11, p.3546-3556, nov. 2008.
- BECK-SCHIMMER, B. et al. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. **Respiratory Research**, London, v. 6, n. 1, p. 61, jun. 2005.
- BERENSON, C. S. et al. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n. 10, p. 1375-1384, nov. 2006.
- BERENSON, C. S. et al. Impaired alveolar macrophage response to *Haemophilus* antigens in chronic obstructive lung disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 174, n. 1, p. 31-40, jul. 2006.

BLACK, P. N. et al. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 31, n. 5, p. 998-1004, 2008.

BUIST, A. S.; VOLLMER, W. M.; MCBURNIE, M. A. Worldwide burden of COPD in high-and low-income countries. Part I. The Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Initiative. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 12, n. 7, p. 703-708, jul. 2008.

CALFEE, C. S. et al. Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 183, n. 12, p. 1660-1665, jun. 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. **Critical Care Medicine**, New York, v. 42, n. 3, p. 574-582, mar. 2014.

CAZZOLA, M.; NOVELLI, G. Biomarkers in COPD. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, London, v. 23, n. 6, p. 493-500, dez. 2010.

CHURG, A. et al. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. **Thorax**, London, v. 62, n. 8, p. 706-713, ago. 2007.

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. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 64, n. 3, p. 465-475, jul. 1982.

DAVIDSON, T. A. et al. Reduced quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome compared with critically ill control patients. **Jama**, Chicago, v. 281, n. 4, p. 354-360, jan. 1999.

DAVYDOW, D. S. et al. Depression in general intensive care unit survivors: a systematic review. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 35, n. 5, p. 796-809, maio 2009. ISSN 1432-1238.

DI STEFANO, A. et al. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 20, n. 3, p. 556-563, set. 2002.

DOMENICI-LOMBARDO, L. et al. Evolution of endotoxin induced acute lung injury in the rat. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 76, n. 5, p. 381, out.1995.

DUNNILL, M. S. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. **Thorax**, London, v. 17, n. 4, p. 320-328, dez. 1962. ISSN 1468-3296.

DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. **American Journal of Physiology: lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 270, n. 1, p. L3-L27, jan.1996.

FERNANDES, D. J.; BONACCI, J. V.; STEWART, A. G. Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. **Current Drug Targets: Immune, Endocrine & Metabolic Disorders**, Hilversum, v. 7, n. 5, p. 567-577, maio 2006.

FINDELSTEIN, R. et al. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 1, 52, n. 5, p. 1666-1672, nov. 1995.

FONSECA, L. M. C. et al. **Lesão pulmonar aguda induzida por injeção intraperitoneal de lipopolissacáride em ratos wistar com ou sem enfisema induzido por elastase**.2015. Dissertação(Mestrado em Saúde) - Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

FOWLER, A. A. et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 98, n. 5, part. 1, p. 593-597, maio 1983.

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

GARCIA, C. S. N. B. et al. What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude?. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 59-70, nov. 2004.

THE GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE (GOLD). **GOLD 2017 Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD**. Disponível em:

<<http://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosis-management-prevention-copd/>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

GREENE, K. E. et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 160, n. 6, p. 1843-1850, dez. 1999.

GROSS, C. M. et al. Endothelial nitric oxide synthase deficient mice are protected from lipopolysaccharide induced acute lung injury. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119918, mar. 2015.

HALBERT, R. J. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 28, n. 3, p. 523-532, set. 2006.

HANTOS, Z. et al. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 105, n. 6, p. 1864-1872, dez. 2008.

HASEGAWA, M. et al. Airflow limitation and airway dimensions in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 173, n. 12, p. 1309-1315, jun. 2006.

HENKE, C. et al. Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. **American Journal of Pathology**, New York, v. 143, n. 4, p. 1189, out. 1993.

HENSON, P. M.; VANDIVIER, R. W.; DOUGLAS, I. S. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease?. **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York v. 3, n. 8, p. 713-717, nov. 2006.

HENZLER, D. et al. Physiologic and biologic characteristics of three experimental models of acute lung injury in rats. **Anesthesia & Analgesia**, Cleveland, v. 112, n. 5, p. 1139-1146, nov. 2011.

HERRIDGE, M. S. et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, n. 14, p. 1293-1304, abr. 2011.

HERRIDGE, M. S. et al. Recovery and outcomes after the acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients and their family caregivers. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 42, n. 5, p. 725-738, maio 2016.

HERRIDGE, M. S. et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 348, n. 8, p. 683-693, fev. 2003.

HODGE, S. J. et al. Increased production of TGF- β and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 285, n. 2, p. L492-L499, agos. 2003.

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

HOFMANN, W. L. T. B.; KOBLINGER, L.; MARTONEN, T. B. Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. **Health Physics**, New York, v. 57, p. 41-47, jul. 1989.

HOGG, J. C. et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 350, n. 26, p. 2645-2653, 2004.

INOUE, S. et al. Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 167, n. 5, p. 764-770, mar. 2003.

JANZ, D. R.; WARE, L. B. Approach to the patient with the acute respiratory distress syndrome. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 35, n. 4, p. 685-696, set. 2014.

JONES, J. G. et al. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. **Lancet**, London, v. 315, n. 8159, p. 66-68, jan. 1980.

JONSSON, S. et al. Human alveolar lining material and antibacterial defenses 1–3. **American Review of Respiratory Disease**, v. 133, n. 1, p. 136-140, jan. 1986.

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

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

KALIL, A. C. et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 63, n. 5, p. e61-e111, set. 2016.

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, dez. 2008.

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

KIM, K. K. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 35, p. 13180-13185, jul. 2006.

KIM, V. et al. Chronic bronchitis and current smoking are associated with more goblet cells in moderate to severe COPD and smokers without airflow obstruction. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0116108, fev. 2015.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford v. 111, n. 2, p. 476-494, ago.2006.

KONONOV, S. et al. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York v. 164, n. 10, p. 1920-1926, jan. 2001.

KRANENBURG, A. R. et al. Enhanced expression of fibroblast growth factors and receptor FGFR-1 during vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 27, n. 5, p. 517-525, nov. 2002.

KRANENBURG, A. R. et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with enhanced bronchial expression of FGF-1, FGF-2, and FGFR-1. **Journal of Pathology**, Edinburgh v. 206, n. 1, p. 28-38, maio 2005.

KUWANO, K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Immunology**, New York, v. 4, n. 6, p. 419-429, dez. 2007.

LEE, C. G. et al. Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and-independent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 38, p. 35466-35474, jul. 2002.

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

LÓPEZ-AGUILAR, J. et al. Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 36, n. 2, p. 347-355, fev. 2010.

LORENTE, J. A. et al. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 41, n. 11, p. 1921-1930, nov. 2015.

LÜTHJE, L. et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. **Respiratory Research**, London v. 10, n. 1, p. 1, jan. 2009.

MACHADO, M. N. et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema in male and female mice. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, Amsterdam, v. 200, p. 90-96, ago. 2014.

MACNEE, W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v. 2, n. 4, p. 258-266, nov. 2005.

MADTES, D. K. et al. Elevated transforming growth factor- α levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 158, n. 2, p. 424-430, ago. 1998.

MARTIN, T. R.; MATUTE-BELLO, G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. **Critical Care Clinics**, Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 735-752, jul. 2011.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 295, n. 3, p. L379-L399, set. 2008

MATUTE-BELLO, G. et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 44, n. 5, p. 725-738, maio 2011.

MATTHAY, M. A.; WIENER-KRONISH, J. P. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 142, n. 6, part. 1, p. 1250-1257, dez. 1990.

MEDURI, G. U. Late adult respiratory distress syndrome. **New horizons**, Baltimore, v. 1, n. 4, p. 563-577, set. 1995.

MENEZES, A. M. B. et al. Worldwide burden of COPD in high-and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 12, n. 7, p. 709-712, jul. 2008.

MEYRICK, B.; BRIGHAM, K. L. Acute effects of Escherichia coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep structure: function relationships. **Laboratory investigation**, Baltimore, v. 48, n. 4, p. 458-470, 1983.

MIN, T. et al. Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, v. 89, n. 6, p. 577-593, jun. 2011.

MIRAVITLLES, M.; CALLE, M.; SOLER-CATALUÑA, J. J. Clinical phenotypes of COPD: identification, definition and implications for guidelines. **Archivos de Bronconeumología**, Barcelona v. 48, n. 3, p. 86-98, mar. 2012.

MIZGERD, J. P.; SKERRETT, S. J. Animal models of human pneumonia. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 294, n. 3, p. L387-L398, mar. 2008.

MORRIS, S. M. et al. Ultrastructural changes in hamster lung 15 min to 3 hr after exposure to pancreatic elastase. **The Anatomical Record**, Philadelphia, v. 215, n. 2, p. 134-143, jun. 1986.

MÜLLER, L.; JASPERS, L. Epithelial cells, the "switchboard" of respiratory immune defense responses: effects of air pollutants. **Swiss medical weekly**, Basel, v. 142, p. w13653, jul. 2012.

NOAH, T. L.; ZHOU, H.; JASPERS, L. Alteration of the nasal responses to influenza virus by tobacco smoke. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v. 12, n. 1, p. 24, fev. 2012.

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. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 131, n. 3, p. 775-789, nov. 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. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 11, p. 4959-4967, set. 2008.

PAPAZIAN, L. et al. Diagnostic workup for ARDS patients. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 42, n. 5, p. 674-685, maio 2016.

PARK, K. et al. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 978-988, abr. 2007.

PARKER, A. M. et al. Posttraumatic stress disorder in critical illness survivors: a metaanalysis. **Critical Care Medicine**, New York, v. 43, n. 5, p. 1121-1129, maio 2015.

PARKER, J. C.; IVEY, C. L.; TUCKER, J. A. Gadolinium prevents high airway pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 84, n. 4, p. 1113-1118, abr. 1998.

PARRA, E. R. et al. Abnormal deposition of collagen/elastic vascular fibres and prognostic significance in idiopathic interstitial pneumonias. **Thorax**, London, v. 62, n. 5, p. 428-437, nov. 2007.

PELOSI, P. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 22, n. 42, suppl, p. 48s-56s, 2003.

PEPE, P. E. et al. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. **American Journal of Surgery**, New York, v. 144, n. 1, p. 124-130, jul. 1982.

PHUA, J. et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time? A systematic review. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 179, n. 3, p. 220-227, fev. 2009.

PINHEIRO, V. B.; LISBOA, L. F. M; HOLANDA, M. A. Fatores de Risco na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 13-18, 2011.

PITTET, J. F. et al. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 155, n. 4, p. 1187-1205, abr. 1997.

PONS, A. R. et al. Decreased macrophage release of TGF- β and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. 60-66, mar. 2005.

PRIETO, A. et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (immunoforon). **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 163, n. 7, p. 1578-1583, jun. 2001.

REIS, F. F. dos et al. Pre-treatment with dexamethasone attenuates experimental ventilator-induced lung injury. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 166-173, jun. 2016.

RETAMALES, I. et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 164, n. 3, p. 469-473, ago. 2001.

RICHARDS, R. J.; OREFFO, V. I.; LEWIS, R. W. Clara cell cultures from the mouse and their reaction to bronchiolar toxins. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 85, p. 119, abr. 1990.

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. **Journal of Intensive Care Medicine**, Crambridge, v. 29, n. 6, p. 357-364, nov. 2014.

ROCCO, P. R.; DOS SANTOS, C.; PELOSI, P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. **Minerva Anestesiologica**, Torino, v. 75, n. 12, p. 730-740, dez. 2009.

ROTTA, A. T.; STEINHORN, D. M. Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, New York, v. 26, n. 10, p. 1707-1715, out. 1998.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 353, n. 16, p. 1685-1693, dez. 2005.

RYAN, D.; FROHLICH, S.; MCLOUGHLIN, P. Pulmonary vascular dysfunction in ARDS. **Annals of Intensive Care**, New York, v. 4, n. 1, p. 1, fev. 2014.

SAETTA, M. et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 163, n. 6, p. 1304-1309, maio 2001.

SAJJAN, U. et al. Elastase-and LPS-exposed mice display altered responses to rhinovirus infection. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 5, p. L931-L944, 2009.

SAPEY, E. et al. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 183, n. 9, p. 1176-1186, maio 2011.

SCHLEIMER, R P. Innate Immune Responses and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: "Terminator" or "Terminator 2"? **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v. 2, n. 4, p. 342-346, nov. 2005.

SEEMUNGAL, T. A.; HURST, J. R.; WEDZICHA, J. A. Exacerbation rate, health status and mortality in COPD—a review of potential interventions. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, Auckland v. 4, p. 203, jun. 2009.

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

SKURIKHIN, E. G. et al. Response of Inflammatory Mediators, Extracellular Matrix Proteins and Stem and Progenitor Cells to Emphysema. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, London, v. 161, n. 4, p. 566-570, set. 2016.

SHAPIRO, S. D. et al. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **American Journal of Pathology**, New York, v. 163, n. 6, p. 2329-2335, 2003.

SWAMY, M. et al. Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. **Nature Immunology**, New York, v. 11, n. 8, p. 656-665, ago. 2010

STOCKLEY, R. A.; MANNINO, D.; BARNES, P. J. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v. 6, n. 6, p. 524-526, set. 2009.

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

SUN, C. et al. LL-37 secreted by epithelium promotes fibroblast collagen production: a potential mechanism of small airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 94, n. 9, p. 991-1002, jun. 2014.

TAYLOR, A. E. et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 35, n. 5, p. 1039-1047, nov. 2010.

THILLE, A. W. et al. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. **The Lancet Respiratory Medicine**, Kidlington, v. 1, n. 5, p. 395-401, jul. 2013.

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

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

TSUNO, K. et al. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 143, n. 5, part. 1, p. 1115-1120, maio 1991.

UNROE, M. et al. One-year trajectories of care and resource utilization for recipients of prolonged mechanical ventilation: a cohort study. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 153, n. 3, p. 167-175, ago. 2010.

VADÁSZ, I.; SZNAJDER, J. I. Update in acute lung injury and critical care 2010. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 183, n. 9, p. 1147-1152, mar. 2011.

VAN DE LEST, C. H. et al. Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 8, n. 2, p. 238-245, nov. 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. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 301, n. 1, p. R148-R158, jul. 2011

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, mar. 2013.

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, p. e235-e241, ago. 2014.

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

WANG, D.; WANG, Y; LIU, Y. Experimental pulmonary infection and colonization of *Haemophilus influenzae* in emphysematous hamsters. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, London, v. 23, n. 4, p. 292-299, ago. 2010.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **TheNew England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1334-1349, maio 2000.

WEINERT, C. R. et al. Health-related quality of life after acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 156, n. 4, p. 1120-1128, nov. 1997.

WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**, London, v. 369, n. 9572, p. 1553-1564, maio 2007.

WIENER-KRONISH, J. P.; ALBERTINE, K. H.; MATTHAY, M. A. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 88, n. 3, p. 864, set. 1991.

WILCOX, M. E. et al. Cognitive dysfunction in ICU patients: risk factors, predictors, and rehabilitation interventions. **Critical Care Medicine**, New York v. 41, n. 9, p. S81-S98, nov. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chronic of respiratory disease: chronic obstructive pulmonary disease (COPD)**. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/copd/en/>>. Acesso em: 20 dez 2016.

WOUTERS, E. F. M; CREUTZBERG, E. C.; SCHOLS, A. M. W. J. Systemic effects in COPD. **CHEST Journal**, Park Ridge, v. 121, n. 5, suppl, p. 127S-130S, maio 2002.

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

YOSHIKAWA, S. et al. Clara cell secretory protein and phospholipase A2 activity modulate acute ventilator-induced lung injury in mice. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 98, n. 4, p. 1264-1271, abr. 2005.

ANEXO A

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



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 026/2014 – CEUA sobre “Avaliação do desenvolvimento de lesão pulmonar induzida por administração de lipolissacarídeo intratraqueal 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 e LÍDIA MARIA CARNEIRO DA FONSECA 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 02/09/2014. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 48 ratos Wistar machos (48 machos) de 90 dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período de 13/10/2014 a 28/08/2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 026/2014 - CEUA about “Avaliação do desenvolvimento de lesão pulmonar induzida por administração de lipolissacarídeo intratraqueal em ratos Wistar com enfisema induzido por elastase” under responsibility of MAYCON DE MOURA REBOREDO and collaboration of BRUNO DO VALLE PINHEIRO, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, AYDRA MENDES ALMEIDA BRANCHI, FERNANDO FONSECA DOS REIS and LÍDIA MARIA CARNEIRO DA FONSECA - 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 02/09/2014. For the development of this research 48 male Wistar rats of 90 days old, will be delivered as requested in the period of 13/10/2014 to 28/08/2015.

Juiz de Fora, 03 de setembro de 2014

Presidente
CEUA

Vice-presidente
CEUA

ANEXO B

Comprovante de submissão do artigo "*Acute lung injury in response to intratracheal instillation of lipopolysaccharide in an animal model of emphysema induced by elastase*"

Maria Aparecida Esteves Rabelo^{1,2} Leda Marília Fonseca Lucinda^{1,2,3}, Maycon Moura Reboredo^{1,3}, Lídia Maria Carneiro da Fonseca^{1,3}, Fernando Fonseca Reis^{1,3}, Thaís Fernanda Fazza^{1,3}, Danielle Ribeiro Brega¹, Flavia de Paoli², Adenilson de Souza da Fonseca⁴, Bruno Valle Pinheiro^{*1,3}

"Lung (LUNG)"

Dear Dr. Pinheiro,

Thank you for submitting your manuscript, *Acute lung injury in response to intratracheal instillation of lipopolysaccharide in an animal model of emphysema induced by elastase*, to Lung.

The submission id is: LUNG-D-16-00583

Please refer to this number in any future correspondence.

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

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

Springer Journals Editorial Office

Lung