

Indução de Enfisema Pulmonar Experimental com Elastase em Camundongos

GROSS LS¹, CIRNE-LIMA EO²

¹ Letícia da Silveira Gross, Medicina Veterinária, UFRGS
² Elizabeth Obino Cirne Lima

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

INTRODUÇÃO

O enfisema pulmonar é caracterizado por limitação crônica de fluxo aéreo persistente e diversas alterações patológicas nos pulmões. Histologicamente, pode-se definir a doença por aumento permanente dos espaços aéreos distais até os bronquíolos terminais, acompanhado por destruição de suas paredes, sem fibrose óbvia¹. Não há tratamento capaz de reverter o quadro, somente amenizar os sintomas. Dessa forma o objetivo do trabalho é desenvolver um modelo murino de enfisema pulmonar para futuras pesquisas terapêuticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 8 semanas foram divididos em 4 grupos:

- Controle (C; n=8) recebeu 50µl de solução salina
- Enfisema 1 (E10; n=8) 0,1U de elastase em 50µl de salina
- Enfisema 2 (E15; n=7) 0,15U diluídas em 50µl de salina
- Enfisema 3 (E20; n=7) 0,2U diluídas em 50µl de salina

Foram feitas quatro instilações intratraqueais com intervalo de uma semana conforme esquema abaixo.

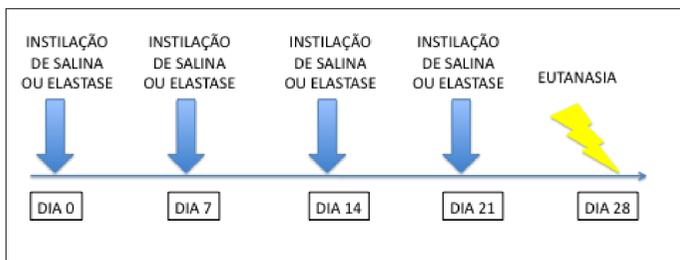


Figura 1: Linha do tempo do estudo

Os animais foram anestesiados com Isoflurano e receberam 5 mg/kg de tramadol por via intraperitoneal. A exposição da traquéia foi feita através de uma incisão longitudinal de 0,5 cm na porção medial da região cervical para instilação de salina ou elastase. Uma semana após a última instilação, os animais foram eutanasiados por sobredose de cetamina e xilazina, os pulmões foram insuflados, retirados e armazenados em formalina tamponada 10%, para as análises histológicas. Cortes histológicos de 3 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE), foram realizados e analisados em microscopia óptica com aumento de 400x. A análise do diâmetro alveolar médio (Lm) foi realizada através de técnica de contagem de pontos². Um retículo contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas, com auxílio do *software* ImageJ. O número de interceptos foram contados em 20 campos aleatórios, sendo $Lm = \frac{\sum \text{comprimento dos seguimentos}}{\text{número de interceptos}}$ (1250µm)/número de interceptos. Os dados não-paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn. Foi considerado significativo $p < 0,05$. O projeto foi aprovado pelo CEUA-HCPA sob o número 13-0086. Apoio financeiro FIPE/HCPA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na figura 2 o diâmetro alveolar médio aumentou com doses maiores.

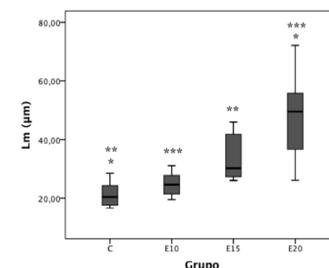


Figura 2: Diâmetro alveolar médio (Lm). Valores expressos em mediana (intervalo interquartil 25-75). * C versus E20 ($p=0,001$). ** C versus E15 ($p=0,028$). *** E10 versus E20 ($p=0,017$). C= grupo controle; E10= 0,1U 1xsemana por 4 semanas; E15= 0,15U 1xsemana por 4 semanas; E20= 0,2U 1xsemana por 4 semanas.

Assim, o Lm foi maior nos grupos E15 e E20, quando comparados com valores do grupo C. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo controle e E10 no Lm. Adicionalmente, o Lm do grupo E20 foi maior que no E10. Portanto, observa-se, que o diâmetro alveolar médio aumenta proporcionalmente com o aumento da dose de elastase utilizada.

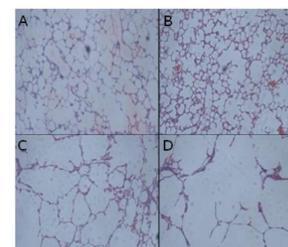


Figura 3: Fotomicrografias de parênquima pulmonar (200x) coradas com HE. A - Controle; B - E10; C - E15; D - E20.

Ao analisarmos a figura 3, observamos que a dose de 0,1U, instilada 1 vez por semana durante 4 semanas não foi suficiente para causar a doença nos animais. Já os grupos E15 e E20 apresentam diâmetro alveolar médio confirmando a presença da patologia. Ainda, o diâmetro alveolar médio do grupo E2, mesmo não havendo diferença significativa para E15, foi maior, demonstrando que com dose maior, o enfisema pulmonar desenvolvido é mais severo.

CONCLUSÕES

Concluímos que para indução de enfisema em camundongos C57BL/6 é necessário utilizar doses de elastase de no mínimo 4 x 0,15U. Se considerarmos a gravidade da doença, com 4 instilações de 0,2U de elastase, é produzido enfisema pulmonar severo.

REFERÊNCIAS

- ¹ Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2011. Available from: <http://www.goldcopd.org/>
- ² Dunnill MS. Evaluation of a simple method of sampling the lung for quantitative histological analysis. Thorax 1964; 19: 443-448