

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**REABILITAÇÃO**

**EFEITO DA PREDNISOLONA SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E  
NO DIÂMETRO ALVEOLAR EM ENFISEMA ELASTASE INDUZIDO EM  
RATOS.**

**MARTHA TRINDADE MANCHINI**

**São Paulo, SP**

**2010**

**MARTHA TRINDADE MANCHINI**

**EFEITO DA PREDNISOLONA SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E  
NO DIÂMETRO ALVEOLAR EM ENFISEMA ELASTASE INDUZIDO EM  
RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Willian L. Nascimento.

**São Paulo, SP**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Manchini, Martha Trindade.

Efeito da prednisolona sobre o processo inflamatório e no diâmetro alveolar em efisema elastase induzido em ratos. / Martha Trindade Manchini. 2010.

66 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE - Ciências da Reabilitação, São Paulo, 2010.

Orientador (a): Prof. Dr. Jorge Willian L. Nascimento.

**I.** Glicocorticóides. 2. Prednisolona. 3. Enfisema pulmonar. 4. Ratos.

**I-** Nascimento, Jorge Willian L.

CDU 615.8

São Paulo, 14 de dezembro de 2010.

TERMO DE APROVAÇÃO

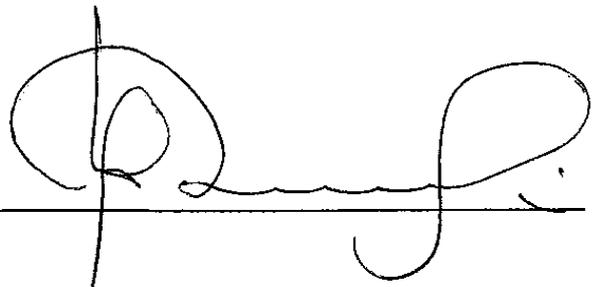
Aluna: MARTHA TRINDADE MANCHINI

Título da Dissertação: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PREDNISOLONA SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E NO DIÂMETRO ALVEOLAR EM ENFISEMA ELASTASE INDUZIDO EM RATOS".

Presidente PROF. DR. JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO



Membro: PROF. DR. CARLOS ALBERTO DA SILVA



Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Cleuza e Elcio, por sempre estarem ao meu lado, me incentivando e motivando a nunca desistir dos meus sonhos. Sem eles, não estaria nessa fase tão importante da minha vida.*

**O mérito do homem não reside apenas no conhecimento que tem, mas no esforço que despendeu para alcançá-lo.**

**Gotthold Ephraim Lessing**

## AGRADECIMENTO

*Agradeço a Deus por sempre iluminar meus caminhos e conquistas.*

*Agradeço meus pais, minha família, minha irmã Claudia, minhas amigas Daniele, Mariane e Marta por sempre estarem ao meu lado, tendo paciência e tolerância nesse processo de construção pessoal e profissional.*

*Agradeço aos meus novos amigos do mestrado, Carmen, Carlos, Marcelo, Raphael e Tati, juntos, passamos por momentos de preocupação e angústia e sem o apoio deles as coisas seriam muito mais complicadas e difíceis. OBRIGADA AMIGOS!! Serei eternamente agradecida a Deus por ter conhecido vocês.*

*Agradeço todo o corpo docente do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação por me auxiliar na construção do saber, principalmente a Profa. Carla Malaguti e Prof. José Antônio por terem auxiliado no meu desenvolvimento científico.*

*Agradeço aos alunos da iniciação científica Gabriel e Sheila e ao mestrando Dannylo por ajudarem no desenvolvimento do trabalho, pois sem eles as coisas se tornariam muito mais complicadas.*

*Agradeço em especial meu orientador Prof. Dr. Jorge Willian, pela paciência que teve comigo durante esses dois anos, e mesmo percebendo as minhas dificuldades, sempre mostrou se disposto a me ajudar. OBRIGADA PELA CONFIANÇA PROFESSOR E AMIGO!*

*Agradeço à Uninove por ter me concedido a bolsa, pois sem esse apoio não teria realizado o mestrado.*

## RESUMO

Os glicocorticoides, como a prednisolona, são utilizados para uma variedade de condições inflamatórias, incluindo asma e enfisema pulmonar. Entretanto o entendimento de seu mecanismo de ação e seu uso clínico ainda permanecem controversos. Avaliar a resposta inflamatória aguda, alterações teciduais e dosagem de óxido nítrico em enfisema elastase induzido em ratos, após tratamento com a prednisolona. 32 ratos machos, divididos em 4 grupos (n=8): C=controle, E=enfisema, P=prednisolona e EP=Enfisema + prednisolona. Os grupos C e P receberam instilação intratraqueal de 0,2 ml de solução salina e os grupos E e EP receberam instilação de 0,2 ml de elastase pancreática para indução do enfisema. Foi administrado prednisolona (5mg/Kg) nos grupos P e EP e veículo (CMC) nos grupos C e E. As administrações foram realizadas em dose única diária, por gavagem, durante 25 dias. Após o sacrifício, os pulmões foram retirados para avaliação do diâmetro alveolar (Lm), quantificação de leucócitos e dosagem de óxido nítrico no líquido broncoalveolar. Comparando-se o grupo enfisematoso com o grupo controle foi observado um aumento significativo do espaço alveolar no grupo enfisematoso. No entanto, comparando os animais do grupo controle com o grupo enfisema tratado com prednisolona, este não apresentou redução significativa do alargamento do espaço alveolar. Na quantificação de leucócitos ou de óxido nítrico no BALF não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Apesar do amplo uso clínico dos corticosteróides em doenças respiratórias, não foi observado efeito protetor direto sobre a redução do diâmetro alveolar dos animais enfisematosos tratados, sugerindo maiores estudos relacionados à seu mecanismo de ação e sobre sua utilização clínica em pacientes com enfisema.

**Palavras-chave:** Glicocorticóides; Prednisolona; DPOC; Enfisema pulmonar; Ratos.

## ABSTRACT

Glucocorticoids, as prednisolone, are used for a variety of inflammatory conditions, including asthma and pulmonary emphysema. However its mechanism of action and clinical use are still controversial. To evaluate the acute inflammatory response, tissue damage and nitric oxide in elastase-induced emphysema in rats after prednisolone treatment. 32 male rats were divided in four groups (n=8): Control (C), Emphysema (E), Prednisolone (P), Emphysema+Prednisolone (EP). Groups C and P received intratracheal instillation of 0.2 ml of saline and groups E and EP received instillation of 0.2 ml of porcine pancreatic elastase to induce emphysema. Prednisolone was administered (5mg/kg) in groups P and EP and vehicle in groups C and E. The administrations were performed once a day, by gavage, for 25 days. After sacrifice, lungs were removed for evaluation of alveolar diameter (Lm), quantification of leukocytes and nitric oxide in bronchoalveolar lavage. Comparing the elastase group with the control group, there was a significant increase in the alveolar airspace enlargement in the group with emphysema. However, comparing the control group with emphysema group treated with prednisolone, the treatment did not show significant reduction in the alveolar airspace enlargement. The number of leukocytes and nitric oxide level in BALF did not show statistically significant difference between groups. Despite widespread clinical use of corticosteroids in respiratory diseases, there was no direct protective effect on reducing the mean linear intercept of alveolar emphysema treated animals, suggesting further studies related to its mechanism of action and on its clinical use in patients with emphysema.

**Keywords:** Glucocorticoid; Prednisolone; COPD; Emphysema; Rats.

## LISTA DE FIGURA

### **2. ARTIGO (AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PREDNISOLONA SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E NO DIÂMETRO ALVEOLAR EM ENFISEMA ELASTASE INDUZIDO EM RATOS).**

**Figura 1.** Diâmetro alveolar médio de ratos com enfisema elastase induzido tratado com prednisolona (5 mg/Kg)

**Figura 2.** Imagens microscópicas de lâminas com cortes histológicos de pulmões de ratos corados com hematoxilina-eosina (HE 400x)

**Figura 3.** Número de leucócitos no BALF de ratos com enfisema elastase induzido tratado com prednisolona (5 mg/Kg)

**Figura 4.** Quantificação do óxido nítrico no BALF de ratos com enfisema elastase induzido tratado com prednisolona (5 mg/Kg)

## LISTA DE ABREVIATÖES

- DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
- MMP - Metaloproteinase de matriz
- VEF1 - Volume expiratório forçado no primeiro minuto
- PPE - Elastase pancreática suína
- CoEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CMC - Carboximetilcelulose
- BALF - Fluido do lavado broncoalveolar
- PBS - Tampão fosfato
- HE - Hematoxilina eosina
- Lm - Medida de intersecção linear
- NO - Óxido Nítrico
- iNOS - Óxido Nítrico induzível
- eNOS - Óxido Nítrico sintase endotelial
- GSH - Glutathiona reduzida

## ÍNDICE

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
<b>1.CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	
1.1 Introdução	13
1.2 Referências Bibliográficas	17
<b>2.ARTIGO</b>	
2.1 Introdução	23
2.2 Materiais e Métodos	26
2.3 Análise Estatística	29
2.4 Resultados	29
2.5 Discussão	33
2.6 Conclusão	36
2.7 Referências Bibliográficas	36
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	41
<b>4. APÊNDICES</b>	
4.1 Repercussões musculares do uso de glicocorticóides na distrofia muscular de Duchenne e na DPOC	44
4.2 Efeito da prednisolona sobre o diâmetro alveolar de ratos com enfisema elastase induzido	63
4.3 Effects of atorvastatin on alveolar diameter of rats with elastase-induced emphysema	64
<b>5. ANEXOS</b>	
5.1 Aprovação do Coep – Universidade Nove de Julho	66

## **1. CONTEXTUALIZAÇÃO**

## 1.1 Introdução

O enfisema é uma doença caracterizada pelo alargamento dos espaços alveolares juntamente com a destruição das paredes alveolares, constituindo uma das manifestações da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)<sup>1,2</sup>. Na DPOC, o enfisema coexiste com inflamação crônica dos brônquios e bronquíolos, fibrose e hipersecreção de muco, que ocasiona estreitamento e fechamento das pequenas vias aéreas<sup>3</sup>. As manifestações extra-pulmonares também ocorrem, tais como disfunção muscular periférica, osteoporose, anemia e outras<sup>4</sup>.

Atualmente, a DPOC é o maior e mais crescente problema de saúde global, o que pode torná-la a terceira causa mais comum de morte e a quinta maior causa de incapacitação no mundo por volta de 2020<sup>2,5</sup>. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80 milhões de pessoas sofrem de DPOC moderada ou grave. No Brasil, a prevalência em grandes centros urbanos, como a cidade de São Paulo, varia de 6% a mais de 15%, dependendo do critério diagnóstico adotado<sup>2</sup>.

O tabagismo é o principal fator de risco para desenvolvimento da DPOC, por ser um hábito muito prevalente, e de duração prolongada na maioria dos casos. Exposição a substâncias tóxicas também pode levar a lesão crônica de vias aéreas. Exposição ocupacional a substâncias tóxicas ao longo de vários anos pode levar ao desenvolvimento da DPOC, principalmente quando associados ao tabagismo. Outros fatores incluem hiper-responsividade de vias aéreas, poluição ambiental e deficiência de alfa1-antitripsina<sup>6,7</sup>.

Os principais sintomas relacionados na DPOC são: tosse diária ou intermitente que pode preceder a dispnéia ou aparecer simultaneamente a ela. Os pacientes geralmente apresentam intolerância ao exercício devido à fadiga e dispnéia limitante. Estes sintomas são os principais determinantes da redução do desempenho nas atividades de vida diária, no trabalho e na qualidade de vida relacionada à saúde, e constituem a fundamentação óbvia da indicação de programas de reabilitação pulmonar<sup>8</sup>.

O mecanismo que melhor explica a dispnéia se deve a inflamação crônica das vias aéreas, a qual se manifesta pelo edema, hipertrofia do músculo liso e muco na via aérea, reduzindo o calibre da porção condutora do

ar, limitando o fluxo expiratório, conduzindo a hiperinsuflação dinâmica, o que resulta no aumento do trabalho ventilatório e maior sensação de desconforto respiratório <sup>1,8</sup>.

Nos últimos anos, vários pesquisadores exploraram novos horizontes fisiopatogênicos, o que permitiu a mudança do enfoque, até então quase exclusivamente relacionado à função pulmonar, para o estudo celular e bioquímico da doença. Isto foi introduzido na definição da DPOC pela Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. Na DPOC ocorrem alterações dos componentes celulares do pulmão, com aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócito CD8+, excesso de produtos oxidativos e a facilitação de colonização por microorganismos. Tais fatores interagem de modo a recrutar mais células pró-inflamatórias. Nas áreas de maior ventilação pulmonar ocorre a destruição periférica das ligações dos alvéolos, facilitando a sua fusão e hiperinsuflação (enfisema) <sup>1,9,10</sup>.

O acúmulo de macrófagos nos alvéolos, bronquíolos e vias aéreas de pequeno porte é positivamente associado com o desenvolvimento do enfisema. A serinaproteases (por exemplo, a elastase de neutrófilos) e metaloproteinases (MMPs) parecem participar desse processo <sup>11,12</sup>.

Ainda não está plenamente estabelecido o papel de cada uma dessas células inflamatórias na alteração estrutural causada pela doença. Em algumas circunstâncias, como na infecção ou no fumo, os neutrófilos migram em grande quantidade para o pulmão. Durante este processo, os neutrófilos podem liberar suas enzimas, como a elastase, com a finalidade de preservação pulmonar. Assim, substâncias neutrofílicas são liberadas em grande quantidade, atuando nos sítios reconhecidos de sua interação enzimática, sem distinção entre substâncias nocivas ou componentes da matriz extracelular <sup>6,13</sup>.

A elastase lisossomal neutrofílica é a principal enzima que age degradando a elastina, componente da estrutura das fibras elásticas. Em condições normais, a atividade enzimática proteolítica é prevenida e restaurada pelas enzimas antiproteolíticas. Este fato tem estimulado alguns pesquisadores a produzirem modelos de enfisema com altas concentrações de elastase ou com deficiência de alfa-1 antitripsina. No entanto, a correlação entre estes modelos inflamatórios e as alterações estruturais por eles produzidas não é simples e direta. Nem todos os tabagistas com alto número de neutrófilos

recolhidos de suas vias aéreas desenvolvem enfisema, sugerindo que os neutrófilos não sejam as únicas células a participarem desse processo <sup>1,6,13</sup>.

O estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo amplificador na DPOC. Biomarcadores do estresse oxidativo (ex.:peróxido de hidrogênio, 8-isoprostano) estão aumentados no ar exalado e condensado, no muco e na circulação sistêmica dos pacientes com DPOC. O estresse oxidativo se eleva ainda mais nas exacerbações. Os oxidantes são gerados por fumaça de cigarro e outros particulados inalados, e liberados de células inflamatórias ativadas como macrófagos e neutrófilos. Pode também haver uma redução nos antioxidantes endógenos em pacientes com DPOC. O estresse oxidativo tem várias conseqüências adversas nos pulmões, incluindo ativação de genes inflamatórios, inativação de antiproteases, estimulação de secreção do muco, e estimulação do aumento da exudação plasmática. Muitos desses efeitos adversos são mediados por peroxinitrito, que é formado via uma interação entre anions superóxido e óxido nítrico. Por sua vez, o óxido nítrico é gerado por óxido nítrico sintase induzível, que se expressa nas vias aéreas periféricas e parênquima pulmonar de pacientes com DPOC <sup>2,10,14,15</sup>.

Os tratamentos farmacológicos mais eficazes para prevenir e controlar os sintomas, reduzir a freqüência e a gravidade das exacerbações da DPOC, são os broncodilatadores (particularmente  $\beta_2$ -agonistas inalados com ou sem anticolinérgicos) e os corticosteróides <sup>7,10</sup>.

A administração de corticóides para o tratamento das exacerbações já foi amplamente difundido muito antes de grandes evidências em sua utilização nesta doença. A administração de corticóide seja inalatória, oral ou intravenosa mostrou-se eficaz em diferentes estágios de gravidade da doença, com melhorias no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) de até três vezes quando comparado com indivíduos utilizando placebo <sup>16,17</sup>, porém as diretrizes atuais sugerem que a via oral de administração deve ser preferível no tratamento de exacerbações, pelo fato de ser mais conveniente e de menor custo <sup>18</sup>.

As reações adversas da terapia sistêmica de glicocorticóides podem ser divididas em reversíveis, que incluem diabetes mellitus, hipertensão, obesidade e alterações na pele; e irreversíveis, como a miopatia induzida por esteróides em altas doses ou em tratamentos de longa duração <sup>19</sup>.

Os corticóides causam uma miopatia caracterizada pela diminuição no tamanho das fibras musculares, ou seja, atrofia preferencialmente das fibras do tipo II, as de contração rápida, com menos impacto nas fibras do tipo I. A miopatia ocorre devido à redução da síntese e aumento na degradação de proteínas, culminando assim em atrofia muscular <sup>20</sup>. Especificamente, o corticosteróide altera a microestrutura muscular reduzindo proteínas contrateis, aumentando a quebra de proteína pelo baixo fator de regulação dos fatores de crescimento, reduzindo a atividade glicolítica e permitindo a atrofia do sarcômero e das fibras do tipo II <sup>21</sup>.

Schakman et al. (2008), sugerem também que os glicocorticóides estimulam a produção de miostatina pelo músculo. A miostatina é um fator de crescimento que inibe o desenvolvimento de massa muscular e desregula a proliferação e diferenciação de células satélites, alterando a síntese de proteínas e contribuindo para a atrofia e fraqueza muscular comumente encontrada nesses pacientes.

Estas condições catabólicas estão associadas ao hipercostisolismo que, por sua vez, desempenha um papel importante na atrofia músculo-esquelética. A administração de doses elevadas de glicocorticóides induz a degradação de proteínas, mediada principalmente pela ativação de ubiquitina-proteosoma e pelas vias lisossomais e inibe também a ação do RU486, um antagonista do receptor de glicocorticóides, que reduz a perda de massa muscular <sup>22</sup>.

Os glicocorticóides sintéticos são usados terapêuticamente de forma eficaz para uma ampla variedade de condições que exigem modulação imunológica ou inflamatória, incluindo o tratamento do enfisema pulmonar, porém as reações adversas da terapia sistêmica com o uso destes fármacos podem repercutir no decurso da doença e na qualidade de vida dos pacientes.

Desta maneira, o perfeito entendimento do enfisema é de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias adequadas e a completa reabilitação do paciente, levando-se em conta que, até o momento, a terapêutica nestes pacientes tem obtido resultados apenas paliativos.

## 1.2 Referências Bibliográficas

1. Morris DG, Sheppard D. Pulmonary emphysema: when more is less. *Physiology* 2006; 21:396-403.
2. Cavalcante AG, Bruin PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J. Bras. Pneumol.* 2009;35(12):1227-1237.
3. Irion KL, Hochegger B, Marchiori E. *J Bras Pneumol.* 2007; 33(6):720-732.
4. Mador MJ, Bozkanat E. Skeletal Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2001;2(4):216-24.
5. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization; c2009 [cited 2009 Jul 2]. World Health Report 2008. Available from: <http://www.who.int/whr/2008/en/index.html> 2008;34(10):787-795.
6. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Disease* 2008;12(4):361-367.
7. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. *J. Bras.Pneumol.* 2004;30(5):1-5.
8. Buist AS, Anzueto A, Calverley P, et al. Global Strategy for the management, and prevention of chronic obstructive lung disease. Global Initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD), 2007.
9. Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol.* 2006;32(3):241-8.
10. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2008. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
11. Oudijk EJD, Lammers JWJ, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22(46): 5s–13s.
12. Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *J Bras Pneumol.* 2008;34(10):787-795.

13. Rufino R, Madi K, Souza HSP. Avaliação quantitativa das fibras elásticas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol.* 2007;33(5):502-509.

14. Demedts IK, Demoor T, et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary Emphysema. *Respiratory Research* 2006;7(53):1-10.

15. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):258-66.

16. Singh JM, Palda VA, Stanbrook, et al. Corticosteroide therapy for patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2002;162(22):2527-36.

17. Christensson C, Thorén A, Lindberg B. Safety of inhaled budesonide clinical manifestations of systemic corticosteroid-related adverse effects. *Drug Saf* 2006;31(11):965-88.

18. Jong YP, Uil SM, Grotjohan HP, Postma DS et al. Oral or IV Prednisolone in the Treatment of COPD Exacerbations. *Chest* 2007;132(6):1741-7.

19. Manchini MT, Boiati RF, Malaguti C, Nascimento JWL. Repercussões musculares do uso de glicocorticóides na distrofia muscular de Duchenne e na DPOC. *Revista Terapia Manual* 2010; 8(35):70-77.

20. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol.* 2008;197(1):1-10.

21. MacIntyre NR. Muscle dysfunction associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care.* 2006;51(8):840-7.

22. A statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society. "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease". *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(4):1-40

23. Rubio ML, M, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G and González-Mangado N. Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats. *Chest* 2004; 125:1500-1506.

24. Kim DK, Zhu J, et al. Myosin heavy chain and physiological adaptation of the rat diaphragm in elastase-induced emphysema. *Respir Res* 2003;4(1):1-10. 25. Lüthje L, Raupach T, et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respiratory Research* 2009;10(7):1-10.

26. Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental d enfisema pulmonar induzido em papaína. J Pneumol. 2002;28(1):1-7.

27. Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. Anal Chem. 1989;61(24):2715-8.

## **2. ARTIGO**

## Carta de submissão do Artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Pulmonary Pharmacology and Therapeutics  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of prednisolone treatment on inflammation and alveolar diameter in model of elastase-induced emphysema in rats.

Article Type: Full Length Article

Keywords: glucocorticoid, prednisolone, COPD, emphysema, rats.

Corresponding Author: Ms Martha Manchini,

Corresponding Author's Institution: Nove de Julho University

First Author: Martha Manchini

Order of Authors: Martha Manchini; Martha Manchini; Raphael Boiati; Dannylo Souza; Jorge Gabriel Batista; Carla Malaguti; Jorge Willian L Nascimento

**MANUSCRITO SUBMETIDO**

Evaluation of prednisolone treatment on inflammation and alveolar diameter in model of elastase-induced emphysema in rats.

## 2.1 Introdução

O enfisema é uma doença caracterizada pelo alargamento dos espaços alveolares juntamente com a destruição das paredes alveolares, constituindo uma das manifestações da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)<sup>1,2</sup>. Na DPOC, o enfisema coexiste com inflamação crônica dos brônquios e bronquíolos, fibrose e hipersecreção de muco, que ocasiona estreitamento e fechamento das pequenas vias aéreas<sup>3</sup>.

Atualmente, a DPOC é o maior e mais crescente problema de saúde global, o que pode torná-la a terceira causa mais comum de morte e a quinta maior causa de incapacitação no mundo por volta de 2020<sup>2,4</sup>.

Nos últimos anos, vários pesquisadores exploraram novos horizontes fisiopatogênicos, o que permitiu a mudança do enfoque, até então quase que exclusivamente relacionado à função pulmonar, para o estudo celular e bioquímico da doença, avaliando desta forma, os efeitos extrapulmonares e comorbidades importantes que podem contribuir para a gravidade da doença. Isto foi introduzido na definição da DPOC pela Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. Na DPOC ocorrem alterações dos componentes celulares do pulmão, com aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócito CD8+, estresse oxidativo e a facilitação de colonização por microorganismos. Tais fatores interagem de modo a recrutar mais células pró-inflamatórias. Nas áreas de maior ventilação pulmonar ocorre a destruição periférica das ligações dos alvéolos na região de parênquima pulmonar, facilitando a sua fusão e hiperinsuflação, caracterizando o enfisema<sup>1,5,6</sup>.

Ainda não está plenamente estabelecido o papel destes elementos na alteração estrutural causada pela doença. Em algumas circunstâncias, como na infecção ou no tabagismo, há uma importante migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o pulmão. Durante este processo, os neutrófilos podem liberar enzimas, como a elastase, com a finalidade de preservação pulmonar, entretanto, sem distinção entre substâncias nocivas ou componentes da matriz extracelular<sup>7,8</sup>.

A elastase neutrofílica é a principal enzima que age degradando a elastina, componente da estrutura das fibras elásticas. Em condições normais, a atividade enzimática proteolítica é prevenida e restaurada pelas enzimas

antiproteolíticas, como a  $\alpha_1$ -antitripsina<sup>1,6,7</sup>. Desta forma, a patogênese do enfisema é resultado de uma série de fatores, como a inflamação, atividade proteolítica, desequilíbrio de metaloproteases de matriz, apoptose e estresse oxidativo. Este fato tem estimulado alguns pesquisadores a desenvolver modelos de enfisema em ratos ou camundongos utilizando elastase pancreática suína (PPE), uma enzima que atua predominantemente na elastina provocando uma resposta inflamatória pulmonar aguda que contribui para a destruição do tecido conectivo pulmonar, ocasionando destruição do parênquima e alterações da função pulmonar, de forma semelhante ao enfisema humano<sup>9,10</sup>.

O estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo amplificador na DPOC. Biomarcadores do estresse oxidativo como o peróxido de hidrogênio e o 8-isoprostano estão aumentados no ar exalado e condensado, no muco e na circulação sistêmica dos pacientes com DPOC. Pode também haver uma redução nos antioxidantes endógenos em pacientes com DPOC. O estresse oxidativo tem várias conseqüências adversas nos pulmões, incluindo ativação de genes inflamatórios, inativação de antiproteases e estimulação de secreção do muco. Muitos desses efeitos são mediados por peroxinitrito, que é formado por uma interação entre ânions superóxido e óxido nítrico.<sup>2,6,11,12</sup>

Uma vez desenvolvida a DPOC e suas comorbidades, estas não podem ser curadas e, portanto, devem ser tratadas continuamente. O tratamento inclui a reabilitação pulmonar, oxigenioterapia, cirurgia redutora de volume pulmonar e a terapia farmacológica, a qual, apesar de reduzir os sintomas e as exacerbações, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, apresenta apenas resultados paliativos<sup>6,13</sup>.

Dentre os fármacos mais utilizados para prevenir e controlar os sintomas, reduzir a freqüência e a gravidade das exacerbações da DPOC, estão os broncodilatadores (agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos e anticolinérgicos) e os antiinflamatórios glicocorticóides, como a budesonida e a prednisolona<sup>6,14</sup>. Estes antiinflamatórios reduzem a hiperatividade bronquial, a freqüência das crises e melhoram o estado de saúde e a qualidade de vida dos pacientes, entretanto não alteram a taxa de declínio da função pulmonar<sup>3,8</sup>, nem impedem ou retardam o desenvolvimento progressivo do enfisema<sup>15</sup>.

A prednisolona é um análogo sintético adrenocorticosteróide, um esteróide sob a forma de álcool livre ou esterificado, com predominantes propriedades glicocorticóides podendo reproduzir alguns efeitos dos glicocorticóides endógenos e possuem ações que proporcionam efeitos antiinflamatórios que resultam em seu uso no tratamento das mais variadas patologias como a DPOC. Os glicocorticóides também induzem as proteínas antiinflamatórias, as lipocortinas. Essa proteína inibe a enzima fosfolipase 2 $\alpha$ , inibindo a síntese de prostaglandinas e de produtos da lipoxigenase. Os corticosteróides também se ligam a receptores glicocorticóides localizados no citoplasma e os receptores glicocorticóides ativados movem-se para o núcleo, onde ocorre a regulação dos genes antiinflamatórios (ex.: lipocortina, endopeptidase neutral, inibição dos ativadores do plasminogênio). Os corticosteróides também diminuem a estabilidade de moléculas selecionadas do RNA mensageiro alterando a transcrição genética. Esses genes afetados por essa ação incluem aqueles envolvidos na síntese da colagenase, elastase, ativador de plasminogênio, óxido nítrico-sintase, cicloxigenase tipo II, citocinas e quimoquinas. Assim sendo, os corticosteróides são inibidores efetivos das citocinas descritas e por isso reduzem a resposta inflamatória iniciada por estas citocinas <sup>16,17</sup>.

Desta forma, o uso de glicocorticóides para o tratamento das exacerbações já foi amplamente difundido muito antes de grandes evidências em sua utilização nesta doença. Sua administração, seja inalatória, oral ou intravenosa, mostrou-se eficaz em diferentes estágios de gravidade da doença, com melhorias de até três vezes no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) quando comparado com indivíduos utilizando placebo <sup>18,19</sup>, porém estudos recentes sugerem que a via oral de administração deve ser preferível no tratamento de exacerbações, pelo fato de ser mais conveniente e de menor custo <sup>20,21,22</sup>.

Dentre as reações adversas da terapia sistêmica com o uso destes fármacos, destacam-se a osteoporose, a hipertensão, obesidade e disfunções músculo-esquelética, que podem repercutir no decurso da doença e na qualidade de vida dos pacientes <sup>20</sup>.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença pulmonar obstrutiva crônica tem afetado o mundo todo devido a sua alta prevalência, morbidade e mortalidade, ocasionando grande impacto social e econômico. Desta maneira, a melhor compreensão da fisiopatologia da doença e sua relação com os fármacos utilizados são de grande importância, favorecendo sua efetividade com redução de efeitos adversos e contribuindo para uma melhor terapêutica, visto que até o momento esses pacientes tem obtido resultados apenas paliativos.

Desta forma, avaliou-se neste estudo o efeito da administração da dose única de elastase (PPE) sobre a resposta inflamatória aguda, alterações teciduais e dosagem de óxido nítrico em pulmões de ratos enfisematosos. Além disso, avaliou-se o efeito do glicocorticóide prednisolona na resposta inflamatória e no diâmetro alveolar no enfisema elastase induzido em ratos.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Animais**

Foram utilizados 32 ratos machos Wistar com peso entre 200-250g mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a água e ração. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Nove de Julho. O experimento foi aprovado pelo comitê de ética da UNINOVE (n° AN0011/2009).

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8): grupo controle (C), grupo prednisolona (P), grupo enfisema (E), grupo enfisema tratado com prednisolona (EP).

O protocolo de indução realizado foi adaptado de estudos semelhantes de indução de enfisema realizado por outros autores<sup>9,23,24</sup>, utilizando Elastase 0258 (*pancreatic from porcine pancreas*, tipo IV – Sigma-Aldrich) diluída em salina, para indução do enfisema, na concentração de 2mg/ml. Para o tratamento foi utilizado Prednisolona (5mg/Kg), adquirida da Aché Laboratórios Farmacêuticos, preparada na forma de suspensão em carboximetilcelulose 0,2% (CMC).

Para os procedimentos de indução e coleta de material os animais foram anestesiados com Ketamina-Xilazina (75/10mg/kg) administrada por via intraperitoneal.

Para indução do enfisema, a traquéia foi exposta e uma dose única de elastase (0,4mg/Kg) ou salina foi injetada entre os anéis cartilagosos, com seringas de 1 ml. Os animais dos grupos E e EP receberam 0,2ml de Elastase e os grupos C e P receberam 0,2ml de salina. Logo após o procedimento, a ferida cirúrgica foi suturada e os animais foram recolocados em suas respectivas caixas, permanecendo em observação até o retorno da anestesia.

A administração da Prednisolona ou CMC, foi iniciada 1 hora antes da indução do enfisema e realizada durante 25 dias ininterruptos, em doses únicas diárias, por gavagem. Os grupos P e EP foram tratados com 1 ml de Prednisolona (5mg/Kg). Os grupos C e E receberam 1 ml do veículo (CMC 0,2%). No 25º dia todos os animais foram anestesiados e as amostras biológicas coletadas.

### 2.2.2 Protocolo Experimental

**Sangue:** foi coletado 3ml de sangue arterial da aorta abdominal em tubos de 10 mL, com gel separador, sem anticoagulante. Separou-se uma alíquota para contagem diferencial de leucócitos e o restante do sangue foi centrifugado (3000 g, 10 minutos) e o soro armazenado a -70°C. Posteriormente os animais foram sacrificados por exsanguinação.

**Líquido Broncoalveolar (BALF):** Para a coleta do BALF bloqueou-se o brônquio do pulmão esquerdo com o auxílio de uma linha e foi instilado 3 x 3 ml de tampão fosfato (PBS) pela traquéia com o auxílio de cateter acoplado a conector *threeway*, perfundindo apenas o pulmão direito. Cerca de 80-90% do volume instilado foi recuperado. Deste total, 0,02ml foram separados para quantificação de leucócitos e o restante centrifugado (10000rpm/10min/4°C). O sobrenadante foi armazenado em freezer -70°C até o momento das análises.

**Tecido Pulmonar:** Instilou-se no pulmão esquerdo 0,3 ml de formol tamponado através dos brônquios sendo posteriormente fixados em formaldeído a 4% em solução tamponada (pH 7,5 aproximadamente) por 24h; após a fixação, os tecidos são impregnados com parafina formando-se um bloco de parafina com o tecido no seu interior (inclusão) e desta forma esse

bloco de parafina são seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se cortes de 6 a 8 micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) de espessura. Esses cortes são estirados em água quente e, depois, colocados nas lâminas. E por fim as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) <sup>25,26,27</sup>.

### **2.2.3. Procedimentos laboratoriais**

#### **Contagem diferencial de leucócitos no BALF**

A contagem de leucócitos foi realizada através de contagem tradicional em câmara de Neubauer utilizando microscópio ótico com aumento de 40x. Foram contadas todas as células dos quadrantes externos do retículo da câmara e aplicada a fórmula: n° de leucócitos contados nos 4 quadrados x 50 = número de leucócitos/ $\text{mm}^3$ , conforme técnica descrita na literatura <sup>26</sup>.

#### **Análise morfométrica e morfológica dos tecidos**

A quantificação do enfisema pulmonar foi verificada através da medida do diâmetro médio alveolar em micrômetros (medida de interseção linear - Lm). A técnica consiste na determinação do número de vezes que estruturas do parênquima pulmonar interceptam um conjunto de retas coerentes<sup>25</sup>. Na presença de destruição alveolar ocorre um número menor de interseções, o que caracteriza o enfisema <sup>25,28</sup>. O diâmetro alveolar médio de cada amostra foi obtido pela relação  $Lm = Ltot / Li$  ( $\mu\text{m}$ ). Onde Ltot é o comprimento total das retas do campo e Li é o número de interceptos das estruturas alveolares com as retas do retículo <sup>25,26</sup>. As lâminas foram fotografadas com câmara fotográfica integrada (Canon A530) com objetiva de 25X (aumento de 100X) em cinco campos não coincidentes, escolhidos aleatoriamente. O diâmetro alveolar foi quantificado utilizando a sobreposição do retículo com o auxílio do software Microsoft Office Picture Manager 2007. A contagem das interseções foi realizada por um observador cego.

## **Dosagem de Óxido Nítrico**

A dosagem do óxido nítrico foi realizada com a utilização do equipamento *Nitric Oxide Analyzer 280* (Sievers, USA), no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo/USP. As amostras de BALF estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram desproteinizadas por incubação (3:1) com etanol, em banho-de-gelo, por 30 minutos. Centrifugou-se a  $14.000\text{ g}$  e retirou-se o sobrenadante para análise. A detecção do produto da reação foi feita por quimioluminescência. O sistema de dosagem dos produtos, em amostras líquidas, é constituído de uma câmara de purga, em que a amostra é colocada para que ocorra a reação, permitindo que somente NO seja liberado para leitura. O gás reage com ozônio, emitindo luz, cuja intensidade é medida em milivolts, e corresponde à quantidade de NO presente na amostra. Os resultados foram descritos em micromolar. As concentrações de nitritos e nitratos foram calculadas por comparação com as soluções-padrão. Finalmente, a média das duplicatas foi multiplicada por três, para corrigir a diluição das amostras, empregada no procedimento de desproteinação.

### **2.3. Análise Estatística**

Para análise estatística, será utilizado o software SPSS 14.0.

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos em todas as avaliações realizadas serão analisadas por ANOVA one-way seguido do teste de Tukey como contraste para os dados paramétricos. A avaliação da correlação entre leucócitos e óxido nítrico dos grupos enfisema, controle, enfisema prednisolona e prednisolona foram realizadas utilizando o teste de Pearson. Foi considerado como indicativo de significância estatística  $p < 0,05$ .

### **2.4. Resultados**

Durante a indução do enfisema, na instilação intratraqueal da elastase ou salina, ocorreu a morte de um animal do grupo enfisema; dois animais do

grupo prednisolona, e três animais do grupo enfisema prednisolona. Não houve morte de animais do grupo controle.

### Avaliação do diâmetro alveolar

A destruição da arquitetura alveolar do parênquima pulmonar promovido pela administração intratraqueal de elastase e as diferenças em relação ao grupo tratado com prednisolona foram verificadas através da medida do diâmetro médio alveolar (Lm). Comparando-se o grupo enfisematoso com o grupo controle foi observado um aumento significativo do espaço alveolar no grupo enfisematoso. No entanto, comparando os animais do grupo controle com o grupo enfisema prednisolona, este não apresentou redução significativa do alargamento do espaço alveolar, conforme mostrado na figura 1.

Nós avaliamos os cortes pulmonares que foram corados com hematoxilina-eosina após 25 da administração intratraqueal de PPE e prednisolona como mostrado na figura 2.

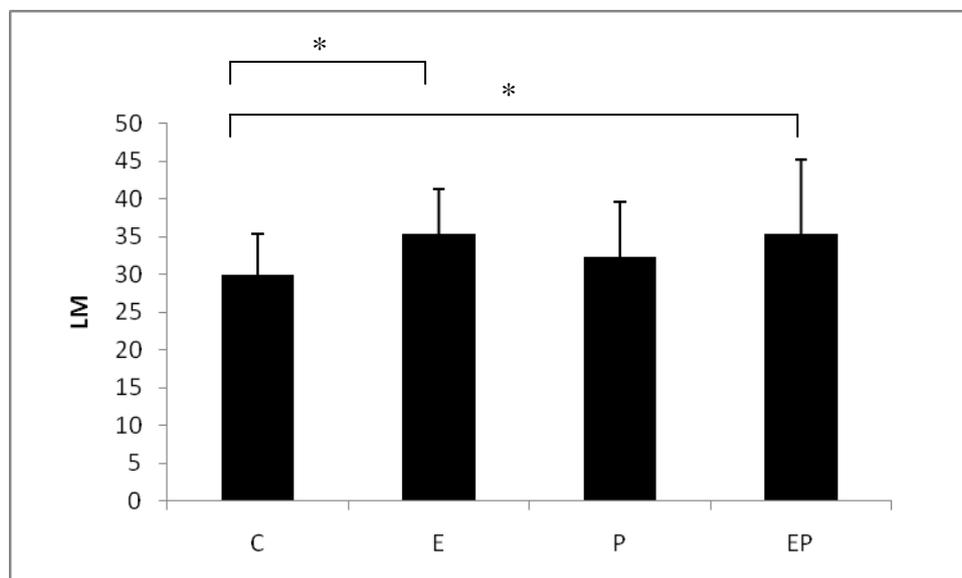


Figura 1: Diâmetro alveolar médio de ratos com enfisema elastase induzido tratados com prednisolona (5 mg/Kg). Dados descritos como média e desvio padrão (n=8 grupo controle; n=7 grupo enfisema; n=6 grupo prednisolona; n=5 grupo enfisema prednisolona). \* Diferença entre os grupos C

e E; e entre C e EP ( $p < 0,05$ ); C: Controle; E: Enfisema; P: Prednisolona; EP: Enfisema+Prednisolona.

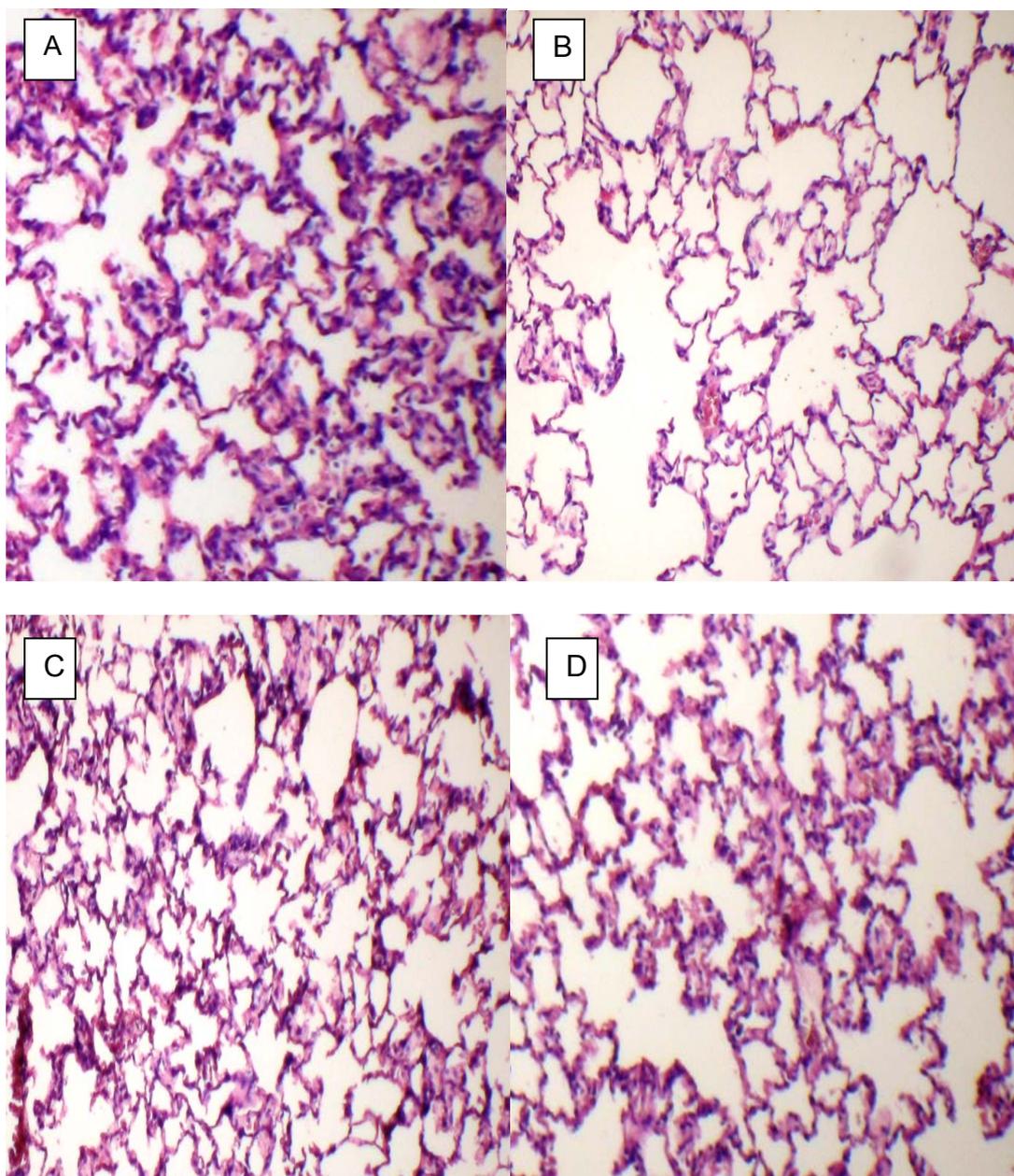


Figura 2: Imagens microscópicas de lâminas com cortes histológicos de pulmões de ratos corados com hematoxilina-eosina (HE 400x) após 25 dias após a instilação intratraqueal de 0,2 ml de elastase ou solução salina. A) Controle; B) enfisema; C) prednisolona; D) enfisema/prednisolona.

### Quantificação de leucócitos no líquido broncoalveolar

Foi avaliado o efeito da prednisolona na redução da migração de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar. Houve uma redução do número de leucócitos no BALF dos animais do grupo controle tratados com prednisolona e enfisematosos tratados com prednisolona, quando comparado com o grupo enfisematoso, entretanto sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, como observado na figura 3.

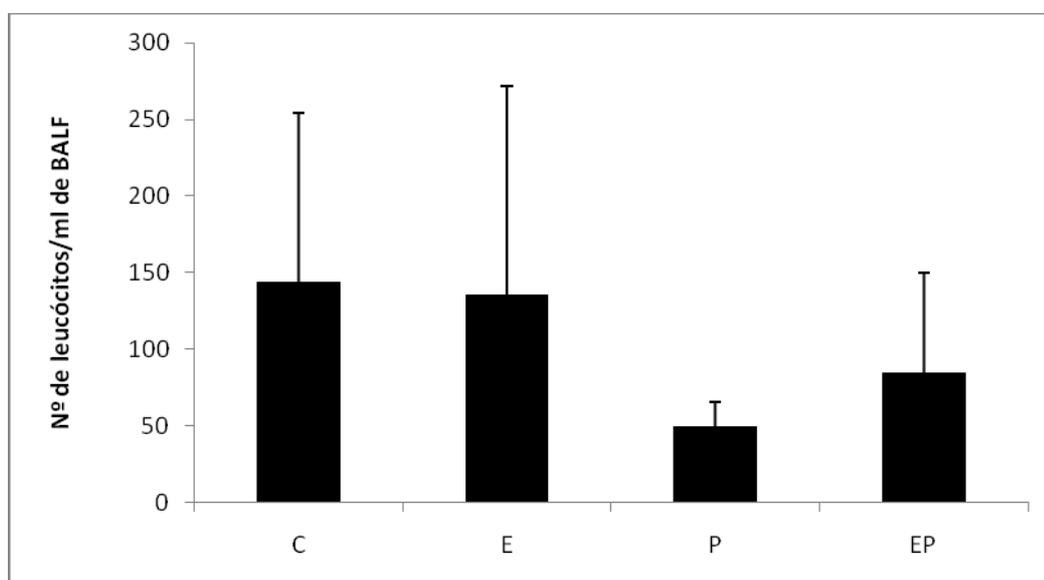


Figura 3: Número de leucócitos no BALF de ratos com enfisema elastase induzido tratados com prednisolona (5 mg/Kg). Dados descritos como média e desvio padrão ((n=8 grupo controle; n=7 grupo enfisema; n=6 grupo prednisolona; n=5 grupo enfisema prednisolona).

### Avaliação do Óxido Nítrico (NO)

Foi realizada a dosagem de óxido nítrico no BALF dos animais estudados. Não foi observada diferença estatística entre os grupos (figura 4).

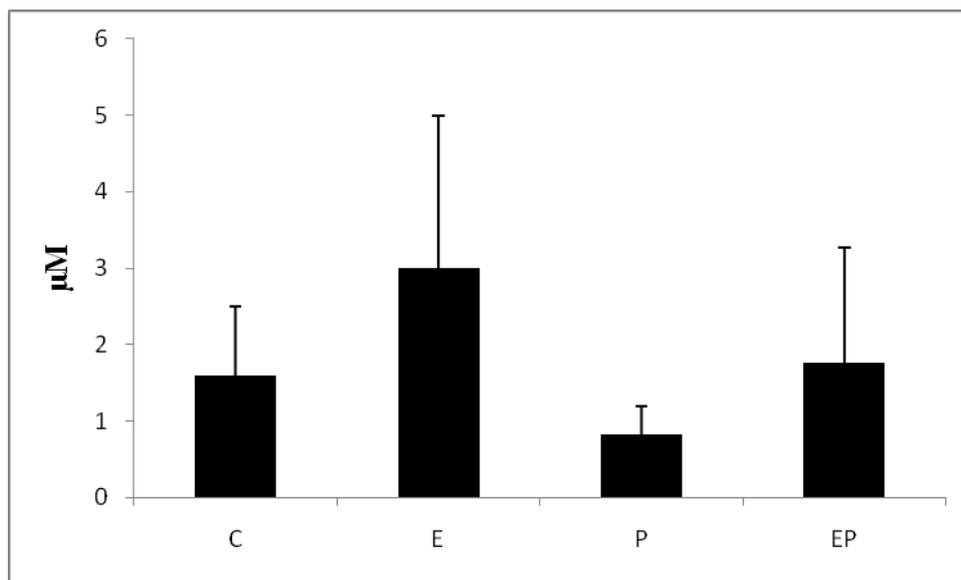


Figura 4: Quantificação do óxido nítrico no BALF de ratos com enfisema elastase induzido tratados com prednisolona (5 mg/Kg). Dados descritos como média e desvio padrão (n=8 grupo controle; n=7 grupo enfisema; n=6 grupo prednisolona; n=5 grupo enfisema prednisolona).

## 2.5. Discussão

O enfisema pulmonar é o maior componente da DPOC e caracteriza-se por destruição da matriz extracelular alveolar, resultando em alargamento do espaço aéreo e uma redução na área de troca alvéolo-capilar, o que leva à obstrução parcialmente reversível. Esta obstrução é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases nocivos<sup>9</sup>.

Para o estudo do enfisema, vários modelos animais foram desenvolvidos e vem sendo utilizados. Entre eles, destacam-se a indução por fumaça de cigarro e o uso de enzimas proteolíticas, como a papaína e a elastase<sup>25,28</sup>.

Segundo dados da literatura, os modelos de enfisema pulmonar que utilizam instilação ou nebulização de enzimas proteolíticas através da via respiratória mostraram-se eficazes na reprodução dessa doença. Esse processo proteolítico, associado à destruição uniforme da matriz extracelular (MEC) do ácino pulmonar, resulta em alterações morfo-histológicas e fisiológicas dos pulmões, equivalentes às alterações encontradas no enfisema em

seres humanos <sup>29</sup>. Morfologicamente, a elastase provoca ruptura das paredes alveolares e alargamento do espaço aéreo em todo o parênquima pulmonar. Além disso, a elastase intratraqueal induz uma resposta inflamatória precoce com neutrófilos e macrófagos. Estas células podem ser a fonte de proteases e oxidantes que podem contribuir para a destruição de tecido conjuntivo pulmonar, bem como de mediadores inflamatórios que exacerbam o enfisema elastase induzido <sup>23</sup> OuvirLer foneticamente . Desta forma, utilizamos, em nosso estudo, o método da instilação de elastase por via intratraqueal para indução do enfisema pulmonar em ratos. Dicionário - Ver dicionário detalhado

As alterações morfométricas observadas nos pulmões submetidos à ação da elastase demonstraram aumento de espaços alveolares (figura 1), semelhante ao observado em outros estudos <sup>9,10,26,28</sup>. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos controle e enfisema e entre os grupos controle e enfisema/prednisolona, corroborando a eficácia da elastase em induzir o enfisema. Entretanto, os dados obtidos sugerem que a prednisolona não reduz a destruição alveolar promovida pela instilação da elastase, uma vez que não foi observada diferença entre o grupo enfisematoso e enfisematoso tratado com prednisolona (EP).

Na avaliação do número de leucócitos do BALF, houve uma redução do número de leucócitos no BALF dos animais controle tratados com prednisolona e enfisematosos tratados com prednisolona, quando comparado com o grupo enfisematoso, entretanto sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (figura 2). Estudos publicados recentemente, também observaram aumento dessas células após a instilação intratraqueal de elastase em camundogos <sup>9</sup>.

O tratamento com o corticosteróide pode afetar a inflamação neutrofilica por reduzir a atividade quimiotática do neutrófilo e pelo aumento da inibição da elastase neutrofilica. Porém alguns autores relatam que tanto o corticosteróide inalatório ou oral (prednisolona) não resulta em nenhum benefício clínico tanto na função pulmonar ou nos sintomas, além de não levar à alterações na contagem total ou diferencial de linfócitos no BALF de pacientes com DPOC<sup>30</sup>. Portanto, o efeito do corticosteróide no tratamento na fase estável da DPOC é controverso. Já, no estudo realizado por Nishi (2003)<sup>10</sup>, foram avaliadas a ação

do corticosteróide dexametasona em coelhos com enfisema elastase induzido no tratamento crônico e este não foi capaz de inibir a ação da elastase nas alterações histológicas ou na função pulmonar <sup>10</sup>.

Desta forma, apesar da ampla utilização de corticosteróide em pacientes com enfisema pulmonar, sabe-se que há pouca evidência do benefício do seu uso durante o tratamento de uma exacerbação <sup>20,31,32,29</sup>, e o seu uso sistêmico prolongado pode levar ao aparecimento de efeitos adversos graves como hiperglicemia, miopatia e osteoporose <sup>20,33</sup>.

Para se avaliar o estresse oxidativo envolvido durante o processo inflamatório do enfisema, foi quantificado o óxido nítrico no BALF dos animais.

Ler foneticamente

Dicionário - Ver dicionário detalhado

OOOO método de avaliação do óxido nítrico foi realizado através da coleta do lavado broncoalveolar dos ratos controle, enfisema, prednisolona e enfisema prednisolona e, apesar de não apresentar diferença estatística entre os grupos, os dados obtidos sugerem que o aumento da concentração de NO no grupo enfisema pode ser devido a efeitos citotóxicos apresentando desta maneira, grande poder oxidante, que foi reduzido com o uso da prednisolna (Figura 4).

No estudo de Vaart et al (2005)<sup>34</sup> foi avaliado os marcadores do estresse oxidativo em modelos animais expostos à fumaça de cigarro e observaram que o NO (iNOS e eNOS) encontrou-se aumentado, entretanto as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) estavam diminuídas <sup>34</sup>. Assim, o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia do desenvolvimento do enfisema pulmonar <sup>5,12</sup>.

Assim, mesmo não havendo diferença estatística no nosso estudo, o estresse oxidativo poderia produzir não só efeitos prejudiciais diretos nos pulmões, mas também pode promover a ativação de mecanismos moleculares que iniciam a inflamação pulmonar <sup>12,35</sup>. E, apesar da influência do corticosteróide na atividade enzimática antioxidante já ter sido descrito, os mecanismos de modulação ainda não foram elucidados <sup>31</sup>.

Em suma, nossos resultados sugerem que a administração de uma dose única baixa (0,4mg/kg) de elastase em ratos pode fornecer uma resposta inflamatória aguda, apresentando alargamento e destruição da parede alveolar

caracterizando o enfisema pulmonar. No entanto, o tratamento com prednisolona, no modelo estudado, não foi capaz de impedir ou reverter as alterações teciduais e celulares promovida pela administração de elastase.

Sabe-se que apesar dos benefícios clínicos da corticoterapia, há relatos na literatura que mostram pouco efeito da sua utilização sobre a função pulmonar de pacientes com DPOC. Desta forma, sua efetividade na doença pulmonar obstrutiva crônica vem sendo questionada, sugerindo maiores estudos relacionados à seu mecanismo de ação sobre o processo inflamatório envolvido no enfisema e sobre sua utilização clínica em pacientes com enfisema.

## **2.6 Conclusão**

O modelo experimental elastase-induzido, promove destruição da parede alveolar que é característico no enfisema pulmonar. E a prednisolona, apesar de ser utilizada clinicamente para o tratamento da exacerbação da doença, não reverteu a destruição da parede alveolar nesse modelo experimental.

## **2.7 Referências Bibliográficas**

1. Morris DG, Sheppard D. Pulmonary emphysema: when more is less. *Physiology* 2006; 21:396-403.
2. Cavalcante AG, Bruin PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J. Bras. Pneumol.* 2009;35(12):1227-1237.
3. Irion KL, Hochhegger B, Marchiori E. *J Bras Pneumol.* 2007; 33(6):720-732.
4. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization; c2009 [cited 2009 Jul 2]. World Health Report 2008. Available from: <http://www.who.int/whr/2008/en/index.html> 2008;34(10):787-795.
5. Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol.* 2006;32(3):241-8.

6. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2008. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
7. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Disease* 2008;12(4):361-367.
8. Rufino R, Madi K, Souza HSP. Avaliação quantitativa das fibras elásticas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*. 2007;33(5):502-509.
9. Inoue K, Koike E, Takano H. Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: effects of ambient existing particulate matters. *Int Immunopharmacol* 2010;10(11):1380-9.
10. Nishi Y, Boswell V, Ansari T et al. Elastase-induced changes in lung function: relationship to morphometry and effect of drugs. *Pulm Pharmacol Ther*. 2003;16(4):221-9.
11. Demedts IK, Demoor T, et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary Emphysema. *Respiratory Research* 2006;7(53):1-10.
12. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):258-66.
13. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. "Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary". *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-76.
14. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. *J. Bras.Pneumol*. 2004;30(5):1-5.
15. Mador MJ, Bozkanat E. Skeletal Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2001;2(4):216-24.
16. Moniusko M, Dabrowska M et al. Oral glucocorticoid treatment decreases interleukin-10 receptor expression on peripheral blood leucocyte subsets. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009;156:328-335.
17. Zimmerman GR, Avery W, et al. Selective amplification of glucocorticoid anti-inflammatory activity through synergistic multi-target action of a combination drug. *Arthritis Research Therapy*, 2009;11:R12.

18. Singh JM, Palda VA, Stanbrook, et al. Corticosteroide therapy for patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2002;162(22):2527-36.
19. Christensson C, Thorén A, Lindberg B. Safety of inhaled budesonide clinical manifestations of systemic corticosteroid-related adverse effects. *Drug Saf* 2006;31(11):965-88.
20. Maltais F, Ostinelli J, Bourbeau J et al. Comparison of nebulized budesonide and oral prednisolone with placebo in the treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(5):698-703.
21. Jong YP, Uil SM, Grotjohan HP, Postma DS et al. Oral or IV Prednisolone in the Treatment of COPD Exacerbations. *Chest* 2007;132(6):1741-7.
22. Niewoehner DE, Erbland ML, Deupree RH, Collins D, Gross NJ, Light RW, Anderson P, Morgan NA. Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1999;340(25):1941-7.
23. Rubio ML, M, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G and González-Mangado N. Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats. *Chest* 2004; 125:1500-1506.
24. Kim DK, Zhu J, et al. Myosin heavy chain and physiological adaptation of the rat diaphragm in elastase-induced emphysema. *Respir Res* 2003;4(1):1-10.
25. Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):787-795.
26. Lüthje L, Raupach T, et al. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respiratory Research* 2009;10(7):1-10.
27. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, 1999;9ª edição.
28. Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental d enfisema pulmonar induzido em papaína. *J Pneumol*. 2002;28(1):1-7.
29. Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease c2: Pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002;57(9):830-4.

30. Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H, Yamaguchi S, Matsuzawa Y. Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 1999;115(3):697-702.
31. Sadowska AM, Klebe B, Germonpré P et al. Glucocorticosteroids as antioxidants in treatment of asthma and COPD. New application for an old medication? *Steroids* 2007;72(1):1-6. Epub 2006 Dec 4.
32. Wedzicha JA. Oral corticosteroids for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2000;55 (1):23-7.
33. Schols AM, Wesseling G, Kester AD et al. Dose dependent increased mortality risk in COPD patients treated with oral glucocorticoids. *Eur Respir J* 2001;17(3):337-42.
34. Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004;59(8):713-21.
35. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 2003;46:14-27.



### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O enfisema pulmonar é uma doença obstrutiva crônica, resultante de importantes alterações de toda a estrutura distal do bronquíolo terminal, seja por dilatação dos espaços aéreos, seja por destruição da parede alveolar, ocasionando a perda da superfície respiratória, diminuição do recolhimento elástico e hiperinsuflação pulmonar.

Uma vez desenvolvido o enfisema pulmonar, metas de tratamento são desenvolvidas com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e trazer conforto para o paciente.

Dentre os tratamentos propostos para aliviar os sintomas e promover qualidade de vida é a terapia farmacológica que inclui a utilização de corticosteróides sistêmicos, como a prednisolona.

Assim, nossos resultados sugerem que a administração de uma dose única de elastase em ratos pode fornecer uma resposta inflamatória aguda, apresentando alargamento e destruição da parede alveolar caracterizando o enfisema pulmonar. No entanto, o tratamento com prednisolona, no modelo estudado, não foi capaz de impedir ou reverter as alterações teciduais e celulares promovida pela administração de elastase. Contudo, se faz necessário estudos não só da fisiopatologia, mas também de possíveis fármacos que possam atuar nos mecanismos que desencadeiem o enfisema e, talvez impedir ou mesmo reverter o desenvolvimento do enfisema pulmonar.



REVISTA **Terapia Manual**  
FISIOTERAPIA MANIPULATIVA

São Paulo, 12 de fevereiro de 2010.

Gostaríamos de informar que o manuscrito intitulado:

**“Repercussões musculares do uso de glicocorticóides na distrofia muscular de Duchenne e na DPOC”**

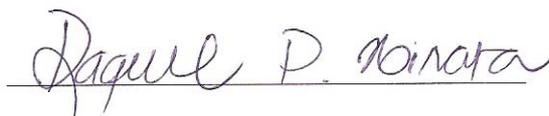
cujos autores são:

**Martha Trindade Manchini , Raphael Fernando Boiati, Carla Malaguti e Jorge Willian Leandro Nascimento**

foi aceito para publicação na revista Terapia Manual ISSN 1677-5937 como Artigo de Revisão.

Agradecemos a colaboração ao desenvolvimento científico e estamos sempre à disposição a novas contribuições.

Atenciosamente,



Raquel Pastréllo Hirata

Supervisão Científica

**Repercussões musculares do uso de glicocorticóides na distrofia muscular de Duchenne e na DPOC**

*Muscle implications of glucocorticoid treatment for Duchenne muscular dystrophy and for COPD*

Uso de Glicocorticóides em Duchenne e DPOC

Martha Trindade Manchini <sup>(1)</sup>, Raphael Fernando Boiati <sup>(2)</sup>, Carla Malaguti <sup>(3)</sup>, Jorge Willian Leandro Nascimento <sup>(3)</sup>

1 Fisioterapeuta, aluno do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

2 Farmacêutico, aluno do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, SP, São Paulo, SP, Brasil

3 Docente do Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, SP, São Paulo, SP, Brasil

Endereço para correspondência

Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

Av. Francisco Matarazzo 612 - Água Branca. São Paulo – SP. CEP: 05001-100 – Tel:

11 3665-9325, email: jorgewillian@uninove.br

## INTRODUÇÃO

Os glicocorticóides pertencem à classe dos hormônios esteróides utilizados terapêuticamente para várias doenças. Estes hormônios desempenham um importante papel fisiológico na regulação da produção, armazenagem, uso e distribuição de substratos para o metabolismo energético sistêmico. A maioria dos tecidos são alvos de ação de glicocorticóides contribuindo para seus efeitos globais no organismo <sup>(1,2)</sup>.

Os glicocorticóides sintéticos são usados terapêuticamente de forma eficaz para uma ampla variedade de condições que exigem modulação imunológica ou inflamatória, incluindo o tratamento de distrofias musculares e doenças respiratórias como asma e DPOC. Entretanto, seu uso é acompanhado por uma série de efeitos adversos, incluindo perda de massa muscular, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão, nefropatia, osteoporose e um aumento do risco de arteriosclerose <sup>(1,2)</sup>.

Dentre as diversas doenças que a fisioterapia exerce seu papel reabilitador e que são tratadas com glicocorticóides destacam-se a DPOC e a distrofia muscular de Duchenne, pois ambas apresentam envolvimento muscular deixando os pacientes mais suscetíveis aos efeitos adversos sistêmicos destes fármacos no que diz respeito às alterações musculares promovida por seu uso crônico.

Neste sentido, diante das modulações fisiológicas, efeitos terapêuticos e adversos que os glicocorticóides promovem, estes podem interferir ou alterar de forma direta as ações fisioterapêuticas reabilitadoras. Portanto, torna-se necessário e crucial o entendimento das implicações clínicas advindas do uso terapêutico dos corticosteróides nestas doenças, para assim poder traçar a melhor estratégia reabilitadora.

Com este intuito, o presente estudo busca avaliar os efeitos terapêuticos e adversos promovidos pela terapia crônica ou repetitiva de glicocorticóides na DPOC e na distrofia muscular de Duchenne, com ênfase nos sítios musculares, os quais

são diretamente afetados pela sua utilização e que constituem um importante alvo reabilitador do manejo fisioterapêutico.

### **Glicocorticóides**

Os glicocorticóides, também conhecidos como corticóides fazem parte do grupo dos corticosteróides os quais se dividem de acordo com suas funções fisiológicas em glicocorticóides (cortisol) que participam do controle metabólico basal, e os mineralocorticóides (aldosterona), os quais desempenham importante papel no equilíbrio hidroeletrolítico no organismo <sup>(3)</sup>.

O cortisol é um hormônio esteróide glicocorticóide humano, o qual é liberado pela glândula adrenal em resposta ao estresse e como mensageiro dos ritmos circadianos, controlando uma variedade de funções fisiológicas, tais como, imunológicas, metabólicas, cardiovasculares e de reprodução, se tornando essencial para o controle de diversas funções vitais <sup>(1,2,4)</sup>. O cortisol e os demais glicocorticóides agem através da ligação ao receptor de cortisol, um receptor citosólico pertencente à superfamília nuclear dos receptores hormonais, desencadeando efeitos similares aos hormônios <sup>(1,5,6)</sup>.

Entretanto, apesar dos efeitos fisiológicos, farmacológicos e clínicos dos glicocorticóides serem bem conhecidos, a compreensão de seus mecanismos de ação ainda permanece obscura <sup>(4)</sup>.

Os glicocorticóides, em concentrações fisiológicas são considerados imunomoduladores, porém em doses farmacológicas são considerados potentes imunossupressores <sup>(1)</sup>. A produção de corticosteróides é diretamente regulada pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), sendo que alterações de suas concentrações plasmáticas geralmente levam a adaptações compensatórias da taxa de produção, degradação e de excreção (*Feedback* negativo) a fim de manter a homeostasia, provocando inclusive alterações na atividade do sistema imunológico. Isto vem sendo demonstrado em relação às isoformas de seus receptores (GR), onde, a expressão abundante de uma isoforma pode causar o desenvolvimento ou

a gravidade de uma doença, bem como, a diminuição da sensibilidade aos glicocorticóides <sup>(1,6)</sup>.

A despeito da sua inquestionável utilidade no tratamento de diversas doenças, principalmente pela sua atividade antiinflamatória, os corticóides apresentam graves efeitos indesejáveis que limitam seu uso. Por isso, o uso desta terapêutica é ainda foco de debate em diversas condições patológicas <sup>(2,7)</sup>. Além disso, alguns pacientes demonstram baixa ou até ausência de respostas, mesmo em altas doses de glicocorticóides devido à resistência ou insensibilidade a esses fármacos <sup>(8)</sup>.

A descrição de seus efeitos indesejáveis é antiga, data desde 1948, quando foi utilizado pela primeira vez para o tratamento da artrite reumatóide <sup>(2,7)</sup>. Dentre as principais reações adversas com o uso de medicamentos desta classe, destaca-se a hipertensão, osteoporose, síndrome de Cushing, diabetes, obesidade, dentre outras, culminando numa série de repercussões clínicas:

#### *Repercussões metabólicas*

A síndrome de Cushing (SC) é o principal efeito adverso que ocorre com o uso crônico de glicocorticóides, afetando vários órgãos e sistemas. Esta síndrome é resultante da exposição crônica aos glicocorticóides (produzido no córtex adrenal) ou por sua utilização em altas doses, levando a várias alterações sistêmicas, como euforia ou depressão, alterações de memória, obesidade com aumento da gordura abdominal, intolerância à glicose, osteoporose, hipertensão arterial e intracraniana, dentre outras, diminuindo assim, a qualidade de vida dos pacientes <sup>(9)</sup>.

Muitos efeitos colaterais da corticoterapia podem ser confundidos com os achados da SC propriamente dita. A principal diferença entre a SC exógena e a endógena é que a última apresenta maior ação mineralocorticóide, resultando em maior incidência de hipertensão arterial sistêmica (HAS), hipocalêmia e sintomas de hiperandrogenismo (hirsutismo e sintomas de virilização). Já os sintomas derivados do uso de glicocorticóides exógenos são menos comuns, os mais importantes são: o

pseudotumor cerebral, necrose óssea avascular, lipomatose epidural espinhal, catarata e glaucoma. Além disto, os glicocorticóides têm demonstrado ação estimuladora de endocanabinóides no hipotálamo, estimulando a atividade da Adenosina monofosfato quinase dependente (AMPK) a qual é ativada pelo organismo quando ocorre decréscimo de energia. Uma vez ativada, a AMPK desliga as vias anabólicas, tais como de ácidos graxos, síntese de colesterol e a glicólise, levando à intolerância a glicose nos pacientes que utilizam estes fármacos <sup>(9)</sup>.

#### *Repercussões cardiovasculares*

Um importante efeito da utilização crônica dos GCs é a hipertensão arterial, que estaria ligada aos níveis elevados de aldosterona no organismo através de ativação dos receptores mineralocorticóides (RM) nos rins <sup>(10)</sup>, porém, dados disponíveis argumentam que este não é o único, ou mesmo, o mecanismo primário subjacente para a hipertensão <sup>(11)</sup>. Atribui-se ao desenvolvimento de hipertensão arterial nestes pacientes, a redução da formação de moléculas vasodilatadoras como o óxido nítrico e o aumento no efeito vasoconstritor através dos efeitos da angiotensina II e do bloqueio do sistema renina-angiotensina. A literatura indica que a causa da hipertensão arterial com o uso de glicocorticóides seja multifatorial, porém a maioria dos estudos relata o aumento da resistência vascular periférica como o principal mecanismo <sup>(12)</sup>.

#### *Repercussões ósseas*

A ação dos glicocorticóides na reabsorção óssea foi relacionada com o aumento no número de fraturas nos pacientes que fazem o uso destes fármacos de maneira crônica. Os GCs reduzem indiretamente a absorção e o aumento da excreção renal de cálcio <sup>(13)</sup>. Além disso têm-se demonstrado que os GC agem diretamente sobre a apoptose de osteoblastos e osteócitos, inibindo a capacidade de reorganização do citoesqueleto, além de aumentar a reabsorção óssea causado

pelo aumento do tempo de permanência dos pré-osteoclastos existentes, diminuindo assim a formação óssea. <sup>(14)</sup>

Em um estudo coorte realizado com crianças com idades entre 5 e 12 anos, avaliou-se o acréscimo mineral ósseo anual em 531 meninos e 346 meninas, com a utilização de corticóides de administração oral e inalatória. O estudo demonstrou que com a administração oral do fármaco, houve uma redução no acréscimo mineral ósseo e um aumento no risco de osteopenia nos meninos, mas não em meninas. Já a administração inalatória, apresentou uma pequena diminuição da deposição mineral óssea apenas em meninos, porém, nenhum risco aumentado de osteopenia, demonstrando menores reações adversas com a utilização de GC inalatórios quando estudada patologias ósseas <sup>(15)</sup>.

#### *Repercussões musculares*

As reações adversas ligadas a partes musculares são amplamente estudadas em corticoideterapia. <sup>(16)</sup> Em um estudo pré-clínico, avaliou-se a função mitocondrial em relação aos músculos de ratos com a utilização de glicocorticóide sintético na dose farmacológica de 4mg/Kg/dia durante 14 dias. Os resultados demonstraram que a função mitocondrial foi mantida, porém, observou-se perda de massa muscular e redução da taxa de síntese protéica tanto em músculos glicolíticos e oxidativos, como nos músculos sóleo e plantar <sup>(16)</sup>. Tem sido demonstrado, ainda, que a quebra de proteínas musculares pela indução dos glicocorticóides, é mediada através de proteólise de ubiquitina-proteassoma dependente e de outras vias de degradação dependentes de cálcio, ou seja, diminuição da taxa de síntese protéica aliada à quebra de proteína <sup>(17)</sup>.

Estas alterações musculares podem interferir inclusive na bioenergética, como por exemplo, no fornecimento de carbono proveniente de aminoácidos para a gliconeogênese no fígado e rins, devido aos ritmos circadianos. Sendo assim, enfermidades que utilizam os corticosteróides podem ter repercussões relacionadas

ao ciclo claro-escuro, como consequência da liberação de glicocorticóides endógenos <sup>(18)</sup>.

### **Distrofia muscular de Duchenne e as implicações do uso de glicocorticóides**

A distrofia muscular do tipo Duchenne é uma doença geneticamente determinada que se manifesta por fraqueza progressiva, degeneração e atrofia dos músculos esqueléticos <sup>(19)</sup> causada por mutações no gene *DMD* (Duchenne Muscular Distrophy), localizado no cromossomo X (região Xp21). Alterações na seqüência do gene *DMD*, como principalmente deleções (perda de DNA) e duplicações (ganho de DNA), são a causa da doença em aproximadamente 65% dos casos. Nos casos restantes, ocorre uma alteração pequena na seqüência gênica, chamada de mutação de ponto. O gene *DMD* codifica uma proteína chamada distrofina que, em conjunto com outras proteínas, formam um complexo localizado na membrana da célula muscular que participa da regulação da permeabilidade desta membrana <sup>(20,21)</sup>.

A DMD possui curso clínico severo, progressivo com perda dos movimentos de membros inferiores em torno da primeira década de vida e morte na terceira década, freqüentemente por insuficiência respiratória <sup>(21)</sup>.

As primeiras manifestações aparecem entre três e cinco anos, quando a criança apresenta dificuldade de sentar-se, ficar em pé ou andar, além de cair com freqüência. Nesta fase, a criança começa a apresentar dificuldade em subir escadas e pode tornar-se incapaz de correr ou saltar, devido à atrofia muscular evidente com predomínio nos músculos antigravitacionais e pela substituição do tecido muscular por tecido adiposo e conjuntivo, fenômeno que se manifesta como pseudo-hipertrofia <sup>(22,23)</sup>.

Próximo aos oito anos de idade as contraturas dos cordões tendíneos do calcanhar e das faixas iliotibiais levam à marcha sobre artelhos. Entre 12 e 13 anos ocorre perda da deambulação <sup>(24)</sup>, que evolui para a utilização de cadeiras de rodas.

O sinal de Gowers é uma característica marcante que denota suspeita da DMD. Trata-se de uma manobra para se levantar que os portadores de DMD realizam onde o paciente rola o corpo, ajoelha-se, apóia-se no chão com a extensão dos dois antebraços e levanta-se com dificuldade após colocar as mãos sobre os joelhos <sup>(23)</sup>.

Os membros superiores são atingidos com a progressão da doença, bem como o comprometimento progressivo dos músculos respiratórios que leva à insuficiência respiratória, complicação esta freqüentemente presente nos estágios mais avançados, e principal causa de morte da doença <sup>(25)</sup>.

Através dos anos muitas intervenções farmacológicas foram propostas como tratamentos para DMD com o objetivo de diminuir a progressão da fraqueza muscular. Muitas substâncias como alupurinol, vitamina E, selênio, bem como o anorexígeno mazindol e inibidores de hormônio do crescimento, os quais foram ineficazes ou não trouxeram benefício significativo contra a progressão da doença. No entanto, muito ainda tem se tentado identificar os componentes que melhoram a função e os aspectos morfológicos da DMD <sup>(26,27)</sup>.

Os pacientes acometidos por esta distrofia, a fim de minimizar complicações utilizam terapia farmacológica associada à terapia física. Uma série de estudos com diferentes dosagens e durações de tratamentos tem demonstrado que a terapia com glicocorticóides altera a história natural da DMD, retardando a necessidade da utilização de cadeira de rodas, pelo menos parcialmente, preservando a força muscular. Da mesma forma, a utilização destes fármacos pode ainda retardar a deterioração da função muscular respiratória <sup>(28,27,29)</sup>. No entanto, o seu uso é ainda controverso e não uniformemente recomendado. Na maioria dos estudos, a terapia oral se inicia entre 5 e 15 anos de idade, com média de aproximadamente 8 anos de idade <sup>(29)</sup>.

A Prednisona é o esteróide mais estudado na distrofia muscular de Duchenne <sup>(26)</sup>. O deflazacort, um oxazoline derivado da prednisona, mostrou ter benefício semelhante a prednisona. Meninos que receberam deflazacort mantiveram

a deambulação por mais tempo com significativa manutenção da função pulmonar (29).

Até o momento, os glicocorticóides são os únicos fármacos para o tratamento de DMD que determinam melhora substancial para estes pacientes (26). Dois estudos relatam efeitos benéficos no controle dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  com a utilização de prednisolona, ao reduzir os níveis deste composto, diminui o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos músculos esqueléticos, provavelmente devido à diminuição no tamanho do retículo sarcoplasmático, conseqüentemente atenuando a contração muscular e aliviando os sintomas e a piora no quadro clínico dos pacientes (30, 31). Este aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é causado pela perda de distrofina ou outros componentes do complexo distrofina-glicoproteína que altera as propriedades físico-químicas do sarcolema, permitindo a contração muscular. Esta perda de distrofina e aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta no inchaço das mitocôndrias, e caso este processo não seja revertido, ocorre ruptura destas mitocôndrias, podendo causar necrose e/ou apoptose das células musculares (32).

Estudos anteriores demonstraram ainda que os glicocorticóides podem aliviar os sintomas da distrofia devido a estimulação da utrofina (*utrophin- gene humano encontrado em abundância na DMD*) nas fibras musculares esqueléticas. Neste contexto, a autoregulação de utrofina representa uma estratégia terapêutica interessante para a DMD, pois é um homólogo autosomal da distrofina, proteína que está em quantidade reduzida nas fibras musculares da DMD, deste modo, a utrofina poderia compensar a ausência da distrofina ou ainda reduzir a presença das células T CD8, as quais apresentam efeitos citotóxicos (33).

O mecanismo pelo qual os pacientes se beneficiam com o tratamento dos glicocorticóides não está totalmente compreendido, porém, os pacientes que fazem uso de drogas desta classe farmacológica apresentaram atraso na progressão da fraqueza muscular e permaneceram em ambulatorios por um período menor de sua vida (22,33).

Apesar da promessa dos glicocorticóides como uma terapia eficaz para combater a distrofia muscular de Duchenne, os efeitos adversos das drogas tem limitado o uso generalizado desta droga, principalmente em crianças, os mais acometidos pela doença <sup>(27)</sup>.

Pradhan S et al (2006), utilizaram glicocorticóides de várias doses e períodos de tratamentos em pacientes acometidos pela DMD, sendo que, mesmo em doses diferentes, foram observadas melhoras significantes, porém, sem consenso sobre o esquema terapêutico mais adequado. Ainda neste estudo, mais da metade dos pacientes submetidos à terapia por glicocorticóides foram retirados do estudo por apresentar reações adversas como: infecções de garganta e pulmões, tuberculose pulmonar, sarampo, obesidade e alto número de leucócitos nas contagens <sup>(34)</sup>.

Em outro estudo envolvendo pacientes com DMD, foi encontrada ligação do uso de glicocorticóides com uremia, acidose, diabetes *mellitus* (devido à resistência muscular a insulina, causando hiperglicemia e perda de massa muscular), septicemia e inanição, além de distrofia muscular, os quais tem demonstrado efeitos na diminuição da síntese de proteínas e na estimulação da degradação de proteínas no músculo <sup>(35,36)</sup>.

Contudo, enquanto os portadores desta doença aguardam benefícios desta terapia, deve-se ter cautela no seu uso a longo prazo devido aos efeitos secundários indesejáveis destes fármacos.

### **Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e as implicações do uso de glicocorticóides**

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença considerada como uma combinação fisiopatológica, abrangendo enfisema e bronquite crônica, caracterizada pela limitação progressiva do fluxo aéreo pulmonar associada a resposta inflamatória anormal dos pulmões às partículas nocivas ou a alguns gases,

caracterizada pelo aumento no número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, sendo observados eventos apoptóticos anormais em fumantes e no enfisema pulmonar <sup>(37)</sup>.

Os principais sintomas relacionados na DPOC são: tosse diária ou intermitente que pode preceder a dispnéia ou aparecer simultaneamente a ela. Os pacientes geralmente apresentam intolerância ao exercício devido a fadiga e dispnéia limitante. Estes sintomas são os principais determinantes da redução do desempenho nas atividades de vida diária, no trabalho e na qualidade de vida relacionada à saúde, e constituem a fundamentação óbvia da indicação de programas de reabilitação pulmonar <sup>(38)</sup>.

O mecanismo que melhor explica a dispnéia se deve a inflamação crônica das vias aéreas, a qual se manifesta pelo edema, hipertrofia do músculo liso e muco na via aérea, reduzindo o calibre da porção condutora do ar, limitando o fluxo expiratório, conduzindo a hiperinsuflação dinâmica, o que resulta no aumento do trabalho ventilatório e maior sensação de desconforto respiratório <sup>(38)</sup>.

O tratamento farmacológico, pelo seu potencial de levar a melhora da dispnéia percebida pelo paciente, é um dos temas mais importantes no manejo clínico da DPOC. Atualmente, o tratamento proposto para os pacientes DPOC inicia-se com a cessação do fumo, sendo posteriormente iniciada a utilização de drogas broncodilatadoras e corticóides inalatórios <sup>(39)</sup>.

Segundo as diretrizes do GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) 2007, recomenda-se a utilização dos fármacos em forma ascendente (*step up*), iniciando, se necessário com broncodilatadores de curta duração, para o uso contínuo de um broncodilatador de longa duração e posterior acréscimo de corticóide inalatório <sup>(38)</sup>.

Além da inflamação das vias aéreas e destruição do parênquima pulmonar que constituem o foco primário da doença, as repercussões no estado geral da saúde que se manifestam de forma sistêmica reforçam a necessidade de abordagem multidimensional que contemple não apenas o sítio pulmonar <sup>(38)</sup>.

É bem estabelecido que a inflamação sistêmica esteja associada com várias complicações em pacientes com DPOC, incluindo a perda de peso, disfunção do músculo esquelético, caquexia, osteoporose, depressão, anemia normocítica e doenças cardiovasculares <sup>(39,40)</sup>.

A administração de corticóides para o tratamento das exacerbações da DPOC já foi amplamente difundido muito antes de grandes evidências em sua utilização nesta doença. A administração de corticóide, seja inalatória, oral ou Intravenosa (IV), mostrou-se eficaz em diferentes estágios de gravidade da DPOC com melhorias no VEF<sub>1</sub> de até 3 vezes quando comparado com indivíduos utilizando placebo <sup>(41,42)</sup>, porém as diretrizes atuais sugerem que a via oral de administração deve ser preferível no tratamento de exacerbações de DPOC, pelo fato de ser mais conveniente e de menor custo. Em alguns países, rotineiramente utilizaram-se glicocorticóides pela via IV pelo menos inicialmente, devido sua biodisponibilidade de 100% <sup>(43)</sup>.

Estudos realizados por Singh JM et al (2002) e Cazzola et al (2007), demonstraram uma redução na frequência das exacerbações agudas e na taxa de declínio no estado de saúde após a utilização de diferentes doses de corticóides inalatórios (ICS). A dose utilizada nos pacientes DPOC, no intuito de uma melhora no quadro clínico, permanece ainda controversa, sendo utilizada uma ampla variedade de dosagens e regimes farmacológicos diferentes para o tratamento <sup>(39,41)</sup>.

A terapia inalatória tem papel central no tratamento de pacientes com DPOC, pois pode minimizar ou evitar muitos efeitos colaterais indesejáveis causados pela corticoterapia oral. Entretanto sua utilização requer um treinamento supervisionado e contínuo, a fim de evitar erros de administração e conseqüentemente, falha terapêutica ou maiores reações adversas <sup>(42)</sup>.

As reações adversas da terapia sistêmica de glicocorticóides podem ser divididas em reversíveis, que incluem diabetes mellitus, hipertensão, obesidade e

alterações na pele; e irreversíveis, como a miopatia induzida por esteróides em altas doses ou em tratamentos de longa duração <sup>(40,41)</sup>.

Os corticóides causam uma miopatia caracterizada pela diminuição no tamanho das fibras musculares, ou seja, atrofia preferencial das fibras do tipo II, as de contração rápida, com menos impacto nas fibras do tipo I. A miopatia ocorre devido a redução da síntese e aumento na degradação de proteínas, culminando assim em atrofia muscular <sup>(44)</sup>. Especificamente, o corticosteróide altera a microestrutura muscular reduzindo proteínas contráteis, aumentando a quebra de proteína pelo baixo fator de regulação dos fatores de crescimento, reduzindo a atividade glicolítica, e permitindo a atrofia do sarcômero e das fibras do tipo II <sup>(30)</sup>.

Schakman O *et al* (2008), sugerem também que os glicocorticóides estimulam a produção de miostatina pelo músculo. A miostatina é um fator de crescimento que inibe o desenvolvimento de massa muscular e desregula a proliferação e diferenciação de células satélites alterando a síntese de proteínas, contribuindo para a atrofia e fraqueza muscular comumente encontrada em pacientes com DPOC <sup>(4)</sup>.

Estas condições catabólicas estão associadas com o hipercortisolismo, que por sua vez, desempenha um papel importante na atrofia músculo-esquelética. A administração de doses elevadas de glicocorticóides induz a degradação de proteínas, mediada principalmente pela ativação da ubiquitina-proteosoma e pelas vias lisossomais e inibe também a ação do RU486, um antagonista do receptor de glicocorticóides, que reduz a perda de massa muscular <sup>(45)</sup>.

No entanto, além da miopatia induzida pelos esteróides, diferentes estudos fornecem evidências de que fatores associados como o descondicionamento, hipóxia sistêmica e/ou hipercapnia, depleção nutricional, alterações induzidas pela idade, disfunção hormonal e inflamação sistêmica <sup>(45, 46)</sup> determinam a etiologia da síndrome da disfunção muscular esquelética <sup>(37,46)</sup>. Tal síndrome é caracterizada por atrofia (sarcopenia), perda de força e potência musculares, constituindo num fator

relevante para explicar a redução da tolerância ao exercício, qualidade de vida, utilização dos serviços de saúde e sobrevida em pacientes com DPOC <sup>(45)</sup>.

Há também relatos de complicações clínicas, como a osteoporose e fraturas associadas a tratamentos a longo prazo de corticosteróides orais <sup>(42,47)</sup>. Metade dos pacientes que recebem esta terapia de forma contínua, podem sofrer fraturas, mesmo com o uso de corticóides inalatórios. Num estudo caso-controle envolvendo 1235 pacientes DPOC, foram encontrados um maior risco de fraturas somente com maiores doses de ICS <sup>(42)</sup>.

Vários mediadores estão envolvidos nas reações adversas dos glicocorticóides, os quais são promissores para futuras abordagens terapêuticas no intuito de evitar a atrofia e fraqueza muscular periférica, minimizando assim os efeitos deletérios nos pacientes DPOC que utilizam estes medicamentos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A presente revisão reforça a grande aplicabilidade clínica dos glicocorticóides em Duchenne e DPOC como agentes antiinflamatórios e imunomoduladores que promovem, em última análise, uma melhora na qualidade de vida. Entretanto seus efeitos adversos, principalmente aqueles relacionados à musculatura esquelética, podem limitar seu uso ou determinar repercussões importantes nestes pacientes.

Desta forma a compreensão das modificações promovidas por estes fármacos fornecem subsídios de como as intervenções físicas destinadas a portadores de DPOC ou distrofia muscular de Duchene podem sofrer interferência dos efeitos terapêuticos ou adversos do uso crônico dos corticosteróides, os quais podem alterar marcadamente o curso da doença e o processo de reabilitação.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Tait SA, Butts CL, Sternberg EM. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *J Leukoc Biol* 2008, 84(4):924–31.
2. Longui CA. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *J Pediatr* 2007, 83(5):163-171.
3. Baxter JD, Forsham PH. Tissue effects of glucocorticoids. *Am J Med* 1972, 53(5):573-89.
4. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrousos GP. Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93 (5):1563–72.
5. Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, et al. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res* 2009, 19(12): 2163-71.
6. Odermatt A, Gummy C. Glucocorticoid and mineralocorticoid action: Why should we consider influences by environmental chemicals? *Biochem Pharmacol* 2008, 76(10):1184-93.
7. Japiassú AM, Salluh JIF, Bozza PT, et al.. Revisiting steroid treatment for septic shock: molecular actions and clinical effects - A review *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104(4): 531-48.
8. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009, 373(9678):1905-17.
9. Christ-Crain M, Kola B, Lolli F, Fekete C, et al. AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. *Faseb J* 2008, 22(6): 1672–83.
10. Benard L, Milliez P, Ambroisine ML, Messaoudi S, Samuel JL, Delcayre C. Effects of aldosterone on coronary function. *Pharmacol Rep* 2009, 61(1):58–66.

11. Goodwin JE, Zhang J, Geller DS. A critical role for vascular smooth muscle in acute glucocorticoid-induced hypertension *J Am Soc Nephrol* 2008, 19(7):1291–9.
12. Baum M, Moe OW. glucocorticoid-mediated hypertension: does the vascular smooth muscle hold all the answers? *J Am Soc Nephrol* 2008, 19(7):1291–9.
13. Yao W, Cheng Z, Busse C, Pham A, Nakamura MC, Lane NE. Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(6):1674–86.
14. Migliaccio S, Brama M, Malavolta N. Management of glucocorticoids-induced osteoporosis: role of teriparatide. *Ther Clin Risk Manag*. 2009, 5(2):305-10.
15. Kelly HW, Natta MLV, Covar RA, Tonascia J, Rebecca P. Prospective longitudinal assessment in the childhood asthma management effect of long-term corticosteroid use on bone mineral density in children: A Program (CAMP) Study. *Pediatrics* 2008, 122(1):e53-61.
16. Hu Z, Wang H, Lee IH, Du J, Mitch WE. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. *J. Clin Invest* 2009, 119(10):3059–3069.
17. You YN, Short KR., Jourdan M, Katherine A. Klaus, Stephane Walrand, K. Sreekumaran Nair. The effect of high glucocorticoid administration and food restriction on rodent skeletal muscle mitochondrial function and protein metabolism. *PLoS ONE* 2009, 4(4): e5283.
18. Almon RR, Yang E, Lai W, Androulakis IP, Ghimbovschi S, Hoffman EP, Jusko WJ, DuBois DC. Relationships between circadian rhythms and modulation of gene expression by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 295(4):R1031–47.
19. Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dymecki D, Dobrowolski S, Wajda Z. Organ microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. A role of nitric oxide. *Physiol Res* 2004, 54(4):363-8.
20. Bellayou H, Hamzi K, Rafai MA, Karkouri M, Slassi I, Azeddoug H, Nadifi S. Duchenne and Becker muscular dystrophy: contribution of a molecular and

immunohistochemical analysis in diagnosis in Morocco. *J Biomed Biotechnol* 2009, (2009):325210.

21. Beggs A., Kunkel L. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990, 85(3): 613-9.

22. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India* 2008, (3) 236-47.

23. Shepherd, R.B. *Fisioterapia em pediatria*. São Paulo: Santos; 1996.

24. Edwards, R.H.T.; Fahal, I.; Thompson, N. Distúrbios musculares In: STOKES, M. Cash. *Neurologia para fisioterapeutas*. São Paulo: Premier: 2000.

25. Nowak J. K., Davies E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* 2004, 5(9):872–6.

26. Campbell C, Jacob P. Deflazacort for the treatment of Duchenne dystrophy: a systematic review. *BMC Neurol.* 2003 3(7):1-10.

27. Chakkalakal, J. V., Thompson, J., Parks, R. J. Jasmin, B. J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/ Becker muscular dystrophies. *FASEB J* 2005, 19(8) 880–91.

28. Simonds AK. Recent advances in respiratory care for neuromuscular disease. *Chest* 2006, 130(5):1879-86 .

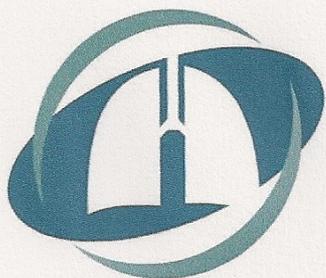
29. Finder JD, Birnkrant D, Carl J, Farber HJ, Gozal D, Iannaccone ST, Kovesi T, Kravitz RM, Panitch H, Schramm C, Schroth M, Sharma G, Sievers L, Silvestri JM, Sterni L Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004, 170(4): 456-65.

30. MacIntyre NR. Muscle dysfunction associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care* 2006, 51(8):840-7.

31. Ruegg UT, Me´tral VN, Challet C, -He´lary KB, Dorchies GM, Wagner S.,. Buetler TM. Pharmacological control of cellular calcium handling in dystrophic skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders* 2002, 12(1): 155–61.

32. Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med* 2008, 14(4): 442–7.
33. Miura P, Andrews M, Holcik M, Jasmin BJ. IRES-mediated translation of utrophin A is enhanced by glucocorticoid treatment in skeletal muscle cells. *PLoS One* 2008, 3(6):e2309.
34. Pradhan S, Ghosh D et al. Prednisolone in Duchenne muscular dystrophy with imminent loss of ambulation. *J Neurol* 2006, 253(10):1309–16.
35. Hu Z, Wang H, Lee IH, Du J, Mitch WE. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. *J Clin Invest* 2009, 119(10): 3059–69.
36. Short KR, Bigelow ML, et al.. Short-term prednisone use antagonizes insulin's anabolic effect on muscle protein and glucose metabolism in young healthy people. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, 297(6):1260-8.
37. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR and Hurd SS. "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary". *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-76.
38. Buist AS, Anzueto A, Calverley P, et al.. Global Strategy for the management, and prevention of chronic obstructive lung disease. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2007.
39. Cazzola M, Matera MG, Rogliani P, Page C. Treating systemic effects of COPD. *Trends Pharmacol Sci* 2007, 28(10):544-50.
40. Mador MJ, Bozkanat E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2001; 2(4):216-24.
41. Singh JM, Palda VA, Stanbrook MB, Chapman KR. Corticosteroid therapy for patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2002, 162(22):2527-36.

42. Christensson C, Thorén A, Lindberg B. Safety of inhaled budesonide clinical manifestations of systemic corticosteroid-related adverse effects. *Drug Saf* 2006, 31 (11):965-88.
43. Jong YP, Uil SM, Grotjohan HP, Postma DS et al. Oral or IV prednisolone in the treatment of copd exacerbations. *Chest* 2007, 132(6):1741-7.
44. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 2008,197(1):1-10.
- 45- A statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society. "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease". *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159(4):1-40.
46. Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ and Schols AM. "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives". *Am J Clin Nutr* 2000, 71(5):1033-47.
47. Kerachian MA, Séguinb C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: A new understanding of the mechanisms of action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009, 114(3-5) 121–8.



# 15° Simpósio Internacional de Fisioterapia Respiratória

Fisioterapia em Terapia Intensiva

29 de setembro a 02 de outubro de 2010  
Porto Alegre/RS - Brasil

ID247

## Efeito da prednisolona sobre o diâmetro alveolar de ratos com enfisema elastase induzido

Email: marthinhamanchini@hotmail.com

Martha Trindade Manchini, Raphael Fernando Boiati, Sheila Cristina Monteiro Paiva Freitas, Jorge Gabriel Batista, Dannylo Wesley Nobrega de Souza, Jorge Willian Leandro Nascimento

**Contextualização:** Os glicocorticóides sintéticos são usados terapêuticamente de forma eficaz para uma ampla variedade de condições que exigem modulação imunológica ou inflamatória, incluindo asma e enfisema pulmonar, porém os efeitos terapêuticos e a completa compreensão dos mecanismos farmacológicos ligados à sua ação ainda encontram-se obscuros. **Objetivo:** Avaliar a ação protetora da prednisolona na destruição estrutural alveolar no enfisema elastase induzido em ratos. **Método:** Vinte e seis ratos machos, divididos em 4 grupos: C=controle (N=8), E=enfisema (N=7), P=prednisolona (N=6) e EP=Enfisema + prednisolona (N=5). Os grupos C e P receberam instilação intratraqueal de 0,2 ml de solução salina e os grupos E e EP receberam instilação de 0,2 ml de elastase pancreática para indução do enfisema. Foi administrado prednisolona (5mg/Kg) nos grupos P e EP e veículo (CMC) nos grupos C e E. As administrações foram realizadas em dose única diária, por gavagem durante 24 dias, após o sacrifício, os pulmões retirados para análise. Para determinar o diâmetro alveolar, os cortes pulmonares foram corados por HE e analisados pelo cálculo da média do intercepto linear alveolar (Lm). **Resultados:** Os valores obtidos através do Lm para avaliação do tecido pulmonar foram: C (83,3±5,4), E (70,8±6,0), P (77,2±7,1), EP (70,6±9,8). Os resultados demonstraram semelhança estatística na média do intercepto linear (Lm) do grupo enfisema tratado com prednisolona, quando comparado ao grupo enfisema. **Conclusão:** Apesar do amplo uso clínico dos glicocorticóides em doenças respiratórias, não foi observado efeito protetor direto sobre a redução do diâmetro alveolar dos animais enfisematosos tratados.

Palavras-chave: glicocorticóides; DPOC; enfisema pulmonar.

**EFFECTS OF ATOVASTATIN ON ALVEOLAR DIAMETER OF RATS WITH ELASTASE-INDUCED EMPHYSEMA.**

RAPHAEL FERNANDO BOIATI, MARTHA TRINDADE MANCHINI, DANNYLO WESLEY NOBREGA DE SOUSA, JORGE GABRIEL DOS SANTOS BATISTA, SHEILA CRISTINA MONTEIRO PAIVA FREITAS, JORGE WILLIAN LEANDRO NASCIMENTO.

Post Graduation Program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University, São Paulo – Brasil

**Introduction and objective:** Recent studies using statins show pleiotropic effects, such as anti-inflammatory activity, which could reduce the destructive effects of chronic inflammation related to pulmonary emphysema. This study evaluated the protective action of atorvastatin in the destruction of alveolar structure in elastase-induced emphysema in rats.

**Materials and methods:** We used 29 male rats divided into 4 groups: C = control (N = 8), E = emphysema (N = 7), A = atorvastatin (N = 7) and EA = Emphysema + atorvastatin (N = 7). Groups C and A received intratracheal instillation of 0.2 ml of saline and groups E and EA were instilled with 0.2 ml of pancreatic elastase (2mg/Kg) to induce emphysema. Groups A and EA were administered atorvastatin (20mg/kg) and groups C and E received a vehicle (carboxymethylcellulose). Administrations were performed once daily by gavage for 24 days. After this period of treatment, the animals were sacrificed and lungs removed for analysis. Lung slices were stained with hematoxylin and eosin and the alveolar destruction analyzed by calculating the mean linear intercept of alveolar (LM) in order to determine the alveolar diameter.

**Results and Conclusion:** Data obtained for LM were: C ( $75.8 \pm 4.9$ ), E ( $66.4 \pm 8.2$ ), A ( $71 \pm 5.4$ ), EA ( $72.3 \pm 9.3$ ). According to these results, we observed a significant LM increase in the emphysema groups treated with atorvastatin, when compared with the other groups, demonstrating less alveolar destruction and a possible protective activity that could represent an eventual therapeutic alternative for pulmonary emphysema treatment.

**Supported By:** Nove de Julho University.



**UNINOVE**



Universidade Nova de Julho

## COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CoEP

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado **EFITO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE OS TECIDOS PULMONAR E MÚSCULO-ESQUELÉTICO DE RATOS ESPERMATÓZOS** sob número de protocolo **AN0011** e responsabilidade de **JORGE WILLIAN L. NASCIMENTO** tendo sido **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa - UNINOVE.

São Paulo, 18 de Junho de 2009.

Prof. Dra. Daniela Ap. Biasotto-Gonzalez  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa