

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

Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to the pulmonary emphysema: experimental study in rats

Rosângela MONTEIRO, Fabio Biscegli JATENE, Rogério PAZETTI, Aristides Tadeu CORREIA, Luiza Antônia MANOEL, Wanderley Marques BERNARDO, Dolores Helena Rodrigues Ferreira RIVERO, Sérgio Almeida de OLIVEIRA

RBCCV 44205-705

Resumo

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

Método: Foram avaliados 75 ratos divididos em dois grupos, papaina (N=50) e controle (N=25), submetidos à instilação intratraqueal de papaina e solução fisiológica, respectivamente. Os animais foram sacrificados 30, 60, 90, 120 ou 180 dias após a instilação. Foi realizada gasometria do sangue arterial, análise morfométrica dos pulmões e coração.

Resultados: A instilação de papaina produziu destruição do tecido alveolar, mimetizando alterações morfológicas encontradas no enfisema pulmonar, com diâmetro alveolar médio maior no grupo papaina em relação ao controle em todos os momentos avaliados ($p < 0,05$). A espessura da parede do ventrículo direito e do septo interventricular não apresentou alterações macroscópicas significativas no período

de até seis meses após a indução do enfisema. A cavidade do ventrículo direito apresentou dilatação, a partir de 120 dias após indução do enfisema, com área média superior aos respectivos controles aos 120 e 180 dias ($p = 0,001$). O ventrículo esquerdo apresentou significativa redução da área de sua cavidade, 90 dias após a indução do enfisema pulmonar, acompanhada de discreto espessamento de sua parede.

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

Descritores: Enfisema pulmonar, induzido quimicamente. Enfisema pulmonar, fisiopatologia. Papaina, farmacologia. Modelos animais de doenças. Ventrículo cardíaco, anatomia & histologia.

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este artigo é parte da tese de doutorado da autora, desenvolvida junto ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Endereço para correspondência: Rosângela Monteiro. Instituto do Coração - Serviço de Cirurgia Torácica. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44. Cerqueira César. São Paulo, SP. CEP 05403-000. Tel (11) 3069-5372. E-mail: lacrosangela@incor.usp.br

Artigo recebido em agosto de 2004
Artigo aprovado em outubro de 2004

Abstract:

Objective: The purpose of this study is to evaluate the occurrence and repercussions of chemically induced pulmonary emphysema and the morphological alterations present in rats' hearts of post-induction and to follow the progression afterwards.

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

Results: Papain instillation produced alveolar tissue destruction similar to the morphological alterations observed in pulmonary emphysema. The papain group presented mean alveolar diameter higher than controls in all periods evaluated ($p < 0.05$). Right ventricle wall thickness and interventricular septum did not show significant macroscopic alterations until

six months after emphysema induction. The right ventricle area presented enlargement 120 days after induction of the pulmonary emphysema, with mean area higher than control at 120 e 180 days ($p = 0.001$). The left ventricle presented significant cavity area decrease 90 days after induction of the pulmonary emphysema, followed by slight wall thickening.

Conclusions: The adopted experimental model was efficient to morphologically induce the pulmonary emphysema. The presence of pulmonary emphysema did not provoke morphological changes in the right ventricle wall and interventricular septum. The alveolar destruction induced left ventricular hypertrophy and enlargement of the right ventricle.

Descriptors: Pulmonary emphysema, chemically induced. Pulmonary emphysema, physiopathology. Papain, pharmacology. Disease models, animal. Heart ventricle, anatomy & histology.

INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais causas de morte e incapacitação em todo o mundo, com mais de 16 milhões de indivíduos afetados só nos Estados Unidos [1]. No Brasil, é responsável por cerca de 30 mil óbitos/ano, sendo a quinta causa de morte mais freqüente. Estima-se que haja, atualmente, três milhões de portadores da doença em nosso país. Ao contrário de diversas doenças crônicas que estão em declínio, a progressão da DPOC é alarmante, exibindo números mundialmente crescentes [2]. Prevê-se que até 2020 será a terceira causa de morte mais freqüente no mundo, sendo superada apenas pela doença cardíaca isquêmica e pela doença vascular cerebral [2]. No Brasil, segundo dados do DATASUS, a cada ano são hospitalizados 280 mil brasileiros com DPOC [3].

A denominação DPOC engloba uma série de doenças de diferentes etiologias que têm em comum a presença de obstrução ao fluxo aéreo não completamente reversível. A limitação ao fluxo aéreo é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e/ou a gases irritantes. Dentre os pacientes com DPOC, aproximadamente 20% apresentam enfisema pulmonar, enquanto os outros 80% têm bronquite crônica ou, ainda, uma combinação destas duas afecções [3].

Dada a sua alta prevalência, a DPOC merece destaque como problema de saúde pública, tornando-se assunto de investigação científica aprofundada, sobretudo o enfisema pulmonar pela sua fisiopatologia controversa. Assim, modelos experimentais que resultem em alterações tanto morfológicas como fisiológicas, mimetizando as condições encontradas no pulmão humano deste tipo de paciente,

revestem-se de extrema importância.

Além das já conhecidas repercussões morfofuncionais que ocorrem nos pulmões em pacientes com enfisema pulmonar, vários órgãos e estruturas sofrem o impacto dessas alterações, como o diafragma, o coração e o corpo carotídeo, entre outros.

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

Dentro deste contexto, insere-se este estudo que objetiva avaliar as alterações morfológicas presentes em corações de ratos portadores de enfisema pulmonar quimicamente induzido, acompanhando sua progressão ao longo do tempo.

MÉTODO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após aprovação pela Comissão Científica e de Ética do Instituto do Coração e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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

Neste estudo, foi empregado o modelo de indução do enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de papaina [4].

Foram utilizados 75 ratos machos, da raça Wistar, adultos e saudáveis, pesando entre 200 e 300g (média de $275,3 \pm 16,9$ g), distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais:

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

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

Todos os animais foram submetidos à anestesia com isoflurano a 2%, sob O_2 a 100%, utilizando-se um nebulizador de gases. Após intubação orotraqueal, foram conectados a um ventilador para pequenos animais, com volume corrente de 10ml/kg e frequência respiratória de 80 ciclos por minuto (Figura 1).

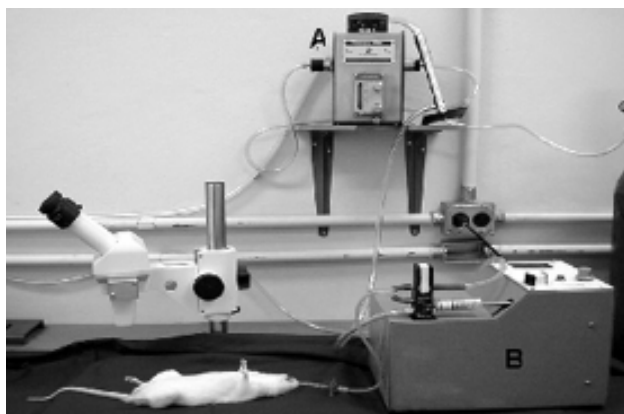


Fig. 1 – Fotografia demonstrando o rato intubado, anestesiado e sob ventilação mecânica, pronto para instilação da solução de papaína. A – Nebulizador de gases. B- ventilador para pequenos animais.

Os animais dos grupos P30, P60, P90, P120 e P180 foram submetidos à instilação intratraqueal de 6mg/kg de papaína dissolvida em 1ml de solução fisiológica a 0,9%, por meio de sonda orotraqueal, em infusão lenta, por cerca de dois minutos. Nos animais dos grupos controle, o procedimento adotado foi o mesmo, exceto pela solução fisiológica instilada que não continha papaína dissolvida.

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

Após o período estabelecido (30, 60, 90, 120 ou 180 dias), os animais foram sacrificados por exsanguinação, sendo retirado o bloco coração-pulmão por meio de esternotomia mediana. Previamente ao sacrifício do animal, foi coletada amostra de sangue diretamente da aorta abdominal, com auxílio de seringa heparinizada para realização de gasometria do sangue arterial.

Os pulmões foram fixados sob pressão por 48 horas. Posteriormente, foram retiradas três amostras de cada pulmão, representando as porções centrais e periféricas destes. Esses cortes foram submetidos às técnicas histológicas habituais e corados com hematoxilina-eosina (HE).

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

A quantificação do enfisema pulmonar foi realizada pela análise histopatológica (presença de destruição alveolar) e pela medida do diâmetro alveolar médio que consiste na determinação do número de vezes que estruturas da parede alveolar interceptam um conjunto de retas coerentes[5].

Após fixação dos corações por imersão em solução de formol tamponado a 10%, foi realizada secção transversal dos ventrículos no ponto médio da distância entre o ápice e o sulco coronário do coração.

Utilizando-se câmera digital, os corações foram fotografados e as imagens digitalizadas dos cortes ventriculares mensuradas com auxílio do software Image Tool, desenvolvido pelo Department of Dental Diagnostic Science of the University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA (Figura 2).

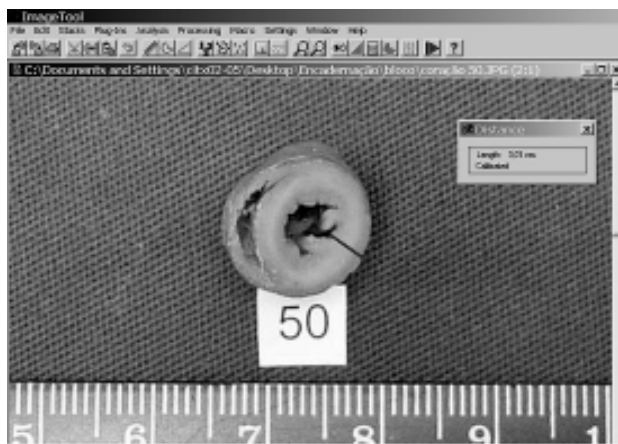


Fig. 2 – Representação da mensuração da espessura da parede do ventrículo esquerdo, utilizando-se o software Image Tool/.

Foram avaliadas a espessura da parede livre dos ventrículos direito e esquerdo e do septo interventricular, bem como a área das cavidades ventriculares direita e esquerda.

Para testar a hipótese de igualdade de médias foi utilizada a Análise de Variância a dois fatores: grupo (papaína e controle) e tempo pós-instilação intratraqueal de papaína (30, 60, 90, 120 e 180 dias). As diferenças entre os grupos foram discriminadas pelo teste t de Bonferroni. O nível de significância para as análises foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Observamos, no grupo em que houve instilação de solução de papaína, alterações morfológicas características de lesões enfisematosas, com padrão de enfisema panacinar, ou seja, comprometimento dos ácinos por um alargamento difuso desde a região hilar até a periferia dos pulmões. Houve destruição de septos e aumento dos espaços alveolares, com formação de estruturas nas extremidades dessa ruptura conhecidas como “baquetas” (Figura 3).

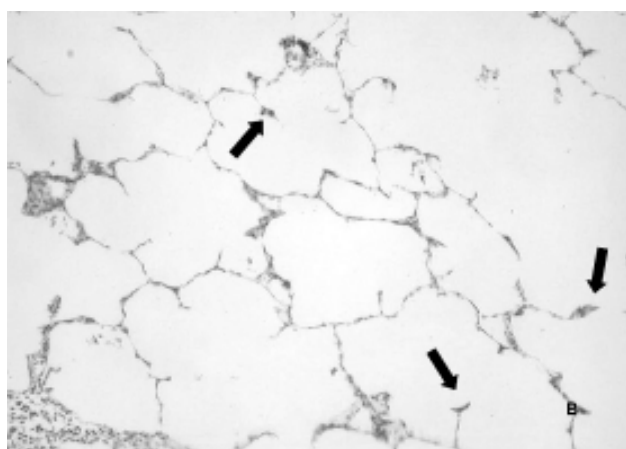


Fig. 3 – Fotomicrografias de parênquima pulmonar de ratos submetidos à instilação de solução fisiológica (A) ou papaína (B). Setas sinalizando a formação de “baquetas”. Coloração HE. Aumento de 100X.

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

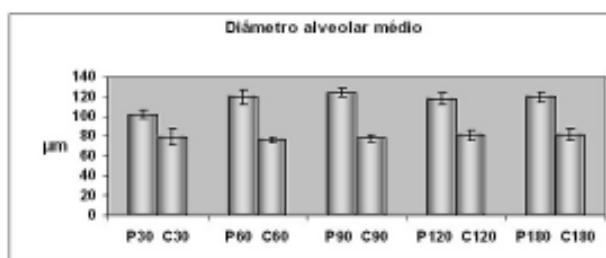


Fig. 4 – Diâmetro alveolar médio (em µm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados.

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

A partir de 90 dias após a indução do enfisema pulmonar, observamos aumento da PCO_2 no grupo papaína em relação ao controle ($p < 0,05$). Os demais parâmetros hemogasométricos apresentaram alterações discretas, porém sem significância estatística.

A espessura da parede livre do ventrículo direito foi similar entre os grupos papaína e controle ($p = 0,9735$), respectivamente, variando entre 1,35 mm e 1,87 mm e entre 1,39 mm e 1,69 mm. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos momentos avaliados ($p = 0,0555$), não havendo portanto sinais evidentes de cor pulmonale (Figura 5).

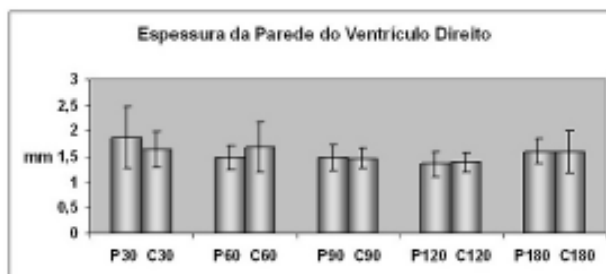


Fig. 5 – Espessura média da parede do ventrículo direito (em mm), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados.

A espessura septal variou de 3,68 a 3,98mm, no grupo papaína, e de 3,43 a 3,82mm, no grupo controle. Igualmente, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na espessura do septo interventricular entre os grupos controle e papaína ($p=0,0737$) e nos diferentes momentos avaliados $p=0,9944$. Observa-se uma tendência de aumento da espessura do septo interventricular nos corações do grupo papaína, a partir de 90 dias, embora sem diferença estatisticamente significativa.

A espessura da parede do ventrículo esquerdo mostrou aumento nos corações de ratos submetidos à instilação intratraqueal de papaína quando comparada ao grupo controle ($p=0,0497$). Da mesma forma que o septo interventricular, observa-se uma tendência de espessamento da parede livre do ventrículo no grupo papaína, a partir de 90 dias, embora sem diferença estatisticamente significativa. A espessura da parede do ventrículo esquerdo no grupo papaína variou de 4,29 a 4,93mm, enquanto que no grupo controle, 4,28 a 4,63mm.

Como pode ser observado na Figura 6, no grupo papaína, a área média da cavidade do ventrículo esquerdo apresentou redução a partir de 90 dias, o mesmo não tendo sido observado no grupo controle. Em alguns animais, a redução da cavidade ventricular esquerda foi muito importante (Figura 7).

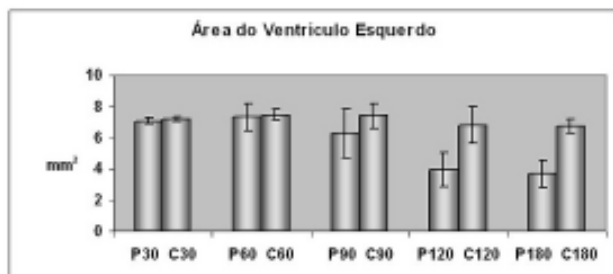


Fig. 6 – Área média da cavidade ventricular esquerda (em mm²), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados.

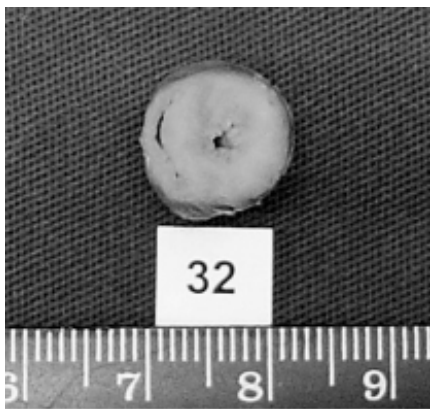


Fig. 7 – Foto de coração de rato submetido à instilação intratraqueal de papaína (grupo P180), demonstrando importante hipertrofia da parede do ventrículo esquerdo e redução da luz da cavidade.

A área média da cavidade do ventrículo direito foi similar nos grupos controle e papaína nos diferentes momentos avaliados, exceto nos subgrupos P120 e P180 que apresentaram área média superior aos respectivos controles ($p=0,001$) – Figura 8.

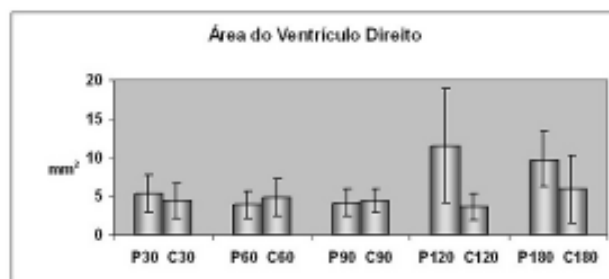


Fig. 8 – Área média da cavidade ventricular direita (em mm²), nos grupos papaína e controle, nos diferentes períodos avaliados.

COMENTÁRIOS

A investigação dos mecanismos de destruição do parênquima pulmonar in vivo pela administração de enzimas proteolíticas como a papaína e outras substâncias, causando enfisema pulmonar e DPOC, tem sido uma das áreas mais intensas de pesquisa sobre doenças pulmonares nos últimos 40 anos [6].

A papaína é reconhecida por apresentar uma potente atividade elastolítica, degradando não apenas a elastina, como também o colágeno dos tecidos [6].

A avaliação histopatológica dos pulmões dos animais submetidos à administração de papaína em nosso estudo demonstrou destruição alveolar difusa, caracterizando um enfisema do tipo panacinar, padrão também encontrado por outros investigadores [4,7].

O cálculo do diâmetro alveolar médio empregado neste estudo é um método classicamente utilizado para quantificação do enfisema pulmonar. É sabido que, em ratos sadios, sem doenças pulmonares, o diâmetro alveolar médio é ao redor de 70 μ m [5]. No presente estudo, os animais do grupo papaína apresentaram diâmetro alveolar médio entre 101,71 μ m e 124,02 μ m, estatisticamente diferente do grupo controle. Outros autores também encontraram valores similares aos nossos achados [4,8,9]. Estes dados demonstram que, nos pulmões de animais submetidos à ação da papaína, houve importante aumento dos espaços alveolares conseqüente à ruptura de septos interalveolares.

A análise do diâmetro alveolar em nosso material mostra que o subgrupo P30 apresenta um diâmetro alveolar médio inferior aos demais subgrupos expostos à ação da papaína, que não diferem entre si. A destruição do parênquima

pulmonar tem início com a agressão provocada pela papaína, progredindo até estabilizar-se no período entre 30 e 60 dias, quando se observa significativa redução da superfície alveolar interna. Estes dados corroboram a afirmação de FUSCO et al. [4] de que o enfisema estabiliza-se ao redor de 40 dias. Um padrão similar foi observado em hamsters após instilação de papaína ou elastase pancreática, verificando-se significativa progressão do enfisema entre 1 e 2 meses após a exposição, seguida de estabilização da lesão histológica [10]. Outros autores afirmam que a lesão estabiliza-se ao redor do terceiro mês após a exposição inicial à papaína [8,9]. MARTORANA et al. [7] observaram que as alterações da arquitetura pulmonar após a administração de papaína são progressivas por um período de algumas semanas e depois se estabilizam, não tendo sido observadas diferenças entre os cães analisados aos 3 e 6 meses após a indução do enfisema. Em trabalho realizado por JOHANSON et al. [11], os ratos foram submetidos à administração única de papaína e sacrificados em diferentes períodos que variaram de horas até 3 meses após a exposição. Verificaram com estes experimentos que a maior expressão das alterações (hemorragia alveolar, infiltrado de polimorfonucleares, inflamação, dilatação dos espaços aéreos centrilobulares) é observada entre 2 e 4 semanas, não havendo regressão ou progressão das lesões.

Uma das complicações mais freqüentemente reportadas em pacientes portadores de DPOC é o cor pulmonale, caracterizado por dilatação e hipertrofia do ventrículo direito, e potencialmente insuficiência secundária à hipertensão primária [12].

Embora o cor pulmonale seja freqüentemente observado nos pacientes, não encontramos em nossos animais sinais de sua presença, como inicialmente esperado. Vários mecanismos têm sido considerados como fatores na patogênese do cor pulmonale no enfisema pulmonar, incluindo hipóxia, redução do leito vascular pulmonar e aumento da pressão arterial pulmonar, aumento da viscosidade do sangue causada por policitemia secundária à hipóxia, entre outros [13].

No estudo realizado por ICOCHEA et al. [13], a hipóxia foi identificada como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de cor pulmonale, em hamsters portadores de enfisema pulmonar induzido experimentalmente, já que a oxigenoterapia produziu melhora na função ventricular direita. A hipertrofia do ventrículo direito pode ser considerada como um indicativo de hipertensão pulmonar, a qual, por sua vez, está relacionada ao grau de hipóxia alveolar [14]. A hipóxia alveolar é um potente constritor dos vasos pulmonares e há uma relação inversamente proporcional entre a pressão arterial pulmonar e a PaO₂ em pacientes com cor pulmonale [14].

Talvez a ausência de alterações hemogasométricas

importantes, visto ser a vasoconstrição hipóxica um dos determinantes da hipertensão pulmonar, possa explicar porque não observamos alterações no ventrículo direito nos animais do presente estudo, em um período de observação de até 180 dias.

Outro aspecto a ser considerado é que o grau de destruição alveolar provocada no protocolo de indução de enfisema pulmonar por nós empregado possa não ter sido suficiente para reprodução das condições morfofisiológicas necessárias para o desenvolvimento do cor pulmonale. Entretanto, alguns autores afirmam que não há relação entre a presença de hipertrofia ventricular direita e a porcentagem de pulmão destruído pelo enfisema [14-16].

Além disso, é possível que o cor pulmonale desenvolva-se mais tardiamente, necessitando de um período maior de observação. Entretanto, segundo alguns autores, os primeiros sinais de hipertrofia ventricular direita parecem já estar presentes três meses após a indução do enfisema, com evidente hipertrofia aos seis meses [8].

Observamos em nosso estudo aumento da área da cavidade do ventrículo direito, a partir de 120 dias após a instilação de papaína, associado à hipertrofia do ventrículo esquerdo.

Vários autores afirmam que a presença de hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com enfisema pulmonar é um assunto controverso [12] e muitos atribuem-na à hipertensão arterial sistêmica [14,17], algumas vezes não detectada clinicamente. Assim, uma hipótese que aventamos para explicar presença de hipertrofia do ventrículo esquerdo nos nossos animais foi a possibilidade da papaína induzir hipertensão arterial sistêmica, já que a hipertrofia geralmente está associada à sobrecarga de pressórica. Não encontramos na literatura nenhum trabalho que associasse a droga à hipertensão arterial sistêmica. Entretanto, há alguns autores que afirmam que a papaína tem ação sobre os canais de cálcio, o que merece investigações futuras [18].

Segundo ISHIKAWA et al. [16], um dos problemas mais embaraçosos encarado pelos clínicos e patologistas é a suposta existência de hipertrofia biventricular na doença pulmonar obstrutiva.

MURPHY et al. [19] afirmam que a incidência de hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com enfisema pulmonar oscila nas diferentes publicações, acometendo entre 24 e 86% dos pacientes. Embora alguns estudos de necropsia [17,20] tenham reportado hipertrofia ventricular esquerda em pacientes com DPOC, trabalhos realizados com métodos não-invasivos e cateterização demonstraram dimensões e função normais nestes pacientes [21]. Hipertrofia ventricular esquerda isolada, sem associação com hipertrofia direita, também foi encontrada em alguns casos de necropsia [17]. SUTINEN et al. [22], em estudo de necropsia, encontraram hipertrofia de ventrículo esquerdo

em muitos pacientes com enfisema pulmonar, entretanto sem associação estatística.

Por fim, concordamos com os autores que afirmam que a associação entre enfisema pulmonar e hipertrofia ventricular esquerda é uma questão não resolvida [17], com causas obscuras [19], merecendo, portanto, investigações mais aprofundadas.

CONCLUSÕES

Diante do que foi exposto, concluímos que o modelo empregado para indução do enfisema pulmonar foi eficiente, produzindo destruição do tecido alveolar e mimetizando alterações morfológicas encontradas no enfisema pulmonar, que se estabelecem até 60 dias após a agressão inicial, sem progressão.

A presença de enfisema pulmonar não provocou alterações morfológicas na parede do ventrículo direito e septo interventricular, enquanto que a destruição alveolar induziu hipertrofia do ventrículo esquerdo e dilatação do ventrículo direito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Rev Med* 2003;54:113-29.
2. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1256-76.
3. Datasus. Ministério da Saúde, Brasil. 2004. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>
4. Fusco LB, Pêgo-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol* 2002;28:1-7.
5. Bivin WS, Crawford MP, Brewer NR. Morphophysiology. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editors. *The laboratory rat. I- Biology and diseases*. Bridgewater: American College of Laboratory Animal Medicine Series; 1979. p.74-103.
6. Turino GM. The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. *Chest* 2002;122:1958-60.
7. Martorana PA, Wusten B, van Even P, Gobel H, Schaper J. A six-month study of the evolution of papain-induced emphysema in the dog. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:898-903.
8. Sulkowska M, Musiatowicz B, Sulkowski S, Zimnoch L, Ejsmont-Pietrow G, Sulik M et al. Cor pulmonale in experimental lung emphysema. I-The morphometric evaluation of pulmonary and myocardium changes. *Rocz Akad Med Bialymst* 1995;40:335-43.
9. Sulkowski S, Musiatowicz B, Sulkowska M, Sobaniec-Lotowska M, Dzieciol J, Sulik M et al. Changes of myocardial capillary density in progression of experimental lung emphysema. *Exp Toxicol Pathol* 1996;48:19-28.
10. Snider GL, Sherter CB. A one-year study of the evolution of elastase-induced emphysema in hamsters. *J Appl Physiol* 1977;43:721-9.
11. Johanson Jr WG, Pierce AK, Reynolds RC. The evolution of papain emphysema in the rat. *J Lab Clin Med* 1971;78:599-607.
12. Minal OA, Maurer JR, Kesten S. Comorbidities in end-stage lung disease. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:891-903.
13. Icochea A, Cooper BS, Kuhn C. The effect of oxygen on cor pulmonale in experimental emphysema induced by elastase or elastase and beta-aminopropionitrile in hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:792-6.
14. Edwards C, Heath D, Harris P. The carotid body in emphysema and left ventricular hypertrophy. *J Pathol* 1971;104:1-13.
15. Hicken P, Heath D, Brewer D. The relation between the weight of the right ventricle and the percentage of abnormal air space in the lung in emphysema. *J Pathol Bacteriol* 1966;92:519-28.
16. Ishikawa S, Fattal GA, Popiewicz J, Wyatt JP. Functional morphometry of myocardial fibers in cor pulmonale. *Am Rev Respir Dis* 1972;105:358-67.
17. Michelson N. Bilateral ventricular hypertrophy due to pulmonary disease. *Dis Chest* 1960;38:435-46.
18. Armstrong CM, Cota G. Calcium block of Na⁺ channels and its effect on closing rate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4154-7.
19. Murphy ML, Adamson J, Hutcheson F. Left ventricular hypertrophy in patients with chronic bronchitis and emphysema. *Ann Intern Med* 1974;81:307-13.
20. Edwards CW. Left ventricular hypertrophy in emphysema. *Thorax* 1974;29:75-80.
21. Matthey RA, Berger HJ, Davies R, Loke J, Mahler DA, Gottschalk A et al. Right and left ventricular exercise performance in chronic obstructive pulmonary disease: radionuclide assessment. *Ann Intern Med* 1980;93:234-9.
22. Sutinen S, Paakko P, Tienari J. Weights of the body and cardiac ventricles in pulmonary emphysema. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1985;407:249-57.