JULIANA TIYAKI ITO

**O papel da imunidade adaptativa (Th17/Treg) na progressão
da DPOC em modelo induzido por exposição à fumaça de
cigarro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Degobbi
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

São Paulo
2018

JULIANA TIYAKI ITO

**O papel da imunidade adaptativa (Th17/Treg) na progressão
da DPOC em modelo induzido por exposição à fumaça de
cigarro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Degobbi
Tenorio Quirino dos Santos Lopes

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ito, Juliana Tiyaki

O papel da imunidade adaptativa (Th17/Treg) na progressão da DPOC em modelo induzido por exposição à fumaça de cigarro / Juliana Tiyaki Ito. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica
2.Tabagismo 3.Imunidade adaptativa 4.Imunidade
inata 5.Mediadores da inflamação 6.Mecânica
respiratória

USP/FM/DBD-298/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico este trabalho
Ao meu amor, Thyago,
Aos meus pais, Augusto e Iyone,
E às minhas irmãs, Harumi e Satomi,
Pelo apoio incondicional em todos os momentos.
Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

Agradecimentos

Ao longo de todo o processo que levou à realização deste trabalho tive a sorte e o privilégio de ter conhecido pessoas realmente fantásticas, sem as quais não teria sido possível chegar até aqui, e das quais nunca me esquecerei. E são a essas pessoas que gostaria de agradecer.

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por colocar, cuidadosamente, pessoas tão especiais em meu caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes, expresso minha gratidão, apreço e admiração. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, pela sua dedicação e pelo seu entusiasmo contagiante, a cada resultado obtido. Sinto-me privilegiada por tê-la sempre presente durante esta jornada, me incentivando e proporcionado amadurecimento para insistir neste caminho, que é a minha paixão pela ciência e pela pesquisa.

Ao meu companheiro, Thyago, agradeço por todo o seu amor, carinho, compreensão e pela presença incansável ao longo do período de elaboração desta tese. Agradeço pela sua parceria, ao se responsabilizar pelos afazeres domésticos quando eu não podia; pela paciência, quando o fazia assistir inúmeros ensaios para apresentações; por me confortar com seu bom-humor quando tudo dava errado e por sempre me convencer de que eu era capaz de seguir neste caminho, quando nem mesmo eu acreditava. Obrigada por sonhar os meus sonhos e partilhar os seus comigo.

À minha família, deixo um agradecimento especial, pelo apoio incondicional e por compreenderem minha ausência, durante mais este período. Aos meus pais, Augusto e Iyone, agradeço por todo o amor, pelo exemplo de vida, por me ensinarem o valor do compromisso, da dedicação, da

amizade, da humildade e da honestidade. Obrigada por me acolherem nos momentos de fragilidade e me incentivarem a lutar para enfrentar o mundo e vencer os desafios. Às minhas irmãs, Harumi e Satomi e às “batyans” Hatue e Margarida, das quais a distância física não me separou, agradeço por me proporcionarem carinho e atenção sempre que tiveram comigo, me amparando em todos os momentos.

Aos demais familiares, “vó” Lúdia, sogros, cunhados e amigos, muito obrigada pela motivação e apoio sempre!

À Profa. Dra. Mariangela Macchione, agradeço por me receber de forma tão generosa e por ter me apresentado a esse grupo. Obrigada pelos ensinamentos e pela sua importante contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Milton de Arruda Martins, antigo chefe do Laboratório de Terapêutica Experimental (LIM-20) e à Profa. Dra. Iolanda Calvo Tibério, atual chefe, agradeço pelas sugestões e pelo auxílio financeiro para a execução deste estudo.

Aos co-autores, Profa. Dra. Thais Mauad, Prof. Dr. Chin Jia Lin, Dra. Natália Gonçalves, Prof. Dr. Gilles Landman, Prof. Dr. Rildo Volpini, Profa. Dra. Élia Caldini, muito obrigada pela contribuição substancial na elaboração e revisão do “paper”.

À Profa. Dra. Elnara Negri, ao Prof. Dr. Celso Carvalho e ao Prof. Dr. Rodolfo Vieira, agradeço pelas sugestões e contribuições fundamentais para o aprimoramento deste trabalho.

A todo o pessoal do LIM-20, muito obrigada pelo aprendizado, colaboração e companheirismo. Às Professoras Doutoras Beatriz Saraiva,

Carla Prado, Edna Leick, Clarisse Olivo, Fernanda Arantes e seus respectivos alunos, muito obrigada por tudo! Aos orientandos da “Fê” Lopes e parceiros de pesquisa, Davi Sales, Rúbia Rodrigues, Juliana Lourenço, Alyne Moreira, Júlia Kohler, Jussara Simões, Larissa Emídio, Ivy Zanchetta, Kaique Silva e Jader Junqueira, agradeço pela disponibilidade em me ajudar sempre que possível, pela colaboração nos longos protocolos de exposição e na coleta de dados, e por contribuírem para o meu crescimento.

Às amigas, Camila Suehiro e Isabella Genaro, agradeço pelos conselhos, pelos momentos de descontração e desabafo, e pela disposição infinita proporcionada por todo esse período.

À Daniela Cervilha, minha parceira de doutorado, agradeço pela amizade construída durante esta jornada, pelas horas infundáveis de discussão dos resultados e das incertezas da vida, e por cada dia de convívio bastante produtivo. Obrigada por tornar esta trajetória mais alegre!

Às técnicas da imuno-histoquímica, Ângela, Esmeralda, Sandra e Cristina, muito obrigada por todos os ensinamentos deste método, pela disponibilidade para sanar dúvidas e por sempre apresentarem soluções para os problemas de padronização.

Aos funcionários da FMUSP, Rosana, Luiz Afonso, Ivan, Reginaldo, Vânia e especialmente ao Davi Ferreira, agradeço pela atenção e disposição em me ajudar sempre, com muita competência.

Aos demais professores e colegas de pós-graduação, obrigada por compartilharem seu conhecimento e pela agradável convivência durante as disciplinas.

Aos membros da banca examinadora de defesa desta tese, agradeço pelo aceite do convite, pela disponibilidade e pelo tempo despendido na leitura deste trabalho.

À CAPES e à FAPESP, agradeço pelo apoio financeiro primordial para a execução deste estudo.

Aos animais utilizados, agradeço porque foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse possível, deixo meu sincero agradecimento.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres espíritos, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Fatores de risco	22
1.2 Patogênese da DPOC	22
1.3 Aspectos imunológicos da DPOC	24
1.3.1 Imunidade inata	24
1.3.2 Imunidade adaptativa.....	25
1.4 Modelo experimental de DPOC.....	27
1.5 Justificativa	29
1.6 Hipótese	30
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Grupos experimentais	32
3.3 Indução da DPOC por exposição à fumaça de cigarro	33
3.4 Avaliação da mecânica do sistema respiratório	34
3.5 Remoção e fixação dos pulmões para análise histológica.....	35
3.5.1 Imuno-histoquímica.....	36
3.5.2 Dupla marcação por imuno-histoquímica.....	37
3.5.3 Avaliação morfométrica	38
3.5.3.1 Avaliação do intercepto linear médio (<i>Lm</i>).....	38
3.5.3.2 Análise dos mediadores inflamatórios.....	39
3.6 Expressão gênica	40

3.6.1	Preparo do tecido e isolamento de células epiteliais por microdissecção à laser.....	40
3.6.2	Extração de RNA e transcrição reversa	41
3.6.3	RT-PCR em tempo real	41
3.7	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Comparação entre os grupos Fumo e os respectivos grupos Controle	43
4.1.1	Mecânica do sistema respiratório	43
4.1.2	Alargamento dos espaços aéreos: peribrônquico e distal	44
4.1.3	Resposta inflamatória	45
4.2	Comparação entre os grupos Fumo nos diferentes tempos de exposição....	56
4.2.1	Alterações funcionais e estruturais	56
4.2.2	Inflamação pulmonar	57
4.3	Células Treg expressando IL-10.....	59
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÃO.....	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICE		

Lista de figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.	24
Figura 2. Principais células inflamatórias e seus mediadores na fisiopatologia da DPOC.	26
Figura 3. Diferenciação das células T CD4 ⁺ <i>naïve</i>	26
Figura 4. Linha temporal do protocolo experimental.	33
Figura 5. Foto ilustrativa da exposição à fumaça de cigarro.	34
Figura 6. Retículo de Weibel utilizado para quantificação do Lm.	39
Figura 7. Fotomicrografia ilustrativa da delimitação do espaço peribroncovascular.	40
Figura 8. Esquema ilustrativo do isolamento de células por microdissecção à laser.	40
Figura 9. Parâmetros da mecânica do sistema respiratório.	43
Figura 10. Alargamento dos espaços aéreos peribrônquicos e distais.	44
Figura 11. Fotomicrografia do parênquima pulmonar.	45
Figura 12. NF-κB no espaço peribroncovascular e nas células epiteliais brônquicas.	47
Figura 13. TNF-α no espaço peribroncovascular e nas células epiteliais brônquicas.	48
Figura 14. Células T CD4 ⁺ no espaço peribroncovascular.	49
Figura 15. Células T CD8 ⁺ no espaço peribroncovascular.	50
Figura 16. Linfócitos granzima-B ⁺ no espaço peribroncovascular.	51
Figura 17. Células B CD20 ⁺ no espaço peribroncovascular.	52
Figura 18. Linfócitos IL-17 ⁺ no espaço peribroncovascular.	53
Figura 19. Células Treg no espaço peribroncovascular.	54
Figura 20. Linfócitos IL-10 ⁺ no espaço peribroncovascular.	55
Figura 21. Análise temporal da função e estrutura pulmonar.	57
Figura 22. Análise temporal da inflamação pulmonar.	58
Figura 23. Imagens de imunofluorescência das células Treg expressando IL-10.	59

Lista de tabela

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados.	37
---	----

Lista de siglas e abreviaturas

α 1-AT	<i>alpha</i> -1 antitripsina
ANOVA	análise de variância
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CO	monóxido de carbono
CVF	capacidade vital forçada
DAB	diaminobenzidina
DALY	<i>disability-adjusted life year</i> - anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
DEPC	dietil-pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimática
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FOXP3	forkhead box P3
Gtis	resistência tecidual
H&E	hematoxilina e eosina
Htis	elastância tecidual
Iaw	inertância das vias aéreas
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
INF- γ	interferon- <i>gamma</i>
LIM-20	Laboratório de terapêutica experimental I
Lm	intercepto linear médio
MMP	metaloproteinase de matriz
NF- κ B	fator nuclear- <i>kappa</i> B
OCT	temperatura ótima para corte
PBS	tampão fosfato-salino

PLATINO	Projeto latino-americano de investigação em obstrução pulmonar
Raw	resistência de vias aéreas
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RT-PCR	transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
TGF- β	fator de crescimento transformador <i>-beta</i>
Th	T <i>helper</i> – T auxiliaries
TNF- α	fator de necrose tumoral- <i>alpha</i>
Treg	T regulatórias
VEF ₁	volume expiratório forçado no primeiro segundo
Zrs	impedância do sistema respiratório

Lista de símbolos

cm	centímetro
cmH ₂ O	centímetro de água
g	grama
G	Gauge
kcal	quilocaloria
kg	quilo
L	litro
m ³	metro cúbico
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
ppm	partes por milhão
R\$	real
s	segundo
\$	dólar
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado

Ito JT. *O papel da imunidade adaptativa (Th17/Treg) na progressão da DPOC em modelo induzido por exposição à fumaça de cigarro* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O desequilíbrio entre as respostas imunes pró- e anti-inflamatórias, mediado pela via T *helper* (Th)17 e T regulatória (Treg), respectivamente, contribui para o desenvolvimento e progressão da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Os modelos experimentais são ferramentas valiosas para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na diferenciação dos subtipos celulares presentes nos diferentes estágios da DPOC. **OBJETIVO:** Realizar uma análise temporal da progressão da inflamação mediada pelas respostas imunológicas em modelo experimental induzido por exposição à fumaça de cigarro, com foco no perfil Th17/Treg. **MÉTODOS:** Camundongos C57BL/6 machos foram expostos à fumaça de cigarro para indução da DPOC, durante 1, 3 ou 6 meses, e os grupos controle foram mantidos no biotério recebendo ar filtrado nos mesmos tempos. Os animais foram anestesiados e traqueostomizados para avaliação da mecânica do sistema respiratório: Raw (resistência de vias aéreas), Gtis (resistência do tecido pulmonar) e Htis (elastância do tecido pulmonar). Em seguida, foram eutanasiados para remoção dos pulmões para posterior análise morfométrica. O alargamento dos espaços aéreos peribrônquico e distal foi mensurado pelo intercepto linear médio (Lm) e as células T CD4⁺, T CD8⁺, Treg, B CD20⁺ e células positivas para granzima-B, IL-17, IL-10, NF-κB e TNF-α foram quantificadas na região peribroncovascular por imuno-histoquímica. Adicionalmente, foi realizada dupla marcação por imunofluorescência para as células Treg e IL-10⁺ e foi avaliada a expressão gênica de NF-κB e TNF nas células epiteliais brônquicas. **RESULTADOS:** Este modelo experimental de DPOC induzido por exposição à fumaça de cigarro demonstrou um desequilíbrio entre a resposta imune pró-inflamatória, refletida pelo aumento das células T CD4⁺, T CD8⁺, B CD20⁺, IL-17⁺, NF-κB⁺ e TNF-α⁺; e a resposta imune anti-inflamatória, representada pela redução de células Treg e IL-10⁺. Esta resposta foi progressiva ao longo do tempo de exposição à fumaça de cigarro e foi associado ao aumento do alargamento dos espaços aéreos desde o primeiro mês de exposição e à piora da função pulmonar a partir do terceiro mês. **CONCLUSÃO:** Nossos achados apontam que o desequilíbrio Th17/Treg associado à falha na regulação do processo inflamatório, mediado pela deficiência na liberação de IL-10 nos estágios iniciais da DPOC, contribuam para a progressão desta doença.

Descritores: doença pulmonar obstrutiva crônica; tabagismo; imunidade adaptativa; imunidade inata; mediadores da inflamação; mecânica respiratória.

Ito JT. *The role of adaptive immunity (Th17/Treg) in COPD progression in a cigarette smoke induced model* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

BACKGROUND: The imbalance between pro- and anti-inflammatory immune responses, mediated by T helper (Th)17 and T regulatory (Treg) profiles, respectively, contributes to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) development and progression. Experimental models are valuable tools to clarify the pathophysiological mechanisms involved in the cell subtypes differentiation present in different stages of COPD. **AIM:** To perform a temporal analysis of inflammation progression mediated by immune responses in a cigarette smoke (CS) induced model, focusing on the Th17/Treg profile. **METHODS:** C57BL/6 mice were exposed to CS to induce COPD for 1, 3 or 6 months, and the control groups were kept under filtered air conditions at the same time points. Animals were anesthetized and tracheostomized for the respiratory mechanics evaluation: airway resistance (Raw), tissue damping (Gtis) and tissue elastance (Htis). Subsequently, they were euthanized for lungs removal in order to perform morphometric analysis. Airspace enlargement was measured by the mean linear intercept (Lm) around airways and in distal parenchyma, and CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, Treg cells, CD20⁺ B cells and positive cells for granzima-B, IL-17, IL-10, NF-κB and TNF-α were quantified in peribronchovascular areas by immunohistochemistry. Also, double-label immunofluorescence for Treg cells and IL-10⁺ cells was performed and gene expression of NF-κB and TNF was evaluated in bronchiolar epithelial cells. **RESULTS:** This experimental model of COPD induced by CS exposure demonstrated an imbalance between pro-inflammatory immune response, reflected by the increase in CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells, IL-17⁺, NF-κB⁺ and TNF-α⁺ cells; and anti-inflammatory immune response, represented by the reduction of Treg cells and IL-10⁺ cells. This response was progressive throughout CS exposure time and was associated with increased alveolar enlargement from the first month of CS exposure and impaired lung function from the third month. **CONCLUSION:** Our results suggest that Th17/Treg imbalance associated with a failure in pulmonary inflammatory process regulation, mediated by deficiency in IL-10 release in the early stages of COPD, contribute to this disease progression.

Descriptors: pulmonary disease, chronic obstructive; tobacco use disorder; adaptive immunity; immunity, innate; inflammation mediators; respiratory mechanics.

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença evitável e tratável, caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e limitação do fluxo aéreo geralmente progressiva, não totalmente reversível, associada a uma resposta inflamatória anormal das vias aéreas e dos alvéolos causada pela exposição constante a partículas ou gases nocivos¹.

A DPOC é a principal causa de morbidade por doenças crônicas em todo o mundo, com prevalência de 11,4% da população mundial adulta². De acordo com o projeto latino-americano de investigação em obstrução pulmonar (PLATINO), 15,8% da população no município de São Paulo apresenta a doença, o que representa cerca de 5 a 6 milhões de brasileiros com DPOC³.

Acerca do ônus financeiro global atribuído à DPOC, segundo o critério *disability-adjusted life year* (DALY) – que soma os anos perdidos devido a mortes prematuras e os anos vividos com incapacidade – esta doença teve o quinto maior índice de DALY no mundo em 2013, com custo avaliado entre \$1.000 a \$4.000 para cada paciente⁴. No Brasil, a DPOC gerou um custo de R\$103 milhões ao Sistema Único de Saúde, referente a mais de 142 mil internações nos hospitais públicos em 2011⁵. E foi a enfermidade relacionada ao tabagismo que mais gerou gastos nos sistemas públicos e privados de saúde, somando R\$ 16 bilhões em 2015⁶.

A cada hora, três pessoas morrem em consequência da DPOC no Brasil, gerando cerca de 40 mil mortes por ano⁷. No mundo, são mais de três milhões de mortes devido a esta doença, o que a classifica em quarto lugar dentre as causas de morte mundial¹. E a estimativa é que até 2020, a DPOC seja a terceira maior causa de morte

global, resultante da incessável exposição aos fatores de risco para a doença e do envelhecimento populacional⁸.

1.1 Fatores de risco

Embora o tabagismo seja o principal fator etiológico da DPOC, visto que 90% dos pacientes com DPOC são ou já foram fumantes, apenas 20% de toda a população tabagista desenvolve a doença, o que indica que fatores intrínsecos do indivíduo, como susceptibilidade genética e mudanças epigenéticas possam potencializar a inflamação induzida pela exposição constante à fumaça do cigarro, contribuindo fortemente para a patogênese e progressão desta doença⁹.

Outros fatores ambientais como, a poluição atmosférica, exposição ocupacional a poeiras e gases nocivos, inalação da fumaça proveniente da queima de biomassa e tabagismo passivo também estão associados à DPOC¹⁰.

A deficiência hereditária de *alfa*-1 antitripsina (α 1-AT) é a causa genética mais bem documentada da DPOC¹¹. Os deficientes de α 1-AT apresentam enfisema e piora da função pulmonar de maneira precoce e acelerada, porém a suscetibilidade à doença é significativamente aumentada quando há interação com exposições ambientais, como o tabagismo¹².

1.2 Patogênese da DPOC

Os mecanismos que conduzem às alterações patológicas características da DPOC observadas nas vias aéreas, no parênquima pulmonar e nos vasos pulmonares incluem inflamação crônica, alterações estruturais, assim como o estresse oxidativo e o excesso de proteases que potencializam a inflamação¹ (Figura 1).

A inflamação pulmonar de pacientes com DPOC é caracterizada pelo aumento de macrófagos e neutrófilos ativados e células T *helper* (Th) 1 e Th17. Todas estas células em conjunto com as células epiteliais e outras células estruturais liberam diversos mediadores inflamatórios¹³, que por sua vez, recrutam mais células inflamatórias da circulação, amplificam o processo inflamatório e induzem alterações estruturais¹⁴. Mesmo após anos de cessação do tabagismo esta inflamação persiste, sugerindo que haja um mecanismo de autoperpetuação ainda não completamente esclarecido¹⁴.

O estresse oxidativo representa um dos mecanismos patológicos mais importantes da DPOC, e pode estar associado tanto ao tabagismo e à inalação de partículas nocivas quanto ao aumento de neutrófilos e macrófagos ativados, procedentes do processo inflamatório pulmonar¹⁵. Pacientes com DPOC apresentam níveis elevados de biomarcadores do estresse oxidativo no condensado do ar exalado, no escarro e na circulação sistêmica, os quais aumentam acentuadamente durante as exacerbações¹.

O desequilíbrio protease/antiprotease está intimamente ligado à destruição tecidual e ao enfisema¹⁶. O acúmulo de macrófagos e neutrófilos ativados nas vias aéreas distais e nos espaços alveolares, decorrente da exposição crônica à fumaça de cigarro, é considerada a principal fonte de proteases nos pulmões de fumantes com DPOC. Nestes indivíduos, a produção de antiproteases é insuficiente para neutralizar as proteases e evitar a lesão pulmonar. O tabagismo, ainda ativa o epitélio respiratório para promover o remodelamento das vias aéreas, que somado ao enfisema resultam na obstrução do fluxo aéreo¹⁷.

Figura 1. Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.

Todos estes mecanismos ressaltam a importância da resposta inflamatória pulmonar na patogênese da DPOC¹. Esta inflamação mediada por células e mediadores inflamatórios da imunidade inata e adaptativa, que persiste mesmo após anos sem fumar, tem sido considerada elemento chave desta doença¹³.

1.3 Aspectos imunológicos da DPOC

A inflamação pulmonar crônica é um componente fundamental na fisiopatologia da DPOC¹⁸. Estudos prévios em pacientes com DPOC descreveram um padrão inflamatório característico, com aumento de neutrófilos, macrófagos, células T e células B, mediada pelas respostas imunológicas inata e adaptativa¹³.

1.3.1 Imunidade inata

A exposição contínua da fumaça de cigarro no trato respiratório promove a ativação de macrófagos e células epiteliais, as quais produzem e liberam diversos mediadores inflamatórios para os pulmões, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)¹³. Esta citocina tem um importante papel na amplificação da inflamação, ao

ativar a transcrição de genes de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, mediado pelo fator nuclear-*kappa* B (NF- κ B), que resulta no recrutamento adicional de macrófagos e neutrófilos para o local da inflamação¹³. A secreção de enzimas proteolíticas por estas células, em conjunto com o aumento do estresse oxidativo causam lesões no tecido pulmonar¹⁹.

Quando este processo inflamatório não é minimizado, a ação de patógenos invasores estimula a inflamação e a imunidade adaptativa por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células dendríticas. Estas últimas, quando ativadas são direcionadas aos órgãos linfoides, onde irão apresentar os antígenos às células T *naïve*, promovendo a proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺²⁰.

1.3.2 Imunidade adaptativa

Em fumantes com DPOC é observado um aumento de células dendríticas ativadas e de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ao redor das vias aéreas periféricas²¹. King et al.²² observaram que tanto células T CD4⁺ como T CD8⁺ de indivíduos com DPOC produzem altos níveis de TNF- α ²², o que contribui para a intensificação da inflamação e da lesão tecidual.

A predominância de células T CD8⁺ é observada nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de indivíduos com DPOC²⁰ e sua expressão é ainda maior naqueles que apresentam piora da limitação do fluxo aéreo e do enfisema²³. Células T CD8⁺ liberam enzimas proteolíticas como a perforinas e a granzima-B, que provocam a morte de células estruturais por apoptose ou necrose^{20,24,25}, levando à degradação de matriz extracelular e remodelamento, resultando na obstrução de pequenas vias aéreas em indivíduos com DPOC²⁶ (Figura 2).

Figura 2. Principais células inflamatórias e seus mediadores na fisiopatologia da DPOC (adaptado de Lane N, 2010⁷⁶).

As células T CD4^+ *naïve* podem se diferenciar em células Th1, Th2, Th17 ou T regulatórias (Treg) de acordo com a sinalização de citocinas presentes no microambiente²⁷. Cada subtipo celular apresenta diferentes fatores de transcrição, receptores de membrana e produzem determinadas citocinas²⁸. Dentre os subtipos de células T CD4^+ , as células Th17 e Treg tem se destacado por seu importante papel na progressão da DPOC^{27,29,30}(Figura 3).

Figura 3. Diferenciação das células T CD4^+ *naïve* (adaptado de Lane N, 2010⁷⁶).

As células Th17, responsáveis pela liberação da interleucina (IL) -17, contribuem para a proliferação de células T efectoras e expressão de vários mediadores pró-inflamatórios associados ao desenvolvimento da DPOC^{29,31}. Outros estudos também relatam o papel protetor da IL-17 contra infecções respiratórias agudas ao ativar citocinas e quimiocinas inflamatórias e promover o rápido recrutamento de neutrófilos para o local da infecção^{32,33}.

As células Treg, por sua vez, exercem o controle do processo inflamatório ao suprimir a atividade de células T efectoras mediante secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o fator de crescimento transformador-*beta* (TGF- β)³⁴.

Sales et al. relataram aumento de células positivas para IL-17 e redução de células Treg e IL-10 nas vias aéreas de pacientes com DPOC comparados aos fumantes que não apresentavam obstrução brônquica³⁵. O mesmo comportamento foi observado por Wang et al. no sangue periférico de pacientes com DPOC com grau de obstrução moderado e grave²⁷. O desequilíbrio entre respostas pró- e anti-inflamatórias mediado pelas células Th17 e Treg, respectivamente, foi correlacionada à progressão da DPOC^{27,36}.

O aumento de células B também foi observado nos pulmões de indivíduos com DPOC, principalmente em estágios mais avançados da doença. Estas células se organizam em folículos linfoides em torno de pequenas vias aéreas³⁷.

1.4 Modelo experimental de DPOC

Modelos animais de DPOC são ferramentas valiosas para o estudo dos mecanismos inerentes desta doença, uma vez que abordam respostas integradas de todo o organismo. E ao refletir com precisão a fisiopatologia da DPOC, esses modelos

permitem testes de agentes terapêuticos potenciais, indispensáveis para a descoberta de novas drogas³⁸⁻⁴⁰.

Dentre as espécies utilizadas em estudos científicos (roedores, cães, cobaias, macacos e ovelhas) a mais utilizada é a de camundongos, dada a extensa informação sobre seu genoma, a abundância de sondas de anticorpos para sua espécie, o baixo custo e a capacidade de gerar animais geneticamente modificados que evidenciem processos específicos no âmbito da DPOC⁴¹. Porém, é importante considerar que há divergências anatômicas entre camundongos e humanos, que geram limitações neste modelo experimental.

Os camundongos, por apresentarem respiração nasal obrigatória, quando expostos à fumaça de cigarro, apresentam padrão de filtração das partículas inaladas nas narinas e no trato respiratório superior diferente da vivenciada por humanos, que realizam respiração bucal⁴².

As glândulas submucosas dos camundongos são limitadas à traqueia e estes animais quase não apresentam células caliciformes em seus brônquios e bronquíolos, resultando em uma resposta metaplásica fraca destas células, diferente da observada em pequenas vias aéreas de indivíduos com DPOC⁴³.

Outro fator é a ausência de bronquíolos respiratórios nesta espécie, o que implica na falta de base anatômica para o desenvolvimento de enfisema centrolobular⁴⁴. Além disso, os camundongos possuem uma resistência genética intrínseca⁴⁵ que os impede de desenvolver o enfisema pulmonar grave, restringindo-os a obstruções de graus leve a moderado⁴⁶.

Os aspectos característicos da DPOC em humanos podem ser reproduzidos em camundongos por administração exógena de proteases, partículas, substâncias químicas e por exposição à fumaça de cigarro³⁸⁻⁴⁰. Entretanto, uma vez que o tabagismo é a

principal causa da DPOC, muitos autores têm direcionado suas investigações nas respostas celulares e moleculares desencadeadas pela fumaça de cigarro^{38-40,47,48}.

Este método ainda pode apresentar variações de acordo com o tipo de exposição (via nasal e de corpo inteiro), de cigarro (de referência ou comercial), dosagem, câmara e protocolo de exposição, além das diferentes linhagens de camundongos utilizadas⁴⁹.

Independentemente da forma de exposição à fumaça de cigarro, muitos aspectos característicos da DPOC em humanos podem ser reproduzidos, como inflamação pulmonar crônica, função pulmonar prejudicada, enfisema, espessamento da parede de pequenas vias aéreas e remodelamento, remodelamento vascular, formação de agregados linfoides e hipertensão pulmonar^{49,50}.

1.5 Justificativa

A inflamação pulmonar crônica em resposta à inalação de gases nocivos como a fumaça de cigarro exerce um papel central na patogênese da DPOC^{18,20} e a natureza desta inflamação é bem definida nestes pacientes¹³. Um importante destaque tem se dado ao desequilíbrio entre respostas pró- e anti-inflamatória, mediado pelas células Th17 e Treg^{27,29,30}. No entanto, poucos estudos investigaram as consequências funcionais da alteração populacional destas células, bem como de sua relação com as lesões teciduais nos diferentes estágios da DPOC.

O modelo experimental de DPOC é fundamental para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na inflamação persistente nos diferentes estágios desta doença, o que nos permitirá o melhor entendimento da regulação das respostas imunológicas pró- e anti-inflamatórias no desenvolvimento e progressão da

DPOC, bem como poderá contribuir para futuras alternativas terapêuticas para estes pacientes.

1.6 Hipótese

Espera-se que a progressão da DPOC esteja associada à intensificação das respostas pró-inflamatórias em detrimento das respostas anti-inflamatórias, mediado pelo perfil Th17 e Treg e que a falha na regulação imunológica possa contribuir para a progressão das alterações estruturais e funcionais dos pulmões.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi realizar uma análise temporal do processo inflamatório crônico, mediado pelas células Th17 e Treg bem como por suas citocinas relacionadas, na progressão da DPOC em modelo induzido por exposição à fumaça de cigarro.

2.2 Objetivos secundários

Avaliar as alterações funcionais e morfológicas nos pulmões e a expressão gênica dos mediadores inflamatórios nas células epiteliais brônquicas neste modelo experimental de DPOC.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Estudo experimental, no qual foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade de 6-8 semanas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo 076/2014) e todos os animais receberam os cuidados necessários de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” (NIH publication 85-23, revisado em 1996) e com a Lei Arouca (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008).

Os animais foram mantidos em gaiolas específicas para camundongos no biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20) da FMUSP, em condições controladas de temperatura (20 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 horas) e alimentados com ração (Purina, Labina®, Brasil, 2,99 kcal/g) e água filtrada à vontade, sendo cuidados por profissional treinado e capacitado durante todo o período do estudo.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais:

Grupo Fumo 1º mês: Animais expostos à fumaça de cigarro por 1 mês.

Grupo Controle 1º mês: Animais mantidos no biotério recebendo ar filtrado por 1 mês.

Grupo Fumo 3º mês: Animais expostos à fumaça de cigarro por 3 meses.

Grupo Controle 3º mês: Animais mantidos no biotério recebendo ar filtrado por 3 meses.

Grupo Fumo 6º mês: Animais expostos à fumaça de cigarro por 6 meses.

Grupo Controle 6º mês: Animais mantidos no biotério recebendo ar filtrado por 6 meses

(Figura 4).

Figura 4. Linha temporal do protocolo experimental.

3.3 Indução da DPOC por exposição à fumaça de cigarro

Para indução da DPOC, realizamos o protocolo estabelecido por estudos prévios realizados por nosso grupo^{51,52}. Os animais foram expostos de corpo inteiro à fumaça de cigarro por 30 minutos (12 ± 1 cigarros comercialmente filtrados constituintes de 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono por cigarro), duas vezes por dia, cinco dias na semana, durante 1, 3 ou 6 meses. As exposições foram realizadas em uma câmara de inalação com volume de aproximadamente 28 L contendo duas entradas de ar: uma para ar sintético e outra para fumaça de cigarro, e na parte superior desta câmara uma saída ventilatória para homogeneização do ar⁵³.

O fluxo de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado a um torpedo de ar comprimido e mantido em 2 L/min. A outra entrada de ar recebeu uma mistura de ar sintético e fumaça de cigarro, que foi aspirada por um sistema Venturi conectado ao cigarro aceso. O fluxo laminar de ar sintético ao passar por uma região de menor diâmetro sofreu uma aceleração e consequente redução da pressão neste ponto

(efeito Venturi), o que permitiu a aspiração da fumaça do cigarro⁵³ (Figura 5). A redução na pressão que ocorreu no ponto de redução do diâmetro do tubo foi dependente do fluxo de ar mantido constante em 1,5 L/min, o que produziu níveis de monóxido de carbono (CO) dentro da câmara de 250 a 350 partes por milhão (ppm) (ToxiPro, biosystems, EUA), 10% ($\pm 1,6\%$) de concentração de carboxihemoglobina nos camundongos expostos e concentração de material particulado total de $354,8 \pm 50,3 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{dia}^{-154}$.

Figura 5. Foto ilustrativa da exposição à fumaça de cigarro.

3.4 Avaliação da mecânica do sistema respiratório

Para avaliação da função pulmonar, os animais foram anestesiados com Thiopental (50 mg/kg, por via intraperitoneal) e traqueostomizados para instalação de um cateter intravascular 20 G, sendo este fixado à traqueia por meio de fios de algodão e conectados a um respirador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, CAN).

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto e receberam injeção de *pancuronium* (0.2

mg/kg) a fim de evitar esforço respiratório. Para calcular a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações, e após isso os dados foram coletados.

Para análise das impedâncias obtidas, utilizamos o modelo de fase constante, descrito por Hantos et al.⁵⁵.

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

O R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância das vias aéreas, G_{tis} caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H_{tis} caracteriza a energia acumulada nos tecidos do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e $\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$.

O parâmetro R_{aw} nos permite analisar isoladamente as vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro G_{tis} avalia a resistência tecidual e H_{tis} a elastância do tecido pulmonar.

3.5 Remoção e fixação dos pulmões para análise histológica

Após avaliação da mecânica ventilatória, os animais foram eutanasiados por meio de exsanguinação da veia cava inferior para retirada dos pulmões, os quais foram fixados em formaldeído (10 %) infundidos através da traqueia sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas⁵⁶. Esse material foi incluído em parafina para o preparo de cortes histológicos de 5 µm de espessura, que foram posteriormente utilizadas para marcações específicas pela técnica de imuno-histoquímica e coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do intercepto linear médio (Lm).

3.5.1 Imuno-histoquímica

Para avaliar a presença de citocinas e tipos celulares da imunidade inata e adaptativa no tecido pulmonar realizamos marcações específicas pela técnica de imuno-histoquímica. Para tanto, as lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xilol quente a 60-65 °C e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol, água corrente e água destilada. Os epítomos antigênicos foram recuperados por alta temperatura em solução de citrato 10 mM (pH = 6,0) e os sítios inespecíficos reativos à oxidação foram bloqueados com peroxidase endógena em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário e após este período, os cortes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS - pH = 7,5) e incubados com anticorpo secundário de acordo com a origem do anticorpo primário a 37 °C. Finalmente, para a revelação foi utilizada solução de cromógeno diaminobenzidina (DAB, Sigma, USA) e hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Darmstadt, GER) para contra corar.

Para cada marcador específico foram utilizados um anticorpo primário com seu respectivo anticorpo secundário, das marcas Vector ABC Kit (Vector Laboratories, CA, USA) ou Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences, Tokyo, JPN). Na Tabela 1, encontram-se descritas as diluições determinadas nos testes de padronização:

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados.

MARCADOR	ANTICORPO PRIMÁRIO	ANTICORPO SECUNDÁRIO	DILUIÇÃO	ESPECIFICAÇÃO
NF-κB	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit (Histofine)	1:100	sc 109, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
TNF-α	Produzido em camundongo	Anti-mouse (Vector)	1:5000	sc 52746, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
T - CD4	Monoclonal produzido em rato	Anti-rat (Vector)	1:10	sc 13573, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
T - CD8	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit (Histofine)	1:200	ab4055, abcam, Cambridge, UK
B - CD20	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit (Histofine)	1:200	orb 10307, Biorbyt LLC, CA, USA
granzima-B	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit (Histofine)	1:400	ab4059, abcam, Cambridge, UK
IL-17	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit (Histofine)	1:200	ab79056, abcam, Cambridge, UK
Treg - FOXP3	Policlonal produzido em coelho	Anti-rabbit (Histofine)	1:700	ab54501, abcam, Cambridge, UK
IL-10	Monoclonal produzida em rato	Anti-rat (Vector)	1:100	sc 73309, Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA

3.5.2 Dupla marcação por imunofluorescência

Para ilustrar a deficiência das células Treg em expressar IL-10, foi realizada a dupla marcação por imunofluorescência. As lâminas histológicas foram incubadas simultaneamente com anti-FOXP3 (sc-28705, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-IL-10 (sc-1783, 1:1200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e em seguida, com Alexa 488-conjugado (anti-rabbit, 1:150, Invitrogen, Eugene, OR, USA) e Alexa 546-conjugado (anti-goat, 1:150, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Os núcleos foram contra corados com DAPI (Molecular Probes TM, Invitrogen, Eugene, OR, USA) e as imagens foram capturadas no microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX51) no aumento de 400 $\times$ e as fotos de cada marcador foram sobrepostas utilizando o programa ImageJ (US National Institutes of Health).

3.5.3 Avaliação morfométrica

3.5.3.1 *Avaliação do intercepto linear médio (Lm)*

A quantificação do enfisema pulmonar foi realizada por meio da medida do Lm, que consiste num índice do diâmetro médio dos espaços aéreos e representa um marcador de distensão alveolar⁵⁷. Para a análise morfométrica convencional foi utilizado o retículo de Weibel⁵⁸ de 100 pontos e 50 retas (Figura 6), com área conhecida ($62.500 \mu\text{m}^2$, em aumento de 400 $\times$), acoplado à ocular de um microscópio óptico comum, com o qual foram realizadas as medidas de Lm de todos os grupos experimentais.

A quantificação do Lm foi obtida pela contagem do número de vezes que as retas do retículo interceptaram as paredes alveolares, em aumento de 400 $\times$. Foram analisados 15 campos aleatórios e não coincidentes no parênquima pulmonar distal e ao redor de vias aéreas, em cada lâmina estudada. Após obtidos os valores das médias dos campos para cada lâmina, o Lm foi calculado pela seguinte equação:

$$\mathbf{Lm = Ltotal/MI}$$

Onde Ltotal é a somatória de todos os segmentos do retículo, obtida pela medida de cada segmento com uma régua do fabricante Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) em um microscópio com o retículo. E MI é a média do número de vezes que as retas interceptam as paredes dos alvéolos. Os valores de Lm são expressos em micrômetros (μm).

Figura 6. Retículo de Weibel utilizado para quantificação do Lm.

3.5.3.2 *Análise dos mediadores inflamatórios*

Os cortes de tecido pulmonar especificamente marcados por imuno-histoquímica foram digitalizados em aumento de 400× utilizando um escâner digital de alta-resolução (Pannoramic Scan, 3DHISTECH Ltd., Budapeste, HUN), e as imagens foram analisadas por meio do *software* Pannoramic Viewer 1.15.4 (3DHISTECH Ltd., Budapeste, HUN).

Para cada caso foram delimitadas manualmente 5-10 espaços peribroncovasculares aleatórios, que compreende a adventícia entre uma via aérea e seu vaso sanguíneo adjacente⁵⁹ (Figura 7). Todos os mediadores inflamatórios avaliados foram quantificados pelo cálculo: número de células positivas dividido pela área total do seu respectivo espaço peribroncovascular calculado pelo *software*, expresso em células/ μm^2 .

Figura 7. Fotomicrografia ilustrativa da delimitação do espaço peribroncovascular.

3.6 Expressão gênica

3.6.1 Preparo do tecido e isolamento de células epiteliais por microdissecção à laser

Após eutanásia dos animais, os pulmões foram removidos em bloco, insuflados com “Tissue-Tek OCT” (Sakura Finetek USA., Torrance, CA) (50% vol/vol) diluído em PBS livre de RNase contendo 10 % de sacarose, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C^{60} . Posteriormente, as peças congeladas foram seccionadas a 12 μm de espessura, colocadas em lâminas de vidro e mantidas desidratadas. Em seguida, foram coradas com Cresil Violeta, para a marcação nuclear das células epiteliais brônquicas, as quais foram isoladas por microdissecção à laser utilizando o sistema PALM Micro Beam da Zeiss (PALM Microlaser Technologies, Bernried, Germany) (Figura 8).

Figura 8. Esquema ilustrativo do isolamento de células por microdissecção à laser.

3.6.2 Extração de RNA e transcrição reversa

O RNA total foi extraído das células epiteliais brônquicas utilizando o RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion®, Applied Biosystems, Foster City, CA). A medida de quantidade foi realizada pela espectrometria com o uso do espectrômetro NanoDrop®, e a de qualidade pela eletroforese microcapilar utilizando o Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Santa Clara, CA) no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O RNA total foi submetido à transcrição reversa e pré-amplificação para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.6.3 RT-PCR em tempo real

A expressão dos marcadores de respostas imunológicas nas células epiteliais brônquicas foi avaliada pelo método de RT-PCR em tempo real. Para isso foi utilizado o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que já possui ensaios padronizados para o estudo da expressão de NF-κB (Mm00476361_m1) e TNF (Mm00443258_m1).

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços contendo 2 µL de cDNA da amostra, 10 µL de TaqMan® Universal Master Mix II (2×), 1 µL do ensaio TaqMan® Gene Expression (20×) e 7 µL de água tratada com DEPC (Ambion®, Applied Biosystems, Foster City, CA) totalizando volume final de 20 µL.

O perfil térmico das reações consistiu em 10 min a 95 °C (ativação da polimerase), 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturação) e de 1 min a 60 °C (anelamento/amplificação). As amplificações foram realizadas no termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) e a

expressão gênica foi normalizada para o gene constitutivo β -actina (Mm01205647_g1).

A expressão dos genes de interesse foi calculada utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.7 Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism®. A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, e os dados foram descritos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para a comparação entre os grupos Controle e Fumo foi utilizado o teste t não pareado ou teste de Mann-Whitney, dependendo da normalidade dos dados. Para a comparação entre os grupos Fumo nos diferentes tempos de exposição à fumaça de cigarro utilizamos a análise de variância para um fator (*One-Way ANOVA*) seguido do pós-teste de Tukey's ou o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, dependendo da normalidade dos dados. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação entre os grupos Fumo e os respectivos grupos Controle

4.1.1 Mecânica do sistema respiratório

Os parâmetros da mecânica do sistema respiratório, Raw, Htis e Gtis dos grupos Controle e Fumo no primeiro, terceiro e sexto mês estão representados na Figura 9. Estes valores foram normalizados de acordo com o peso corporal de cada animal⁶¹, devido ao menor valor desta variável apresentada pelos grupos Fumo no final dos protocolos experimentais ($P < 0,001$). Não houve alteração de Raw nos momentos avaliados. Um mês de exposição à fumaça de cigarro resultou em aumento de Htis, que diminuiu no terceiro mês acompanhado da redução de Gtis. Ambos os parâmetros se mantiveram reduzidos até o sexto mês de exposição comparado aos respectivos grupos Controle.

Figura 9. Parâmetros da mecânica do sistema respiratório.

Valores de Raw (A), Htis (B) e Gtis (C) dos grupos Controle 1º mês (n = 10, n = 10, n = 10, respectivamente), 3º mês (n = 4, n = 5, n = 4, respectivamente) e 6º mês (n = 4, n = 6, n = 6, respectivamente), e dos grupos Fumo 1º mês (n = 11, n = 11, n = 11, respectivamente), 3º mês (n = 7, n = 5, n = 7, respectivamente) e 6º mês (n = 7, n = 10, n = 10, respectivamente) expressos como média $\pm$ DP. (B) Diferença significativa de Htis entre os grupos Controle e Fumo no 1º mês (*P = 0,0265, teste de Mann-Whitney), 3º mês (*P = 0,0317, teste de Mann-Whitney) e 6º mês (*P = 0,0339, teste-T). (C) Diferença significativa de Gtis entre os grupos Controle e Fumo no 3º mês (*P = 0,0242, teste de Mann-Whitney) e 6º mês (*P=0,0173, teste de Mann-Whitney).

4.1.2 Alargamento dos espaços aéreos: peribrônquico e distal

Foram quantificados valores de Lm no parênquima peribrônquico (Figura 10A) e no parênquima distal (Figura 10B) dos grupos Controle e Fumo no primeiro, terceiro e sexto mês. Houve aumento deste índice, no parênquima pulmonar peribrônquico e no parênquima pulmonar distal, desde o primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro comparado aos respectivos grupos Controle, mantendo-se elevado até o sexto mês de exposição.

Figura 10. Alargamento dos espaços aéreos peribrônquicos e distais.

Valores de Lm no parênquima peribrônquico (A) e no parênquima distal (B) dos grupos Controle 1º mês (n = 7, n = 9, respectivamente), 3º mês (n = 6, n = 5, respectivamente) e 6º mês (n = 6, n = 7, respectivamente), e dos grupos Fumo 1º mês (n = 10, n = 11, respectivamente), 3º mês (n = 6, n = 6, respectivamente) e 6º mês (n = 11, n = 11, respectivamente) expressos como média $\pm$ DP. Comparado aos respectivos grupos Controle, houve aumento significativo de Lm no parênquima peribrônquico e no parênquima distal dos grupos Fumo 1º mês (*P = 0,0002, teste de Mann-Whitney) (*P = 0,0002, teste de Mann-Whitney), 3º mês (*P = 0,0002, teste-T) (*P = 0,0008, teste-T), e 6º mês (*P = 0,0001, teste-T) (*P = 0,0004, teste-T), respectivamente.

Figura 11. Fotomicrografia do parênquima pulmonar.

Fotomicrografia representativa do parênquima peribrônquico e do parênquima distal corado em H&E dos grupos Controle 1º mês (A e G, respectivamente), 3º mês (B e H, respectivamente) e 6º mês (C e I, respectivamente) e Fumo 1º mês (D e J, respectivamente), 3º mês (E e K, respectivamente) e 6º mês (F e L, respectivamente). Aumento de 200× e barra de escala de 100 µm.

4.1.3 Resposta inflamatória

Os mediadores inflamatórios NF-κB (Figura 12) e TNF-α (Figura 13) foram quantificados no espaço peribroncovascular e nas células epiteliais brônquicas dos grupos Controle e Fumo no primeiro, terceiro e sexto mês. Comparado aos respectivos

grupos Controle, houve aumento de células positivas para NF- κ B desde o primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro (Figura 12A), enquanto que a expressão gênica deste mediador aumentou a partir do terceiro mês (Figura 12B). O aumento de TNF- α nos grupos Fumo comparado aos respectivos grupos Controle foi observado a partir do terceiro mês, tanto no espaço peribroncovascular como nas células epiteliais brônquicas (Figura 13).

As células T CD4⁺ (Figura 14), T CD8⁺ (Figura 15), granzima-B⁺ (Figura 16), B CD20⁺ (Figura 17), os linfócitos IL-17⁺ (Figura 18), as células Treg (Figura 19) e os linfócitos IL-10⁺ (Figura 20) também foram analisadas no espaço peribroncovascular dos grupos Controle e Fumo no primeiro, terceiro e sexto mês. Comparado aos respectivos grupos Controle, as células T CD4⁺, T CD8⁺ e granzima-B⁺ aumentaram a partir do terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro, enquanto que o aumento das células B CD20⁺ foi observado somente após seis meses de exposição.

Comparado ao grupo Controle correspondente, os linfócitos IL-17⁺ foram aumentados após seis meses de exposição à fumaça de cigarro. Por outro lado, houve uma redução das células Treg e de linfócitos IL-10⁺ no terceiro mês e a partir do primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro, respectivamente.

Figura 12. NF-κB no espaço peribroncovascular e nas células epiteliais brônquicas.

Valores de NF-κB no espaço peribroncovascular (A) e nas células epiteliais brônquicas (B) dos grupos Controle 1º (n = 10 e 5, respectivamente), 3º (n = 6 e 5, respectivamente) e 6º (n = 7 e 4, respectivamente) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 8 e 5, respectivamente), 3º (n = 5 e 4, respectivamente) e 6º (n = 10 e 4, respectivamente) mês expressos como média ± DP. (A) Foram observadas diferenças significantes no 1º (*P = 0,0025, teste-T), 3º (*P = 0,0001, teste-T) e 6º (*P = 0,0025, teste-T) mês. (B) Foram observadas diferenças significantes no 3º (*P = 0,0001, teste de Mann-Whitney) e 6º (*P = 0,0357, teste de Mann-Whitney) mês. (C) Fotomicrografia representativa das células NF-κB⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200× e cada inserto no aumento de 1000×.

Figura 13. TNF- α no espaço peribroncovascular e nas células epiteliais brônquicas.

Valores de TNF- α no espaço peribroncovascular (A) e nas células epiteliais brônquicas (B) dos grupos Controle 1º (n = 10 e 5, respectivamente), 3º (n = 6 e 5, respectivamente) e 6º (n = 7 e 4, respectivamente) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 10 e 5, respectivamente), 3º (n = 6 e 4, respectivamente) e 6º (n = 11 e 4, respectivamente) mês expressos como média $\pm$ DP. (A) Foram observadas diferenças significantes no 3º (*P = 0,0486, Teste-T) e 6º (*P = 0,0066, teste de Mann-Whitney) mês. (B) Foram observadas diferenças significantes no 3º (*P = 0,0004, Teste-T) e 6º (*P = 0,0286, teste de Mann-Whitney) mês. (C) Fotomicrografia representativa das células TNF- α ⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200 $\times$ e cada inserto no aumento de 1000 $\times$.

Figura 14. Células T CD4⁺ no espaço peribroncovascular.

Número de células T CD4⁺ (A) no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 10), 3º (n = 6) e 6º (n = 7) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 9), 3º (n = 5) e 6º (n = 7) mês expressos como média ± DP. (A) Foram observadas diferenças significantes no 3º (*P = 0,0190, teste de Mann-Whitney test) e 6º (*P = 0,0023, teste de Mann-Whitney) mês. (B) Fotomicrografia representativa das células T CD4⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200× e cada inserto no aumento de 1000×.

Figura 15. Células T CD8⁺ no espaço peribroncovascular.

Número de células T CD8⁺ no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 10), 3º (n = 5) e 6º (n = 7) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 10), 3º (n = 7) e 6º (n = 9) mês expressos como média $\pm$ DP. (A) Foram observadas diferenças significantes no 3º (*P = 0,0002, teste-T) e 6º (*P = 0,0014, teste-T) mês. (B) Fotomicrografia representativa das células T CD8⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200 $\times$ e cada inserto no aumento de 1000 $\times$.

Figura 16. Linfócitos granzima-B⁺ no espaço peribroncovascular.

Número de linfócitos granzima-B⁺ no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 9), 3º (n = 5) e 6º (n = 5) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 9), 3º (n = 6) e 6º (n = 9) mês expressos como média $\pm$ DP. (A) Foram observadas diferenças significantes no 3º (*P = 0,0198, teste-T) e 6º (*P = 0,0030, teste-T) mês. (B) Fotomicrografia representativa dos linfócitos granzima-B⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200 $\times$ e cada inserto no aumento de 1000 $\times$.

Figura 17. Células B CD20⁺ no espaço peribroncovascular.

Número de células B CD20⁺ no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 9), 3º (n = 6) e 6º (n = 6) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 9), 3º (n = 7) e 6º (n = 8) mês expressos como média ± DP. (A) Foi observada diferença significativa no 6º (*P = 0,0007, teste de Mann-Whitney) mês. (B) Fotomicrografia representativa das células B CD20⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200× e cada inserto no aumento de 1000×.

Figura 18. Linfócitos IL-17⁺ no espaço peribroncovascular.

Número de linfócitos IL-17⁺ no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 10), 3º (n = 6) e 6º (n = 7) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 9), 3º (n = 5) e 6º (n = 7) mês expressos como média $\pm$ DP. (A) Foi observada diferença significativa no 6º (*P = 0,0048, teste-T) mês. (B) Fotomicrografia representativa dos linfócitos IL-17⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200 $\times$ e cada inserto no aumento de 1000 $\times$.

Figura 19. Células Treg no espaço peribroncovascular.

Número de células Treg no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 8), 3º (n = 6) e 6º (n = 5) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 7), 3º (n = 6) e 6º (n = 10) mês expressos como média $\pm$ DP. (A) Foi observada diferença significativa no 3º (*P = 0,0024, teste-T) mês. (B) Fotomicrografia representativa das células Treg no espaço peribroncovascular no aumento de 200 $\times$ e cada inserto no aumento de 1000 $\times$.

Figura 20. Linfócitos IL-10⁺ no espaço peribroncovascular.

Número de linfócitos IL-10⁺ no espaço peribroncovascular dos grupos Controle 1º (n = 9), 3º (n = 7) e 6º (n = 5) mês, e dos grupos Fumo 1º (n = 10), 3º (n = 6) e 6º (n = 9) mês expressos como média ± DP. (A) Foi observada diferença significativa no 1º (*P = 0,0001, teste de Mann-Whitney), 3º (*P = 0,0029, teste-T), 6º (*P = 0,0001, teste-T) mês. (B) Fotomicrografia representativa dos linfócitos IL-10⁺ no espaço peribroncovascular no aumento de 200× e cada inserto no aumento de 1000×.

4.2 Comparação entre os grupos Fumo nos diferentes tempos de exposição

Uma vez que não houve diferença estatística das variáveis analisadas entre os grupos Controle nos diferentes tempos, prosseguimos com a análise temporal entre os grupos Fumo no primeiro, terceiro e sexto mês.

4.2.1 Alterações funcionais e estruturais

Os parâmetros Htis e Gtis diminuíram desde o terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro comparado ao primeiro mês (Figura 21A). O Lm no parênquima pulmonar peribrônquico e distal aumentou no sexto mês, comparado ao primeiro mês de exposição (Figura 21B).

Figura 21. Análise temporal da função e estrutura pulmonar.

Valores dos parâmetros da mecânica respiratória (A) e de Lm (B) dos grupos Fumo 1º, 3º e 6º mês expressos como média ± DP. (A) Redução significativa de Htis (*P = 0,0004, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey) e de Gtis (*P = 0,0014, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey) no 3º e 6º mês comparado ao 1º mês. (B) Aumento de Lm no parênquima peribrônquico (*P = 0,0019, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) e no parênquima distal (*P = 0,0202, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) no 6º mês de exposição comparado ao 1º mês.

4.2.2 Inflamação pulmonar

Houve aumento das células T CD4⁺, TCD8⁺ e granzima-B⁺ a partir do terceiro mês de exposição comparado ao primeiro mês, mantendo-se elevadas até o sexto mês. E as células B CD20⁺ foram aumentadas no sexto mês comparado ao primeiro e ao terceiro mês de exposição (Figura 22A). No sexto mês, um desequilíbrio Th17/Treg foi observado, refletido pelo aumento de linfócitos IL-17⁺ e redução de células Treg,

comparado ao primeiro mês de exposição. Não houve diferença de linfócitos IL-10⁺ ao comparar os três tempos de exposição à fumaça de cigarro (Figura 22B).

Figura 22. Análise temporal da inflamação pulmonar.

Número de células T, B e granzima-B⁺ (A), e células Treg, linfócitos IL-17⁺ e IL-10⁺ (B) no espaço peribroncovascular dos grupos Fumo 1º, 3º e 6º mês expressos como média $\pm$ DP. (A) Comparado ao 1º mês, houve aumento de células T CD4⁺ (*P = 0,0003, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey), T CD8⁺ (*P < 0,0001, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) e granzima-B⁺ (*P = 0,0018, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey) desde o 3º mês de exposição. As células B CD20⁺ foram elevadas no 6º mês comparado ao 1º e 3º mês (#P < 0,0001, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey). (B) Aumento de linfócitos IL-17⁺ (*P = 0,0004, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey) e diminuição de células Treg (*P = 0,0004, teste de ANOVA e pós-teste de Tukey) no 6º mês comparado ao 1º mês. Não houve alteração de linfócitos IL-10⁺ nos diferentes tempos avaliados (P = 0,2069, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

4.3 Células Treg expressando IL-10

As análises de dupla-marcação por imunofluorescência confirmam os resultados obtidos pela técnica de imuno-histoquímica. A sobreposição das imagens revela a co-localização de Treg/IL-10 para todos os grupos Controle. Nos grupos expostos à fumaça de cigarro, apenas os linfócitos IL-10⁺ diminuíram no primeiro mês, enquanto que no terceiro e no sexto mês, houve redução tanto de células Treg como de linfócitos IL-10⁺ (Figura 23).

Figura 23. Imagens de imunofluorescência das células Treg expressando IL-10.

Expressão de células Treg (verde) e IL-10⁺ (vermelho) em linfócitos infiltrados no espaço peribroncovascular pela técnica de imunofluorescência dos grupos Controle e Fumo no 1º, 3º e 6º mês. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). As setas indicam células positivas no aumento de 400x.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram um desequilíbrio Th17/Treg na progressão da DPOC em modelo animal induzido por exposição à fumaça de cigarro. Adicionalmente, a redução de IL-10 esteve presente nos estágios iniciais desta doença, desde o primeiro mês de exposição, sugerindo que uma falha no controle do processo inflamatório desempenhe papel fundamental na progressão desta doença.

No primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro também foi observado um aumento transitório da elastância pulmonar (Htis), provavelmente devido à presença de edema tecidual e infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar⁶². Entretanto, a partir do terceiro mês até o final do protocolo experimental, houve uma piora da função pulmonar, refletido pela redução da elastância e resistência tecidual (Gtis).

O alargamento dos espaços aéreos peribrônquicos e distais foi observado desde o primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro bem como demonstrado na função pulmonar, o qual também foi progressivo ao longo do tempo.

Nosso modelo experimental demonstrou a presença do enfisema previamente às alterações funcionais. Estudos experimentais prévios descrevem que a avaliação morfológica do tecido seja mais sensível do que as análises funcionais, devido às dificuldades técnicas para avaliar a mecânica respiratória em pequenos roedores⁶³, à interferência do processo de remodelamento sobre a função pulmonar⁵⁶ e à necessidade de lesões teciduais mais avançadas para promover alterações funcionais⁶⁴.

Toledo et al.⁵⁴ observaram aumento de Lm e redução de Gtis e Htis somente após 6 meses de exposição à fumaça de cigarro. No entanto, nesse trabalho os animais foram expostos somente uma vez ao dia, diferentemente das duas exposições ao dia

realizadas em nosso estudo, indicando que a carga tabágica desempenhe um papel importante na antecipação das modificações histológicas e funcionais nos pulmões.

O aumento das células T CD8⁺ e T CD4⁺ descrito em pacientes^{35,37,65,66} e em modelo experimental de DPOC⁶⁷ também foi demonstrado em nosso estudo, a partir do terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro.

As células T CD8⁺ desempenham papel importante na patogênese desta doença, ao promover a liberação de interferon-*gamma* (INF- γ) e TNF- α , os quais estão envolvidos na manutenção do recrutamento de células inflamatórias para o tecido pulmonar perpetuando a destruição das paredes alveolares^{68,69}. Além disso, essas células podem causar a lesão tecidual diretamente por apoptose, devido à liberação de seus grânulos citotóxicos, perforina e granzima-B⁷⁰. Esta última esteve igualmente aumentada desde o terceiro mês de exposição à fumaça de cigarro, sugerindo que a liberação da granzima-B pelas células T CD8⁺ potencializaram o processo de lesão tecidual a partir deste período.

As células T CD4⁺ contribuem substancialmente para o desenvolvimento e progressão da DPOC. Estas células administram as respostas imunes pela liberação de citocinas e ativação da diferenciação de outras células imunes efectoras, como as células B, induzindo-as a produzirem anticorpos IgG, que são mais potentes contra antígenos proteicos⁶⁸.

Em nosso estudo, o aumento das células B CD20⁺ foi observado apenas no sexto mês de exposição à fumaça de cigarro. Outros trabalhos também demonstraram um aumento na densidade destas células em vias aéreas pequenas³⁷ e grandes⁷¹ de pacientes com DPOC em estágios mais avançados da doença. A associação do número de células B com a gravidade da DPOC sugere um papel significativo desta célula na progressão desta doença⁷¹. Além do seu envolvimento na neogênese linfóide e na

produção de anticorpos, as células B atuam como células apresentadoras de antígeno e fornecem sinais co-estimulatórios para as células T⁷².

Em consonância com a progressão das modificações funcionais e estruturais do pulmão, também foi observado um processo inflamatório crônico e progressivo, representado pelo aumento de células T CD4⁺, T CD8⁺ e Granzima-B no terceiro mês comparado com o primeiro mês. No sexto mês, houve um aumento de células B CD20⁺ e linfócitos IL-17⁺ com concomitante redução de células Treg, corroborando com estudos prévios que relataram o envolvimento do desequilíbrio Th17/Treg na progressão da DPOC^{24,27,30,36}.

Wang et al.²⁷ demonstraram uma correlação negativa entre o balanço Th17/Treg mensurado no sangue periférico de pacientes com DPOC e o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) % predito, capacidade vital forçada (CVF) % predito e a relação VEF₁/CVF. Adicionalmente, a densidade de células Th17 e Treg foram associadas ao alargamento dos espaços aéreos em modelo de DPOC, no qual o aumento desta medida foi relacionado a maiores valores de células Th17 e menores de células Treg no tecido pulmonar²⁴.

Diversos estudos relatam que a exposição crônica à fumaça de cigarro promove o aumento da citocina IL-17^{24,30,73}. Apesar desta citocina regular parcialmente a expressão de importantes mediadores inflamatórios e proteases, como IL-1 β e MMP-12, ela não é considerada um mediador central para promover o desenvolvimento do enfisema induzido pela exposição à fumaça de cigarro, visto que camundongos IL-17^{-/-} apresentaram danos na estrutura alveolar e redução da elastância do sistema respiratório⁷⁴.

Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores que destacam o importante papel das células Treg, bem como a produção de IL-10 na progressão da obstrução em fumantes^{27,29,30,35}.

Sales et al.³⁵ demonstraram que embora o aumento de IL-17 estivesse presente em vias aéreas de fumantes obstruídos e não obstruídos, somente os pacientes com DPOC apresentaram redução de células Treg e IL-10⁺. A redução de Treg e de IL-10 também foi observada no sangue periférico de pacientes com DPOC moderado e grave, avaliados pela citometria de fluxo e pelo método de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática)²⁷.

Em modelo experimental, camundongos expostos à fumaça de cigarro por três meses demonstraram menores expressões de Treg e de IL-10 nos pulmões, com concomitante aumento na expressão de IL-17, que se intensificaram no sexto mês⁷⁵. Wang et al.⁷³, por sua vez, encontraram um aumento da expressão de células Treg nos pulmões e maiores níveis de IL-10 no lavado bronco-alveolar de camundongos expostos à fumaça de cigarro no primeiro mês, seguido de redução destes marcadores no sexto mês. Os autores sugerem que este aumento inicial seja uma resposta protetora do organismo na tentativa de controlar a resposta inflamatória. Porém, quando a exposição à fumaça do cigarro persiste, as células Treg e o IL-10 se tornam incapazes de sustentar este controle, conduzindo a uma resposta inflamatória amplificada⁷³.

Vale salientar, que em nosso estudo, apesar de observarmos redução de células Treg apenas no sexto mês de exposição à fumaça de cigarro, a queda de linfócitos IL-10⁺ foi detectada nos estágios iniciais, quando comparado aos grupos controle. Tais resultados reforçam as descobertas anteriores que descrevem a associação da atividade prejudicada de células Treg no controle da inflamação, mediado pela liberação de IL-10 com a progressão da DPOC^{66,76,77}.

A IL-10 atua sobre células apresentadoras de antígeno para impedir sua maturação e diminuir a expressão de moléculas coestimuladoras⁷⁸. Assim, a deficiência na produção desta citocina pode indiretamente promover maior proliferação e diferenciação de células T nos pulmões⁷⁹. Nossos resultados sustentam estes dados, revelando a supressão de IL-10 desde o primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro combinado ao aumento de células T a partir do terceiro mês.

Considerando a importância da resposta imune inata no desenvolvimento da DPOC e a participação do epitélio respiratório nesta resposta^{80,81}, quantificamos o NF- κ B e o TNF- α no espaço peribroncovascular e nas células epiteliais brônquicas dos camundongos. Ambos os compartimentos apresentaram resultados semelhantes, com aumento de células NF- κ B⁺ desde o primeiro mês de exposição à fumaça de cigarro e aumento de células TNF- α ⁺, bem como da expressão gênica de ambos os mediadores inflamatórios no terceiro mês, permanecendo-se elevados até o sexto mês.

O TNF- α atua na amplificação das respostas inflamatórias ao ativar a transcrição de genes inflamatórios em células epiteliais, neutrófilos e macrófagos, mediado pelo NF- κ B⁸². Em estudos experimentais, a ativação do NF- κ B induzido pelo tabagismo está associado à progressão da inflamação no parênquima pulmonar e nas vias aéreas^{83,84}. Outros autores ainda relatam que o aumento na produção de TNF- α , em conjunto com o recrutamento de neutrófilos para o pulmão, mediado pelo NF- κ B resultam em lesão pulmonar aguda e enfisema^{85,86}. Do mesmo modo, nós observamos aumento de ambos os mediadores inflamatórios acompanhado das alterações estruturais e inflamatórias no tecido pulmonar.

Ao compararmos nossos achados aos estudos prévios que avaliaram amostras de tecido humano³⁵⁻³⁷, a principal diferença encontrada foi o compartimento pulmonar no qual o sinal inflamatório predominou. Em pacientes com DPOC, o infiltrado

inflamatório foi mais evidente nas vias aéreas entre o epitélio respiratório e a adventícia^{35,37}, enquanto que neste modelo o infiltrado prevaleceu no espaço peribroncovascular, entre as vias aéreas e os vasos sanguíneos adjacentes. Supomos que isto se deva aos capilares especializados presentes nesta região em modelos murinos, que permitem uma rápida liberação de leucócitos, resultando em edema e infiltrado inflamatório predominantemente nesta região⁸⁷.

Embora existam diferenças quando comparamos as características fisiopatológicas da DPOC entre humanos e modelos animais, é importante considerar que ambos apresentam o mesmo perfil inflamatório, com aumento de células T e B e redução de células Treg e IL-10⁺.

6 CONCLUSÃO

Em vista do exposto, podemos concluir que o desequilíbrio Th17/Treg e a falha na regulação do processo inflamatório pulmonar, mediado pela deficiente liberação de IL-10 nos estágios iniciais da DPOC, contribuam para a progressão desta doença, bem como para a piora das alterações funcionais e estruturais pulmonares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2018 (GOLD 2018) - Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD 2018. [cited 2018 jun 16]. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.
2. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I, Global Health Epidemiology Reference G. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015;5:020415.
3. Menezes AM, Jardim JR, Perez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in Sao Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005;21:1565-73.
4. DALYs GBD, Collaborators H, Murray CJ, Barber RM, Foreman KJ, Abbasoglu Ozgoren A, Abd-Allah F, Abera SF, Aboyans V, Abraham JP, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NM, Achoki T, Ackerman IN, Ademi Z, Adou AK, Adsuar JC, Afshin A, Agardh EE, Alam SS, Alasfoor D, Albittar MI, Alegretti MA, Alemu ZA, Alfonso-Cristancho R, Alhabib S, Ali R, Alla F, Allebeck P, Almazroa MA, Alsharif U, Alvarez E, Alvis-Guzman N, Amare AT, Ameh EA, Amini H, Ammar W, Anderson HR, Anderson BO, Antonio CA, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet*. 2015;386:2145-91.
5. Ministério da Saúde do Brasil. Brasília. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>.
6. Pinto M, Bardach A, Palacios A, Biz AN, Alcaraz A, Rodríguez B, Augustovski F, Pichon-Riviere A. Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos. [cited 2017 may 18]. Available from: www.iecs.org.ar/tabaco.
7. Rabahi MF. Epidemiologia da DPOC: Enfrentando Desafios. *Pulmão RJ*. 2013;22:4-8.
8. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3:e442.
9. Brody H. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nature*. 2012;489:S1-S4.
10. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balme JR, Committee on Nonsmoking Copd E, Occupational Health A. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:693-718.
11. Stoller JK, Aboussouan LS. α 1-antitrypsin deficiency. *The Lancet*. 2005;365:2225-36.

12. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1419-24.
13. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:16-27.
14. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2014;35:71-86.
15. Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:1207-24.
16. Johnson SR. Untangling the protease web in COPD: metalloproteinases in the silent zone. *Thorax*. 2016;71:105-6.
17. Houghton AM. Endogenous modifiers of cigarette smoke exposure within the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9:66-8.
18. Eapen MS, Myers S, Walters EH, Sohal SS. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a true paradox. *Expert Rev Respir Med*. 2017;11:827-39.
19. Doss M, White MR, Tecle T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol*. 2010;87:79-92.
20. Cosio MG, Sietta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009;360:2445-54.
21. Freeman CM, Martinez FJ, Han MK, Ames TM, Chensue SW, Todt JC, Arenberg DA, Meldrum CA, Getty C, McCloskey L, Curtis JL. Lung dendritic cell expression of maturation molecules increases with worsening chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:1179-88.
22. King PT, Lim S, Pick A, Ngui J, Prodanovic Z, Downey W, Choong C, Kelman A, Baranyai E, Francis M, Moshinsky R, Bardin PG, Holmes PW, Holdsworth SR. Lung T-cell responses to nontypeable *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:1314-21 e14.
23. Sietta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:822-6.
24. Duan MC, Huang Y, Zhong XN, Tang HJ. Th17 cell enhances CD8 T-cell cytotoxicity via IL-21 production in emphysema mice. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:898053.
25. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res*. 2010;11:76.

26. Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA, Froelich CJ, Nice EC, Bird PI. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem*. 2005;280:23549-58.
27. Wang H, Ying H, Wang S, Gu X, Weng Y, Peng W, Xia D, Yu W. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J*. 2015;9:330-41.
28. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*. 2011;378:1015-26.
29. Jin Y, Wan Y, Chen G, Chen L, Zhang MQ, Deng L, Zhang JC, Xiong XZ, Xin JB. Treg/IL-17 ratio and Treg differentiation in patients with COPD. *PLoS One*. 2014;9:e111044.
30. Li H, Liu Q, Jiang Y, Zhang Y, Zhang Y, Xiao W. Disruption of th17/treg balance in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med Sci*. 2015;349:392-7.
31. Vargas-Rojas MI, Ramirez-Venegas A, Limon-Camacho L, Ochoa L, Hernandez-Zenteno R, Sansores RH. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2011;105:1648-54.
32. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KHG. TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to Bordetella pertussis: Role of IL-17-Producing T Cells. *The Journal of Immunology*. 2006;177:7980-89.
33. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*. 2007;8:369-77.
34. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Cure Murine Colitis: The Role of IL-10, TGF- β , and CTLA4. *The Journal of Immunology*. 2003;171:5012-17.
35. Sales DS, Ito JT, Zanchetta IA, Annoni R, Aun MV, Ferraz LFS, Cervilha DAB, Negri E, Mauad T, Martins MA, Lopes F. Regulatory T-Cell Distribution within Lung Compartments in COPD. *COPD*. 2017;14:533-42.
36. Chu S, Zhong X, Zhang J, Lao Q, He Z, Bai J. The expression of Foxp3 and ROR gamma t in lung tissues from normal smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:1780-8.
37. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2645-53.
38. Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:L612-31.

39. Wright JL, Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med*. 2010;4:723-34.
40. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:L1-15.
41. Vlahos R, Bozinovski S. Preclinical murine models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur J Pharmacol*. 2015;759:265-71.
42. Rennard SI. Cigarette smoke in research. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:479-80.
43. Wright JL, Churg A. Animal models of COPD: Barriers, successes, and challenges. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21:696-8.
44. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bengali ZH. The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:182-5.
45. Guerassimov A, Hoshino Y, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR, Cosio MG. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:974-80.
46. Martorana PA, Cavarra E, Lucattelli M, Lungarella G. Models for COPD involving cigarette smoke. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2006;3:225-30.
47. Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57:908-14.
48. Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and marlboro mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22:4-7.
49. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126:253-65.
50. Mercer PF, Abbott-Banner K, Adcock IM, Knowles RG. Translational models of lung disease. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:235-56.
51. Toledo-Arruda AC, Vieira RP, Guarnier FA, Suehiro CL, Caleman-Neto A, Olivo CR, Arantes PMM, Almeida FM, Lopes F, Ramos EMC, Cecchini R, Lin CJ, Martins MA. Time-course effects of aerobic physical training in the prevention of cigarette smoke-induced COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2017;123:674-83.
52. Lourenco JD, Ito JT, Cervilha DAB, Sales DS, Riani A, Suehiro CL, Genaro IS, Duran A, Puzer L, Martins MA, Sasaki SD, Lopes F. The tick-derived rBmTI-A protease inhibitor attenuates the histological and functional changes induced by cigarette smoke exposure. *Histol Histopathol*. 2018;33:289-98.
53. Biselli PJ, Lopes FD, Moriya HT, Rivero DH, Toledo AC, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44:460-8.

54. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, Mauad T, Lopes FD, Martins MA. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 2012;39:254-64.
55. Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1992;72:168-78.
56. Lopes FD, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, Santos AB, Garippo A, Martins MA, Mauad T. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol*. 2013;28:269-76.
57. Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JH, Hoidal JR, Cosio MG. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1596-603.
58. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131-55.
59. Hizume DC, Toledo AC, Moriya HT, Saraiva-Romanholo BM, Almeida FM, Arantes-Costa FM, Vieira RP, Dolhnikoff M, Kasahara DI, Martins MA. Cigarette smoke dissociates inflammation and lung remodeling in OVA-sensitized and challenged mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;181:167-76.
60. Betsuyaku T, Griffin GL, Watson MA, Senior RM. Laser capture microdissection and real-time reverse transcriptase/ polymerase chain reaction of bronchiolar epithelium after bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:278-84.
61. Gomes RF, Shen X, Ramchandani R, Tepper RS, Bates JH. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89:908-16.
62. Toumpanakis D, Kastis GA, Zacharatos P, Sigala I, Michailidou T, Kouvela M, Glynos C, Divangahi M, Roussos C, Theocharis SE, Vassilakopoulos T. Inspiratory resistive breathing induces acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1129-36.
63. Anciaes AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto Tda S, Moriya HT, Mauad T, Martins Mde A, Lopes FD. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66:1797-803.
64. Foronjy RF, Mercer BA, Maxfield MW, Powell CA, D'Armiento J, Okada Y. Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoking model. *Exp Lung Res*. 2005;31:547-62.
65. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest*. 2007;132:156-63.
66. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agusti AG. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J*. 2008;31:555-62.

67. Eppert BL, Wortham BW, Flury JL, Borchers MT. Functional characterization of T cell populations in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2013;190:1331-40.
68. Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3:531-41.
69. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T Cells Are Required for Inflammation and Destruction in Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *The Journal of Immunology*. 2007;178:8090-96.
70. Walter U, Santamaria P. CD8+ T cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:624-31.
71. Gosman MM, Willemse BW, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, Postma DS, Timens W, Kerstjens HA, Groningen, Leiden Universities Corticosteroids in Obstructive Lung Disease Study G. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J*. 2006;27:60-4.
72. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26:4410-7.
73. Wang H, Peng W, Weng Y, Ying H, Li H, Xia D, Yu W. Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure. *Int Immunopharmacol*. 2012;14:504-12.
74. Voss M, Wolf L, Kamyschnikow A, Wonnenberg B, Honecker A, Herr C, Lepper PM, Wegmann M, Menger MD, Bals R, Beisswenger C. Il-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309:L188-95.
75. Duan MC, Zhang JQ, Liang Y, Liu GN, Xiao J, Tang HJ, Liang Y. Infiltration of IL-17-Producing T Cells and Treg Cells in a Mouse Model of Smoke-Induced Emphysema. *Inflammation*. 2016;39:1334-44.
76. Lane N, Robins RA, Corne J, Fairclough L. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119:75-86.
77. Hou J, Sun Y, Hao Y, Zhuo J, Liu X, Bai P, Han J, Zheng X, Zeng H. Imbalance between subpopulations of regulatory T cells in COPD. *Thorax*. 2013;68:1131-9.
78. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
79. Freeman CM, McCubbrey AL, Crudgington S, Nelson J, Martinez FJ, Han MK, Washko GR, Jr., Chensue SW, Arenberg DA, Meldrum CA, McCloskey L, Curtis JL. Basal gene expression by lung CD4+ T cells in chronic obstructive pulmonary disease identifies independent molecular correlates of airflow obstruction and emphysema extent. *PLoS One*. 2014;9:e96421.

80. Hiemstra PS, McCray PB, Jr., Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*. 2015;45:1150-62.
81. Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Tzanakis N. Mechanisms of altered cell immunity and cytotoxicity in COPD. *Curr Drug Targets*. 2011;12:450-9.
82. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*. 2004;56:515-48.
83. Yoshida T, Mett I, Bhunia AK, Bowman J, Perez M, Zhang L, Gandjeva A, Zhen L, Chukwueke U, Mao T, Richter A, Brown E, Ashush H, Notkin N, Gelfand A, Thimmulappa RK, Rangasamy T, Sussan T, Cosgrove G, Mouded M, Shapiro SD, Petrache I, Biswal S, Feinstein E, Tudor RM. Rtp801, a suppressor of mTOR signaling, is an essential mediator of cigarette smoke-induced pulmonary injury and emphysema. *Nat Med*. 2010;16:767-73.
84. Schuliga M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules*. 2015;5:1266-83.
85. Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:368-74.
86. Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin SY, Hung MC. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*. 2002;2:323-34.
87. Pabst R, Tschernig T. Perivascular capillaries in the lung: An important but neglected vascular bed in immune reactions? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;110:209-14.

APÊNDICE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/06/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **076/14** intitulado: “Epitélio respiratório como regulador da resposta imune na patogênese da DPOC induzida por fumo”, que utilizará **48** animais da espécie **camundongo**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Fernanda Degobbi T.Q.S. Lopes

Pesquisador (a) Executante: Juliana Tiyaki Ito

CEUA-FMUSP, 26 de Junho de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais