

Júlia Benini Kohler

**O papel dos macrófagos M1 e M2 no enfisema pulmonar em
modelos experimentais de indução por instilação de elastase e
exposição à fumaça de cigarro**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

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

**São Paulo
2019**

Júlia Benini Kohler

**O papel dos macrófagos M1 e M2 no enfisema pulmonar em
modelos experimentais de indução por instilação de elastase e
exposição à fumaça de cigarro**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre 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
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kohler, Júlia Benini

O papel dos macrófagos M1 e M2 no enfisema pulmonar em modelos experimentais de indução por instilação de elastase e exposição à fumaça de cigarro / Júlia Benini Kohler. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Modelos animais 2.Enfisema pulmonar 3.Macrófagos 4.Camundongos 5.Inflamação 6.Sistema respiratório

USP/FM/DBD-390/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, pelo seu amor incondicional. Por me mostrar que entre tantos caminhos que podemos percorrer, o caminho do conhecimento e da educação são os que realmente valem a caminhada.

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta etapa se concretizasse.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a pessoa que tornou essa experiência realidade. Obrigada Profa. Dra. Fernanda DTQS Lopes por ter me dado esta oportunidade, por ter me acolhido e acreditado no meu potencial. Sou grata pois além de orientadora, foi professora, mãe e amiga ao mesmo tempo.

Agradeço, de igual forma, a minha família, mãe, irmã, pai e meus avós, que me acompanharam, ampararam e comemoraram em todos os momentos que vivi durante estes últimos anos. Agradeço por todo amor que transborda do coração de vocês.

Obrigada também as pessoas que compartilham seus conhecimentos e apoio em especial a equipe Team Fe Lopes, hoje mais do que amigas: Juliana Tiyaki Ito, Daniela Aparecida Brito, Juliana Lourenço e Larissa Emídio, obrigada meninas por sempre me ajudarem, sem essa equipe tudo teria sido mais difícil. E um agradecimento também pelas amigadas que fiz ao longo desses anos Isabella Santos de Genaro, Suellen Keroline, Jussara Jesus Simao, Maysa Mariana Cruz e apoio da Prof. Iolanda Tibério, Paula Fernandes, Prof. Beatriz Saraiva e Rosana Paz por todo suporte, carinho e amizade neste laboratório.

Agradeço imensamente a uma pessoa que tornou a minha experiência muito mais feliz e engraçada, Alyne Riane Moreira. Uma pessoa que chamo de “parceira” por dividir todos esses momentos e fases praticamente ao mesmo

tempo. Entramos juntas e finalizamos juntas também. Obrigada por toda paciência, sintonia, amor, compreensão, amizade. Sem você não teria sido a mesma coisa, pode apostar!!!

Agradeço também à pessoa incrível que me apoia e acompanha em todos os momentos, meu namorado Marcelo Silva. Obrigada por ser a minha base e suporte nos momentos bons e difíceis, por apoiar e incentivar sempre! A vida fica muito mais leve ao seu lado.

Agradeço também à CAPES pelo suporte financeiro.

À Deus, por possibilitar viver todas essas experiências, conhecer estas pessoas e permitir finalizar esta etapa melhor do que quando cheguei.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“A vida não é sobre metas, conquistas e linhas de chegada. É sobre quem você se torna durante a caminhada”

(Gisele Ferreira)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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 Aneliese 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

Lista de abreviaturas, símbolos, siglas e unidades

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Definição da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	18
1.2. Mecanismos envolvidos no desenvolvimento do enfisema pulmonar	19
1.2.1. Desequilíbrio Protease anti-protease.....	19
1.2.2. Estresse Oxidativo.....	21
1.2.3. Apoptose	21
1.1.1. Processo Inflamatório.....	22
1.3. Diferentes Fenótipos de macrófagos	24
1.3.1. Mediadores envolvidos na polarização dos macrófagos	25
1.4. Modelos Experimentais para o estudo da fisiopatologia do enfisema pulmonar	29
1.4.1. Modelo de Enfisema induzido por Exposição à Fumaça de Cigarro	30
1.4.2. Modelo de Enfisema induzido por Instilação de Elastase	31
1.5. Justificativa	31
2. OBJETIVO	33
3. MÉTODOS	34
3.1. Animais	34
3.2. Indução do enfisema pulmonar por Instilação intranasal de elastase pancreática de porco	35
3.3. Indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro	35
3.4. Grupos experimentais	36

3.5. Remoção dos pulmões e análise histológica	37
3.6. Avaliação do intercepto inear médio	37
3.7. Técnica de imunohistoquímica para marcação específica das citocinas e metaloproteases.....	38
3.7.1. Contagem de células positivas por área de parênquima.....	40
3.8. Avaliação por ELISA das citocinas no lavado broncoalveolar	41
3.9. Avaliação da expressão dos fenótipos M1 e M2 por PCR em Tempo Real	42
3.9.1. Criopreservação de tecidos e Extração de RNA	42
3.9.2. Transcrição reversa	42
3.9.3. PCR em Tempo Real.....	42
3.10. Análise Estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Intercepto Linear Médio.....	45
4.2. Macrófagos totais	46
4.3. Expressão gênica dos macrófagos totais CD68	46
4.4. Marcadores fenótipos M1 no parênquima pulmonar.....	47
4.5. Marcadores fenótipos M2 no parênquima pulmonar.....	48
4.6. Metaloproteases- 9 e -12 no parênquima pulmonar	50
4.7. Marcadores de fenótipo M2 no lavado broncoalveolar	51
4.8. Avaliação da expressão gênica PCR em Tempo Real	53
4.8.1. Expressão gênica: fenótipos M1	53
4.8.2. Expressão gênica: fenótipos M2	55
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	

Lista de Abreviaturas, Símbolos, Siglas e Unidades

α 1-AT	Alpha-1 antitripsina
cmH ₂ O	Centímetros de água
CO	Monóxido de carbono
CXCL9	Quimiocina da família CXC ligante 9
CXCL10	Quimiocina da família CXC ligante 10
C57BL/6	Linhagem camundongos
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)
EP	Erro padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
e col.	E colaboradores
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IRF-	Fator de regulação de interferon
iNOS	Oxido nítrico sintase
i.p.	Intraperitoneal
L	Litro
LBA	Lavado brônquio alveolar
LIM-20	Laboratório de terapeutica experimental I
Lm	Intercepto linear médio
kg	Quilograma
MA	Macrofagos alveolares
mg	Miligramas

min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteases de matriz
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PPE	Elastase Pancreática de Porco (Porcine pancreatic elastase)
ppm	Partículas por milhão
rpm	Rotações por minuto
SF	Soro Fisiológico 0,9% estéril
Th	T helper- T auxiliares
TIMP	Inibidor de metaloproteases de matriz (Tissue inhibitor of metalloproteinase)
TLR	Receptor de membrana do tipo "toll" (Toll-like receptors)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
v	Volume
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
UI	Unidades internacionais
X	Vezes
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros
μ m	Micrômetro
α	Alfa
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
<	Menor
\pm	Mais ou menos

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.....	24
Figura 2 - Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na polarização e ativação dos macrófagos M1 e M2 e seus subtipos.....	29
Figura 3 - Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.....	36
Figura 4 - Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	38
Figura 5 - Intercépto linear médio (Lm) dos diferentes grupos experimentais.....	45
Figura 6 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar corado em H&E.....	45
Figura 7 - Densidade de células positivas para os macrófagos totais MAC-2.....	46
Figura 8 - Expressão gênica para CD68 expresso em unidades arbitrárias.....	47
Figura 9 - Densidade de células positivas para interleucinas envolvidas na diferenciação do Fenótipo M1.....	48
Figura 10 - Densidade de células positivas para interleucinas envolvidas na diferenciação do Fenótipo M2	49
Figura 11 - Fotomicrografias representativas de células positivas para interleucinas envolvidas na diferenciação do Fenótipo M1 e M2.....	50
Figura 12 - Densidade de células positivas para metaloproteases	51
Figura 13 - Quantificação por ELISA de IL-4, IL-10 e IL-13	52
Figura 14 - Expressão gênica para marcadores de Fenótipo M1 expresso em unidades arbitrárias.....	54
Figura 15 . Expressão gênica para marcadores de Fenótipo M2 expresso em unidades arbitrárias.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Macrófagos totais.....	25
Tabela 2 - Marcadores envolvidos na indução da polarização para fenótipos M1.....	26
Tabela 3 - Marcadores envolvidos na indução da polarização para fenótipos M2.....	27
Tabela 4 - Descrição dos anticorpos utilizados para técnica de imunohistoquímica.....	40
Tabela 5 - Descrição da sequência sense e antisense dos primers utilizados no PCRq.....	44
Tabela 6 - Resumo dos resultados obtidos.....	57

Kohler JB. *O papel dos macrófagos M1 e M2 no enfisema pulmonar em modelos experimentais de indução por instilação de elastase e exposição à fumaça de cigarro* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Os macrófagos são células inflamatórias importantes no desenvolvimento e progressão do enfisema pulmonar e dependendo do estímulo do microambiente estas células podem ser diferenciadas em fenótipos M1 ou fenótipo M2. Os macrófagos de fenótipo M1 são reconhecidos como pró-inflamatórios enquanto que os macrófagos de fenótipo M2 são reconhecidos pela ação anti-inflamatória. O objetivo deste estudo foi caracterizar a polarização dos macrófagos em fenótipos M1 e M2 nos diferentes modelos experimentais de indução de enfisema pulmonar. **MÉTODOS:** foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e foram divididos em quatro grupos experimentais, Grupo PPE (Elastase Pancreática de Porco): Animais que receberam instilação intranasal de 50 µL de PPE (0,667UI) com eutanásia no 28º dia; Grupo Salina: Animais que receberam instilação intranasal de 50 µL de soro fisiológico (SF) (0,9%) com eutanásia no 28º dia; Grupo Fumo: Animais que foram expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana consecutivos durante 12 semanas e Grupo Controle: Animais que foram mantidos no biotério e expostos ao ar ambiente por 12 semanas. Após eutanásia, os pulmões foram removidos, fixados em formaldeído e em seguida, foram feitos cortes para análise do intercepto linear médio (Lm) e contagem de células positivas para os macrófagos totais (MAC-2), interferon-gama (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-10, transformação do fator do crescimento (TGF)- β , metaloproteases (MMP)-9 e -12, no parênquima pulmonar. Pela técnica de ELISA foi avaliado no lavado broncoalveolar (LBA): IFN- γ e IL-12 (fenótipo M1) e IL-4, IL-10 e IL-13 (fenótipo M2). Pela técnica de PCR em tempo-real foi avaliada a expressão gênica para cluster of differentiation 68 (CD68), fator de regulação de interferon (Irf)-5, quimiocinas- CXC (CXCL9) e (CXCL10), o receptor de interleucina (IL)-12b e óxido nítrico sintase (iNOS) (fenótipo M1) e Irf-4, resistin-like molecule alpha (Fizz1), chitinase-3-like protein 3 (Ym1) e arginina-1 (Arg1) (fenótipo M2).

RESULTADOS: Nossos resultados demonstraram aumento dos espaços aéreos distais e consequente presença de enfisema pulmonar nos dois grupos avaliados. Observamos redução da expressão gênica para CD68 no grupo PPE em comparação ao seu controle e tendência a aumento da expressão deste gene para o grupo Fumo comparado ao seu controle. A avaliação da expressão gênica para marcadores M1 revelou aumento para CXCL9 e CXCL10 nos grupos PPE, aumento de CXCL9 e redução de CXCL10 no grupo Fumo e redução de IL-12b no grupo Fumo comparados aos seus respectivos controles. A avaliação da expressão gênica para fenótipo M2, demonstrou diminuição de Arg1 e Fizz1 nos grupos PPE comparado ao salina. Pela técnica de ELISA encontramos uma redução de IL-4, IL-10 e IL-13 nos grupos PPE e aumento no grupo Fumo de IL-10, ambos comparados aos seus respectivos controles. Para a contagem de células positivas MAC-2, encontramos o aumento de macrófagos totais nos dois modelos avaliados, para marcadores de fenótipo M1, encontramos aumento de TNF- α e IFN- γ nos dois modelos avaliados, para marcadores de fenótipo M2, encontramos aumento de TGF- β nos dois modelos de enfisema pulmonar avaliado. Entretanto para interleucina-10 encontramos uma redução no grupo PPE e aumento no grupo Fumo, ambos comparados aos seus respectivos controles. **CONCLUSÃO:** Demonstramos que os modelos induzidos pela exposição a fumaça de cigarro e instilação elastase resultaram em diferentes polarizações de macrófagos devido às diferenças do microambiente e que o modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro foi o que melhor representou as características fisiológicas observadas em pacientes DPOC.

Descritores: modelos animais; enfisema pulmonar; macrófagos; camundongos; inflamação; sistema respiratório.

Kohler JB. *The role of M1 and M2 macrophages on pulmonary emphysema in experimental models of elastase instillation induction and exposure to cigarette smoke* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Macrophages are important inflammatory cells on development and progression of pulmonary emphysema. Depending on microenvironment stimuli, these cells can differentiate into M1 or M2 phenotypes. Macrophages M1 phenotype play proinflammatory role whereas macrophages M2 phenotype play anti-inflammatory role. Our objective was to characterize the polarization of macrophages in M1 and M2 phenotypes in different experimental models of pulmonary emphysema induction. Male C57BL/6 mice were used and divided into four experimental groups. Group PPE (Porcine Pancreatic Elastase): Animals received intranasal instillation of 50 μ L of PPE (0.677 IU) with euthanasia on the 28th day; Saline Group: Animals which received intranasal instillation of 50 μ L SF (0.9%) with euthanasia on the 28th day; Cigarette Smoke Group: Animals exposed to cigarette smoke for 30 minutes, twice a day, 5 days a week for 12 weeks and Control Group: Animals that were exposed to ambient air for 12 weeks. After euthanasia, the lungs were removed, fixed in formaldehyde and then sectioned for analysis of the mean linear intercept (Lm) and counting of cells positive for total macrophages (MAC-2), interferon gamma (IFN- γ), factor Tumor necrosis (TNF- α), interleukin (IL)-10, transforming growth factor beta (TGF)- β , matrix metalloproteinases- (MMP)-9 e -12 in the lung parenchyma through the immunohistochemistry technique. In order to evaluate the expression of proteins we used ELISA technique for IFN- γ and IL-12 (M1 phenotype) and IL-4, IL-10 and IL-13 (M2 phenotype) by bronchoalveolar lavage (BAL). They were also evaluated by gene expression analysis by the Real Time-PCR technique for cluster of differentiation 68 (CD68), interferon regulating factor (Irf-5), chemokines CXC (CXCL9) and (CXCL10), subunit beta of interleukin 12 (IL-12b) and nitric oxide synthase (iNOS) and for M2 phenotypes were analyzed Irf4, found in inflammatory zone- 1(Fizz1), chitinase type-1 (Ym1) and arginine-1 (Arg1) molecules. RESULTS: Our results demonstrated an increase in distal air spaces and consequent presence of

pulmonary emphysema in both groups. Also, we observed reduction of CD-68 gene expression in PPE group compared to his control and tendency to increase the expression on Cigarette Smoke group (CS) compared to his Control. The evaluation of gene expression for M1 markers revealed an increase for CXCL9 and CXCL10 in the PPE groups, increase of CXCL-9 and reduction of CXCL10 on CS group and reduction of IL-12b on CS group compared to their respective controls. The evaluation of gene expression for M2 phenotype demonstrated a decrease of Arg1 and Fizz1 in PPE groups compared to saline group. By ELISA technique, we found reduction of IL-4, IL-10 and IL-13 on PPE groups, while we did not observe statistical difference in CS group, both compared to their respective controls. The TNF- α and IFN- γ positive cells counts showed an increase for both groups in the two models evaluated, for M2 phenotype we found an increase for TGF- β in both emphysema models whereas for IL-10 we found a reduction in PPE group and increase on CS group, both compared to their respective controls. CONCLUSIONS: We demonstrated that the models induced by exposure to cigarette smoke and elastase instillation resulted in different macrophages polarizations due to differences in the microenvironment and that the experimental model of exposure to cigarette smoke was the one that best represented the physiological characteristics observed in COPD patients.

Descriptors: models, animal; pulmonary emphysema; macrophages; mice; inflammation; respiratory system.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença prevenível, tratável, caracterizada pela obstrução persistente e progressiva do fluxo aéreo, associada a resposta inflamatória anormal das vias aéreas e dos pulmões às partículas e/ou gases nocivos. A limitação ao fluxo aéreo é causada principalmente pela recorrente exposição às partículas e consequente destruição do parênquima pulmonar (enfisema) e das pequenas vias aéreas (bronquiolite obstrutiva)⁽¹⁾.

Atualmente a DPOC é considerada a quarta maior causa de morte no mundo⁽¹⁾ e um importante e crescente problema de saúde mundial⁽²⁾. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem 65 milhões de pessoas no mundo com DPOC de grau moderado a grave. No Brasil, a cada hora três pessoas morrem em consequência desta doença, resultando em 40 mil mortes por ano⁽³⁾. Acredita-se que até 2030, a DPOC seja a terceira maior causa de morte mundial⁽⁴⁾. Recentemente demonstrou-se que a continuidade do tabagismo determinaria a obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas em até 50% em indivíduos com mais de 70 anos⁽¹⁾. Estes dados são resultante da incessável exposição aos fatores de risco para a doença e do crescente envelhecimento populacional⁽⁵⁾. 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.

Tal fato deve-se a fatores intrínsecos do hospedeiro, como susceptibilidade genética, mudanças epigenéticas e estresse oxidativo que potencializam a inflamação induzida pela exposição constante à fumaça do cigarro e fatores extrínsecos como exposição as partículas ambientais, status socioeconômico, sexo, idade e tipos de ocupação no ambiente de trabalho⁽⁶⁾.

1.2. Mecanismos envolvidos no desenvolvimento do enfisema pulmonar

Entre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do enfisema pulmonar, incluem-se a hipótese protease-anti-protease, exacerbação do processo inflamatório, estresse oxidativo e apoptose.

1.2.1. Desequilíbrio Protease antiprotease

O desequilíbrio entre proteases e antiproteases é reconhecido como o principal mecanismo para explicar a patogênese da DPOC desde a década de 60⁽⁷⁾. Esta teoria provém de observações clínicas em pacientes deficientes em alpha-1 antitripsina (α 1-AT) que desenvolveram enfisema grave, embora seja raro o aparecimento de enfisema somente devido à ausência desta antiprotease⁽⁸⁾. Este desequilíbrio se dá principalmente devido ao aumento do número de macrófagos e neutrófilos no trato respiratório e o consequente aumento da liberação de proteases. Essas proteases causam destruição do tecido pulmonar que é inibida pela ação da α 1-AT. Assim, se há baixos níveis séricos de α 1-AT, o processo de destruição do tecido pulmonar leva ao enfisema⁽⁹⁾.

O aumento de proteases em relação às antiproteases resulta na destruição das fibras constituintes do parênquima pulmonar e como consequência a perda de elasticidade tecidual⁽¹⁰⁾. A exposição à fumaça do cigarro é considerada como um importante fator no desenvolvimento do enfisema pulmonar pois potencializa a lesão pulmonar reduzindo a atividade das antiproteases⁽¹¹⁾. Os inibidores de metaloproteases de matriz (TIMP- Tissue inhibitor of metalloproteinase) são citocinas antagonistas endógenas que se ligam às metaloproteases onde provocam perda de atividade proteolítica destas últimas. Assim esse desequilíbrio é considerado um evento importante na patogênese da DPOC⁽¹²⁾.

Segundo Russel⁽¹³⁾ a ativação crônica de macrófagos alveolares de pacientes com DPOC resulta no aumento de liberação de MMP-9, enquanto que Hautamaki ⁽¹¹⁾ descreve que camundongos quando expostos a fumaça de cigarro por um longo período apresentam aumento da liberação de metaloproteases de matriz (MMP)-12, resposta relacionada com a destruição e consequente desenvolvimento do enfisema pulmonar^(14, 15).

Neutrófilos, macrófagos e linfócitos T são as principais células inflamatórias envolvidas nos processos de desenvolvimento da DPOC. Essas células são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios que interagem com as células das vias aéreas e do parênquima pulmonar⁽¹⁾. Os neutrófilos estão envolvidos com o aumento da liberação de oxidantes e proteases, perpetuando o desequilíbrio protease antiprotease⁽¹⁶⁾.

O hábito de fumar provoca o aumento do número de neutrófilos no pulmão e a consequente liberação de elastase neutrofílica⁽¹⁷⁾ que associada a um aumento da produção de muco, agrava a obstrução ao fluxo aéreo e a

destruição das paredes alveolares⁽¹⁶⁾. Muitos estudos demonstram o potencial proteolítico dos neutrófilos e a produção de metaloproteases como MMP-9 e MMP-8⁽¹⁾.

1.2.2. Estresse Oxidativo

Células inflamatórias geram espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio que levam ao estresse oxidativo caso haja um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Em fumantes, os macrófagos alveolares liberam mais EROs que em não fumantes e a capacidade antioxidante do plasma está reduzida⁽¹⁸⁾. O aumento da liberação de EROs traz conseqüentemente o aumento da oxidação de antiproteases como a α 1-AT, podendo assim ativar as MMPs, aumentando a proteólise. O aumento de H₂O₂ está relacionado à constrição da musculatura lisa *in vitro*⁽¹⁷⁾.

1.2.3. Apoptose

A apoptose é considerada um mecanismo importante no desenvolvimento da DPOC⁽¹⁹⁾. Um aumento na apoptose das células estruturais (epiteliais e endoteliais) do pulmão, não contrabalançado pelo aumento na proliferação celular, leva a destruição tecidual⁽²⁰⁾.

O aumento da apoptose em células alveolares do enfisema foi inicialmente verificado em pulmões de pacientes com DPOC⁽²¹⁾ e em um modelo de enfisema pulmonar dependente de apoptose pelo bloqueio do receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em roedores⁽²²⁾. Em outro estudo, os autores encontraram aumento de apoptose e diminuição

da proteína VEGF nos pulmões de pacientes com enfisema induzido pelo cigarro⁽²³⁾.

Tuder e col.⁽²⁴⁾ demonstraram a interação entre o estresse oxidativo e a apoptose no enfisema experimental. Seu grupo verificou que a inibição do estresse oxidativo anulou a apoptose de células alveolares, impedindo o desenvolvimento do enfisema.

1.1.1. Processo Inflamatório

As principais células inflamatórias envolvidas no processo inflamatório da DPOC são neutrófilos, macrófagos e linfócitos T⁽¹⁾. Estas células, quando ativadas, são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas e proteases, promovendo quimiotaxia de células inflamatórias para o pulmão^(1, 14). Tais fatores, em conjunto com a persistência da exposição aos fatores exógenos nocivos, promovem a exacerbação deste processo e, conseqüentemente, a destruição tecidual e desenvolvimento do enfisema pulmonar^(1, 25).

Em estudos feitos por Lacoste e col.⁽²⁶⁾ e Keatings e col.⁽²⁷⁾ foram observados aumento de neutrófilos ativados em amostras de escarro e no LBA de pacientes com DPOC. Estas células inflamatórias são responsáveis pela secreção de proteases, incluindo elastase neutrofílica, catepsina G, e proteinase-3, envolvidas no aumento da produção de muco pelo epitélio das vias aéreas e na destruição das paredes alveolares. Fatores quimiotáticos incluindo interleucina-8 (IL-8) e leucotrieno B₄ (LTB₄) promovem a migração neutrofílica da circulação sistêmica para o trato respiratório. Além disso, o

aumento no número de neutrófilos nos brônquios e amostras de escarro está diretamente relacionado à gravidade da doença⁽¹⁷⁾.

Há também um aumento no número total de linfócitos T no parênquima pulmonar e nas vias aéreas centrais e periféricas, principalmente CD8+ em pacientes enfisematosos que estão relacionados à citólise e apoptose de células epiteliais alveolares⁽¹¹⁾.

Os macrófagos apresentam extrema importância no desenvolvimento das doenças respiratórias. O aumento do número de macrófagos está associado com a gravidade da DPOC, com diferentes caracterizações fenotípicas e padrões inflamatórios^(18- 21).

Quando ativados, os macrófagos são responsáveis por liberam mediadores como o TNF- α , MMPs, EROs, citocinas e quimiocinas envolvidas na migração de outros tipos celulares, como os neutrófilos, perpetuando o processo inflamatório^(17, 28). Com a persistência do processo inflamatório a partir da perpetuação da exposição às partículas nocivas do cigarro, ocorre um aumento da migração destas células para o sitio pulmonar, o que promove a progressão da doença onde é também observado o aumento do número de macrófagos em regiões de lesão do parênquima alveolar em enfisematosos^(17, 29).

A Figura 1 representa, esquematicamente, um resumo de todos os mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC abordados até aqui, bem como o processo de interação entre eles.

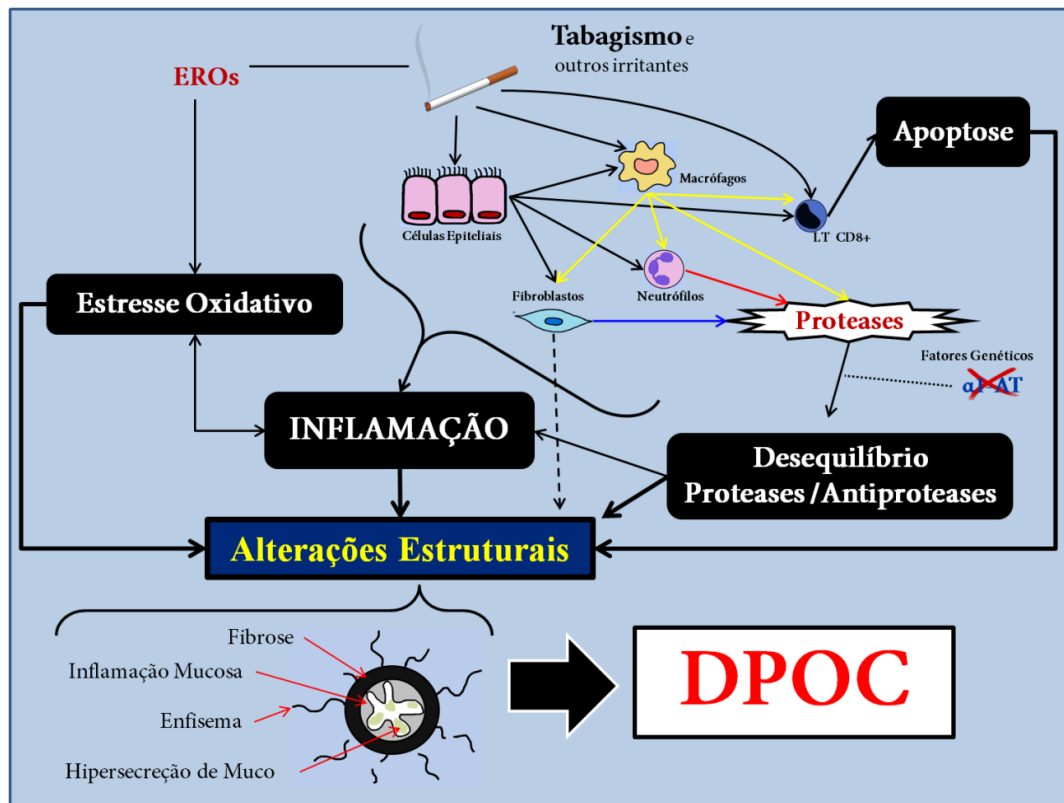


Figura 1: Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC. A fumaça do cigarro e outros irritantes atuam nas células epiteliais, macrófagos e estimulam a liberação de EROs. Nesta reação são liberados diversos mediadores inflamatórios que levam a reações como estresse oxidativo, aumento do processo inflamatório, desequilíbrio protease-antiprotease e apoptose celular. Todos esses mecanismos juntos, levam às alterações estruturais que caracterizam a fisiopatologia da DPOC (Robertoni FSZ, 2015³⁰).

1.3. Diferentes Fenótipos de macrófagos

Os macrófagos desempenham papel crucial na imunidade inata e adaptativa⁽¹⁹⁾. Dependendo do microambiente, ou seja, das interleucinas e fatores de crescimento presentes, podem assumir diferentes fenótipos, com funções diferentes e até o momento são conhecidos os macrófagos de fenótipo M1 e M2^(19, 31).

1.3.1. Mediadores envolvidos na polarização dos macrófagos

Olsen e col.⁽³²⁾ encontraram 91% de macrófagos alveolares, 7% de linfócitos, 1% de neutrófilos e 1% de mastócitos no lavado broncoalveolar (LBA) de adultos saudáveis. Barnes e col.⁽³³⁾ encontraram um aumento de 5 a 10 vezes no número de macrófagos em pacientes fumantes comparados aos indivíduos não fumantes. Este resultado pode estar associado a uma resposta imunorreguladora na tentativa de prevenir a inflamação excessiva às partículas nocivas devido à ação fagocítica destas células⁽³⁴⁾. Portanto, compreender a base molecular da polarização dos macrófagos é um aspecto importante para melhor entender as diferentes fases do processo inflamatório e remodelamento tecidual envolvidos no desenvolvimento da patogênese da DPOC. Assim, a tabela a seguir apresenta importantes marcadores envolvidos na indução e polarização dos fenótipos M1 e M2, bem como a sua classificação, característica e possíveis funções.

Tabela 1. Mediadores de macrófagos totais

Mediadores para macrófagos totais	Características e Funções
MAC-2	-Marcadores de proteínas específicas ⁽³⁵⁾ -Identificador de macrófagos no tecido ⁽³⁵⁾
CD68	-Marcadores de proteínas específicas ⁽³⁶⁾ -Identificador de macrófagos no tecido ⁽³⁶⁾

Tabela 2. Marcadores envolvidos na indução da polarização para fenótipo**M1**

Mediadores envolvidos no processo inflamatório	Classificação Fenótipo	Características e Funções
IFN-γ	Citocina Fenótipo M1	- Propriedades antivirais: Diferenciação Th1 ⁽³⁸⁾ . - Indução de apoptose ⁽³⁸⁾ .
TNF-α	Citocina Fenótipo M1	-Inicia resposta inflamatória, controla a duração do processo inflamatório com ação imunossupressora ⁽³⁸⁾ .
IL-12b	Citocina Fenótipo M1	-Codifica uma subunidade da interleucina 12 ⁽³⁷⁾ - Indução de Th1 ⁽³⁷⁾
Irf5	Fator de transcrição Fenótipo M1	- Fator de transcrição chave para a diferenciação de macrófagos M1 ⁽³⁹⁾
iNOS	Enzima Fenótipo M1	- Enzima indutora da produção de NO _(40, 41)
CXCL9	Quimiocina Fenótipo M1	- Liberação induzida por IFN- γ ^(37,42) - Resposta TH1
CXCL10	Quimiocina Fenótipo M1	- Induzidos por IFN- γ ^(37, 42) - Indução de Th1 ⁽³⁶⁾

Tabela 3. Marcadores envolvidos na indução da polarização para fenótipo M2

Mediadores envolvidos no processo inflamatório	Classificação Fenótipo	Características e Funções
IL-4	Citocina Fenótipo M2	- Induz diferenciação Th2 ⁽³⁷⁾ - Suprime desenvolvimento de imunidade do tipo 1, incluindo células Th1 e macrófagos M1 ⁽³⁷⁾ - Inibidor de IFN- γ ⁽³⁷⁾
IL-10	Citocina Fenótipo M2	- Inibidor de macrófagos M1 ⁽³⁷⁾ - Citocina com ação anti-inflamatória ⁽³⁷⁾ - Inibidor de macrófagos M1 ⁽³⁷⁾
IL-13	Citocina Fenótipo M2	- Induz diferenciação Th2 ⁽³⁷⁾ - Indução Treg ⁽³⁸⁾
TGF-β	Fator de crescimento Fenótipo M2	- Também suprime ativação células T ⁽²⁸⁾ - Indução de remodelamento ⁽³⁸⁾ - Promove a degradação da matriz extracelular ⁽²⁸⁾
MMP-9	Metaloproteases Fenótipo M2	- Remodelamento tecidual ⁽²⁸⁾ - Contribui para mudanças estruturais pulmonar ⁽²⁸⁾ - Promove a degradação da matriz extracelular ⁽²⁸⁾
MMP-12	Metaloproteases Fenótipo M2	- Remodelamento tecidual ⁽²⁸⁾ - Contribui para mudanças estruturais pulmonar ⁽²⁸⁾
Irf4	Fator de transcrição Fenótipo M2	- Fator de transcrição chave para a diferenciação de macrófagos M2 ⁽³⁹⁾
Fizz1	Molecula Fenótipo M2	- Induz polarização M2 que pode ou não ser via IL-4 ⁽⁴²⁾
Ym1	Molecula Fenótipo M2	- Induz polarização M2 que pode ou não ser via IL-4 ⁽⁴²⁾
Arg1	Enzima Fenótipo M2	- Aumento da fagocitose de células apoptóticas e de restos de matriz extracelular, acarretando aumento de espécies reativas de oxigênio ^(19, 29, 39)

Macrófagos M1 são induzidos pela liberação de IFN- γ e/ou citocina TNF- α características da resposta Th1. A polarização M1 leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12, enzima iNOS, quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e fator de transcrição Irf5⁽⁴¹⁾.

A polarização M2 ocorre na presença de citocinas TGF- β , IL-10, fator de transcrição Irf4, expressão de enzima Arg1 e das moléculas Fizz1 e Ym1^(19, 41). Esta polarização é caracterizada pela resposta Th2 e apresenta subtipos de polarização sendo eles: M2a, M2b e M2c. A ativação M2a é induzida pela presença de interleucina (IL) -4 e -13, referente a resposta a alérgenos, a M2b é induzida pela presença de imuno complexos +TLR (receptor toll-like) ou agonista IL-1R referente a resposta de imunorregulação e M2c à exposição de IL-10, resposta imunorreguladora com presença de remodelamento tecidual e deposição de matriz^(31, 41).

A Figura 2 representa, esquematicamente, um resumo dos mecanismos envolvidos na polarização M1 e M2 e subtipos M2a, M2b e M2c abordados até aqui, bem como do processo de interação entre eles.

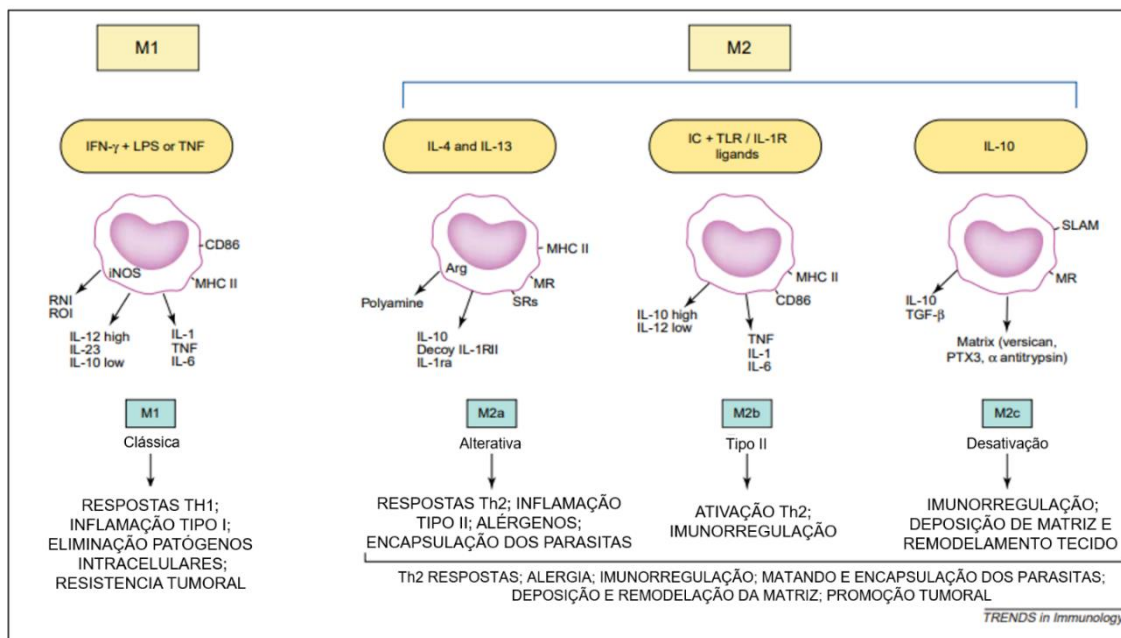


Figura 2. Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na polarização e ativação dos macrófagos M1 e M2 e seus subtipos (Mantovani A, 2004 ⁽⁴³⁾).

1.4. Modelos experimentais para o estudo da fisiopatologia do enfisema pulmonar

Considerando as dificuldades de estudar os mecanismos de desenvolvimento do enfisema pulmonar em humanos, considerando que para tanto é necessário que estes indivíduos sejam submetidos a procedimentos cirúrgicos e limitados a um único tempo, os modelos experimentais se tornam de extrema importância, pois a utilização destes proporciona um maior entendimento da fisiologia do desenvolvimento da doença.

Existem diferentes modelos experimentais, cujas utilizações apresentam vantagens e desvantagens. Os mais descritos na literatura são: exposição à fumaça de cigarro (fumo) e a instilação de elastase pancreática de porco (PPE- Porcine Pancreatic Elastase) .

1.4.1. Modelo de Enfisema induzido por Exposição à Fumaça de Cigarro

A exposição à fumaça de cigarro é o modelo que mais mimetiza a doença observada em humanos, uma vez que o cigarro é a principal causa de desenvolvimento da DPOC. Nestes estudos, os animais são expostos diariamente à fumaça de cigarro, em sistemas nos quais os animais permanecem com o corpo todo ou somente o nariz sob exposição⁽⁴²⁾.

No entanto, um fator importante considerar que é necessário um longo tempo de exposição para a indução do enfisema pulmonar. Wright e col.⁽⁴²⁾ encontraram desenvolvimento de enfisema em camundongos após 6 meses de exposições diárias. No entanto, Valença e col.⁽⁴³⁾ demonstraram presença de lesão do parênquima após 2 meses de exposições diárias durante 3 vezes ao dia, porém a avaliação do intercepto linear médio demonstrou uma lesão tecidual menor do que a obtida em modelos de exposição de 6 meses ao fumo. Experimentos prévios em nosso laboratório demonstraram que a exposição crônica por 3 meses, duas vezes ao dia, provocou enfisema em camundongos⁽⁴⁴⁾.

A grande vantagem da utilização da exposição à fumaça de cigarro é que, além do enfisema ser provocado pelo mesmo agente causador da doença em humanos é possível produzir a lesão tecidual característica do enfisema pulmonar, remodelamento das vias aéreas, e em algumas espécies, o remodelamento vascular e hipertensão pulmonar⁽⁴²⁾.

A grande desvantagem deste modelo, no entanto é que a lesão tecidual observada é considerada inferior à observada nos modelos que utilizam a instilação de proteases e em humanos com enfisema. Além disso, no momento

em que se encerra a exposição destes animais à fumaça de cigarro, não existe a progressão da doença, ao contrário do que é observado em humanos⁽⁴⁷⁾.

1.4.2. Modelo de Enfisema Induzido por Instilação de Elastase

A utilização de proteases em estudos experimentais surgiu com base em descrições clínicas de indivíduos deficientes em α 1-AT que desenvolviam precocemente enfisema pulmonar, originando a hipótese protease anti-protease. Nos estudos que elucidaram essa teoria, foram usados vários tipos de enzimas e, observou-se que apenas as enzimas que degradavam as fibras elásticas do pulmão e causavam o enfisema, provando que a destruição das fibras constituintes do parênquima é fundamental para o desenvolvimento dessa doença ^(48, 49).

A vantagem da utilização de proteases é que a gravidade da doença pode ser determinada pela concentração da protease instilada além de requer apenas uma única dose de administração da droga para o desenvolvimento do enfisema. Estudos demonstram que após 21 dias da data da instilação, pode-se obter lesão e remodelamento do parênquima pulmonar ^(50, 51). Entretanto, a maior desvantagem desse modelo é que não são observados todos os eventos fisiopatológicos que ocorrem em humanos e em animais expostos à fumaça de cigarro.

1.5. Justificativa

Considerando as diferenças nos mecanismos fisiopatológicos e padrões morfológicos entre os modelos experimentais de indução de enfisema

pulmonar por exposição à fumaça de cigarro e instilação intranasal de PPE e o papel dos macrófagos M1 e M2 na progressão do enfisema, pretendemos neste estudo, fazer uma caracterização destes tipos celulares, bem como das citocinas correspondentes e de algumas das metaloproteases envolvidas neste processo.

2. OBJETIVO

Tivemos como objetivo neste estudo avaliar se existem diferenças entre as polarizações dos macrófagos entre os dois modelos experimentais mais descritos na literatura (instilação de PPE e exposição à fumaça de cigarro).

3. MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram mantidos em gabinetes com temperatura e ventilação adequadas, acomodados em caixa moradia de polipropileno no biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20) da FMUSP. Durante o período de aclimatização e experimentação os animais receberam água e ração comercial peletizada à vontade e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12h em temperatura ambiente de 20°C, sendo cuidados por profissionais treinados e capacitados durante todo o período do estudo. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da FMUSP (Protocolo 136/2015). 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 1985) e com a Lei Arouca (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008). Neste estudo, foram utilizados 16 animais por grupo onde os animais foram expostos em dois protocolos experimentais. Não houveram óbitos durante as exposições à fumaça de cigarro e as instilações de PPE.

3.2. Indução do enfisema pulmonar por Instilação intranasal de elastase pancreática de porco

A indução do enfisema pulmonar foi realizada com PPE (Elastase Type I/ E-1250, Sigma Aldrich). Cada animal foi anestesiado através da aplicação intramuscular de Xylazina (5 mg/Kg) e Ketamina (40 mg/kg) e receberam 50 μ l de solução de elastase em dose única com concentração de 0,667 UI, através de instilação intranasal. Nos grupos controles, os animais receberam instilação nasal de solução fisiológica (SF)(0,9% NaCl), veículo da elastase.

3.3. Indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

Para indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro, realizamos o protocolo estabelecido por estudos prévios realizados por nosso grupo⁽⁴⁶⁾. Os animais foram expostos de corpo inteiro à fumaça de cigarro utilizando uma câmara de exposição de 28L, com duas entradas de ar (para ar sintético e fumaça de cigarro) e um ventilador para homogeneizar o ar sintético e a fumaça de cigarro dentro da caixa. O fluxo de ar sintético foi mantido a 2L/min, e a outra entrada recebeu um fluxo de ar sintético, que passou por um Sistema Venturi ligado a um cigarro aceso, que conduziu a fumaça do cigarro para dentro da caixa. O fluxo de ar nesta segunda entrada foi definida à 2L / min, o que produz níveis de monóxido de carbono (CO) variando de 250 a 350 partes por milhão (ppm)⁽⁵²⁾. A concentração de carboxihemoglobina em camundongos expostos ao fumo foi mantida a 10% (\pm 1,3). Os animais foram expostos a 12 (\pm 1) cigarros comercialmente filtrados

(0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de carbono monóxido por cigarro) com concentração total de partículas em suspensão (TPM) $354,8 \pm 50,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por dia. Os camundongos expostos ao fumo do cigarro foram mantidos na caixa com estes níveis de CO durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 12 semanas. Os animais controles foram mantidos no biotério recebendo ar filtrado.

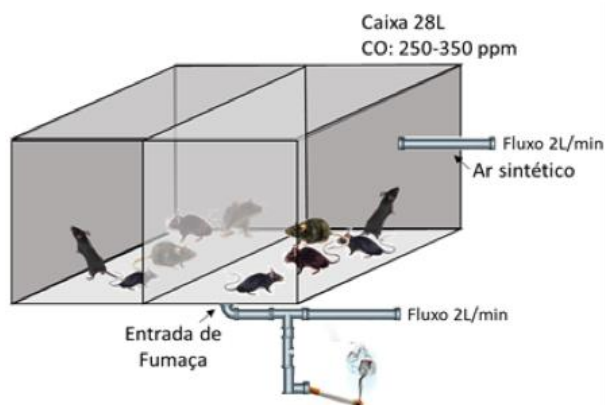


Figura 3. Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro. Elaborado pela autora.

3.4. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo PPE: Animais que receberam instilação intranasal de 50 μL de PPE (0,667UI) e que foram eutanasiados 28 dias após a instilação (n=16).

Grupo Salina: Animais que receberam instilação intranasal de 50 μL de SF (0,9%) e foram eutanasiados 28 dias após a instilação (n=16).

Grupo Fumo: Animais que foram expostos à fumaça de cigarro durante 30 minutos, duas vezes por dia, 5 dias por semana, durante 12 semanas. Foram eutanasiados após as 12 semanas de exposição à fumaça de cigarro (n=16).

Grupo Controle: Animais que foram mantidos por 12 semanas no biotério expostos ao ar filtrado. Foram eutanasiados após 12 semanas. (n=16).

3.5. Remoção dos pulmões e análise histológica

Para remoção dos pulmões, os animais foram anestesiados com Thiopental (50mg/kg) por via intraperitoneal e eutanaziados por meio de exsanguinação da veia cava e em seguida, a caixa torácica foi aberta para retirada dos pulmões e coração em monobloco⁽⁵³⁾.

Os pulmões foram fixados em formaldeído (10%) sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24 horas. Esse material foi incluído em parafina para confecção de lâminas histológicas que foram utilizadas para as marcações específicas pela técnica de imunohistoquímica⁽⁵³⁾.

3.6. Avaliação do Intercepto linear médio

Para a análise morfométrica as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e posteriormente fizemos a contagem do intercepto linear médio (Lm) por microscopia óptica (Nikon Eclipse - E200, Japão). A análise quantitativa foi realizada pela técnica convencional de contagem de pontos ("point-counting")⁽⁵⁴⁾. Em um aumento de 400x, utilizando-se uma ocular, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo, acoplada ao microscópio de luz convencional (Figura 4).

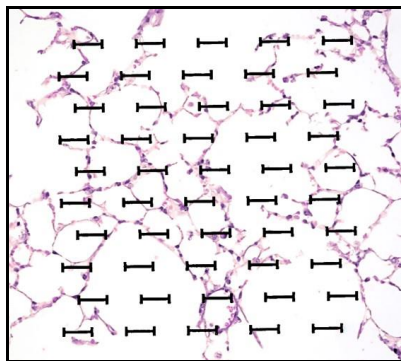


Figura 4 - Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

O Lm é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Utilizando o retículo sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas do parênquima, foi contado o número de vezes que os interceptos cruzam as paredes dos alvéolos⁽⁵⁴⁾.

Foi feita uma média de vinte campos para cada lâmina e calculado o Lm através da seguinte equação:

$$\text{Lm} = 2.500 \mu\text{m} / \text{média do número de vezes que os interceptos cruzaram as paredes dos alvéolos.}$$

O valor de 2.500 μm é obtido através da aferição do retículo utilizado, por meio de uma régua da fabricante Zeiss. A somatória de todos os segmentos do retículo resulta no valor 2.500 μm em aumento de 400X.

3.7. Técnica de imunohistoquímica para marcação específica das citocinas e metaloproteases

Para realizar a imunohistoquímica, 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 a 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 (PBS - pH=7,4) 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 (DAB) e Hematoxilina de Harris para contracorar.

Para cada marcador específico foi utilizado um determinado anticorpo primário com seu respectivo anticorpo secundário. Foi feita a padronização da diluição dos mesmos, iniciando os testes com as diluições sugeridas pelos fabricantes, os quais foram descritos na tabela a seguir:

Tabela 4. Descrição dos anticorpos utilizados para técnica de imunohistoquímica

FENÓTIPO	MARCADOR	ANTICORPO PRIMÁRIO	ANTICORPO SECUNDÁRIO	DILUIÇÃO	ESPECIFICAÇÃO
Macrófagos totais	MAC-2	Monoclonal produzido em rato	Anti-rat IgG2a (Vector)	1:25.000	MAC-2 (104226C): CL8942AP
M1	IFN- γ	Monoclonal produzido em rato	Anti-rat IgG2a (Vector)	1: 1.000	IFN- γ (H-145): sc-8308 Sta. Cruz Biotechnology, Ca, EUA
M1	TNF- α	Monoclonal produzido em rato	Anti-rat IgG2a (Vector)	1:15.000	TNF- α (52b83): SC-52746 Sta. Cruz Biotechnology, Ca, EUA
M2	TGF- β	Policlonal produzido em cabra	Anti-goat IgG (Vector)	1:400	TGF- β (F2112): SC-146 Sta. Cruz Biotechnology, Ca, EUA
M2	IL-10	Policlonal produzido em cabra	Anti-goat IgG (Vector)	1:50	IL-10 (M-18): sc-1783 Sta. Cruz Biotechnology, Ca, EUA
M2	MMP-9	Policlonal produzido em cabra	Anti-goat IgG (Vector)	1:700	MMP-9 (C-6540): SC-8839 Sta. Cruz Biotechnology, Ca, EUA
M2	MMP-12	Policlonal produzido em cabra	Anti-goat IgG (Vector)	1:2.000	MMP-12 (M-19): SC-8839 Sta. Cruz Biotechnology, Ca, EUA

Para revelação utilizamos o Vectastin Abc Kit, Vector Laboratories (Sta. Cruz Biotechnology, CA, EUA) ou Envisionision + Dual Link System Peroxidase (DakoCytomation, CA, EUA).

3.7.1. Contagem de células positivas por área de parênquima

O número de células positivas para MAC-2, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-10, MMP-9 e MMP-12 no parênquima pulmonar foi obtido pela contagem do

número de pontos. Para isso, utilizamos o mesmo retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida ($62.500 \mu\text{m}^2$) no aumento de 400x e foi contado o número de pontos que caíram no parênquima para cada campo escolhido⁽⁵⁴⁾. A densidade de células no tecido foi determinada pelo número de pontos que interceptaram os septos alveolares sobre o número de células positivas presentes no tecido do parênquima. Como na seguinte equação:

Densidade de células positivas = número de células positivas / número de pontos que incidiam no parênquima.

3.8. Avaliação por ELISA das citocinas no lavado broncoalveolar

Os níveis de IFN- γ , IL-12 (Citocina característica da polarização M1), e IL-4, IL-10 e IL-13 (Citocinas características da polarização M2) foram determinados por ELISA (OptEIA, BD PharMingen, Oxford, UK) por meio de microplacas (Costar, Cambridge, MA, USA) para cada citocina sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos. Após lavagem e distribuição das amostras, foram adicionados anticorpos específicos para as diferentes citocinas conjugados à biotina. Para a revelação da ligação, solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro M2 (Spectramax L, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes e o resultado foi expresso por pg/ml.

3.9. Avaliação da expressão dos fenótipos M1 e M2 por PCR em Tempo Real

3.9.1. Criopreservação de tecidos e Extração de RNA

O tecido pulmonar foi homogeneizado em presença de 1 ml de mistura de extração de RNA (TRIzol, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) com o auxílio de um homogeneizador de alta frequência (Precellys 24, Bertin) utilizando tubos preenchidos com pérolas de cerâmica (Precellys CK14 2 ml Tubes) e armazenados em *freezer* -80°C. O isolamento do RNA foi completado pelo método de extração em coluna através de *Kit* em etapa única (Qiagen, Roermond, Netherlands). A quantidade e a qualidade dos RNAs produzidos foram verificadas pela espectrofotometria e pela eletroforese em gel de agarose nativo.

3.9.2. Transcrição reversa

Os RNAs totais que passaram pelo controle de qualidade foram submetidos à transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA), que a partir de 1 µg de RNA total e iniciador (*primer*) oligo dT. A reação foi catalizada pela transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen Life Technologies) em presença de dNTPs.

3.9.3. PCR em Tempo Real

A expressão gênica foi avaliada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCRq) em termociclador *Rotor Gene* (Qiagen) e kit *Syber*

Green como marcador fluorescente (Qiagen). As reações aconteceram nas seguintes etapas: 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos (desnaturação) e 60°C por 10 segundos (anelamento e extensão). Os produtos do PCR foram submetidos à corrida em gel de agarose para confirmação dos tamanhos dos fragmentos e especificidade da reação. Os *primers* foram desenhados e utilizados para quantificar os RNA mensageiros (RNAm) codificados pelos genes listados na Tabela 1. A análise dos resultados foi realizada através do *software* disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, o número arbitrário de cópias dos genes de interesse e constitutivos foram calculados pela fórmula $(1000000/2^{CT})$ para cada amostra, onde CT é o número de ciclos de amplificação necessários para atingir o limiar determinado na fase exponencial da curva. Os valores foram apresentados como número de cópias relativas ao controle após correção com o constitutivo GAPDH.

Tabela 5. Descrição da sequência sense e antisense dos primers utilizados no PCRq

Gene	Fenótipo	5' Primer (5'-3')	3' Primer (5'-3')
CD68	Macrófagos totais	TTCTGCTGTGGAAATGCAAG	AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT
CXCL9	M1	TGCACGATGCTCCTGCA	AGGTCTTTGAGGGATTTGTAGTGG
CXCL10	M1	GACGGTCCGCTGCAACTG	GCTTCCCTATGGCCCTCATT
IL-12b	M1	CGCAAGAAAGAAAAGATGAAGGAG	TTGCATTGGACTTCGGTAGATG
iNOS	M1	ACCCGTCCACAGTATGTGAGGA	GACCCAAGCAAGACTTGGACT
Irf5	M1	AATACCCACACCTTTTGA	TTGAGATCCGGGTTTGAGAT
Arg1	M2	GCACTCATGGAAGTACACGAGGAC	CCAACCCAGTGATCTTGACTGA
Fizz1	M2	TCCCAGTGAATACTGATGAGA	CCACTCTGGATCTCCCAAGA
Ym1	M2	GGGCATACCTTTATCCTGAG	CCACTGAAGTCATCCATGT
Irf4	M2	CAAAGCACAGAGTCACCTGG	TGCAAGCTCTTTGACACACA
GAPDH	Normalizador	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	CTTGGGCTACACTGAGGACC

3.10. Análise Estatística

A análise estatística e os gráficos foram realizados utilizando o programa SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, EUA; versão 11.0) e os dados foram expressos como média \pm erro padrão (EP). Foi utilizado o teste t não pareado ou teste de Mann-Whitney dependendo da normalidade dos dados. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Intercepto Linear Médio

A avaliação do Lm revelou um aumento nos dois modelos experimentais propostos, demonstrando o aumento dos espaços aéreos distais. Houve aumento estatisticamente significativo de Lm nos grupos PPE e Fumo comparados aos seus respectivos controles (Figura 5).

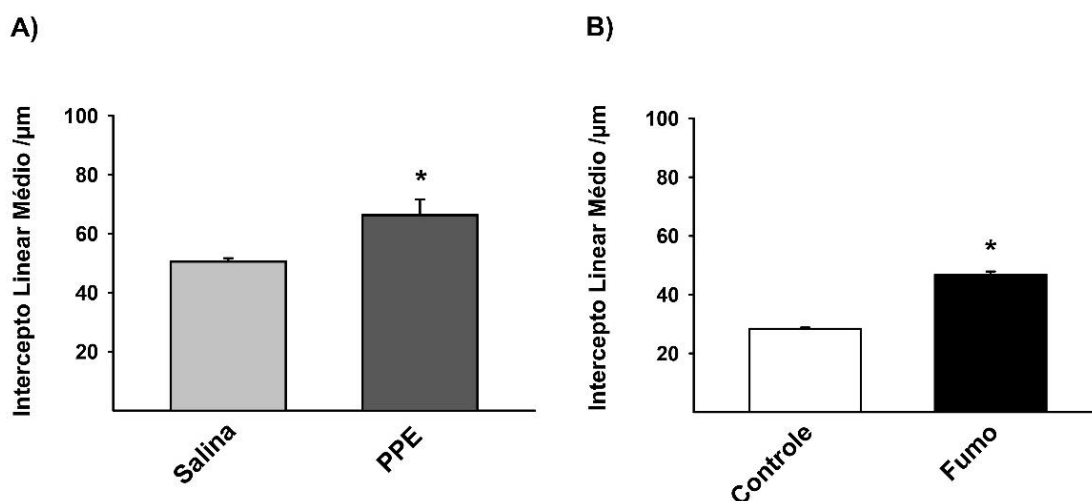


Figura 5: Diâmetro alveolar médio (Lm) dos diferentes grupos experimentais. Houve um aumento estatisticamente significativo nos grupos PPE (5A) e Fumo (5B) comparados aos seus respectivos grupos Controle (* $p= 0,009$; * $p<0,001$, respectivamente). Os valores estão expressos como média \pm EP (Salina $n=10$; PPE $n=8$; Controle $n= 8$; Fumo $n=9$).

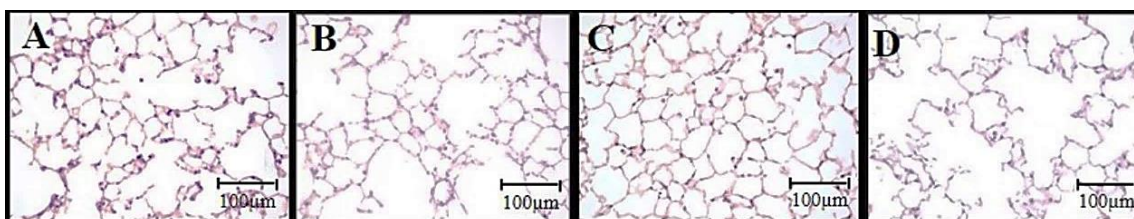


Figura 6: Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar corado em H&E dos Grupos Salina(6A); PPE (6B); Controle (6C); Fumo (6D). Aumento de 200X e barra de escala de 100μm.

4.2. Macrófagos totais

A densidade de células positivas no parênquima pulmonar revelou aumento MAC-2 nos dois modelos propostos. Houve aumento estatisticamente significativo nos grupos PPE e Fumo comparados aos seus respectivos grupos controles (Figura 7).

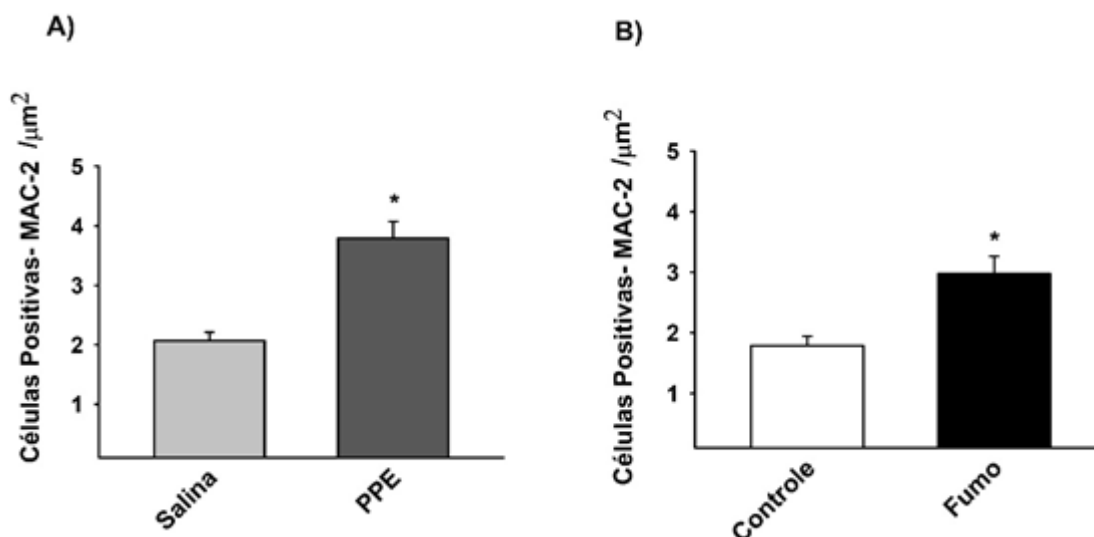


Figura 7: Densidade de células positivas para macrófagos totais. Houve um aumento estatisticamente significativo nos grupos PPE (7A) e Fumo (7B) comparados aos seus respectivos grupos Controle (* $p= 0,009$; * $p=0,001$, respectivamente). Os valores estão expressos como média \pm EP (Salina $n=11$; PPE $n=10$; Controle $n=11$; Fumo $n=9$).

4.3. Expressão gênica dos macrófagos totais CD68

A expressão gênica para CD68 apresentou diminuição estatisticamente significativo apenas no Grupo PPE comparado ao Grupo Salina. Embora tenhamos observado uma tendência de aumento da expressão deste gene no Grupo Fumo comparado ao Controle não observamos diferença estatisticamente significativo (Figura 8).

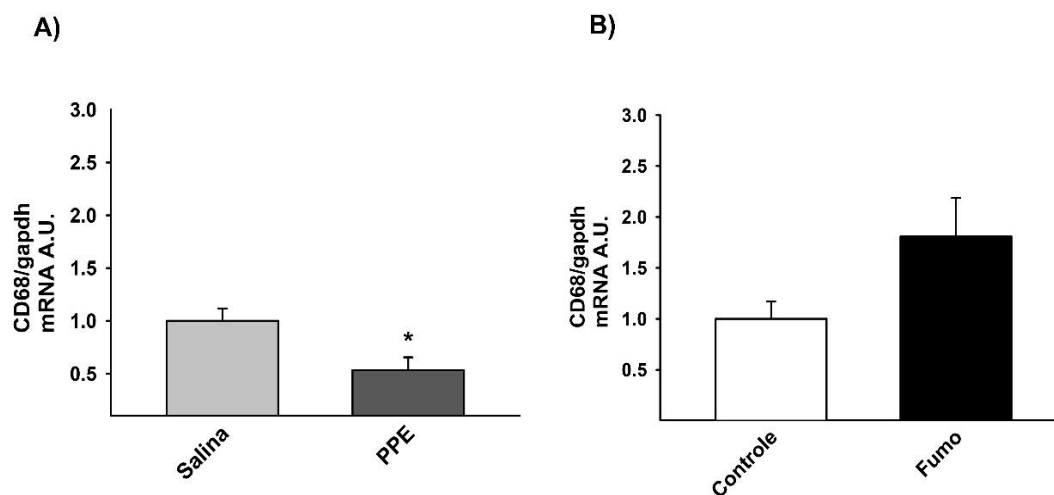
**Fig**

Figura 8: Expressão gênica para CD68 expresso em unidades arbitrárias. Houve diminuição estatisticamente significativo no Grupo PPE comparado ao Grupo Salina (8A) (* $p=0,012$). Não houve diferença estatisticamente significativo entre os grupos Fumo e Controle (8B). Os valores estão expressos como média \pm EP (Salina $n=14$; PPE $n=15$; Controle $n=12$; Fumo $n=17$).

4.4. Marcadores fenótipos M1 no parênquima pulmonar

A densidade de células positivas para as interleucinas envolvidas na diferenciação do fenótipo M1 demonstrou um aumento estatisticamente significativo de IFN- γ e TNF- α (Fenótipo M1) nos grupos PPE e Fumo comparados aos seus respectivos grupos Controles (Figura 9).

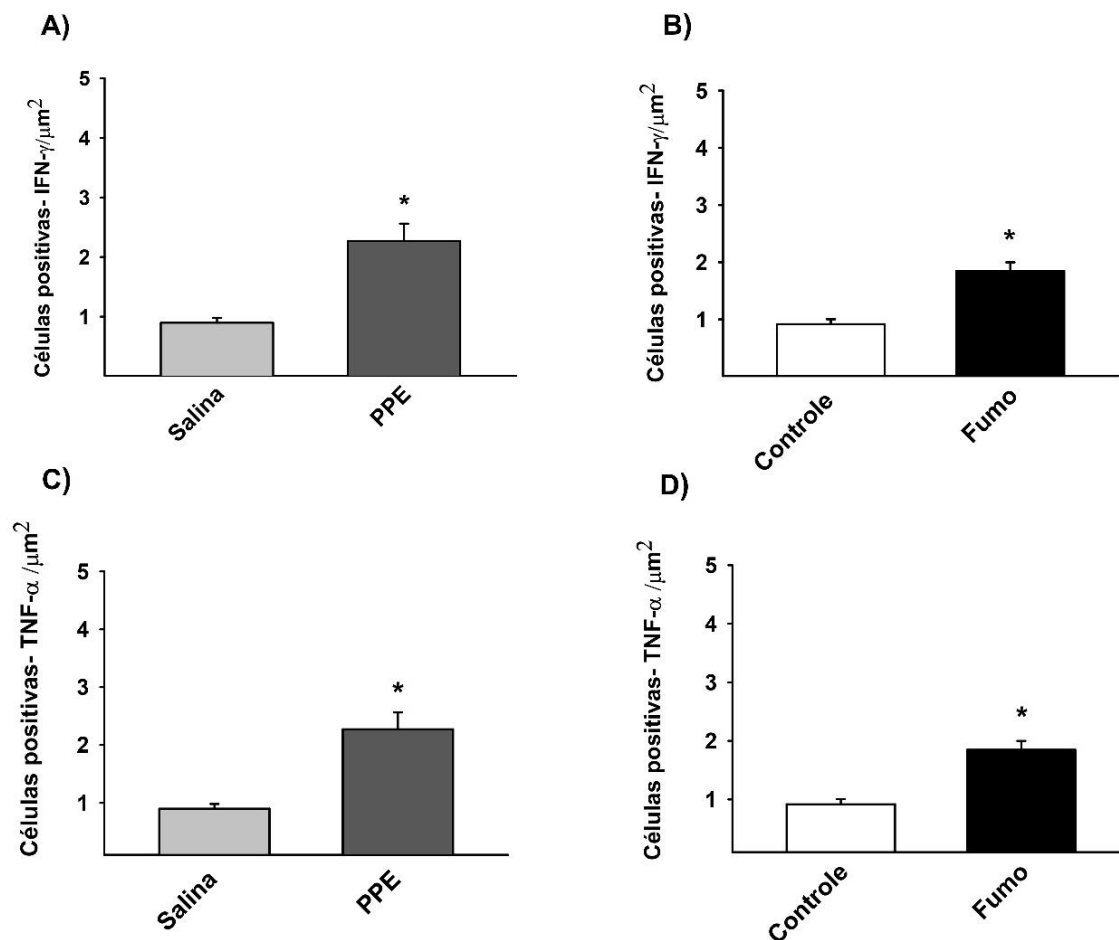


Figura 9: Densidade de células positivas para interleucinas envolvidas na diferenciação do Fenótipo M1. Houve um aumento estatisticamente significativo de IFN- γ nos grupos PPE (9A) (* $p=0,004$) e Fumo (9B) (* $p=0,001$), e para TNF- α nos grupos PPE (9C) (* $p=0,037$) e Fumo (9D) (* $p=0,001$), comparado com seus respectivos controles. Os valores estão expressos como média \pm EP. (IFN- γ Salina $n=8$; PPE $n=10$; Controle $n=9$; Fumo $n=9$); (TNF- α Salina $n=8$; PPE $n=10$; Controle $n=9$; Fumo $n=9$).

4.5. Marcadores fenótipos M2 no parênquima pulmonar

A densidade de células positivas para as interleucinas envolvidas na diferenciação do fenótipo M2 demonstrou um aumento estatisticamente significativo de TGF- β nos dois grupos estudados enquanto que observamos uma redução estatisticamente significativo de IL-10 no grupo PPE e aumento estatisticamente significativo no grupo Fumo comparados aos seus respectivos Controles (Figura 10).

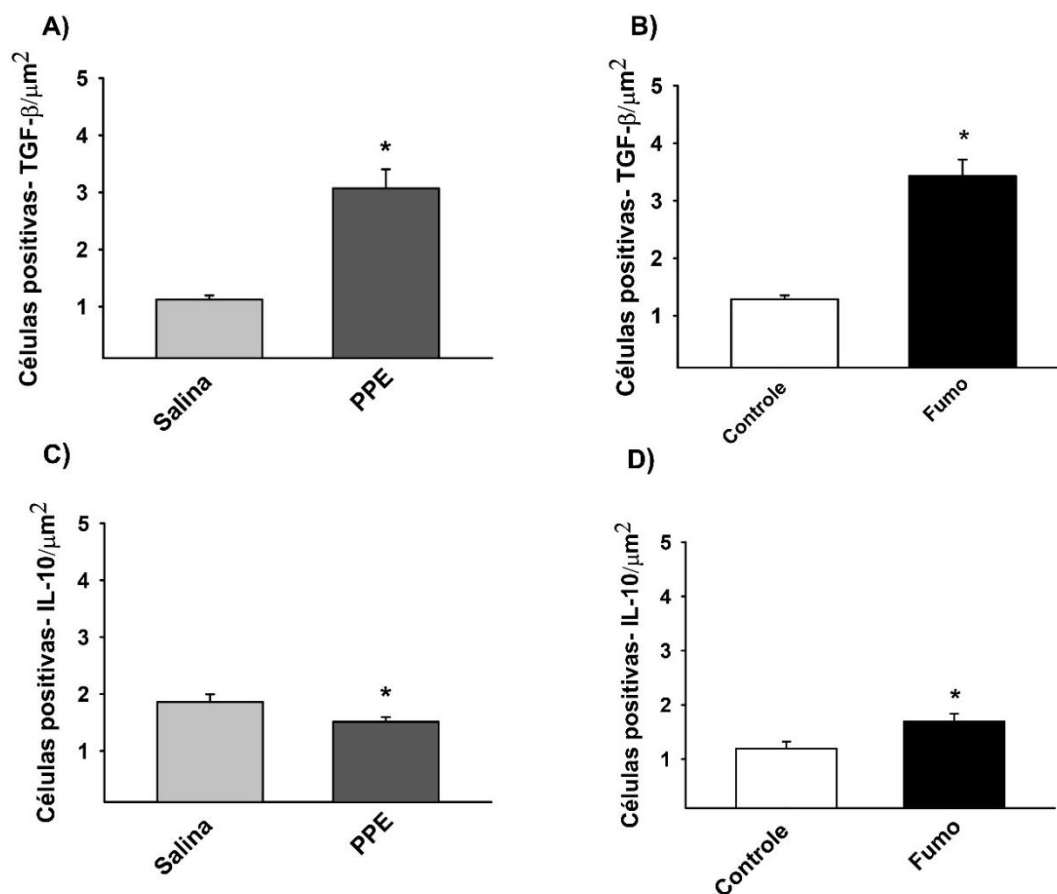


Figura 10: Densidade de células positivas para marcadores envolvidos na diferenciação do Fenótipo M2. Houve um aumento estatisticamente significativo para TGF-β tanto no grupo PPE quanto para o grupo Fumo (10A) (* $p=0,001$) e (10B) (* $p=0,001$), respectivamente. Enquanto que para interleucina IL-10 observamos uma diminuição no grupo PPE comparado ao grupo Salina (10C) (* $p=0,041$) e um aumento no grupo Fumo comparado ao grupo Controle (10D) (* $p=0,029$). Os valores estão expressos como média \pm EP. (TGF-β Salina $n=9$; PPE $n=8$; Controle $n=8$; Fumo $n=9$); (IL-10 Salina $n=8$; PPE $n=8$; Controle $n=7$; Fumo $n=7$).

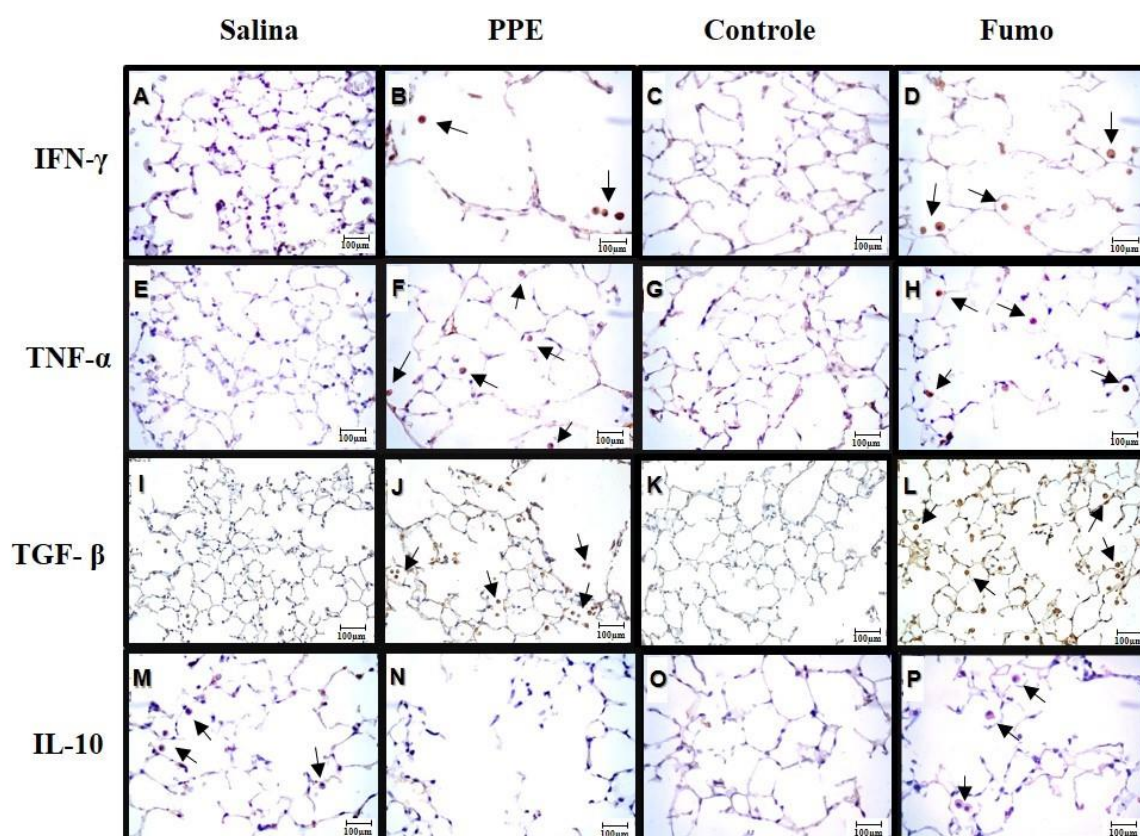


Figura 11: Fotomicrografias representativas da densidade de células positivas por imunohistoquímica para as citocinas IFN- γ (A-D); TNF- α (E-H); TGF- β (I-L) e IL-10 (M-P). Aumento de 200X e barra de escala de 100 μ m.

4.6. Metaloproteases- 9 e -12 no parênquima pulmonar

A densidade de células positivas para as citocinas envolvidas no processo de remodelamento, relacionada ao fenótipo M2 demonstrou um aumento estatisticamente significativo de MMP-9 e MMP-12 nos dois grupos estudados comparados aos seus respectivos Controles (Figura 12).

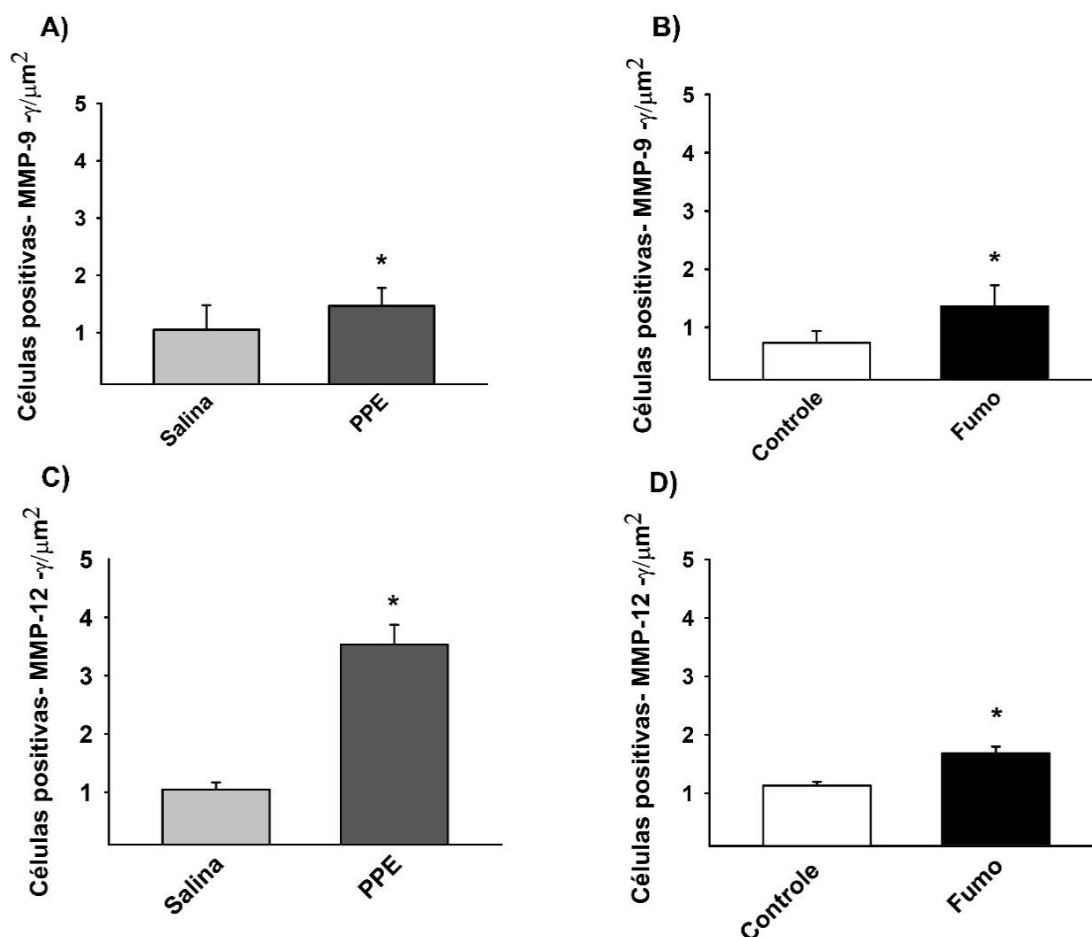


Figura 12: Densidade de células positivas para metaloproteases da matriz. Houve um aumento estatisticamente significativo de MMP-9 e MMP-12 nos grupos PPE (12A)(*p=0,04); (12C)(*p=0,001); respectivamente, e Fumo (12B) (*p=0,001), (12D) (*p=0,016), respectivamente, comparados aos seus respectivos grupos controles. Os valores estão expressos como média \pm EP. (MMP-9 Salina n=9; PPE n=9; Controle n=8; Fumo n=8); (MMP-12 Salina n=8; PPE n=9; Controle n=7; Fumo n=7).

4.7. Marcadores de fenótipo M2 no lavado broncoalveolar

A quantificação de proteínas pela técnica de ELISA demonstrou diminuição estatisticamente significativa para IL-4 (13A), IL-10 (13C) e IL-13 (13E) no grupo PPE comparado ao Salina. Não houve diferença para estas proteínas entre os grupos Fumo e Controle. A quantificação por ELISA das interleucinas IL-12 e IFN- γ (Macrófagos M1) não revelou expressão das mesmas (Figura 13).

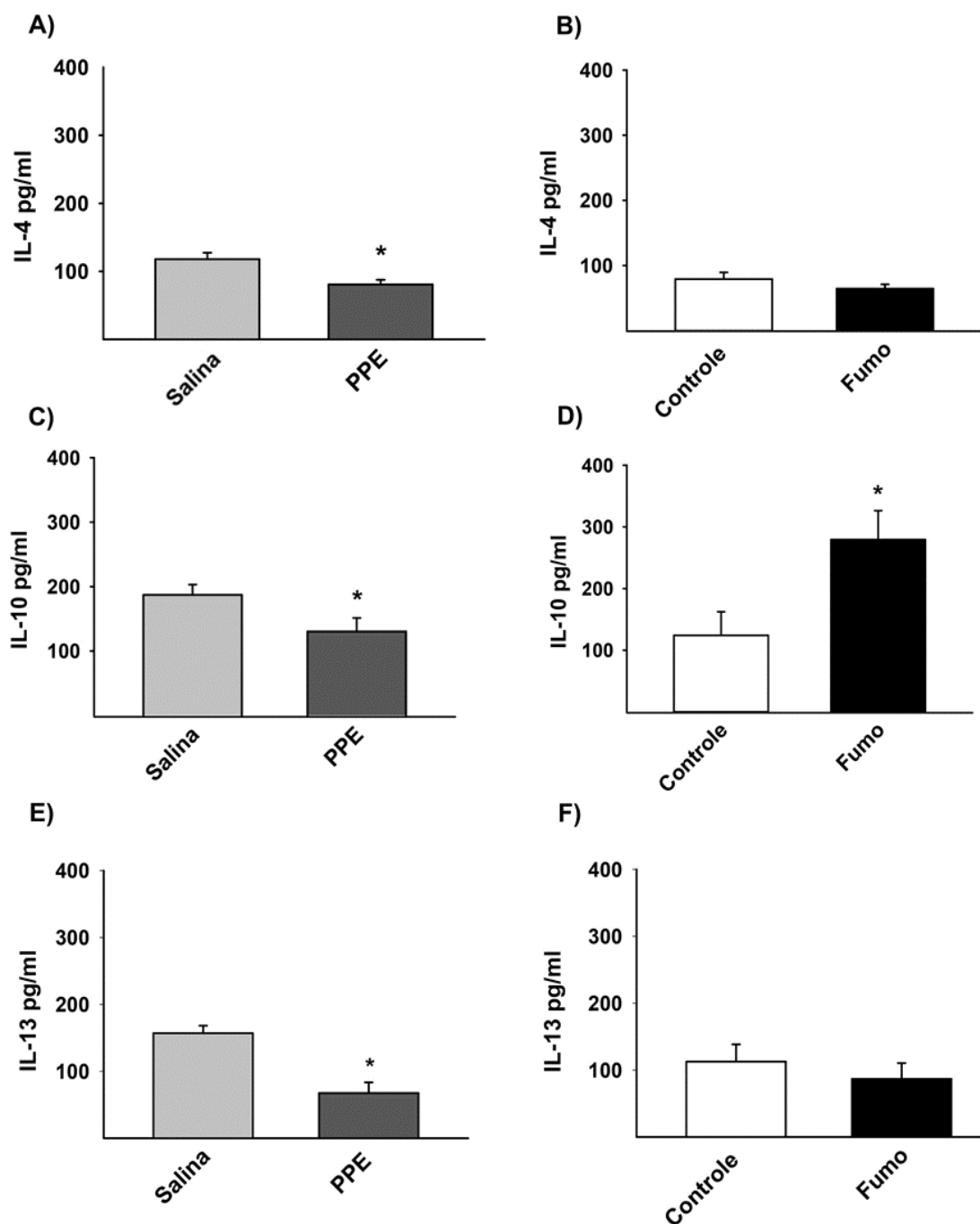


Figura 13: Quantificação de proteínas por ELISA envolvidos na diferenciação do Fenótipo M2. Houve diminuição estatisticamente significativa destas interleucinas no grupo PPE comparado ao Salina (13A)(* $p=0,016$); (13C)(* $p=0,046$); (13E)(* $p=0,001$), respectivamente. Não houve diferença para os grupos Fumo e Controle. Os valores estão expressos como média \pm EP. (IL-4 Salina $n=10$; PPE $n=9$; Controle $n=8$; Fumo $n=6$); (IL-10 Salina $n=7$; PPE $n=8$; Controle $n=6$; Fumo $n=6$); (IL-13 Salina $n=6$; PPE $n=9$; Controle $n=6$; Fumo $n=7$).

4.8. Avaliação da expressão gênica PCR em Tempo Real

4.8.1. Expressão gênica: fenótipos M1

Expressão gênica para marcadores de Fenótipo M1 expresso em unidades arbitrárias. A avaliação da expressão gênica para caracterização de fenótipo M1 demonstrou um aumento estatisticamente significativo na expressão de CXCL9 para os grupos PPE (14A) e Fumo (14B) comparado aos seus respectivos controles. A análise CXCL10 demonstrou aumento estatisticamente significativo da expressão do gene no grupo PPE comparado ao Salina (14C) e uma diminuição no grupo Fumo comparado ao grupo Controle (14D). A expressão gênica para IL-12b apresentou uma diminuição no grupo Fumo comparado ao grupo Controle(14F). Não encontramos diferença estatisticamente significativo para as análises de expressão gênica de Irf5 e iNOS entre os diferentes grupos experimentais (Figura 14).

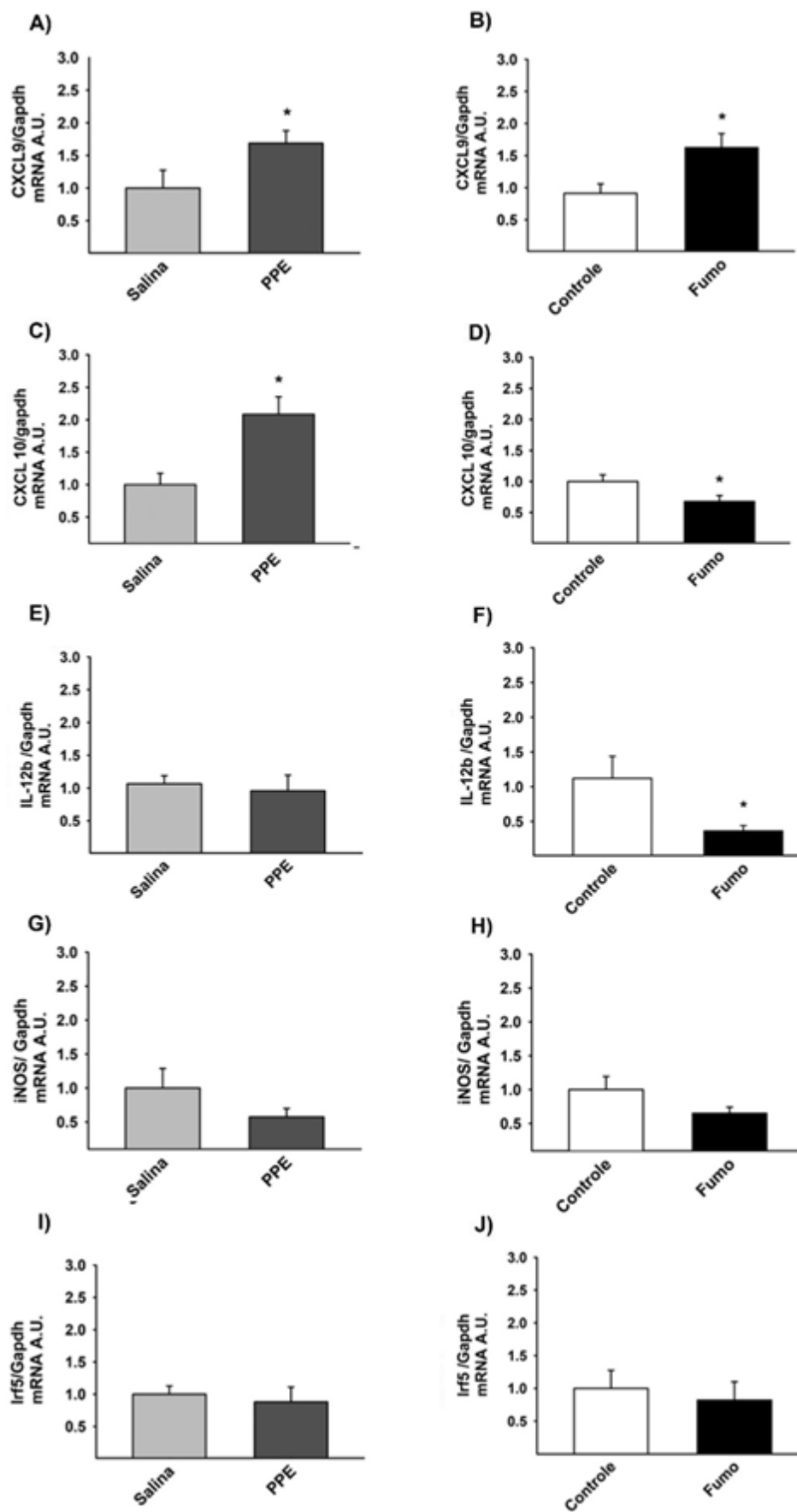


Figura 14: Expressão gênica para marcadores de Fenótipo M1 expresso em unidades arbitrárias. Houve aumento estatisticamente significativo para a expressão de CXCL9 nos

grupos PPE e Fumo comparado aos seus respectivos controles (14A)(*p=0,004); (14B)(*p=0,017) respectivamente. Para CXCL10 observamos aumento de expressão no grupo PPE comparado ao grupo Salina (14C)(*p=0,001) e diminuição da expressão no grupo Fumo comparado ao Controle (14D)(*p=0,036). Houve diminuição estatisticamente significativo para expressão de IL-12b no grupo Fumo comparado ao grupo Controle (14F)(*p= 0,026). Não houve diferenças estatisticamente significativas para as análises de expressão de Irf-5 e iNOS entre os diferentes grupos experimentais. Os valores estão expressos como média \pm EP. (CXCL9 Salina n=14; PPE n=13; Controle n=11; Fumo n=13); (CXCL10 Salina n=14; PPE n=14; Controle n=11; Fumo n=16); (IL-12b Salina n=13; PPE n=13; Controle n=10; Fumo n=11); (iNOS Salina n=7; PPE n=4; Controle n=4; Fumo n=3); (Irf5 Salina n=14 ; PPE n=15; Control n=12; Fumo n=17).

4.8.2. Expressão gênica: fenótipos M2

Expressão gênica para caracterização de fenótipo M2 revelou uma diminuição estatisticamente significativa para a expressão de Arg1 e Fizz1 apenas nos grupos PPE comparado ao grupo Salina (15A) e (15C), respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos para expressão gênica de Ym1 e Irf4 (Figura 15).

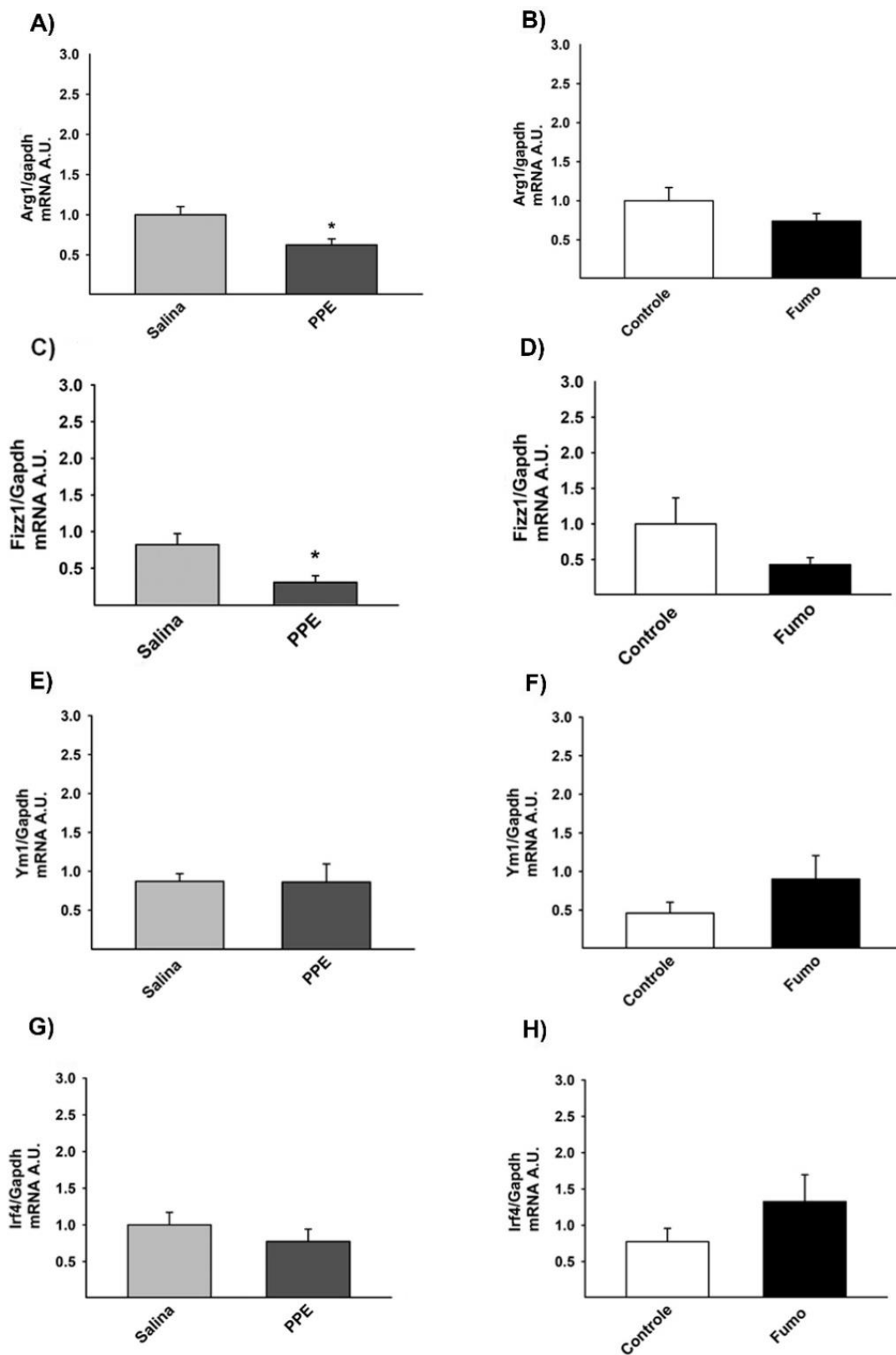


Figura 15: Expressão gênica para marcadores de Fenótipo M2 expresso em unidades arbitrárias. Houve diminuição estatisticamente significativo para a expressão de Arg1 e Fizz1 nos grupos PPE comparado ao grupo Salina (15A)(* $p=0,005$) e (15C)(* $p= 0,002$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para expressão gênica de Ym1 e Irf-4. Os valores estão expressos como média \pm EP. (Arg1 Salina $n=14$; PPE $n=15$; Controle $n=12$; Fumo $n=17$); (Fizz1 Salina $n=13$; PPE $n=14$; Controle $n=12$; Fumo $n=16$); (Ym1 Salina $n=13$;

PPE n=14; Controle n=9; Fumo n=16); (Irf4 Salina n=14 ; PPE n=14; Control n=10; Fumo n=14).

Tabela 6. Resumo dos resultados

	Análises	PPE	Fumo
Morfometria	LM	Alargamento alveolar ↑	Alargamento alveolar ↑
Macrófagos totais	Imunohistoquímica	MAC-2 ↑	MAC-2 ↑
	RT-PCR	CD-68 ↓	—
Marcadores fenótipo M1	Imunohistoquímica	TNF- α ↑	TNF- α ↑
		IFN- γ ↑	IFN- γ ↑
	RT-PCR	CXCL-9 ↑	CXCL-9 ↑
		CXCL-10 ↑	CXCL-10 ↓ IL-12b ↓
Marcadores fenótipo M2	Imunohistoquímica	TGF- β ↑	TGF- β ↑
		IL-10 ↓	IL-10 ↑
		MMP-9 ↑	MMP-9 ↑
		MMP-12 ↑	MMP-12 ↑
	RT-PCR	ARG-1 ↓	—
		FIZZ-1 ↓	—
ELISA	IL-4 ↓ IL-10 ↓ IL-13 ↓	IL-10 ↑	

(-) Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos.

5. DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, o estudo das citocinas envolvidas na polarização M1 e M2 revelou haver diferenças entre os dois modelos avaliados. Enquanto o modelo de exposição à fumaça de cigarro exibe um aumento da polarização M1 e M2, o modelo de instilação de elastase demonstrou um aumento de M1 e supressão de M2.

Embora as diferenças entre estes dois modelos experimentais já estejam descritas extensamente na literatura, considerando os padrões de remodelamento de fibras e dos diferentes mecanismos de desenvolvimento da doença, este é o primeiro estudo que avalia a polarização de macrófagos.

Nos dois modelos estudados observamos o alargamento dos espaços aéreos distais, constatando a presença de enfisema pulmonar. Entretanto no modelo de instilação de elastase demonstramos um maior grau de lesão comparado ao observado nos animais expostos à fumaça de cigarro. Tais achados corroboram com estudos prévios que descrevem que uma das principais vantagens dos modelos que utilizam a instilação de proteases é o fato de se obter lesão tecidual maior em menor espaço de tempo ^(44, 55).

Apesar do modelo de exposição à fumaça de cigarro requerer um tempo maior de exposição para se obter um grau de lesão tecidual compatível com a presença do enfisema, ele é considerado o que melhor mimetiza o desenvolvimento desta doença em humanos, uma vez que seu fator etiológico é o mesmo.

Entretanto, como já descrito por Lourenço e col.⁽⁵⁶⁾, ambos os modelos demonstraram aumento do processo inflamatório com aumento da densidade de células positivas para MAC-2, MMP-12 e MMP-9.

A análise para molécula CD68, um marcador para macrófagos totais, demonstrou uma diminuição no modelo de PPE, e tendência de aumento para o modelo de exposição à fumaça de cigarro. Apesar de amplamente descrito o papel dos macrófagos no processo inflamatório promovido pela instilação de PPE, não detectamos aumento da expressão deste gene em nosso modelo de indução por instilação de PPE⁽⁵⁷⁾. Ploeger e col.⁽⁵⁸⁾ descreveram em cultura de células em humanos que os macrófagos M1 apresentam baixa expressão da molécula CD68 comparados aos macrófagos M2. Possivelmente, em nosso estudo, devido ao aumento da polarização de macrófagos para fenótipo M1 no modelo experimental de instilação de elastase, tivemos uma menor expressão de CD68 nas amostras de tecido obtidas após indução da doença. Desta forma, este resultado não apenas se dá à diminuição da densidade de macrófagos no tecido, mas sim à predominância de macrófagos M1 neste modelo.

Os macrófagos são células inflamatórias, caracterizadas pela sua plasticidade, com capacidade de alterar suas respostas fisiológicas frente aos estímulos do microambiente⁽³¹⁾. Assim, os diferentes fenótipos de macrófagos encontrados, em nosso estudo, comparando os dois modelos experimentais, refletem as diferenças entre as citocinas liberadas e os diferentes mecanismos envolvidos.

No que diz respeito ao grupo PPE, observamos maior densidade de células TNF- α +, IFN- γ + e aumento da expressão gênica de CXCL9 e CXCL10, resultando em estímulos que induzem polarizações de macrófagos M1. Por outro lado encontramos uma diminuição na maioria dos genes relacionados a polarização M2 e quimiocinas como IL-4, IL-10, IL-13, Arg1 e Fizz1.

Como previamente descrito por Hautamaki e col.⁽¹¹⁾ os fragmentos de elastina resultantes da destruição do parênquima pela instilação de elastase são também responsáveis pela perpetuação do processo inflamatório. Weathington e col.⁽⁵⁷⁾ e Jiang e col.⁽⁵⁸⁾ demonstraram que tais fragmentos são responsáveis pela ativação de receptores de quimiocina CXCR-2 e CXCR-3, receptores de CXCL9 e CXCL10, e estão envolvidas na quimiotaxia de células inflamatórias características da resposta Th1⁽³⁴⁾.

Nos animais expostos à fumaça de cigarro observamos uma diminuição da expressão de IL-12b e CXCL10 e aumento densidade de células positivas para TNF- α e IFN- γ , estímulos que induzem polarizações de macrófagos de fenótipo M1. Ainda neste modelo, também encontramos aumento de células positivas para IL-10 e TGF- β , estímulos que induzem polarizações de macrófagos relacionados ao fenótipo M2, o que nos mostra uma polarização mista neste grupo experimental. Foi demonstrado por Shaykayev e col.⁽²¹⁾ em escarro de pacientes com DPOC, a supressão de genes envolvidos com a diferenciação de fenótipos M1 e aumento da expressão de genes envolvidos na diferenciação para fenótipos M2. Em conjunto estes resultados sugerem que o tabagismo crônico reprograma a polarização de macrófagos de fenótipo M1 para fenótipo M2 com potencial remodelamento tecidual e diminuição da expressão de genes relacionadas com inflamação e imunidade o que esteve associado à progressão da doença.

Considerando o fenótipo M2, Mantovani e col.⁽⁴³⁾ descreveram mais recentemente diferentes subtipos: M2a, M2b e M2c, com diferentes funções. Enquanto que o subtipo M2a são descritos como relacionados com processos alérgicos, os subtipos M2b e M2c são ativados em respostas a

imunorregulação, ativação das respostas Th2 e processos remodelamento e deposição de matriz extracelular.

Em relação aos resultados obtidos no modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro, observamos um aumento na IL-10 por imunohistoquímica e ELISA com uma diminuição concomitante na expressão gênica da IL-12b associada ao aumento das células TNF- α + no parênquima, sugerindo a presença de um fenótipo polarizado M2b, que exercem funções imunorreguladoras e conduzem respostas Th2. Além disso, detectamos um aumento na expressão de células positivas para TGF- β e IL-10, características do macrófago tipo M2c e associadas à supressão da resposta imune e remodelamento tecidual.

Considerando a ação importante dos macrófagos de fenótipo M1 na manutenção de processos inflamatórios pela liberação de oxidantes, Frankenberger M. e col.⁽⁶¹⁾ observaram no escarro induzido de pacientes DPOC, o aumento de M1 por meio da expressão de HLA-DR e da capacidade de produzir TNF- α quando comparados ao grupo Controle. Já em outro estudo desenvolvido por Kunz e col.⁽⁶²⁾ foi observada uma alta porcentagem de polarização de macrófagos M2 no LBA de ex-fumantes, pois apesar de cessarem o fumo, ainda apresentavam importante processo inflamatório com presença de neutrófilos e mediadores pró-inflamatórios.

Estudos prévios demonstraram que durante o desenvolvimento da DPOC ocorre uma supressão da polarização M1, juntamente com o aumento de fatores imunossupressores como IL-10 e TGF- β relacionados a polarizações macrofágicas tipo M2⁽²¹⁾. Por outro lado, Hodge e col.⁽⁵³⁾ descreveram um fenótipo misto no lavado broncoalveolar de pacientes com DPOC em

comparação com fumantes saudáveis, eles detectaram uma atividade fagocítica defeituosa para as células apoptóticas.

Nossos resultados mostraram que a polarização de macrófagos induzido pela fumaça de cigarro foram similares àquelas descritas anteriormente em pacientes com DPOC, com aumento de genes e quimiocinas relacionadas à M1 e M2. Esta resposta é provavelmente devido à exposição crônica à fumaça de cigarro em comparação com o modelo induzido por PPE que necessitou de uma única instilação de elastase.

É importante notar que, devido às diferenças anatômicas e fisiológicas entre humanos e outras espécies, não existe um modelo animal ideal que seja capaz de mimetizar todas as características observadas em doenças humanas.^(21, 62) Porém, a partir dos nossos resultados é possível escolher qual o melhor modelo experimental para futuras análises de polarizações M1 (instilação de elastase) e M2 (exposição à fumaça de cigarro).

6. CONCLUSÃO

Concluimos que os modelos induzidos pela exposição à fumaça de cigarro e instilação de elastase resultaram em diferentes fenótipos de macrófagos devido às diferenças do microambiente e o modelo experimental de exposição à fumaça de cigarro foi o que melhor representou as características fisiológicas observadas em pacientes DPOC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017.
2. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 1997;349(9064):1498-504.
3. Notícias e Eventos: Departamento de Informática do SUS (DATASUS). 2014.
4. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*. 2012;379(9823):1341-51.
5. Lopez A, Shibuya K, Rao C, Mathers C, Hansell A, Held L, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *European Respiratory Journal*. 2006;27(2):397-412.
6. Sarir H, Henricks PA, van Houwelingen AH, Nijkamp FP, Folkerts G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *European journal of pharmacology*. 2008;585(2-3):346-53.
7. Pessoa CLC PR. Epidemiologia da DPOC no presente – aspectos nacionais e internacionais 2009.
8. Lomas DA, Mahadeva R. α 1-Antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(11):1585-90.
9. Maitra A KV. The lung and the upper respiratory tract. In: Science E, editor. *Robbins Basic Pathology- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL Robbins 7th ed*. Philadelphia Saunders. 2002; 30-1.
10. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):3942-6.
11. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277(5334):2002-4.
12. Mercer JS, A Bhowmik, GC Donaldson, JA Wedzicha and, Warner J. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory research*. 2005; 6(151).

13. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(4):L867-73.
14. Hiemstra PS. Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society*. 2013;10 Suppl:S180-5.
15. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clinical science*. 2017;131(13):1541-58.
16. Suki B, Lutchen KR, Ingenito EP. On the progressive nature of emphysema: roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(5):516-21.
17. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annual review of medicine*. 2003;54:113-29.
18. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2004;350(26):2645-53.
19. George L, Upadhyay S, Ganguly K, Stoeger T. Macrophage Polarization in Lung Biology and Diseases. 2014.
20. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152(5 Pt 1):1666-72.
21. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology*. 2009;183(4):2867-83.
22. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *The European respiratory journal*. 2008;31(6):1334-56.
23. Shifren A, Mecham RP. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(5):428-33.
24. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;29(1):88-97.

25. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(3 Pt 1):1175-7.
26. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1993;92(4):537-48.
27. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):530-4.
28. Vlahos R, Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Frontiers in immunology*. 2014;5:435.
29. Boorsma CE, Draijer C, Melgert BN. Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:769214.
30. Robertoni FSZ. Estudo das fibras constituintes da matriz extracelular e da expressão de metaloproteases durante o desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2015.
31. Johnston LK, Rims CR, Gill SE, McGuire JK, Manicone AM. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;47(4):417-26.
32. Olsen HH, Grunewald J, Tornling G, Skold CM, Eklund A. Bronchoalveolar lavage results are independent of season, age, gender and collection site. *PloS one*. 2012;7(8):e43644.
33. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3546-56.
34. Mantovani ABS, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176-85.
35. Sato S, Hughes RC. Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. *Eur J Immunol*. 1994 Jan;24(1):216-21.
36. Barros MHM, Franziska H, JH Dreyer, Kempkes B and Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*. 2013; 8(11): e80908.

37. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
38. Akdis M AA, Altunbulakli C, Akdis CA, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;4(138):984-1010.
39. Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in wound care*. 2012;1(1):10-6.
40. Cavalcante AG de M BP. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *J bras pneumol*. 2009;35(12).
41. Chatkin JM, QIAN W, Haight J, Zamel N. Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias. *J Pneumol*. 2000;1(26):36-43.
42. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
43. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004;25(12):677-86.
44. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(1):L1-15.
45. Valença SS dHK, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol*. 2004 3(32):351-6.
46. Lopes FD, Toledo AC, Olivo CR, Prado CM, Leick EA, Medeiros MC, et al. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histology and histopathology*. 2013;28(2):269-76.
47. Wright JL, Sun JP. Effect of smoking cessation on pulmonary and cardiovascular function and structure: analysis of guinea pig model. *Journal of applied physiology*. 1994;76(5):2163-8.
48. Lieberman J. Elastase, Collagenase, Emphysema, and Alpha1-Antitrypsin Deficiency. *Chest*. 1976;70(1):62-7.
49. Takamoto M, Miyazaki N, Ishibashi T, Sugiyama K. Protease-induced experimental emphysema: the relationship between elastolytic activity and emphysema induction. *The Japanese journal of experimental medicine*. 1978;48(5):419-25.

50. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *The American review of respiratory disease*. 1985;132(2):417-33.
51. Janoff A, White R, Carp H, Harel S, Dearing R, Lee D. Lung injury induced by leukocytic proteases. *The American journal of pathology*. 1979;97(1):111-36.
52. Biselli PJ. Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos C57/Bl6 (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina- FMUSP).
53. Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(5 Pt 1):1750-7.
54. Margraf LR, Tomashefski JF, Jr., Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *The American review of respiratory disease*. 1991;143(2):391-400.
55. Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, et al. Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;44(5):673-81.
56. Lourenco JD, Neves LP, Olivo CR, Duran A, Almeida FM, Arantes PM, et al. A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice. *PloS one*. 2014;9(6):e98216.
57. Robertoni FS, Olivo CR, Lourenco JD, Goncalves NG, Velosa AP, Lin CJ, et al. Collagenase mRNA Overexpression and Decreased Extracellular Matrix Components Are Early Events in the Pathogenesis of Emphysema. *PloS one*. 2015;10(6):e0129590.
58. Ploeger DT, Hosper NA, Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell communication and signaling : CCS*. 2013;11(1):29.
59. Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS, et al. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nature medicine*. 2006;12(3):317-23.
60. Jiang T, Olson ES, Nguyen QT, Roy M, Jennings PA, Tsien RY. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(51):17867-72.

61. Frankenberger M, Menzel M, Betz R, Kassner G, Weber N, Kohlhauf M, et al. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138(3):507-16.

62. Kunz LI, Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Budulac SE, Timens W, van Wijngaarden S, et al. Smoking status and anti-inflammatory macrophages in bronchoalveolar lavage and induced sputum in COPD. *Respiratory research*. 2011;12:34.

APÊNDICE



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**O PAPEL DOS MACRÓFAGOS M1 E M2 NA PROGRESSÃO DO ENFISEMA PULMONAR EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO POR INSTILAÇÃO DE ELASTASE E EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO**” protocolo nº 136/15 sob a responsabilidade de **Fernanda Degobbi T.Q.S. Lopes e Júlia Benini Kohler**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 03.09.2015.

Vigência do Projeto	Agosto de 2016
Espécie/linhagem	Camundongos SPF C57 Bl/6
Nº de animais	64
Peso/Idade	6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 03 de Setembro de 2015

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